



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



## **Ensaio clínico duplo-cego e randomizado sobre o uso de antimonial pentavalente associado à pentoxifilina no tratamento da leishmaniose cutânea**

Maria das Graças de Oliveira Brito

Salvador (Bahia), 2016

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

B862

Brito, Maria das Graças de Oliveira

Ensaio clínico duplo-cego e randomizado sobre o uso de antimonial pentavalente associado a pentoxifilina no tratamento da leishmaniose cutânea/ Maria das Graças de Oliveira Brito. – Salvador, 2016.

89f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Lima Machado

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Imunoterapia. 3. TNF- $\alpha$ . 4. Pentoxifilina. 5. Ensaio clínico. 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



## **Ensaio clínico duplo-cego e randomizado sobre o uso de antimonial pentavalente associado à pentoxifilina no tratamento da leishmaniose cutânea**

Maria das Graças de Oliveira Brito

Professor-orientador: Paulo Roberto Lima Machado

Tese 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 Doutor em Ciências da Saúde, da área de concentração em Medicina.

Salvador (Bahia), 2016



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



## TESE DE DOUTORADO

**Ensaio clínico duplo-cego e randomizado sobre o uso de antimonial pentavalente associado à pentoxifilina no tratamento da leishmaniose cutânea.**

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

**Dra. Anette Chrusciak Talhari** - Doutorado em Doenças Tropicais e Infeciosas pela Universidade do Estado do Amazonas.

**Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho** - Doutorado em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia.

**Dra. Jussamara Brito Santos** - Doutorado em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

**Dr. Marcus Lessa** - Doutorado em Otorrinolaringologia pela Universidade de São Paulo.

**Dra. Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira** – Doutorado em Patologia pela Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – FIOCRUZ

## FRONTISPÍCIO

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”. **Albert Einstein**

“A persistência é o caminho do êxito”. **Charles Chaplin**

## **DEDICATÓRIA**

Á minha família, meus amigos e meus pacientes.  
Pelo apoio, carinho e tolerância.

## 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.
- Ao Dr. Luiz Henrique Guimarães, pela colaboração sempre constante.
- 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.
- Ao Deus pai 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)

Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESB)

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

## ÍNDICE

Índice de Quadros e Tabelas .....	11
Índice de Figuras e Gráficos .....	12
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	13
I. RESUMO .....	15
II. OBJETIVOS .....	17
III. INTRODUÇÃO .....	18
IV. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
IV. 1 - Introdução .....	22
IV. 2 - Imunopatogênese .....	24
IV. 3 - Resistências à terapia com Antimonial Pentavalente .....	30
IV. 4 - Imunoterápicos .....	31
IV. 4.1 - GM-CSF .....	31
IV. 4.2 - Imiquimode.....	32
IV. 4.3 - Pentoxifilina.....	33
V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	37
V.1 - Modelo do estudo.....	37
V.2 - Área endêmica.....	37
V.3 - Critérios de inclusão .....	37
V.4 - Critérios de não inclusão.....	38
V.5 – Randomização e inscrição no clinical trials.gov .....	38
V.6 - Teste intradérmico.....	38
V.7 - Administração dos medicamentos .....	39
V.8 - Procedimentos do estudo .....	39
V.9 - Desfechos .....	40
V.10- Critérios de ética .....	40
V.11 - Análise estatística.....	40

VI. RESULTADOS .....	42
VII. DISCUSSÃO .....	48
VIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO .....	52
IX. CONCLUSÕES.....	53
X. SUMMARY .....	54
XI. REFERÊNCIAS .....	56
XII. ARTIGOS PUBLICADOS .....	70
XIII. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO .....	71
XIV. ANEXOS .....	72
1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	72
2. Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa .....	76
3. Escala CTCAE .....	78
4. Normas de publicação da revista para a qual o artigo foi submetido	79

## ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

---

**Tabela I:** Incidência de leishmaniose cutânea no Brasil

**(Página 18).**

**Tabela II:** Ensaio com GM-CSF na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

**(Página 32).**

**Tabela III:** Ensaio com Pentoxifilina na leishmaniose tegumentar americana causada por *L. braziliensis*.

**(Página 36).**

**Tabela 1:** Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com leishmaniose cutânea tratados com a associação de pentoxifilina e antimonial pentavalente ou com placebo e antimonial pentavalente.

**(Página 44).**

**Tabela 2:** Resposta terapêutica dos pacientes com leishmaniose cutânea tratados com a associação de pentoxifilina e antimonial pentavalente ou com placebo e antimonial pentavalente (Análise de intenção-de-tratar).

**(Página 45).**

**Tabela 3:** Efeitos colaterais encontrados em ambos os grupos.

**(Página 47).**

## ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

---

**Figura I:** Parasito e fatores do hospedeiro contribuem na fisiopatologia da infecção por *L. braziliensis*. Carvalho, 2012.  
**(Página 29).**

**Figura 1:** Fluxograma  
**(Página 43).**

**Figura 2:** Curva de Kaplan Meyer mostra a proporção de pacientes tratados e não curados com a associação pentoxifilina-Sb<sup>v</sup> ou placebo-Sb<sup>v</sup> (pelo teste de log-rank:  $p = 0,831$ ).  
**(Página 46).**

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

---

AQP-1	<i>Aquagliceroporina 1</i>
CD	Cluster of differentiation
CCL-2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL-3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CXCL-9	C-X-C motif chemokine 9
CXCL-10	C-X-C motif chemokine 10
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-1 $\beta$	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-17	Interleucina 17
IL-27	Interleucina 27
IL-32	Interleucina 32
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II

MMP	Metaloproteinase
MMP-9	Metaloproteinase 9
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PDE IV	Fosfodiesterase IV
RNA	Ácido Ribonucléico
Sb <sup>v</sup>	Antimonial pentavalente
SBIII	Antimonial trivalente
SC	Sub-clínico
TCD4, TCD8	Antígenos de superfície
Th1, Th2	Célula T <i>helper</i> do tipo 1,2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
RNA	Ácido ribonucléico

## I. RESUMO

---

### **ENSAIO CLÍNICO DUPLO-CEGO E RANDOMIZADO SOBRE O USO DE ANTIMONIAL PENTAVALENTE ASSOCIADO À PENTOXIFILINA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.**

**Introdução:** A leishmaniose cutânea (LC) é uma endemia, que causa danos sócio-econômicos relevantes. Tem-se mostrado que a resposta imune inflamatória na leishmaniose por *L. braziliensis* é fundamental na gênese das ulcerações: (1) intenso infiltrado inflamatório na lesão, com poucos parasitas, (2) produção elevada de IFN- $\gamma$  e TNF *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, citocina pró-inflamatória. **Objetivo:** Avaliar em um ensaio clínico controlado de fase III a eficácia da pentoxifilina associada ao antimonial na resposta terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea. **Metodologia:** Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado de 164 pacientes com LC atendidos no posto de saúde de Corte de Pedra (BA). Foram incluídos pacientes apresentando de 1 a 3 lesões ulceradas com 1 a 3 meses de evolução, entre 18 e 65 anos, com isolamento de *L. braziliensis* por PCR ou cultura. Todos foram tratados com antimonial pentavalente (Sb<sup>v</sup>) (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.

**Resultados:** Não houve diferença entre os grupos com relação ao critério de cura inicial (dois meses após tratamento) ( $p=0,64$ ), tempo de cura



( $p=0,89$ ), e necessidade de segunda série de tratamento ( $p=0,64$ ). A incidência de efeitos adversos foi maior no grupo pentoxifilina (37,8%), enquanto que no grupo placebo foram 23%. Cefaléia (11%), náusea (8,6%) e mialgias (13,5%) foram significativamente mais frequentes no grupo pentoxifilina, enquanto artralrias (12%) foram mais frequentes no grupo placebo. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a associação  $Sb^V$  e pentoxifilina não foi mais efetiva que o tratamento convencional com  $Sb^V$  na LC causada pela *Leishmania braziliensis* na Bahia, Brasil. **Palavras-chave:** 1. Leishmaniose Cutânea; 2. Imunoterapia; 3. TNF; 4. Pentoxifilina.

## II. OBJETIVOS

---

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar através de ensaio clínico controlado de fase III o uso da pentoxifilina associada ao antimonial pentavalente no tratamento da leishmaniose cutânea.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **Avaliação do desfecho primário do ensaio clínico:**

Índice de cura final (seis meses pós-tratamento)

#### **Avaliação dos desfechos secundários:**

Índice de cura inicial (dois meses pós-tratamento)

Tempo de cicatrização

Necessidade de 2ª série de tratamento com antimonial pentavalente isolado

### III. INTRODUÇÃO

---

A Leishmaniose é doença de ampla distribuição, mas como muitas outras doenças tropicais negligenciadas, ocorre de modo focal e em locais remotos, dificultando a exatidão de dados a partir de fontes oficiais (Bern et al., 2008). Além de negligenciada, é ignorada no rol das doenças tropicais (Hotez et al., 2006). No Brasil a incidência de leishmaniose cutânea apresenta uma estabilidade nos últimos anos:

**Tabela I: Incidência de leishmaniose cutânea no Brasil**

Ano	Número de casos/Ano
2008	3233
2009	3453
2010	4835
2011	3838
2012	4430
2103	2769
2104	2100
2105	2275

**Fonte: Datasus**

Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* podem levar às formas tegumentar e visceral. Os principais agentes da leishmaniose cutânea no novo mundo são *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis panamensis*, *Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania mexicana mexicana* (Desjeux et al., 1992; Lainson et al., 1983). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) acomete outras espécies além do homem e a transmissão do parasita entre animais silvestres é bem documentada. A invasão humana nas florestas alterou o ciclo do vetor-hospedeiro, trazendo a leishmaniose para o homem e animais domésticos (SVS/MS, 2007). 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, mediada pelos linfócitos CD4 (Ritter et al., 2002). Essas células produzem IFN- $\gamma$ , ativando os macrófagos. Na ausência desta resposta, ocorre a leishmaniose cutânea difusa (LCD) – onde se observam múltiplas lesões nodulares com macrófagos cheios de parasitas (Sher et al., 1992). Outras formas clássicas de LTA são mais comuns e incluem a cutânea localizada, disseminada e mucosa (Jones et al., 1987). A leishmaniose cutânea localizada (LC) é caracterizada por úlcera única ou múltipla com borda bem delimitada e aspecto granulomatoso. A leishmaniose mucosa (LM) se caracteriza por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores e é secundária à lesão cutânea. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente surge após a cura clínica da LC. Na maioria dos casos, a LM resulta de LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. A forma disseminada (LD) é uma apresentação caracterizada por mais de 10 lesões papulares e/ou acneiformes e/ou ulceradas em pelo menos duas partes do corpo. 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, Machado et al., 2007).

Na leishmaniose causada por *Leishmania braziliensis*, comum na área endêmica estudada, as lesões são caracterizadas por: (1) Infiltrado inflamatório rico e com poucos parasitas (Faria et al., 2005), (2) IFN- $\gamma$  e

TNF em concentrações altas nas células mononucleares do sangue periférico e no tecido (Bacellar et al., 2002), (3) células T CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$  e TNF 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). Desnutrição, deficiência de ferro e sexo masculino tem sido associados às formas mais severas (Machado-Coelho et al., 2005). 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). A droga de escolha é o antimonial pentavalente (Sb<sup>V</sup>). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o cálculo em mg/Sb<sup>V</sup>/kg/dia (Gontijo et al., 2003) como padrão. A estrutura molecular dos antimoniais, o seu metabolismo e mecanismo de ação ainda estão sendo investigados. Sugere-se que antimônio pentavalente (Sb<sup>V</sup>) age como um pró-fármaco que é convertido em ativos e mais antimônio trivalente (Sb<sup>III</sup>). (Goodwin, et al., 1943; Shaked-Mishan et al., 2001). Não é ainda claro se a forma ativa final é de Sb (V) ou Sb (III). O local (se amastigota ou macrófagos) e o mecanismo de redução (enzimática ou não enzimática) permanecem controversos. A capacidade dos parasitos em reduzir Sb (V) para Sb (III) é específico do estágio. Exemplo, amastigotas, mas não promastogotas, podem reduzir Sb (V) para Sb (III). Isto explica porque os amastigotas são mais susceptíveis ao Sb (V) (Goyard et al., 2003). A conversão de Sb (V) para Sb (III) pode ocorrer em macrófagos e parasitas, e o parasita desempenha um papel importante na geração de concentrações letais de Sb (III) (Sereno et al.,

1998). Evidências obtidas de que Sb (III) entra na célula da *Leishmania* através da aquagliceroporina (AQP1) e que o nível de expressão dessa porta de entrada modularia a resistência do parasito ao Sb (III). Descreveu-se também que o modo de ação do Sb<sup>v</sup> é dependente de vários fatores, incluindo subconjuntos de células T e citocinas (Murray, et al., 2001). O Sb<sup>v</sup> aumenta diretamente a fagocitose, ânions superóxidos e a produção de TNF, mas somente via TNF há aumento indireto na produção de óxido nítrico por fagócitos de indivíduos saudáveis, *in vitro* (Muniz-Junqueira et al., 2008).

Cardiotoxicidade (Convit et al., 1987), hepatotoxicidade (Martinez et al., 1997), nefrotoxicidade (Scope et al., 2003) e pancreatite (Saldanha et al., 2000) limitam sua segurança. Adicionalmente, o SB<sup>v</sup> é abortivo, devendo ser evitado durante a gravidez. O seu uso tem sido limitado pela ausência de eficácia, pelo tempo prolongado do tratamento e pelo aumento crescente de resistência terapêutica: 10 a 40% de falha em formas cutâneas clássicas de leishmaniose (Machado et al., 2010).

Dessa forma, diversas opções terapêuticas ao tratamento padrão têm sido investigadas. (Santos et al., 2014; Almeida et al., 2005). A convicção de que a leishmaniose é associada à intensa resposta imune e a um desequilíbrio dos componentes pró-inflamatórios, fortalece o uso de imunomoduladores, como a pentoxifilina, reconhecido inibidor de TNF.

A pentoxifilina associada ao antimonial acelera o tempo de cura na leishmaniose mucosa (LM) (Machado et al., 2007) e também nas formas cutâneas (Sadeghian et al., 2006 ). Esta droga bloqueia a transcrição de TNF 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 resposta terapêutica em pacientes tratados com antimonial isoladamente ou associado à pentoxifilina nos caso de leishmaniose por *L. braziliensis*.

## IV. REVISÃO DE LITERATURA

---

### IV. 1 - Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um sério problema de saúde pública e social, sobretudo nos países em desenvolvimento. É uma doença endêmica com uma incidência anual de 0,7 a 1,2 milhões de casos/ano (Alvar et al., 2012). É desfigurante e estigmatizante, afeta a pele e membranas mucosas e é causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Os principais agentes da LTA são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis panamensis*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana mexicana* (Lainson et al., 1983). No Brasil a infecção é causada predominantemente pela espécie *L. braziliensis*. O período de incubação da doença no homem tem uma média de 60 dias, variando de duas semanas a 24 meses (MS/SVS). A leishmaniose cutânea localizada forma mais comum de LTA e objeto de nosso estudo, pode evoluir para cura espontânea ou progredir para a formação de pápulas, nódulos, placas e, principalmente, úlceras. Pode ocorrer invasão de linfonodos regionais, progressão para lesões mucosas (LM) (Gontijo et al., 2003) e 05% dos curados têm novo episódio de doença (Jirmanus et al., 2012). Em áreas endêmicas, 10% dos indivíduos são assintomáticos ou subclínicos. (Follador et al., 2002).

O diagnóstico parasitológico é realizado através de métodos diretos utilizando-se material coletado para biópsia ou aspirado das úlceras. Dentre os métodos diretos estão: cultura – onde o material da base da úlcera é rico e a combinação de microscopia mais cultura aumenta a sensibilidade diagnóstica em até 85% (Murray et al., 2005; Wilson et al., 2011) e PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction), que 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; Wilson et al., 2011). Dentre os métodos indiretos a sorologia e a intradermoreação de Montenegro (IDRM) têm sido utilizados. Os testes sorológicos apresentam baixa sensibilidade (Murray et al., 2005), mas o valor preditivo da IDRM é alta e é diagnóstico em áreas endêmicas, mesmo se o parasito não for identificado na úlcera (Weigle et al., 1991). A 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).

As terapias atuais são limitadas pela falta de eficácia e o tempo prolongado, além do crescente desenvolvimento de resistência. A droga de escolha é o antimonial pentavalente ( $Sb^V$ ) 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). Os efeitos colaterais mais frequentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatotoxicidade e hepatotoxicidade limitam sua segurança. Não deve ser administrado em gestantes. O  $Sb^V$  usado isoladamente está associado a 10 a 40% de falha terapêutica na forma cutânea clássica (Machado et al., 2010).

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico, que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que



alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando a morte da célula (Croft et al., 2003). É considerada a droga de segunda escolha quando não há resposta ao tratamento com o antimonial ou na impossibilidade de seu uso. É contraindicada em cardiopatas, hepatopatas e nefropatas. Os efeitos são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão. 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 SbV, conforme revisão sistemática (González et al., 2009). Poucos estudos foram realizados nas Américas utilizando as pentamidinas na terapêutica da LTA. A dose preconizada é de 4mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de 2 em 2 dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2g.

#### **IV. 2 - Imunopatogênese**

A percepção de que grande número de indivíduos não desenvolve a doença favorece o papel do hospedeiro nesta infecção. Nesses indivíduos a resposta Th1 é fraca, sugerindo depender de uma resposta imune inata – com envolvimento de neutrófilos, macrófagos e células NK (Carvalho et al., 2012).

A leishmaniose cutânea clássica (LC) é caracterizada por úlcera única ou múltipla com borda bem delimitada e aspecto granuloso. Estudos sugerem um desequilíbrio da resposta imune nas formas cutânea e mucosa, conduzindo a uma exacerbação da resposta inflamatória e conseqüentemente, o dano tecidual. As lesões são caracterizadas por: (1) infiltrado inflamatório rico e com poucos parasitas (Faria et al., 2005), (2) IFN- $\gamma$  e TNF 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 o tamanho da úlcera (Antonelli et al., 2005), (5) IFN- $\gamma$  e TNF decrescem após terapia e cura da doença (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998), (6) tratamento precoce com antimônio antes da formação da úlcera é associado a alto índice de falha (Machado et al., 2002), sugerindo-se a estreita relação entre resposta inflamatória ao aparecimento da úlcera.

As lesões papulares apresentam menor quantidade de células CD4+ que as lesões ulceradas (Esterra et al., 1992). Nas úlceras, os macrófagos estão relacionados à intensidade da inflamação, assim como plasmócitos e linfócitos. Estudos sugerem que a resposta humoral diminuída leva à exarcebação da doença, sugerindo-se o papel mediador das células B na atividade das células T (Scott et al., 1986). A resposta imune na LC localizada é mais eficiente, com alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF, do que na LD. (Turetz et al., 2002).

Na condução das fases iniciais da resposta imune o papel das quimiocinas e seus receptores são cruciais, colaborando com a evolução para as diferentes formas clínicas descritas (Oghumu et al., 2010). Os neutrófilos exercem um papel fundamental na correlação das respostas inata e adaptativa: interagem com monócitos, células dendríticas, linfócitos B e T – através de contato célula a célula ou pelas citocinas produzidas (Charmoy et al., 2010). A IL-12 e o IFN- $\gamma$  coordenam a resposta Th1 com o recrutamento de células efetoras: TCD4+, TCD8+, macrófagos e células NK. As células T produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 são denominadas Th1, ativando macrófagos com atividade citotóxica (Heinzel et al., 1991). Macrófagos são leishmanicidas, mas algumas espécies de *leishmania* desenvolvem resistência (Mosser et al., 2008) e diferenças na resposta macrofágica da leishmaniose têm sido documentadas. Nos casos sub-clínicos (SC), os macrófagos controlam mais adequadamente o crescimento do parasito que na (LC) (Giudice et al., 2012). As interleucinas têm ação fundamental na eliminação dos parasitos: o IFN- $\gamma$  é relacionado à produção

de óxido nítrico (NO) e intermediários do nitrogênio. No entanto, algumas espécies têm desenvolvido polimorfismo genético e fenotípico, gerando resistência (Schriefer et al., 2004). O metabolismo da arginina é determinante nesse processo: a arginase, expressada na célula do hospedeiro, pode resultar na produção de NO ou L-Ornitina, sendo o primeiro tóxico e o segundo, essencial ao crescimento do parasito (Iniesta et al., 2001). Existe uma forte associação entre o genótipo do parasito e as diferentes formas clínicas: LC, LM e LD (Schriefer et al., 2004). Não houve diferenças histológicas entre as diferentes formas clínicas da LC. Estudos com biopsias antes e após o tratamento também não evidenciaram diferenças (Esterra et al., 1992). A patologia não prediz a evolução, nem seu tempo exato. No entanto, as úlceras antigas apresentam maior concentração de célula CD4+ que as novas, assim como maior concentração de células CD8+ (Dantas et al., 2013).

IL-1 beta ( $\beta$ ) e TNF estão presentes em todas as manifestações tegumentares da leishmaniose. O TNF é produzido por monócitos/macrófagos ativados em resposta a produtos de membrana que se liga a receptores toll-like, sendo também produzido por células NK (Pirmez et al., 1993). Esta citocina é determinante na inflamação e seus instrumentos na injúria imunológica são os eicosanóides, prostaglandinas, proteases e leucotrienos (Blam et al., 2001). Induz também a produção de NO, necrose, citotoxicidade e expressão de metaloproteinases. (Baugh et al., 2001; Gupta et al., 2002; Lehmann et al., 2005). As metaloproteinases são enzimas zinco-dependentes, que degradam a proteína da matriz extracelular e são funcionalmente classificadas de acordo com o substrato que degrada. (Nagase et al., 1991). MMP-9 é envolvida na degradação do colágeno tipo IV, o maior componente da membrana basal da pele. (Murphy et al., 1994). O aumento dos níveis de TNF produzidos em virtude da leishmaniose contribui para o aumento da produção de MMP-9. Os

TIMPs, inibidores naturais das metaloproteinases, são importantes nessa modulação; e em LC há um desequilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 (Carvalho, 2014). Os monócitos, em especial os CD16+, são também fonte e principais produtores de MMP-9 (Marzano et al., 2010).

IL-6 e GM-CSF, produzido pelos macrófagos, estão presentes em metade dos pacientes com leishmaniose tegumentar (Almeida et al., 1999). Assim como o TNF e a IL-1 beta ( $\beta$ ), todas essas citocinas se apresentam em níveis elevados na LC, LM e na IDR (Almeida et al., 1999). 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 TCD4+ (Ritter et al., 2002). Os níveis séricos dessas quimiocinas são mais altos na LM e LC do que nos casos SC (sub-clínicos) causados por *L. braziliensis*, também agem na modulação para baixo da resposta Th1 nos casos de leishmaniose visceral (Carvalho et al., 1994; Nylén e Sacks, 2007). CXCL-9 e CXCL-10 são fundamentais na resposta imune inata (Ritter e Körner, 1992), crítica na indução de TCD8+ (Barbi et al., 2007). Essas quimiocinas têm afinidade por células que expressam receptores CCR-3, como as TCD4+, TCD8+, células NK, macrófagos e células dendríticas (Oghumu et al., 2010). CXCL-10 aumenta a citotoxicidade das células NK, representando ação protetora na LC e sua produção é sustentada pelo IFN- $\gamma$  (Svenson et al., 2005). CCL-2 e CCL-3 tem atividade anti-leishmaniótica. Na 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).

A IL-10 modula a resposta Th1, diminuindo a pouca produção de citocinas pró-inflamatórias, e também neutralizando a produção de IFN- $\gamma$  nos estágios iniciais da LC (Rocha et al., 1999). O desenvolvimento da úlcera clássica coincide com aumento dos níveis de TNF e IFN- $\gamma$ , em

paralelo com a diminuição dos níveis da IL-10 (Bacellar et al., 2002). Na LM foi evidenciada diminuição tecidual de receptores para IL-10, quando comparado à LC, o que justificaria o déficit de regulação da resposta inflamatória nos casos de lesão mucosa (Faria et al., 2005). Essa interleucina favorece a manutenção do parasito no tecido e foi observada sua concentração diminuída nos curados em relação aos com atividade de doença (Castellano et al., 2009). A IL-27 tem o papel de diminuir a ação das células T, e independe da IL-10 (Hunter et al., 1994). Não foi relacionada à baixa produção de citocina nos casos SC com a ação de IL-10 e/ou IL-27 (Novoa et al., 2011).

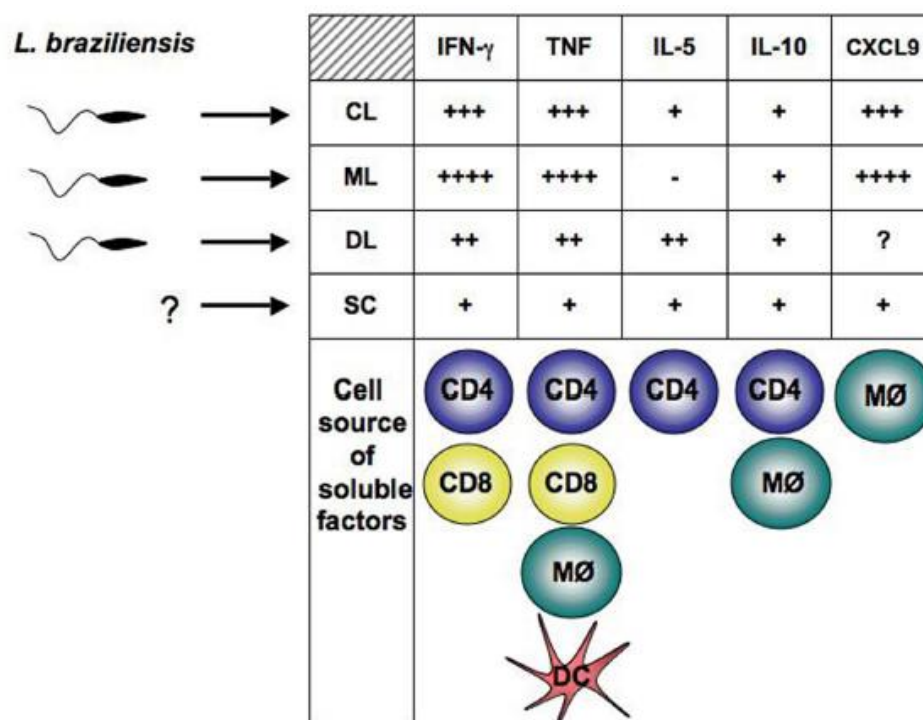
A IL-32 é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células imunes e não imunes frente a infecções bacterianas e virais. Foi evidenciado que a expressão do RNA-m da IL-32 (isoforma  $\gamma$ ) foi mais alta em lesões de LM e/ou LC (Galdino Jr. et al., 2014). A IL-32 induz a produção de TNF, IL-6, prostaglandina E2 e IL-10 em monócitos humanos (Kang et al., 2009; Joosten et al., 2006). Há uma correlação positiva entre IL-32 e TNF na LM e não na LC, sugerindo melhor controle de mediadores inflamatórios na LC (Galdino Jr. et al., 2014). Não houve correlação entre a IL-32 e IL-10 em nenhuma forma clínica. Essa citocina também exerce papel em doenças inflamatórias com dermatite atópica, Chron e artrite reumatoide (Meyer et al., 2010; Shioya et al., 2007; Joosten et al., 2006) e infecciosas como *M. avium*, HIV e influenza A (Bai et al., 2001; Bae et al., 2012).

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). A maioria dos indivíduos não produz IFN- $\gamma$  em resposta ao antígeno solúvel de leishmania após cura. Nos indivíduos que respondem após o estímulo do

antígeno, as células TCD4 ( $CD45RA^-CCR7^-$ ) são as responsáveis por essa produção. Os linfócitos  $CD45RA^-CCR7^+$  são responsáveis pela memória central e os  $CD45RA^-CCR7^-$  pela memória efetora. (Carvalho et al., 2013). Grande número de plasmócitos indica resposta humoral prevalente, que suprime a imunidade celular e é inefetiva para parasitos intracelulares (Abbas et al., 2008).

Após a resolução das lesões o indivíduo permanece com imunidade durante um longo período de tempo, porém reinfecção com *L. braziliensis* tem sido documentada na área endêmica em até 5% dos casos (Jirmanus et al., 2012). Desde que parasitos podem permanecer meses ou anos no tecido, supõe-se que as concentrações de IFN- $\gamma$  não sejam suficientemente altas ou a sua produção não dure tanto tempo (Vargas-Inchaustegui et al., 2008). Para o controle eficiente do parasito, o hospedeiro necessita produzir principalmente IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF (de Souza et al., 2010).

**Figura I: Parasito e fatores do hospedeiro contribuem na fisiopatologia da infecção por *L. braziliensis*.**



Fonte: Carvalho et al, 2012

#### **IV. 3- Falha terapêutica à terapia com Antimonial Pentavalente**

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).

É bem documentado que a resposta ao antimonial varia de acordo com a espécie, e que espécies do mesmo complexo podem ter diferentes evoluções (Arevalo et al., 2007). Os mecanismos de resistência são diversos e os detalhes, escassos. Um grupo de glicoproteínas – proteoglicanos – é super expressada na superfície de promastigotas e amastigotas de *L. donovani* resistente a  $Sb^V$  na Índia (Samant et al., 2007). Os fatores do hospedeiro também influenciam na resistência: há falha a qualquer tipo de terapia nos casos de LCD e a associação de  $IFN-\gamma$  ao  $Sb^V$  aumenta o índice de cura nos casos de leishmaniose visceral (LV) (Badaró et al., 1990).

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  $Sb^V$ . A convicção de que a leishmaniose é associada à resposta imune intensa e com componentes pró-inflamatórios desbalanceados fortalece a necessidade de utilizar imunomoduladores. Consequentemente, são encontrados na literatura numerosos ensaios clínicos utilizando drogas com atividades imunoterápicas.

#### **IV. 4 - Imunoterápicos**

**IV. 4.1 - GM-CSF** (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) também conhecido como fator de crescimento hematopoiético, é comumente utilizado para correção de neutropenia após sessões de quimioterapia. Age também como chave na resposta Th17, que é responsável por condições inflamatórias autoimunes através da produção de IL-6 e IL-23. Ele estimula a apresentação de antígenos, induz fagocitose e polariza macrófagos (M1-like); induzindo-os à produção de TNF, IL-6, IL-12 e IL-23 (Nieuwenhuijze et al., 2013). Níveis elevados de GM-CSF são vistos em condições inflamatórias como: esclerose múltipla, artrite reumatoide, obesidade, doenças pulmonares e câncer. Alta densidade de receptores de GM-CSF em nervos sensoriais levanta a hipótese de que o mesmo seria responsável pelos episódios álgicos nessas condições inflamatórias – sobretudo em sinovite de joelho. A diminuição nos níveis de GM-CSF é fator de proteção à dor (Hamilton, et al., 2008).

A cicatrização de feridas engloba várias etapas com participação de células inflamatórias, fatores de crescimento e citocinas. O GM-CSF participa de várias etapas deste processo. O papel deste ativo já foi bem descrito em queimaduras, úlceras varicosas, úlceras de pressão e úlceras hansênicas. Ele induz diferenciação de miofibroblastos, facilitando a contração da ferida, recruta as células inflamatórias para o local da ferida, induz proliferação epidérmica e de queratinócitos (Xinlei et al., 2011).

Pela sua ação nas respostas Th1 e Th2 (Parronchi et al., 1991), foram realizados ensaios clínicos utilizando-o na leishmaniose cutânea, associado ao Sb<sup>v</sup>. Em ensaio realizado por Almeida e colaboradores (Almeida et al., 1999), 70% dos pacientes que receberam o Sb<sup>v</sup> associado ao GM-CSF perilesional foram curados, em comparação com 10% dos que não receberam a associação. O tempo de cura foi menor, apesar de não ter



significância estatística, no grupo do GM-CSF. O mecanismo de redução do tempo e cura pode ser atribuído a: ativação macrofágica levando à morte do parasita (Ho et al., 1990), aceleração da cicatrização (Boente et al., 1993) e modulação imune (Jones et al., 1996). A tabela I ilustra o uso de GM-CSF na LC, trazendo três ensaios clínicos com exemplo.

**Tabela II: Ensaios com GM-CSF na leishmaniose cutânea causada por *L.braziliensis***

<b>Autor/a no</b>	<b>Desenho do estudo</b>	<b>Grupo controle (n de pacientes)</b>	<b>Grupo GM-CSF (n de pacientes)</b>	<b>Taxa de cura grupo controle</b>	<b>Taxa de cura grupo GM-CSF</b>
<b>Almeida, 1999</b>	EC*randomizado, duplo cego, placebo controlado	Sb <sup>v</sup> :20mg/Kg/dia (20 dias) Placebo: 02 injeções de solução salina intralesional (10)	Sb <sup>v</sup> :20mg/Kg/dia (20 dias) GM-CSF: 02 injeções intralesionais de 200µg (10)	10%	70%
<b>Santos, 2004</b>	EC*randomizado, duplo cego, placebo controlado	Sb <sup>v</sup> : 20mg/Kg/dia (20 dias) Placebo: curativo, 3x/sem -3 semanas (10)	Sb <sup>v</sup> : 20mg/Kg/dia (20 dias) GM-CSF: curativo, 3x/sem - 3 semanas (10)	20%	60%
<b>Almeida, 2005</b>	EC*aberto, em pacientes com LC refratária ao tratamento com Sb <sup>v</sup>	Não se aplica	Sb <sup>v</sup> : 20mg/Kg/dia (20 dias) GM-CSF: curativo, 3x/sem - 3 semanas (05)	-	100%

**\*EC (Ensaio clínico)**

**IV. 4.2 - Imiquimode:** Imiquimode é uma amina, imidazoquinolina, útil na cicatrização de lesões de LC. É usada no tratamento de dermatoses induzidas por HPV e condições premalignas. Potencial de cura também em

neoplasias cutâneas. Estudos com Imiquimode têm sido realizados há mais de uma década. (Seeberger et al., 2003; Arevalo et al., 2001).

Esta droga ativa os receptores toll like (7 e 8) presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno, aumentando a produção de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1e IL-12: estimulando macrófagos a produzirem (NO), favorecendo a morte do parasito pela indução da resposta Th1 (Miranda-Verastegui et al., 2009). 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% (Arevalo et al., 2001). É indicado associá-lo ao Sb<sup>v</sup> nos casos de falha terapêutica do antimonial. Estudos são necessários para esclarecer o mecanismo ou mecanismos de sinergismo entre essas duas drogas. Os efeitos colaterais atribuídos ao uso do Imiquimod são discretos a moderados eritema (40%), edema (30%) e sensação de queimor (10%). Quando utilizado isoladamente em casos de LC do velho mundo – se mostrou ineficaz (Seeberger et al., 2003).

Em outro ensaio no Peru, duplo-cego, randomizado, que mostrou superioridade da associação, apesar de não significativa estatisticamente: casos de *L. peruviana* e *L. braziliensis* (Miranda-Verastegui et al., 2009).

**IV. 4.3 - 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, por inibir a mensagem de transcrição RNA-m de macrófagos; diminuindo também in vivo e in vitro a expressão de

moléculas de adesão intracelular 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., 2001). Esta droga tem sido usada em doenças inflamatórias e infecciosas como: SARA (Síndrome de Angústia Respiratória Aguda) (Martim et al., 2003); osteomielite (Blam et al., 2001); mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (Shirabe et al., 1997), LM e LC (Machado et al., 2007).

A associação da pentoxifilina ao antimonial tem sido avaliada em vários estudos. Ensaio clínico aberto em portadores de leishmaniose mucosa refratária mostrou cura clínica e redução significativa nos níveis de TNF de 9 em 10 pacientes que utilizaram a pentoxifilina associada ao antimonial pentavalente (Lessa et al., 2001). Ensaio randomizado, duplo cego, também em pacientes com LM, evidenciou que a associação antimonial pentavalente-pentoxifilina aumentou a taxa de cura e aboliu a necessidade de outra série de tratamento (Machado et al., 2007). Em relato de 02 pacientes com LC refratária ao tratamento convencional, houve sucesso com a associação antimonial pentavalente-pentoxifilina (Bafica et al., 2003). No Irã, ensaio randomizado, duplo cego, com 64 pacientes de LC (*L. major*), mostrou que a associação antimonial pentavalente-pentoxifilina apresentou maior taxa de cura que o antimonial isolado (Sadeghian et al., 2006). Vinte pacientes com LC foram randomizados em 02 grupos: antimonial associado a pentoxifilina e antimonial associado ao placebo. Nesse ensaio foram realizadas avaliações clínicas e imunológicas. Dosou-se CXCL-9, CXCL-10, CCL-3, IFN-gama e TNF em ambos os grupos nos dias zero e 15 de tratamento. O tratamento com a associação antimonial pentavalente-pentoxifilina diminuiu significativamente os níveis de TNF e de IFN- $\gamma$  comparado ao grupo tratado com antimonial-placebo.

Afirmou-se mais uma vez a convicção de que a leishmaniose é uma patologia imuno-mediada. Documentado também um aumento dos níveis de CXCL-9 após tratamento, principalmente no grupo que não utilizou a associação pentoxifilina-Sb<sup>v</sup>. O aumento desta quimiocina pode ser interpretado como um fator de mal prognóstico; em contrapartida os níveis de TNF, CCL-3 e IFN-gama diminuíram no 15º dia de uso da associação de forma mais pronunciado que nos pacientes que utilizaram o Sb<sup>v</sup> isolado. A queda de IFN-gama durante a terapia pode estar associado não apenas à inibição da pentoxifilina, mas também com a morte do parasito e com a imunomodulação autócrina (Brito et al., 2014). Em todos os estudos acima referidos, a dose de pentoxifilina foi de 1200mg/dia e não houve efeitos tóxicos relevantes. A tabela II traz de forma resumida, o perfil dos ensaios/relatos acima descritos

**Tabela III: Ensaios com Pentoxifilina na leishmaniose tegumentar americana causada por *L. braziliensis***

<b>Autor / ano</b>	<b>Desenho do estudo</b>	<b>Grupo controle (n de pacientes)</b>	<b>Grupo pentoxifilina (n de pacientes)</b>	<b>Taxa de cura grupo controle</b>	<b>Taxa de cura grupo pentoxifilina</b>
<b>Lessa, 2001</b>	EC*aberto, em pacientes com LM refratária ao tratamento com Sb <sup>v</sup>	(0)	Sb <sup>v</sup> : 20mg/Kg/dia + Pentoxifilina: 400mg, 3x ao dia por 30 dias (10)	(0)	90%
<b>Bafica, 2003</b>	Relato de caso em pacientes com LC	(0)	Sb <sup>v</sup> : 15mg/Kg/dia + Pentoxifilina: 400mg, 3x ao dia por 20 dias (02)	(0)	100%
<b>Sadeghian 2006</b>	EC*randomizado, duplo cego, placebo controlado em pacientes com LC	Sb <sup>v</sup> :20mg/Kg/dia + placebo: 01 comp., 3x ao dia por 20 dias (31)	Sb <sup>v</sup> : 20mg/Kg/dia + Pentoxifilina: 01 comp. (400mg), 3x ao dia por 20 dias (32)	51,6%	81,3%
<b>Machado, 2007</b>	EC*randomizado, duplo cego, placebo controlado em pacientes com LM	Sb <sup>v</sup> :20mg/Kg/dia + placebo 01 comp., 3x ao dia por 30 dias (12)	Sb <sup>v</sup> : 20mg/Kg/dia + Pentoxifilina: 01 comp. (400mg), 3x ao dia por 30 dias (11)	41,6%	100%
<b>Brito, 2014</b>	EC*randomizado, duplo cego, placebo controlado em pacientes com LC	Sbv: 20mg/Kg/dia + placebo 01 comp., 3x ao dia por 20 dias (15)	Sbv: 20mg/Kg/dia + Pentoxifilina: 01 comp. (400mg), 3x ao dia por 20 dias (18)	47%	56%

**\*EC (Ensaio clínico)**

## V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.

---

### V.1 - Modelo do estudo

Trata-se de um ensaio clínico de fase III, randomizado, duplo-cego, placebo controlado com 164 pacientes. Comparando o tratamento convencional da leishmaniose – o antimonial pentavalente – associado à pentoxifilina ou ao placebo no tratamento da leishmaniose cutânea.

### V.2 - Área endêmica

Esse estudo foi realizado em uma área endêmica de *L. braziliensis*, situada a 280 km de Salvador, capital da Bahia, Brasil. O centro de saúde onde foi realizado é referência no diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

### V.3 - Critérios de Inclusão

**V.3.1** - 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;

**V.3.2** - Idade: 18 a 65 anos;

**V.3.3** - Sexo: masculino e feminino elegíveis;

**V.3.4** - Presença de no mínimo 1 lesão ulcerada, em qualquer localização;

**V.3.5** - Presença de no máximo 3 lesões ulceradas;

**V.3.6** - Diâmetro das lesões variando entre 1 e 5 cm;

**V.3.7** - Evolução clínica da doença não inferior a 1 mês e não superior a 3 meses.

#### **V.4 - Critérios de não inclusão**

Preocupações de segurança:

**V.4.1-**Evidência clínica de doença subjacente grave (cardíaca, renal, hepática, pulmonar) ou maligna;

**V.4.2-**Pacientes com imunodeficiência ou anticorpo para HIV;

**V.4.3-**Desnutrição protéica e/ou calórica grave;

**V.4.4-**Qualquer doença infecto-contagiosa, não controlada;

**V.4.5-**Mulheres grávidas ou lactentes;

**V.4.6-**Alergia ao antimoniato ou à pentoxifilina;

**V.4.7-**Tratamento anterior para leishmaniose;

**V.4.8-**Pacientes LC sem lesão (ões) ulcerada(s);

**V.4.9-**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.4.10-**Presença de lesão mucosa

#### **V.5 - Randomização e inscrição no clinical trials.gov**

Os pacientes foram randomizados, alocados em 02 grupos, duplo-cegos, cada grupo com 82 pacientes. A alocação randômica foi obtida no site [www.randomization.com](http://www.randomization.com). Pacientes foram incluídos após avaliação quanto aos critérios de elegibilidade e nenhum foi retirado do estudo após randomização por inelegibilidade. Os 164 pacientes foram randomizados aleatoriamente a uma taxa de 1:1 para receberem Sb<sup>v</sup> associado a pentoxifilina oral ou Sb<sup>v</sup> mais placebo oral por 20 dias. Esse estudo foi inscrito no site [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) sob o número NCT01381055.

#### **V.6 - Teste intradérmico**

O antígeno de *Leishmania* utilizado para o teste intradérmico foi obtido de cepa da *Leishmania amazonenses* (MHOM-BR-86BA-125). Na

superfície volar do braço esquerdo foi injetado 25 $\mu$ g do antígeno em 0,1ml de água destilada, e o maior diâmetro da induração foi medido de 24 a 72h. O teste foi considerado positivo se a induração fosse maior que 5 mm.

### **V.7 - Administração dos medicamentos**

Todos receberam o tratamento convencional com Antimoniato de meglumina (Glucantime, Aventis) e foi administrado por via endovenosa na dose de 20 mg Sb<sup>v</sup>/kg/dia por 20 dias consecutivos (dose máxima diário não ultrapassou 3 ampolas ou 1215mg/Sb<sup>v</sup>). O grupo estudo fez uso associado de pentoxifilina (400mg, 3 vezes ao dia por 20 dias); enquanto que o grupo placebo repetiu a posologia com pílulas inertes de apresentação idêntica. Pacientes devolveram os blisteres para verificação do uso e a aderência ao tratamento no 15º dia durante o tratamento. Sb<sup>v</sup> foi administrado diariamente em postos de saúde. A data da administração e a dosagem foram registradas e assinadas pelo aplicador da referida área. Todas as mulheres em idade fértil foram submetidas à realização do teste de beta-HCG para exclusão de gravidez. O uso de contraceptivos antes e 2 meses após tratamento foi realizado em todas as mulheres de idade fértil participantes do estudo.

### **V.8 - Procedimentos do estudo**

Foi coletada uma amostra de 20 ml de sangue venoso periférico de cada paciente para a realização de testes laboratoriais, antes e 15 dias após o início do tratamento. Os testes incluíam: hemograma completo, aminotransferases (AST, ALT), creatinina, uréia e dosagem de beta-HCG, quando cabível. Todos foram submetidos à biopsia incisional no dia da admissão. Pacientes foram vistos para acompanhamento em 2 semanas, 1, 2, 3 e 6 meses após terapia. Caso o paciente não retornasse no tempo



determinado, as visitas eram realizadas em sua residência no mesmo dia ou em até 7 dias da data prevista.

### **V.9 - Desfechos**

Todos os pacientes foram avaliados a cada 30 dias após término do tratamento por um médico clínico que desconhecia o grupo ao qual o paciente pertencia, e com experiência em leishmaniose. O desfecho primário foi considerado como completa reepitelização da lesão, sem qualquer indício de atividade inflamatória 6 meses após término do tratamento.

O Índice de cura inicial, 2 meses após término do tratamento, foi considerado como desfecho secundário deste ensaio e determinante na avaliação dos pacientes: os que não apresentaram cicatrização foram submetidos a 2ª série de tratamento. Eventos adversos clínicos e laboratoriais foram graduados de acordo com a escala CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Event) do Instituto Nacional de Cancer. ([ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae3.pdf](http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf)).

### **V.10 - Critérios de ética**

Este ensaio foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal da Bahia e foi conduzido com base nos princípios determinados pela declaração de Helsinki. Todos os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram e receberam uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido. Estudo aprovado pelo comitê de ética e pesquisa - CEP/COM/UFBA – no. 078/2009.

**V.11 - Análise estatística:** As variáveis de distribuição normal foram comparadas utilizando o teste t de Student. As proporções foram

comparadas com o teste exato de Fisher ou o teste do Chi-quadrado, quando aplicáveis. O tamanho da amostra de 164 pacientes foi obtido calculando-se o número de participantes necessários, considerando-se que o evento de interesse (taxa de cura) tem variação absoluta de 20% com alfa de 0,05 (IC de 95%) e beta de 0,2 ( $\beta = 0.2$ ) com poder de 80%. A análise de intenção de tratar foi usada para calcular o índice de cura. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.00.

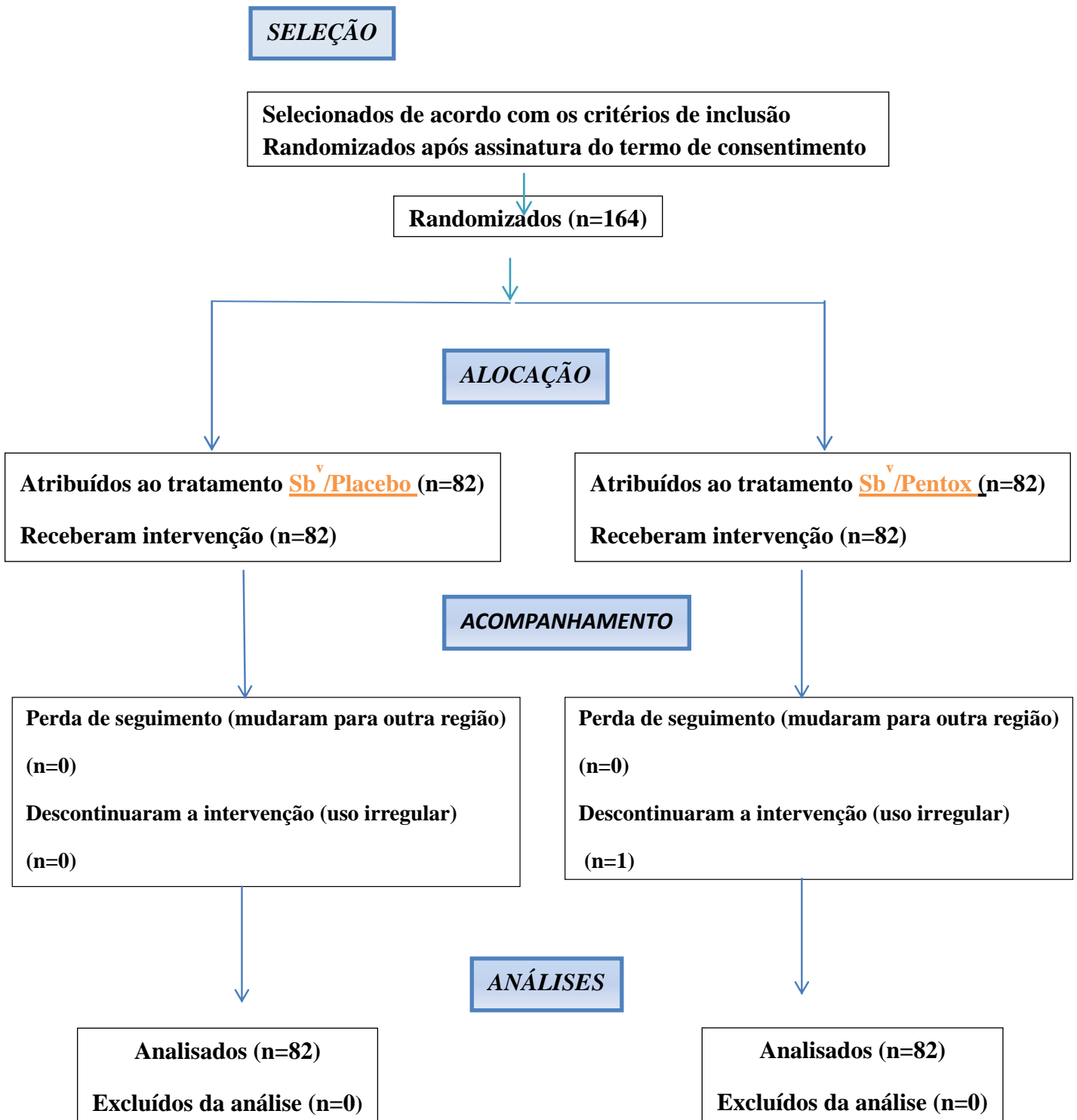
## VI. RESULTADOS

---

Os pacientes foram incluídos no ensaio clínico no período de dezembro de 2010 a outubro de 2013 e receberam Sb<sup>v</sup> associado a placebo ou à pentoxifilina. Não houve diferenças nas características clínico-epidemiológicas de base (tabela 1). Houve homogeneidade entre os grupos baseando-se em sexo, idade, número de lesões ou tamanho das lesões. Dos 164 pacientes incluídos, 01 do grupo da pentoxifilina não fez uso correto da medicação oral, sendo excluído. No entanto, na análise de dados foi mantido – tendo em vista a análise de intenção-de-tratar. Não houve alterações laboratoriais relevantes, que justificassem a interrupção do tratamento.

Os pacientes tinham idades compreendidas entre 18 a 62 anos, com média de idade de 33,4 anos o que não diferiu significativamente entre os dois grupos de tratamento. Houve um predomínio do sexo masculino nos grupos (72% no grupo placebo versus 63% do grupo pentoxifilina). O número de lesões foi semelhante em ambos: média de 1,3 lesões. A lesão com a maior área na apresentação foi considerada a lesão principal. A área da lesão principal não foi diferente entre os grupos de tratamento (132 VS 134mm<sup>2</sup>, placebo VS pentoxifilina). Uma cultura positiva para promastigotas de *Leishmania* foi obtida em 43 dos 164 pacientes (26%). *L. braziliensis* foi identificado em 101 amostras obtidas de biópsia por PCR (61,58%).

**Figura 1: Fluxograma**



**Tabela 1: Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com leishmaniose cutânea tratados com a associação de pentoxifilina e antimonial pentavalente ou com placebo e antimonial pentavalente.**

Características	Sb <sup>v</sup> *+ Placebo (82)	Sb <sup>v</sup> + Pentoxifilina (81)**	Valor de P
Sexo masculino (%)	72	63	0,47
Idade (Md±DP)#	33,4 ± 11,2	33,3 ± 10,4	0,83
Número de lesões (Md±DP)	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,7	0,73
Área das lesões (mm <sup>2</sup> ) (Md±DP)	132 ± 227	134 ± 249,3	0,81
Lesões em membros inferiores (%)	81,7	74	0,14
IDRM (área)(mm <sup>2</sup> ) (Md±DP)	254,8 ± 133,3	252 ± 138,7	0,84

(\*) Sb<sup>v</sup> - representa antimonial pentavalente

(#) Md representa a média e DP o desvio padrão

(\*\*) Exclusão de 01 paciente do grupo pentoxifilina por uso irregular do tratamento

**Eficácia:** Dois meses após o fim do tratamento, 44% (36/82) dos doentes no grupo Sb<sup>v</sup> estavam curados, ou não tinham lesões, em comparação com 48% (39/82) no grupo de pentoxifilina (p = 0,64). As taxas de cura, com 6 meses de seguimento foram 43% (35/82) no grupo Sb<sup>v</sup> e 45% (37/82) no grupo de pentoxifilina (p = 0,35) (Tabela 2). O tempo médio para curar foi 100,2 ± 66,4 dias no grupo Sb<sup>v</sup> e 98,7 ± 72,3 dias no grupo pentoxifilina (p = 0,89). Em seis pacientes (pentoxifilina = 4 e Sb<sup>v</sup> = 2) houve uma reativação da úlcera por uso irregular do tratamento.

**Tabela 2: Resposta terapêutica dos pacientes com leishmaniose cutânea tratados com a associação de pentoxifilina e antimonial pentavalente ou com placebo e antimonial pentavalente (Análise de intenção-de-tratar).**

<b>Características</b>	<b>Sb<sup>v</sup># + Placebo</b>	<b>Sb<sup>v</sup> + Pentoxifilina</b>	<b>Valor de P</b>
Taxa de cura inicial (%)	36/82 (44)	39/82 (48)	0,64*
Taxa de cura final (%)	35/82 (43)	37/82 (45)	0,35*
Tempo de cura (dias) (Md±DP)##	100,2 ± 66,4	98,7 ± 72,3	0,89**
Necessidade de 2a série de tratamento (%)	46,3	43,9	0,64*

(#) Sb<sup>v</sup> - representa antimonial pentavalente

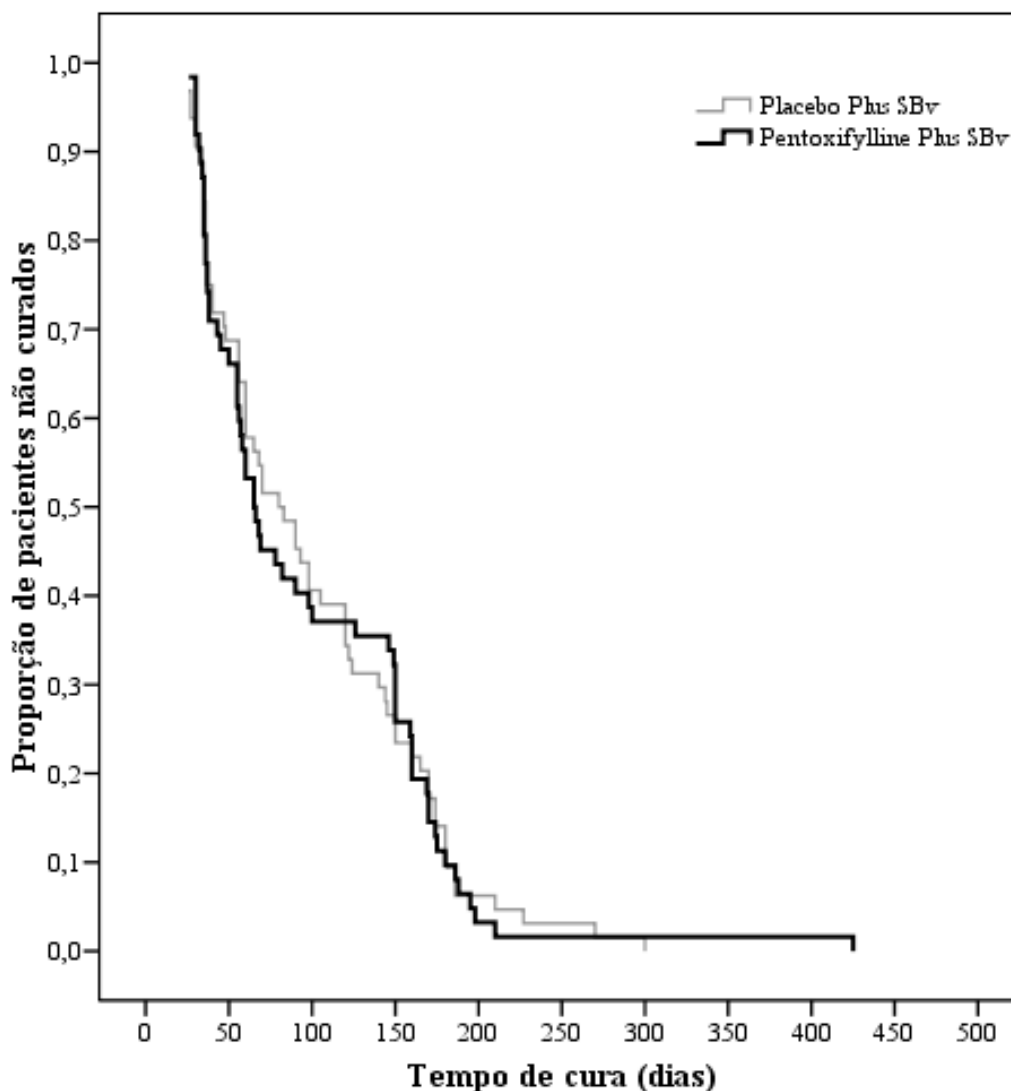
(##) Md representa a média e DP o desvio padrão

(\*) Teste exato de Fischer

(\*\*) Teste t de Student

A curva de Kaplan-Meier estima a proporção de pacientes curados com o tratamento pentoxifilina mais Sb<sup>v</sup> e o tratamento placebo mais Sbv (pelo teste de log-rank – p=0,831) (Figura 1).

**Figura 2:** Curva de Kaplan Meyer estima a proporção de pacientes tratados e não curados com a associação pentoxifilina-Sb<sup>v</sup> ou placebo-Sb<sup>v</sup> (pelo teste de log-rank ( $p = 0,831$ )).



**Toxicidade e tolerabilidade:** Efeitos adversos leves foram observados com maior frequência no grupo pentoxifilina-Sb<sup>v</sup> (31 pacientes) do que no grupo placebo (19 pacientes). Os efeitos mais comuns observados no grupo pentoxifilina foram náuseas (7 pacientes), dor de cabeça (9 pacientes), artralgia (7 pacientes) e mialgia (11 pacientes). No grupo placebo foram queixas de artralgia (10 pacientes) e mialgia (6 pacientes). Efeitos adversos graves foram mais comuns no grupo placebo

(9 pacientes) vs no grupo pentoxifilina (1 paciente). Dentre os efeitos mais graves relatados foram: mialgia, artralgia, epigastralgia, inapetência, astenia e cefaleia (Tabela 3).

**Tabela 3:** Eventos adversos encontrados nos dois grupos de tratamento

EFEITOS COLATERAIS	Sb <sup>v</sup> + Pentoxifilina (31/82)	Grau de CTC	Sb <sup>v</sup> +Placebo (19/82)	Grau de CTC
<b>Vômitos</b>	2 (2,4%)	2 (2)*	NR	NR
<b>Diarréia</b>	1 (1,2%)	2 (1)	NR	NR
<b>Náusea</b>	7 (8,6%)	1 (5) 2 (2)	2 (2,4%)	2 (2)*
<b>Cefaléia</b>	9 (11%)	1 (4) 2 (5)	5 (6%)	2 (3) 3 (2)
<b>Astenia</b>	3 (3,7%)	1 (1) 2 (2)	2 (2,4%)	1 (1) 3 (1)
<b>Inapetência</b>	3 (3,7%)	1 (1) 2 (2)	1 (1,2%)	3 (1)
<b>Epigastralgia</b>	3 (3,7%)	1 (2) 2 (1)	2 (2,4%)	2 (1) 3 (1)
<b>Algia</b>	2 (2,4%)	1 (1) 2 (1)	2 (2,4%)	1 (2)
<b>Tontura</b>	2 (2,4%)	1 (2)	NR	NR
<b>Febre</b>	6 (7,4%)	1 (3) 2 (3)	2 (2,4%)	1 (1) 2 (1)
<b>Artralgia</b>	7 (8,6%)	1 (4) 2 (3)	10 (12%)	1 (6) 2 (2) 3 (2)
<b>Mialgia</b>	11 (13,5%)	1 (8) 2 (2) 3 (1)	6 (7,3%)	1 (2) 2 (2) 3 (2)

\*Entre parêntesis- número absoluto de pacientes por nível de CTC (Critério comum de toxicidade).

NR – não relatado



## VII. DISCUSSÃO

---

A monoterapia de LC com Sb<sup>v</sup> pode induzir resistência à *Leishmania*. Tem sido mostrado que a LC causada por *L. braziliensis* tem maior falha terapêutica quando comparado com a LC devido a outras espécies (Arevalo et al., 2007). Em Corte de Pedra (BA), área endêmica de *L. braziliensis* e base de estudos do nosso grupo, os índices de cura têm diminuído drasticamente – falhas variam de 50% a 90%. Assim, a resistência e irresponsividade da terapêutica padrão traz a necessidade de se buscar drogas imunomoduladoras e/ou leishmanicidas. O norte dessa busca pode ser o conhecimento de que a leishmaniose é uma doença essencialmente imunomediada.

O TNF participa do processo inflamatório com a indução da produção de óxido nítrico, necrose, citotoxicidade e expressão de MMPs (metaloproteinases) (Lehmann et al., 2005). Existe uma associação direta entre a frequência de células CD4+, monócitos ativados, produção de IFN- $\gamma$  e TNF com o tamanho da úlcera na leishmaniose cutânea (Antonelli et al., 2005). O bloqueio da síntese ou da ação do TNF é mais uma alternativa e já foi descrito por ensaios clínicos prévios. A pentoxifilina foi a droga de escolha em vários estudos por fazer esse papel. Nosso grupo foi o autor de ensaios relevantes: em ensaio clínico aberto em pacientes com leishmaniose mucosa refratária mostrou cura clínica e redução significativa dos níveis de TNF em nove de cada 10 pacientes que usaram a pentoxifilina associado com antimônio pentavalente (Lessa et al., 2001). Realizou-se, então, ensaio randomizado, duplo-cego, também em pacientes com LM para confirmação desses resultados. Nesse estudo foi evidenciado mais uma vez que a associação Sb<sup>v</sup>-pentoxifilina aumentou a taxa de cura e aboliu a necessidade de outra série de tratamento (Machado et al., 2007).

Na literatura, relatos do uso da associação Sb<sup>v</sup>-pentoxifilina em LC são escassos. Bafica et al. em 2003, descreveram o relato de 02 pacientes com LC por *L.braziliensis* refratária ao tratamento convencional. Neles, a associação também foi benéfica. No Irã, ensaio clínico randomizado, duplo-cego com 64 pacientes com LC causada por *L. major*, mostrou que a associação Sb<sup>v</sup>-pentoxifilina foi mais eficaz e teve uma taxa de cura maior do que a encontrada no grupo tratado apenas com o antimonial (Sadeghian et al., 2006). Mais recentemente, nosso grupo comparou vinte pacientes com LC, causada por *L. braziliensis*, que foram tratados com Sb<sup>v</sup> associado à pentoxifilina ou ao placebo. Neste ensaio foram realizadas também avaliações clínicas e imunológicas. CXCL-9, CXCL-10, CCL-3, IFN- $\gamma$  e TNF foram dosadas em ambos os grupos nos dias zero e 15 de tratamento. A associação Sb<sup>v</sup> e pentoxifilina diminuiu os níveis de TNF e IFN- $\gamma$  significativamente em comparação com o grupo tratado com placebo e Sb<sup>v</sup>. A diminuição do IFN- $\gamma$  no grupo que usou pentoxifilina foi associada não somente a ação da droga, mas também à morte do parasita e consequente imunomodulação autócrina. Mostrou-se também aumento dos níveis de CXCL-9 durante o tratamento, especialmente no grupo que não usou a associação, e em particular nos pacientes que evoluíram sem melhora clínica. Esse dado indica que o aumento desta quimiocina pode ser interpretado como um fator prognóstico na avaliação da resposta terapêutica dos pacientes com LC (Brito et al., 2014). No entanto, o presente ensaio clínico que tinha como objetivo mostrar a maior eficácia do uso associado da pentoxifilina em uma amostra maior de pacientes com LC, não mostrou benefícios com relação à taxa de cura, tempo de cicatrização ou necessidade de uma segunda série de tratamento. O que merece reflexão é a discrepância entre a ausência de benefício com a associação de pentoxifilina na LC quando comparado com os estudos realizados na LM. Entendemos que isso se deva, pelo menos em parte, à

forte contribuição do TNF na patogênese da LM (Ribeiro de Jesus et al, 1998), em função dos altos níveis desta citocina quando comparado ao encontrado na LC, e do déficit de modulação da resposta inflamatória exacerbada pela menor expressão de receptores de IL-10 (Faria et al., 2005). Será que obteríamos resposta semelhante se usássemos a associação em casos refratários de LC? Será que nos refratários, onde os níveis de TNF seriam teoricamente altos, encontraríamos essa resposta satisfatória?

O desafio de tratar a LC causada por *L. braziliensis* merece a busca incessante por alternativas terapêuticas, avaliando-se também o perfil de paciente responsivo a cada uma. O que sugerimos é a realização de novo ensaio utilizando a associação antimonial-pentoxifilina, mas em pacientes refratários. No entanto essa procura pela melhor droga não deve se restringir apenas aos bloqueadores de TNF: buscar drogas leishmanicidas mais potentes, junto com moduladores da resposta imune inflamatória.

A miltefosina tem sido estudada com resultados animadores. Em ensaio realizado em Corte de Pedra, a miltefosina foi superior ao  $Sb^v$  ( $P=0,04$ ) (Machado et al., 2010) e em ensaio realizado na Bolívia, Sotto et al., encontraram 88% de cura com a Miltefosina – também para *L. braziliensis*. Relatos de resistência à miltefosina já tem sido descritos (Cojean et al., 2012; Rijal et al., 2013). No entanto, o nosso sistema de saúde ignora esses dados, visto que a miltefosina é um medicamento caro e a leishmaniose ainda é uma doença negligenciada. Opções de tratamento oral e com menos efeitos colaterais, assim como a miltefosina tem surgido: o tamoxifeno, um agente antineoplásico, modulador seletivo de receptores de estrógeno, é ativo in vivo e in vitro contra espécies de *Leishmania* (Miguel et al., 2007, 2008, 2009), mas o mecanismo preciso de ação anti-leishmania é desconhecido.

Trilhando o caminho da imunologia e conhecendo a ação patogênica das metaloproteinases na LC, podemos inferir que a inibição

dessas substâncias pode ter potencial terapêutico. Sabe-se que a MMP-9 é envolvida na degradação do colágeno tipo IV, o maior componente da membrana basal da pele (Barbi et al., 2007). O aumento dos níveis de TNF produzidos em virtude da leishmaniose contribui para o aumento da produção de MMP-9. Os TIMPs, inibidores naturais das metaloproteinases, são importantes nessa modulação; e em LC há um desequilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 (Oghumu et al., 2010). A doxíciclina pode ser escolhida como droga potencial a ser testada, por ser um reconhecido inibidor de MMP-9 e MMP-2 (Moses et al., 2006), já sendo utilizada com esse propósito na pneumologia, em casos de linfagioleiomiomatose (Pimenta et al., 2013).

Um caminho leishmanicida que vem sendo explorado é o da via arginase I, mecanismo crítico na regulação imune da infecção por *Leishmania* (Vincendeau et al., 2003). Os marcadores da inflamação: arginase I, ornitina descarboxilase (ODC), fator de crescimento  $\beta$  e prostaglandina E2 se mostram mais elevados no plasma e nas biopsias teciduais de pacientes com LCD do que nos pacientes com LC localizada (França-Costa et al., 2015). *Leishmania amazonensis*, o único agente implicado em LCD no Brasil (Bittencourt et al., 1989), aumenta arginase I, transformando  $\beta$  factor de crescimento (TGF- $\beta$ ), e a expressão de prostaglandina E2 (PGE2), contribuindo para a proliferação intramacrofágica do parasita (Barral-Netto et al., 1992; Guimaraes et al., 2006; Lacerda et al., 2012).

A inibição da arginase e da ODC diminuem os níveis de TGF- $\beta$  e PGE-2, que são cruciais para a sobrevivência e proliferação do parasita (Ribeiro-Gomes, 2004). Além disso, o tratamento com inibidores da arginase e da ODC aumentam os níveis de TNF e IL-12, que podem ativar macrófagos a produzir óxido nítrico, uma molécula leishmanicida potente (Balestieri, 2002).

Portanto há uma necessidade urgente de descobrir e desenvolver novos medicamentos leishmanicidas e/ou imunomoduladores, bem como estratégias para proteger as terapias atuais e futuras da ameaça de resistência.

## VIII. PERSPECTIVA DE ESTUDO

---

Buscar novas opções terapêuticas, associadas ou não ao tratamento convencional, visando modular a resposta imune inflamatória. Nesse sentido, outros alvos na resposta imune podem ser escolhidos, assim como o estudo da ação do TNF em outro perfil de pacientes, a saber:

1. Metaloproteinases – por exemplo, a MMP-9 e a MMP-2, que têm suas ações inibidas pela doxiciclina. Poderia se avaliar em um ensaio clínico controlado o uso da doxiciclina associada ao antimonial no tratamento da leishmaniose cutânea.

2. IL-1beta, citocina importante na gênese do processo inflamatório associado à formação da lesão tecidual na LC. Podemos propor a realização de estudo piloto como prova de conceito com droga que bloqueie o receptor da IL-1 (Anakinra).

3. Ensaio clínico controlado avaliando o uso de pentoxifilina associado ao antimonial no tratamento de casos refratários de leishmaniose cutânea ao tratamento convencional.

## **IX. CONCLUSÃO**

---

A associação antimonial pentavalente e pentoxifilina não se mostrou superior ao tratamento convencional da leishmaniose cutânea com relação à taxa de cura, tempo de cicatrização ou necessidade de uma segunda série de tratamento.

---

## X. SUMMARY

---

**Background:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease in expansion. Evidence for the role of the immune response in the pathogenesis of ulceration includes: (1) the presence of inflammatory infiltrate despite the paucity of parasites in culture or biopsy samples, (2) high levels of IFN- $\gamma$  and TNF in PBMCs and in tissue, (3) direct correlation between the amount of activated lymphocytes and ulcer size, (4) treatment with antimony in the pre-ulcerative stage does not prevent the onset of ulcer. These data support that combined therapy with drugs that modulate the immune response is the way. Pentoxifylline appears as therapeutic potential by inhibiting the production of TNF, pro-inflammatory cytokine. **Objective:** To evaluate in a controlled clinical trial phase III efficacy of pentoxifylline antimony associated with the therapeutic response in patients with cutaneous leishmaniasis. **Methods:** Randomized clinical trial, double-blind, placebo-controlled study of 164 patients with CL served in the post of health Corte de Pedra (BA). Patients were included from 1 to 3 presented ulcerated lesions with 1 to 3 months of evolution, between 18 and 65 years old, with insulating Lishmania with PCR or culture. All were treated with pentavalent antimony (Sb<sup>v</sup>) (20mg / kg / day intravenously) associated with placebo or pentoxifylline (400 mg - 3 times a day) for 20 days. Cure was defined by clinical criteria: complete healing of the lesions 60 days after completion of treatment. **Results:** There was no difference between groups with respect to the initial cure criteria (2 months after treatment) ( $p = 0.64$ ), healing time ( $p = 0.89$ ), and need for second round of treatment ( $p = 0.64$ ). The incidence of adverse events was higher in the pentoxifylline group (37.8%), while in the placebo group was 23%. Headache (11%), nausea (8.6%) and myalgia (13.5%) were



significantly more frequent in the pentoxifylline group, while arthralgias (12%) were more frequent in the placebo group. This study showed that Sb<sup>v</sup> association and pentoxifylline was no more effective than conventional treatment with Sb<sup>v</sup> in CL caused by *Leishmania braziliensis* in Bahia, Brazil. **Keywords:** 1. Cutaneous leishmaniasis; 2. Immunotherapy; 3. TNF; 4. pentoxifylline.

## XI. REFERÊNCIAS

---

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e Molecular*. 6ª. Ed. São Paulo: Elsevier; 2008.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos one*. 2012; 7(5): e35671.
3. Almeida R, D'Oliveira Jr. A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, Mobashery N et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1999 Nov; 180(5): 1735-37.
4. Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najjar E, Alvarez E et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis*. 2001 Dec 1;33(11):1847-51.
5. Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2007; 77(2), 266–74.
6. 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*. 2005 Nov 15; 101(2): 226-30.
7. Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verastegui C et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentar leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007 Jun 15; 195(12): 1846-51.
8. 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 Dec; 70(12): 6734-40.

9. Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A et al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med.* 1990 Jan 4;322(1):16-21.
10. Bai X, Ovrutsky AR, Kartalija M, Chmura K, Kamali A, Honda JR et al. IL-32 expression in the airway epithelial cells of patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Int Immunol.* 2011 Nov; 23(11): 679-91.
11. Bae S, Kang D, Hong J, Chung B, Choi J, Jhun H et al. Characterizing antiviral mechanism of interleukin-32 and a circulating soluble isoform in viral infection. *Cytokine.* 2012 Apr; 58(1): 79-86.
12. Bafica A, Oliveira F, Freitas L, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol.* 2003 Mar; 42(3): 203-7.
13. Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn Ide A. *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 2002; 4: 23–9.
14. Barbi J, Oghumu S, Rosas LE, Carlson T, Lu B, Gerard C et al. Lack of CXCR3 Delays the development of hepatic inflammation but does not impair resistance to *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 2007 Jun 1; 195(11):1713-17.
15. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992; 257:545–8.
16. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis.* 2008. 2: e313.
17. 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.

18. Baugh JA, Bucala R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2001. 4: 635–50.
19. Bittencourt A, Barral A, de Jesus AR, de Almeida RP, Grimaldi Junior G. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1989; 84:585–6.
20. Boente P, Sampaio C, Brandão MA, Moreira ED, Badaro R, Jones TC. Local peri-lesional therapy with rhGM-CSF for Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 1993 May 1; 341(8853):1154.
21. Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, Queiroz A et al. Short report: clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis. Patients treated with pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Apr; 90(4): 617-20.
22. Campos TM, Passos ST, Novais FO, Beiting DP, Costa RS, et al. Matrix Metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis.* 2014. 8(11): e3282.
23. Carvalho et al. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2013 Nov 9; 13:529.
24. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012 Oct 4; 3:301.
25. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. *Hum Immunol* 2009, 70(6): 383–90.
26. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by leishmania parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 719361.

27. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1994 Jun 15; 152(12): 5949-56.
28. Cojean S., Houze S., Haouchine D., Huteau F., Lariven S., Hubert V., Michard F., Bories C., Pratlong F., Le Bras J., Loiseau P.M., Matheron S., 2012. Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg. Infect. Dis.* 18,704e706.
29. Convit J, Castellanos PL, Rondon A, Pinaridi ME, Ulrich M, Castes M, Bloom B, Garcia L. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet*, 21 (1987), pp. 401–05.
30. Dantas ML, Oliveira JC, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P et al.. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013 Nov-Dec; 46(6): 728-34.
31. De Souza MC, de Assis EA, Gomes RS, Marquesda Silva E de A, Melo MN, Fietto JL et al. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop.* 2010 Sep; 115(3): 262-69.
32. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 1997 Oct; 18(10): 487-92.
33. Elder DE, Elenitsas R, Johnson Jr B, Murphy GF, editors. *Lever's histopathology of the skin.* 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
34. Esterre P, Dedet JP, Frenay C, Chevallier M, Grimaud JA. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992, 421: 239-47.
35. 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.* 2005 Dec; 73(12): 7853-59.

36. Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, de Carvalho LP, Bacellar O et al. Immune responses to an inactive vaccine against american cutaneous leishmaniasis together with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 2002, 20(9-10): 1365-68.
37. França-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, Santos de Campos DC, Saldanha AC, dos-Santos WL, Bozza PT, Barral-Netto M, Barral A, Costa JM, Borges VM. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2015 Feb 1;211(3):426-35.
38. Galdino H Jr, Maldaner AE, Pessoni LL, Soriani FM, Pereira LI, Pinto SA et al. Interleukin 32 $\gamma$  (IL-32 $\gamma$ ) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of american tegumentary leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. *BMC Infect Dis.* 2014 May 9; 14:249.
39. Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* 2012 Mar; 29; 12:75.
40. Gontijo B, de Carvalho M de L. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Jan-Feb; 36(1): 71-80.
41. Goodwin LC, Page JE, A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* 1943, 22, 236-40.
42. Goyard, H. Segawa, J. Gordon et al. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 130, no. 1, pp. 31–42, 2003.
43. Guimarães LH, Machado PRL, Lessa HA, Lessa M, D'Oliveira A, Carvalho EM. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. *Gaz méd Bahia.* 75: 66-74.

44. Guimaraes ET, Santos LA, Ribeiro dos Santos R, Teixeira MM, dos Santos WL, Soares MB. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect* 2006; 8: 1219–26.
45. Gupta, S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol*. 2002. 22: 185–94.
46. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul; 8(7): 533-44
47. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 15; 88(16): 7011-15.
48. Ho JL, Reed SG, Wick EA, Giordano M. Granulocyte-macrophage and macrophage colony-stimulating factors activate intramacrophage killing of *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Infect Dis*. 1990 Jul; 162(1): 224-30.
49. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, et al. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. *Plos Med* 3: e102.2006.
50. Hu X, Sun H, Han C, Wang X, Yu W. Topically applied rhGM-CSF for the wound healing: A systematic review. *Burns*. 2011 Aug; 37(5): 729-41.
51. Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. 1994 Jul; 62(7): 2818-24.
52. Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med*. 2001 Mar 19; 193(6): 777-84.

53. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado P et al. Epidemiological and clinical changes in american tegumentar leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 2012, 86(3): 426–33.
54. Jones TC. The effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on macrophage functions in microbial disease. *Med Oncol.* 1996 Sep; 13(3): 141-7.
55. Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, Feb 28; 103(9): 3298-303.
56. Kang JW, Choi SC, Cho MC, Kim HJ, Kim JH, Lim JS et al. A proinflammatory cytokine interleukin-32 beta promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Immunology.* 2009 Sep; 128 (1 Suppl): e532-40.
57. Lacerda DI, Cysne-Finkelstein L, Nunes MP, et al. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; 107:238–45.
58. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(5): 569-96.
59. Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone.* 2005. 36: 300–10.
60. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Aug; 65(2): 87-9.
61. Machado PRL, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun 15; 34(12): E69-73.



62. Machado PRL, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho J et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: A randomized Trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 15; 44(6): 788-93.
63. 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. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Dec 21; 4(12):e912.
64. 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.
65. 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.
66. Martin JFB, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MA. Pentoxifylline and severe acute respiratory syndrome (SARS): a drug to be considered. *Med Sci Monit*. 2003 Jun; 9(6): SR29-34.
67. Martinez S, Gonzalez M, Vernaza ME. Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate. *Clin. Infect. Dis*, 24 (2) (1997), pp. 165–69
68. Marzano AV, Cugno M, Trevisan V, Fanoni D, Venegoni L, et al. Role of inflammatory cells, cytokines and matrix metalloproteinases in neutrophil mediated skin diseases. *Clin Exp Immunol*. 2010. 162: 100–07.
69. Meyer N, Zimmermann M, Burgler S, Bassin C, Woehrl S, Moritz K et al. IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Apr; 125 (4): 858-65.
70. Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Andreoli WK, Mortara RA, Uliana SR. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring

- Leishmania (Leishmania) amazonenses amastigotes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. 60, 526e534.
71. Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008. 2, e249.
72. Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbieri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009. 63, 365e368.
73. Miranda-Verastegui C, Tulliano G, Gyorkos TW, Calderon W, Rahme E, Ward B et al. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. *Plos Negl Trop Dis.* 2009 Jul 28; 3(7): e491.
74. Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008 Nov; Chapter 14: Unit 14.2.
75. Murray H, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005 Oct 29-Nov 4; 366:1561-77.
76. Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2185-97.
77. Moses MA, Harper J, Folkman J. Doxycycline treatment for lymphangiomyomatosis with urinary monitoring for MMPs. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2621-2.
78. Muniz-Junqueira MI, Paula-Coelho VN, Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- $\alpha$  production, but only via TNF- $\alpha$  it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 2008, 8, 1633-38.
79. Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1983 Aug-Oct; 76(4): 377-83.

80. 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*. 1997 Mar; 90(3): 435-39.
81. Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans*. 1991. 19: 715–18.
82. Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. *Parasite Immunol*. 2011 Feb; 33(2):132-6.
83. Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007 Sep; 28(9): 378-84.
84. Oghumu S., Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2010 Nov; 126(3): 389-96.
85. O’Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007; 195:142 – 48.
86. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7, 2004, 257–66.
87. Parronchi C, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E et al. Allergen and bacterial antigenspecific T-cell clones established for atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 15; 88(10): 4538-42.
88. Pathak MK, Yi T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol*. 2001, 167, 3391-97.

89. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura TK, Paes-Oliveira TM, Conceição-Silva F. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993 Apr; 91(4): 1390-95.
90. Pimenta SP, Baldi BG, Kairalla RA, Carvalho, CRR. Doxycycline use in patients with lymphangioliomyomatosis: biomarkers and pulmonary function response. *J Bras Pneumol.* 2013; 39 (1): 5-15.
91. 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 Jan; 31(1): 143-8.
92. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2004; 172:4454–62.
93. Ritter U, Korner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2002 Jun; 24(6): 295-301.
94. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1999 Nov; 180(5): 1731-4.
95. 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.
96. Rijal S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TP, Beijnen JH, Vanaerschot M, Decuypere S, Dhakal SS, Das ML, Karki P, Singh R, Boelaert M, Dujardin JC. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin. Infect. Dis.* 2013.56, 1530e1538.
97. Sadeghian G, Nilforoushzadeh MA. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 2006 Jul; 45(7): 819-21.
98. Saldanha ACR, Romero GAS, Guerra C, Merchan-Hamann E, Macedo VO. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88® e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose

- cutânea: toxicidade bioquímica e cardíaca. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 33. 2000, pp. 383–88.
99. Scope A, Trau H, Anders G, Barzilai A, Confino Y, Schwartz E. Experience with New World cutaneous leishmaniasis in travelers. J Am Acad Dermatol, 49, 2003, pp. 672–78.
100. Samant M, Sahasrabudhe AA, Singh N, Gupta SK, Sundar S, Dube A. Proteophosphoglycan is differentially expressed in sodium stibogluconate-sensitive and resistant indian clinical isolates of *Leishmania donovani*. Parasitology. 2007 Aug; 134(Pt 9):1175-84.
101. Schriefer A, Schriefer AL, Góes- Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for american tegumentar leishmaniasis. Infect Immun. 2004 Jan; 72(1):508-14.
102. Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D, Novel intracellular Sb (V) reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. 2001, 276, 3971-76.
103. Scott P, Natovitz P, Sher A. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. J Immunol. 1986. 137: 1017-21.
104. Scott P, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. Chem Immunol. 1998, 70: 60-80.
105. Seeberger J, Daoud S, Pammer J. Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod. Int J Dermatol. 2003 Jul; 42 (7): 576-79.
106. Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 42, no. 12, pp. 3097–102.

107. 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 Jun; 127:183-204.
108. 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.
109. Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S et al. Epithelial overexpression of interleukin-32 alpha in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2007 Sep; 149(3): 480-6.
110. Svensson M., Zubairi S, Maroof A, Kazi F, Taniguchi M, Kaye PM. Invariant NK T cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun.* 2005 Nov; 73(11): 7541-7.
111. 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.
112. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002. 186: 1829-1834
113. van Nieuwenhuijze A, Koender M, Roeleveld D, Sleeman MA, van den Berg W, Wicks IP. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Mol Immunol.* 2013 Dec; 56(4):675-82.
114. Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription and the generation of protective immune responses. *J Immunol.* 2008 Jun 1; 180(11):7537-45.
115. Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 2003; 19:9–12.

116. Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg.* 1991, 44(3): 260–71.
117. Weigle K and Saravia NG. Natural History, clinical evolution and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 433-450.
118. Hu X, Sun H, Han C, Wang X, Yu W. Topically applied rhGM-CSF for the wound healing: A systematic review. *Burns.* 2011 Aug; 37(5): 729-41.

## XII. ARTIGOS PUBLICADOS

---

### XII.1

**Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline.**

Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, Queiroz A, Carvalho EM, Machado PR, Passos S.

Am J Trop Med Hyg. 2014 Apr;90(4):617-20. doi: 10.4269/ajtmh.12-0729.  
Epub 2014 Feb 24.

PMID: 24567316

### XII.2

**Erythema multiforme upon *L. braziliensis* infection.**

Brito G, Dourado M, Schriefer A, Saldanha M, Machado PR.

Eur J Dermatol. 2015 Sep-Oct;25(5):504-5. doi: 10.1684/ejd.2015.2640.  
No abstract available.

PMID: 26574659



## XIII. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

---

### Oral pentoxifylline associated with pentavalent antimony: a randomized trial for cutaneous leishmaniasis.

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine &amp; Hygiene</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Brito, Graça; Universidade Federal da Bahia, Serviço de Imunologia Dourado, Mayra; Universidade Federal da Bahia, Serviço de Imunologia Guimarães, Luiz Henrique; Universidade Federal da Bahia, Serviço de Imunologia Meireles, Everson; Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Laboratório de Instrumentação e Avaliação Psicológica Schriefer, Albert; Universidade Federal da Bahia, Serviço de Imunologia Carvalho, Edgar; Federal University of Bahia, Serviço de Imunologia Machado, Paulo; Universidade Federal da Bahia, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos
Key Words:	Leishmaniasis, Immunoregulation, Therapy/Treatment, Protozoan Infections, Clinical Studies

### Submission Confirmation

 Print

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to** American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

**Manuscript ID** AJTMH-16-0435

**Title** Oral pentoxifylline associated with pentavalent antimony: a randomized trial for cutaneous leishmaniasis.

**Authors** Brito, Graça  
 Dourado, Mayra  
 Guimarães, Luiz Henrique  
 Meireles, Everson  
 Schriefer, Albert  
 Carvalho, Edgar  
 Machado, Paulo

**Date Submitted** 01-Jun-2016

## XIV. ANEXOS

---

### XIV. 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 outro medicamento chamado Pentoxifilina poderá curar mais rápida e de maneira mais eficiente a sua doença. O tratamento com Glucantime será realizado com uma série de 20 injeções diárias por via intravenosa; 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:** Afirmando 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

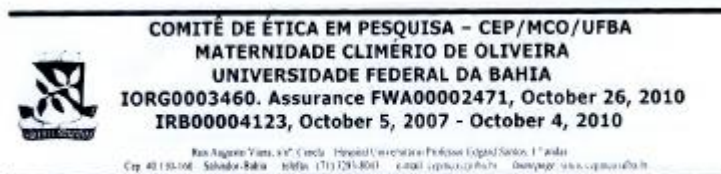
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_/\_\_\_\_\_

### **Impressão dactiloscópica**

*(p/ pessoa não alfabetizada)*

## XIV. 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, devem ser citados nas 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, 1.º andar  
 Cep: 40.118-168 - Salvador-Bahia - tel/fax: (71)3283-8040 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).

## XIV. 3 - Anexo 3: ESCALA CTCAE

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

Publish Date: May 28, 2009

<b>Quick Reference</b>	<b>Definitions</b>	Not all Grades are appropriate for all AEs. Therefore, some AEs are listed with fewer than five options for Grade selection.
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.	A brief definition is provided to clarify the meaning of each AE term.	<b>Grade 5</b> Grade 5 (Death) is not appropriate for some AEs and therefore is not an option.
<b>Components and Organization</b>	<b>Grades</b>	<b>Activities of Daily Living (ADL)</b>
SOC	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:	*Instrumental ADL refer to preparing meals, shopping for groceries or clothes, using the telephone, managing money, etc.
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).	Grade 1 Mild; asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated.	**Self care ADL refer to bathing, dressing and undressing, feeding self, using the toilet, taking medications, and not bedridden.
<b>CTCAE Terms</b>	Grade 2 Moderate; minimal, local or noninvasive intervention indicated; limiting age-appropriate instrumental ADL*.	
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).	Grade 3 Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of hospitalization indicated; disabling; limiting self care ADL**.	
	Grade 4 Life-threatening consequences; urgent intervention indicated.	
	Grade 5 Death related to AE.	
	A Semi-colon indicates 'or' within the description of the grade.	
	A single dash (-) indicates a grade is not available.	



#### **XIV. 4 – Anexo 4:**

### **NORMAS DE PUBLICAÇÃO DE REVISTA PARA O QUAL O ARTIGO FOI SUBMETIDO**

*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*

#### Instructions for Authors

The AJTMH publishes a broad range of papers covering topics in tropical medicine. Authors uncertain about the appropriateness of a manuscript for the Journal are encouraged to review recent issues of the Journal and to contact editorial staff with any questions. Manuscripts and correspondence should be submitted at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>. Questions about the submission process can be directed to the AJTMH editorial office at [cbs15@case.edu](mailto:cbs15@case.edu) and technical support questions should be sent to [support@scholarone.com](mailto:support@scholarone.com)

**Cover Letter and Signatures.** All manuscripts should be accompanied by a cover letter with the following information:

- The title of the paper
- A brief description of the significance of the paper to the readers of the AJTMH
- A statement confirming that the material is original, has not already been published, and has not and will not be submitted for publication elsewhere as long as it is under consideration by the AJTMH
- Written disclosure of any relationships or support which might be perceived as constituting a conflict of interest
- Names and signatures of all contributing authors accompanied by a statement indicating that they have participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions of the manuscript. Electronic signatures and multiple copies of the letter to facilitate gathering of signatures are acceptable, but it is preferable to submit signatures in one batch
- The corresponding author must sign and return the copyright form (available at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>) upon submission.

**Authorship.** There is no limit to the number of authors that may be listed (except for Images in Clinical Tropical Medicine articles; see below), but only those individuals who contributed substantially to the manuscript should be authors. The AJTMH adheres to standard of authorship as described in the following link: [http://publicationethics.org/files/International%20standards\\_authors\\_for%20website\\_11\\_Nov\\_2011.pdf](http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011.pdf). In some cases, for papers with a large number of authors participating in a working group, the group may be cited as author, and all individual authors listed in a footnote.

## MANUSCRIPT TYPES

**Original research reports.** These form the large majority of papers published by the AJTMH and consist of reports of novel research. There is no word limit or limit to the number of references, but efforts should be made to keep manuscripts as succinct as possible. Full reports should include separate sections entitled Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion; the last two sections can be combined. The abstract should not include sub-headings and should contain no more than 200 words. The following sections should be included after the text: Acknowledgments, Financial Support, and Disclosures regarding real or perceived conflicts of interest. Manuscripts should end with a listing of all authors' current addresses, including affiliation, city, country, and email address, followed by References (see Reference section below).

**Short reports.** This format can be used for submission of important preliminary observations, technique modifications, or data that do not warrant publication as a full paper. Short reports should contain no sub-headings, and be no more than 1500 words in length, with no more than 150 words in the abstract, 3 tables and/or figures, and 20 references

**Reviews.** The AJTMH will consider reviews on relevant topics in tropical medicine, global health, and related areas. Typically reviews will be submitted by leading authorities in a field. Reviews may be solicited by the editors. Alternatively, for unsolicited reviews, prospective authors are asked to send a presubmission letter to the Journal ([cbs15@case.edu](mailto:cbs15@case.edu)) for consideration of their proposed topic before submission. We encourage mini-reviews, providing concise reviews of focused topics in no more than 2000 words, but larger reviews will also be considered.

**Perspectives:** These are short articles (up to 1500 words) on timely topics that offer both a focused review of the subject and a balanced presentation of issues that may include key recent changes or areas of controversy. Perspectives may offer the opinions of authoritative experts on timely

topics or personal accounts from those with compelling tropical medicine experiences. As with reviews, some Perspectives may be solicited, and for unsolicited manuscripts a presubmission letter should be sent to the Journal (cbs15@case.edu) for consideration of the proposed topic before submission.

**Case reports.** Short reports of no more than 1500 words can describe a single case or small case series. These must present novel information about a tropical medicine problem of broad interest. Case reports should include an Introduction offering a succinct description of the area, a Case Report section including only clinical information that is relevant to the manuscript, and a brief Discussion.

**Images in Clinical Tropical Medicine.** Short reports (typically up to 200 words, but up to 400 words if complex descriptions are needed, with 5 references and no abstract) including images that demonstrate particularly informative, striking, or unusual presentations of tropical disease are welcome. Manuscripts that offer visual immediacy and clinical relevance will be prioritized. Images will be published in black and white in the print version of the Journal (author will have the option to pay for color) and in color online. Images articles should have no more than 3 authors.

**Book Reviews.** These are occasionally solicited by the editors. They should have no sub-headings and be no more than 1000 words in length.

**Letters to the Editor.** Letters are uncommonly published and should only be responses to recently published articles in the AJTMH. If letters are deemed worthy of publication, they will typically be sent to the authors of the published paper for a response.

**Submission process.** Prepare your manuscript using a word processing program and save it as a .doc file using Microsoft Word. For items that accompany the text (letters, figures, copyright forms, etc.), you may upload the following file types: .xls, .ppt, .gif, .pdf, .jpg, .eps, .png, and .tif. However, for the manuscript text, do NOT upload .pdf files, but rather use the Word "Save As" option to save your text as a .doc file. Reviewers will see a PDF containing all files you uploaded except for those files you have marked as "Not for Review." Other file types such as LaTeX files and QuickTime movies can be uploaded. Videos are best uploaded in mp4 format.

## MANUSCRIPT FORMATTING

**Spacing.** The text should be in 11 or 12 point type, fully double-spaced, leaving a margin of 1 inch on all sides. Continuous line numbers (NOT restarting with each page) should be included throughout the manuscript and pages should be numbered consecutively.

**Title page.** This should include, in the following sequence, the title, a list of all authors, and author institutions, identified by superscripts in Arabic numerals. The corresponding author should be denoted by an asterisk, with address, e-mail, and phone number in a footnote. Also include a list of up to 5 key words and the word counts for the abstract and for the text (not including the abstract, figures, or references). The title page should also list the number of figures, tables, and other pertinent information such as supplementary materials.

**Title.** The manuscript title should be as succinct as possible. Titles should generally not include abbreviations. A running head, for use as a header, should also be provided; the running head should be not longer than 60 characters (including spaces).

**Style.** American spelling should be used. Indent the first sentence of each paragraph. Use only one space between sentences. For presentation of a series of terms, a serial comma (e.g. “red, white, and blue”) should be used. For italics, italicize the words and phrases in your text, but do not underline. Italicize genus and species. For words that were originally foreign, but are now standard English (e.g. i.e., e.g., in vitro, in vivo), italics are not necessary. For complex sentences, parentheses should enclose brackets. Punctuation should follow the parentheses. Superscripts, including reference numbers, should directly follow punctuation marks. Numbers in text should be in Arabic format, except for one. Insert a space between a number and a unit of measure and both before and after the < symbol, > symbol, and = symbol; no space is needed between a number and the % sign.

**Abbreviations.** Abbreviations are commonly overused, compromising the clarity of manuscripts. Authors are advised to keep abbreviations to a minimum, using them when they are clearer than long terms (e.g. PCR, DNA), but avoiding them when possible when they are non-standard and idiosyncratic. Abbreviations should conform to the AMA Style Manual (<http://amamanualofstyle.com>). Terms should be spelled out with first usage in both the abstract and text, with the abbreviation following in parentheses. After this first usage, the abbreviation must be used consistently. Plurals of abbreviations do not require apostrophes.

**Drug names.** Proprietary names of drugs may not appear in the title but may be used in conjunction with the generic name when the drug is first mentioned in the abstract, and again when first mentioned in the text. Thereafter, use only the generic name.

**Names of organisms.** Genus and species should be italicized. After the first usage the genus should be abbreviated with a single letter (e.g. *E. coli*). For different species within a genus, the genus should be spelled out with the first usage of each. Adjectives referring to organisms (e.g. plasmodial, falciparum malaria) are not italicized. Viral nomenclature should be based on the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; see: <http://amamanualofstyle.com>). A complete listing of ICTV recognized viral species can be found at: [http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_documents/m/msl/4911.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4911.aspx).

**Figures.** Figures should be numbered in Arabic numerals and cited in the text. It should be noted that a fee is required for color illustrations in print, but authors can choose black & white in print, but color online at no charge. All figures should contain a brief legend.

**Tables.** Tables should be serially numbered in Arabic numerals and cited in the text. Each table should be placed on a separate page at the appropriate point in the text or at the end of the manuscript.

**References.** References must use standard AJTMH formatting; please refer to prior issues of the Journal and the information below to assure correct formatting. References should be cited by consecutive numbers in the text. The numbers should appear in superscripts that appear after closing punctuation. All authors should be listed. Abbreviate journal names as in PubMed, with journal name and volume number in italics. References should be from peer-reviewed publications. Unpublished sources, including abstracts, conference proceedings, dissertations, and manuscripts not yet accepted for publication, should be cited in parentheses in the text as unpublished data or a personal communication (e.g. Kazura, J., personal communication).

**Examples of references:** Durbin AP, Whitehead SS, 2013. The dengue human challenge model: has the time come to accept this challenge? *J Infect Dis* 207: 697–699.

Muirhead-Thomson RC, 1953. Mosquito Behavior in Relation to Malaria Transmission and Control in the Tropics. London, UK: Edward Arnold and Company.

White GW, 2007. Terminology of insect repellents. Debboun M, Frances SP, Strickman D, eds. *Insect Repellents*. Boca Rotan, FL: CRC Press, 31–46.

GAVI, 2013. Cholera Vaccine Investment Strategy. Available at: <<http://www.gavialliance.org/about/strategy/vaccine-investment-strategy/>>. Accessed March 11, 2014.

**REVIEW PROCESS.** After submission, manuscripts are first reviewed by editorial staff. Manuscripts with incorrect formatting or unacceptable language or style will be returned to authors for correction before transmission to the Editor-in-Chief. A common reason for return at this point is unacceptable quality of English, and so authors who are not fluent in English are encouraged to seek help with writing prior to submission. One resource for this is the Charlesworth Group author services at <http://www.charlesworthauthorservices.com/~AJTMH>. Acceptable manuscripts will be examined by the Editor-in-Chief and either accepted without review, rejected without review, or assigned to a Section Editor. Section Editors elicit reviews from qualified experts. Reviews are considered by Section Editors and the Editor-in-Chief, a decision is made, and authors are notified of review decisions as promptly as possible.

**REQUESTED AND EXCLUDED REVIEWERS.** Authors must list at least 4 potential reviewers, including name and contact information. The careful selection of relevant experts as reviewers will facilitate and speed up the review process. Please do not list reviewers from within an author's institution, and, especially for international authors, avoid only local reviewers. Authors may exclude up to 4 individuals as reviewers, although such exclusions should be uncommon.

**REVISION OF MANUSCRIPTS.** Articles typically require revision before final acceptance. Authors are asked to respond by letter to all concerns raised by editors and reviewers. For each concern the authors should explain exactly how they have modified their manuscript based on the concern, or if they feel that no change is needed, they must justify this decision. Changes to the manuscript must be clearly described, with identification of the site of the change. With resubmission, authors should provide both a marked up version of the earlier submission, with all changes indicated (using Track Changes or highlighting), and a final version. In response to revised manuscripts, editors may seek additional reviews and/or request a second revision, or they may reach a conclusion as to acceptability for publication. Final decisions are confirmed by the Editor-in-Chief.

**SHARING OF INFORMATION.** Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited, and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the Materials and Methods section. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication date of the paper. New information on arboviruses should be deposited into the registry described at: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>.

**ETHICAL GUIDELINES.** For all human research, the Material and Methods section must declare that informed consent was obtained from adult participants and from parents or legal guardians of minors and it must include the names of appropriate institutional review boards that approved the project. Clinical trials must have been registered with [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) or an equivalent body, and the trial number should be provided. For studies involving experimental animals, the Materials and Methods section must declare that the experiments complied with guidelines for the humane use of laboratory animals from the National Institutes of Health or an equivalent organization, and it must include the names of appropriate institutional review boards that approved the project. The journal recommends adhering to the guidelines stated in the Belmont Report <http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/belmont.html> or those set forth by the Council for International Organizations of Medical Sciences [http://www.cioms.ch/publications/guidelines/guidelines\\_nov\\_2002\\_blurb.htm](http://www.cioms.ch/publications/guidelines/guidelines_nov_2002_blurb.htm)

**PAGE CHARGES.** These are \$125 per page for manuscripts submitted by a Corresponding Author who is a member of the ASTMH and \$150 per page for non-members. Charges for printed color figures are \$1,395 per color plate (one page including one or more color figures). There is no charge for figures that are in color only online. Supplemental data such as additional tables and figures can be included in the online version of a paper and referenced in the print version. Page charges are due upon receipt of galley proofs. There are no page charges for Letters to the Editor, book reviews, Images in Clinical Tropical Medicine, or manuscripts that are recruited by the editors.

**PAGE CHARGE WAIVERS.** Manuscripts with only authors from developing countries and with no sources of support for page charges may qualify for a partial or full waiver of charges. Please appreciate that funds for waivers are limited. We do not grant waivers until a paper is accepted.

**AJTMH POLICY ON OPEN ACCESS.** Manuscripts may be made freely available online immediately upon publication for a flat fee of \$2,500, paid

instead of the usual page charges. This fee does not include additional charges for print color figures. For articles for which the open access fee is not paid, authors must honor a 12-month embargo on current content and not deposit their paper in a public repository without permission from the AJTMH. Email [cbs15@case.edu](mailto:cbs15@case.edu) to obtain permission. Authors may elect the open access option on the page charge form when they receive their galley proofs, or they may notify the editorial office of their decision. Published papers will be deposited in PubMedCentral (PMC) by the journal office. Open access articles will be made freely available on PMC at the time of publication. All other articles will be deposited in PMC but will not be available until the 12-month embargo period has expired. Wellcome Trust/Research Council UK authors can self-archive their manuscripts and make these available from PMC and Europe PMC 6 months after the publication date.