

Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana

American Tegumentary Leishmaniasis Immunotherapy

Roque P. Almeida, Jussamara S. Brito, Paulo R. Machado

Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

O uso de citocinas ou de seus bloqueadores na leishmaniose tem sido estudado em vários ensaios clínicos, em função da imunopatogênese da doença e das dificuldades com uso convencional do antimônio pentavalente. O fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) possui capacidade de matar a leishmania *in vitro*, modulando a resposta imune. Dois estudos randomizados e controlados verificaram sua utilidade como terapia adjuvante ao antimônio. No primeiro estudo, o GM-CSF aplicado intralesionalmente na úlcera, associado ao tratamento com antimônio, diminuiu seu tempo de cicatrização de 110 ± 61 dias (grupo controle) para 49 ± 33 dias ($p < 0,05$). No segundo estudo, o GM-CSF foi aplicado topicamente sobre a ulceração, reduzindo o tempo de cura de 104 ± 79 dias para 43 ± 14 dias ($p < 0,05$), comparado ao grupo controle. O racional para utilizar um inibidor da produção de TNF- α (pentoxifilina) na leishmaniose mucosa (LM) é baseado em observações que associam essa citocina a dano tecidual. Um estudo aberto verificou a eficácia da pentoxifilina oral associada ao antimônio em 10 pacientes com LM, refratários ao tratamento convencional. Nove dos 10 pacientes curaram as lesões mucosas em até 90 dias após o tratamento, sem apresentar recidiva após um ano de acompanhamento. Adicionalmente, um estudo randomizado e controlado documentou que a associação da pentoxifilina ao antimônio acelerou a cura da LM, sem necessidade de uma segunda série, comparado com o grupo controle. Esses dados sugerem que o GM-CSF e a pentoxifilina associados ao antimônio devem ser considerados no tratamento de casos refratários ou graves de leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, antimônio, GM-CSF, pentoxifilina, tratamento, imunoterapia.

Cytokines or cytokine antagonists have been used in clinical trials in tegumentary leishmaniasis because of the immunopathogenesis of this disease and the difficulties associated with antimony-based standard therapy. GM-CSF modulates immune response and is able to kill leishmania in vitro. It has been used to treat CL patients in two double-blind, randomized, placebo-controlled studies as an adjuvant therapy to antimony. In the first study, intralesional GM-CSF plus antimony significantly decreased the healing time of CL ulcers when compared to patients who received antimony alone (49 ± 32.8 versus 110 ± 61 days, $p < 0.05$). In the second study, GM-CSF was applied locally to treat CL ulcers. The patients who received GM-CSF plus antimony healed faster than control patients (43 ± 14 versus 104 ± 79 days, respectively, $p < 0.05$). The use of a TNF- α inhibitor (pentoxifylline) in mucosal leishmaniasis (ML) is based on observations that suggest a significant participation of this cytokine in tissue damage. An open study was carried out to evaluate the efficacy of oral pentoxifylline associated with antimony in 10 refractory ML patients. Nine out of ten cases were cured within 90 days following therapy and showed no evidence of relapse after one-year follow-up. Additionally, a randomized and placebo controlled study confirmed

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110. E-mail: imuno@ufba.br.

that pentoxifylline associated with antimony reduces the healing time in ML patients when compared to the control group, and requires no second course of antimony. These data show that GM-CSF and pentoxifylline plus antimonial therapy should be considered for the treatment of cutaneous or mucosal leishmaniasis in patients who are refractory to antimony therapy or those with severe forms of the disease.

Key words: *Cutaneous leishmaniasis, mucosal leishmaniasis, antimony, GM-CSF, pentoxifylline, treatment, immunotherapy.*

As diversas formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana estão associadas a um amplo espectro de resposta imune, variando desde uma forte resposta Th1 na leishmaniose mucosa, em contraste com uma pobre ou ausente resposta Th1 na leishmaniose cutânea difusa^(5,28). Os pacientes com as outras formas de leishmaniose cutânea apresentam resposta imune variável, porém com predomínio de resposta imune Th1, principalmente nas formas ulceradas e localizadas. O conceito de que uma resposta imune exacerbada pode ser prejudicial ao hospedeiro tanto quanto uma deficiência desta resposta é importante para o entendimento da patogênese da doença, assim como pode fornecer o racional para a imunoterapia. A presença de um equilíbrio entre a produção de citocinas Th1 e Th2 e entre a resposta imune protetora e a modulação dessa resposta, como observada em indivíduos com a forma subclínica da infecção causada por *L. braziliensis*⁽¹³⁾, indica que a modulação da resposta imune pode ser fundamental para evitar o aparecimento de lesões teciduais nos indivíduos que estão expostos à infecção.

A documentação da existência de uma forte resposta inflamatória e citotóxica com escassez de parasitas na lesão sugere que o dano tecidual observado na leishmaniose cutânea e mucosa é também consequência da incapacidade do hospedeiro de controlar esta resposta. Esse fenômeno torna-se ainda mais relevante no contexto onde a refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente (Sb^v) e a presença de recidiva se associam aos diversos efeitos colaterais devidos ao uso parenteral de Sb^v ou anfotericina B, limitando o controle adequado da doença. Todos esses fatores ressaltam a importância de pesquisar novas modalidades terapêuticas que contribuam para facilitar o tratamento nas áreas endêmicas tendo como base o conhecimento dos mecanismos da imunopatogênese da LTA e como a

imunoterapia pode contribuir para o tratamento dessas doenças.

Imunoterapia na Leishmaniose Cutânea

A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por leishmania faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para o controle e a prevenção da leishmaniose. Experimentalmente, a combinação de imunoterapia e quimioterapia tem sido usada para aumentar a resposta ao antimonial. Em modelos experimentais de leishmaniose, a depleção de IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* aumentou a eficácia da terapia com antimonial⁽²³⁾. Da mesma maneira, a combinação de IL-12 com antimonial induz a uma resposta protetora e promove cura nos camundongos infectados⁽²⁴⁾. Na última década, têm sido acumuladas experiências com citocinas e antagonistas de citocinas para o tratamento da leishmaniose. A associação de IFN- γ administrado sistemicamente e antimonial pentavalente foi efetiva para a cura de 11 pacientes com LTA ou leishmaniose mucosa, resistentes à terapêutica com antimonial⁽¹²⁾.

O fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma glicoproteína de peso molecular de 23.000 kDa, com papel importante no crescimento de células hematopoiéticas. A sua atividade biológica primária é a indução de colônias maduras de granulócitos e/ou macrófagos⁽²²⁾. Estudos prévios têm mostrado que o rhGM-CSF pode alterar a resposta imune à leishmania em humanos, por aumento da ativação macrofágica, indução de cicatrização e fibrose, e/ou por indução de uma resposta imune Th1 levando a uma apresentação mais eficaz de antígenos^(16,18,34).

Almeida et al. ⁽¹⁾ demonstraram, em um estudo duplo cego, randomizado, placebo controlado, que o uso rhGM-CSF intralesional na dose de 400µg, dividido em 2 doses de 200µg com intervalo de 7 dias, associado ao tratamento com antimonial (20mgSb^v/Kg/dia/20 dias, IV) na leishmaniose cutânea aumenta significativamente a chance de a lesão estar curada até 40 dias de tratamento (Figura 1). Esse tratamento também reduziu o tempo de cura em mais de 50% quando comparado com os pacientes tratados com antimonial e placebo. O tratamento com GM-CSF e antimônio aumentou significativamente a produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico no oitavo dia de tratamento, em relação ao grupo tratado com antimonial isoladamente. A IL-10 é uma citocina que inibe a resposta pró-inflamatória suprimindo a síntese de IFN-γ por células T ou suprimindo a função macrofágica, portanto, tem propriedades imunorregulatórias ⁽²⁶⁾. É possível que a falta de uma modulação adequada da resposta imune, que pode ser conseguida pela IL-10, contribua na exacerbação da inflamação e no dano tecidual na leishmaniose cutânea.

Com base na observação da eficácia da aplicação tópica de rhGM-CSF em baixa dosagem na cicatrização de úlceras da perna de origem vascular ⁽¹⁵⁾, avaliamos o uso do rhGM-CSF tópico em baixa dosagem (10µg/aplicação, 3 vezes por semana, por 3 semanas), associado ao antimonial pentavalente (20mgSb^v/Kg/dia/20 dias, IV), no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea em um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, comparando com o tratamento com antimonial e placebo. Houve diminuição significativa do tempo de cicatrização na leishmaniose cutânea em relação ao grupo placebo (Figura 2)⁽³²⁾, sem efeitos colaterais e sem recidiva da doença após um ano de acompanhamento. Estes dois estudos abrem uma grande perspectiva para o uso do GM-CSF no tratamento da leishmaniose cutânea como uma modalidade mais simples de tratamento, com o custo final mais baixo e que pode ser utilizado nas áreas endêmicas.

O imiquimod a 5% é um novo imunomodulador aprovado pelo Federal Drug Administration (FDA,

USA) para uso tópico como creme. Esta droga exhibe atividade antiviral *in vitro* e em modelos experimentais. Tem sido utilizada para o tratamento de verrugas genitais por HPV ⁽⁹⁾. Experimentalmente, o imiquimod foi efetivo para o tratamento da leishmaniose induzida em camundongos ⁽⁶⁾ e, *in vitro*, ativa macrófagos contra a leishmania ⁽²¹⁾. Um estudo aberto com 12 pacientes portadores de leishmaniose cutânea resistentes ao tratamento com antimonial isolado mostrou cura clínica em 90% dos pacientes seguidos com a associação do antimonial ao tratamento tópico com imiquimod uma vez ao dia durante 20 dias ⁽²⁾. Os resultados obtidos com esse estudo aberto apontam para a necessidade de uma demonstração dos mesmos resultados em um ensaio clínico randomizado, placebo controlado.

A falência terapêutica observada com o antimonial em todas as formas clínicas de leishmaniose e as reações adversas relacionadas à dose e duração do tratamento apontam para a necessidade de novas estratégias para o tratamento dessa doença. As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes tornam essa perspectiva terapêutica a mais promissora atualmente.

Imunoterapia da Leishmaniose Mucosa

A leishmaniose mucosa (LM) é uma forma grave de LTA que se associa a intensas deformidades e seqüelas. O fato de não se descrever cura espontânea nesta forma de leishmaniose, e a evolução lenta e progressiva da doença, que pode resultar em êxito letal ⁽²⁰⁾, sublinham a necessidade de se desenvolver um tratamento eficiente e seguro para essa enfermidade. No entanto, até o presente momento, a LM representa uma doença na qual um tratamento associado a alto índice de cura e baixa morbidade permanecem um desafio.

Quimioterapia específica

O emprego do Sb^v ainda é a melhor opção terapêutica no controle da LM, mesmo após 50 anos da sua introdução no arsenal de medicamentos usados

Figura 1. Curva de Kaplan-Meier do ensaio clínico, randomizado, duplo cego, placebo controlado, usando GM-CSF intralesional (200 μ g) por injeção, em 2 doses com intervalo de 8 dias associado ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV) e salina intralesional associado ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV). A curva mostra a proporção de pacientes não curados com GM-CSF associado ao antimônio (——) e placebo associado ao antimônio (.....) após seguimento clínico de 360 dias.

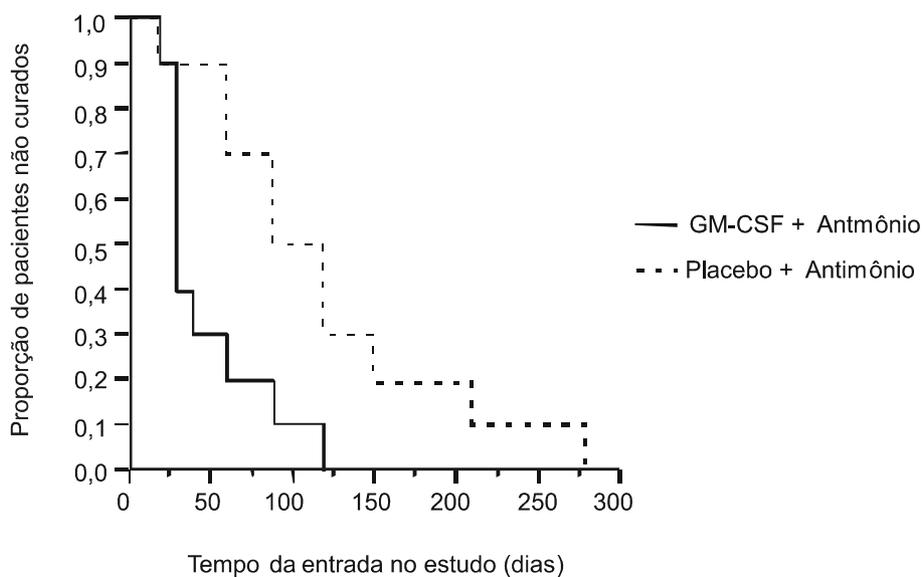
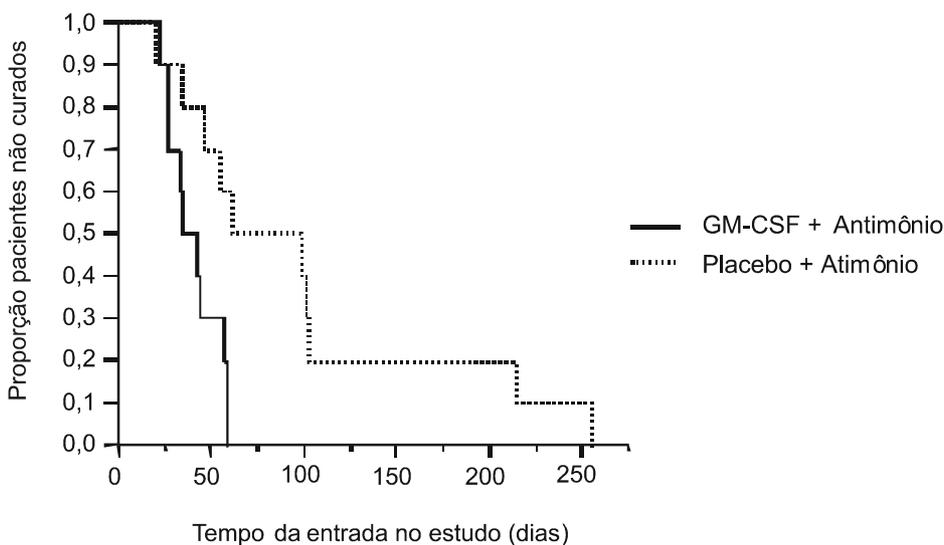


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier do ensaio clínico, randomizado, duplo cego, placebo controlado, usando GM-CSF aplicado topicamente sobre a lesão (10 μ g) por aplicação, em 9 doses, 3 vezes por semana, por 3 semanas, associado ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV) e salina aplicada topicamente nos mesmos intervalos acima, associada ao antimônio pentavalente (20mg/Kg/dia, 20 dias, IV). A curva mostra a proporção de pacientes não curados com GM-CSF associado ao antimônio (——) e placebo associado ao antimônio (.....) após seguimento clínico de 360 dias.



na LTA⁽¹⁴⁾. Embora a maioria dos pacientes sejam curados com esse medicamento, a necessidade de usar doses elevadas (20 mg/Kg/dia) e por um longo período de tempo (30 dias) muitas vezes resulta no aparecimento de toxicidade, que pode impedir a manutenção da droga. Adicionalmente, muitos pacientes podem precisar de nova(s) série(s) de tratamento, aumentando a incidência de efeitos colaterais e o custo do tratamento. A resposta ao uso de Sb^v em pacientes com LM é variável. Falha terapêutica tem sido relatada em até 37% dos casos⁽²⁹⁾, enquanto um estudo realizado em Corte de Pedra/BA documentou que 17% dos pacientes com LTA, causada por *L. braziliensis*, tratados com Sb^v, apresentam recidiva em períodos variáveis de tempo⁽²⁵⁾. Diversos efeitos colaterais têm sido associados ao uso do Sb^v, incluindo artralgia, mialgia, dor abdominal, náuseas, cefaléia, cardiotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas e de enzimas pancreáticas. A anfotericina B é a melhor opção para os pacientes com LM não responsiva a antimonial pentavalente, porém seu emprego requer hospitalização e sua utilização é limitada pela toxicidade⁽²⁰⁾.

Imunoterapia

O racional para o emprego de imunoterapia no tratamento da LM tem por base a presença de um intenso infiltrado inflamatório tecidual, contrastando com a pequena quantidade (nem sempre detectável) de parasitas *in situ*⁽⁴⁾, e exacerbação da resposta de imunidade celular contra o agente parasitário⁽⁷⁾. Embora a análise da expressão de RNA mensageiro para citocinas na lesão mucosa mostre um padrão misto Th1 e Th2, com predominância de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10⁽²⁷⁾, um estudo recente, realizado por nosso grupo⁽³⁾, mostrou alta produção de IFN- γ e TNF- α no sangue periférico, cuja principal fonte são as células CD4+. Adicionalmente, a adição de IL-10 ou TGF- β neste sistema não é capaz de modular a alta produção dessas citocinas inflamatórias.

Diversos estudos indicam uma importante participação do TNF- α na gênese da lesão tecidual nos pacientes com LM: alta produção de TNF- α *in vivo* evidenciada pelos níveis elevados dessa citocina

no soro de pacientes com LM, comparados aos pacientes com LC⁽⁸⁾; alta produção por células mononucleares do sangue periférico em resposta aos antígenos de *Leishmania*⁽²⁸⁾; e diminuição dos níveis de TNF- α após o tratamento da LM⁽¹⁰⁾. Essa elevada produção de TNF- α e também de IFN- γ contribuiu para a síntese de óxido nítrico⁽¹⁹⁾ e para a destruição da *Leishmania*; porém, uma alta produção dessas citocinas pró-inflamatórias pode também resultar em uma intensa resposta inflamatória e dano tecidual. Esses dados sugerem que uma intervenção terapêutica baseada na diminuição dos níveis de TNF- α poderia beneficiar esses pacientes, a exemplo do eritema nodoso hansênico onde a talidomida e a pentoxifilina são empregadas com sucesso, através da inibição da síntese desta citocina^(31,33,35).

A pentoxifilina é uma droga de efeito vasodilatador, causando diminuição da adesividade e agregação plaquetária⁽³⁰⁾. A atuação da pentoxifilina no bloqueio da produção de TNF- α ocorre através da inibição da transcrição do gene para esta citocina⁽¹¹⁾. Outras ações no sistema imune e seus efeitos já foram descritos: aumento da quimiotaxia e deformidade leucocitária; diminuição da resposta leucocitária a IL-1 e TNF; inibição da ativação de linfócitos T e B e da atividade de células NK^(30,36,37).

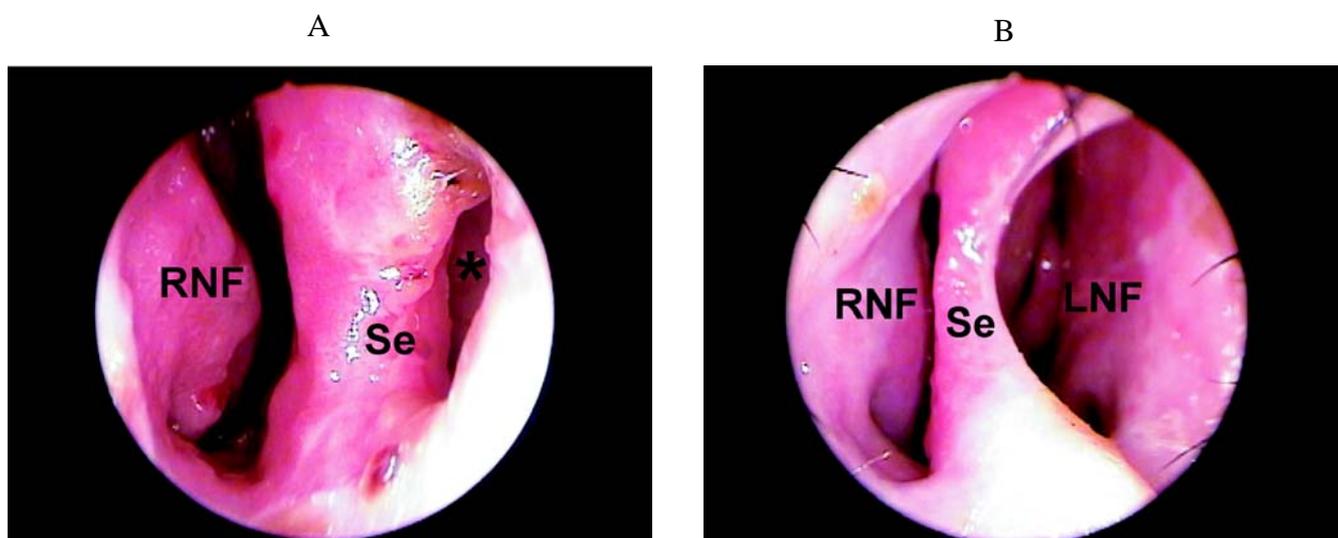
Em nosso estudo, a associação da pentoxifilina com antimonial foi avaliada em 10 pacientes com LM refratária, ou seja, com falha de pelo menos 2 séries de tratamento com Sb^v. A Tabela 1 mostra o perfil clínico dos pacientes. O acompanhamento otorrinolaringológico foi realizado a cada 30 dias, até, no mínimo, 1 ano, sendo depois realizado a cada 90 dias. O tratamento foi realizado com Sb^v na dose padrão de 20 mg/Kg/dia associado à pentoxifilina na dose de 400 mg, 3 vezes ao dia, durante 30 dias⁽¹⁷⁾. A cura foi documentada em 9 pacientes, ocorrendo em menos de 60 dias (8 casos) e 90 dias (1 caso) do início do tratamento. O único paciente com falha terapêutica apresentava longa duração da doença (128 meses) e já havia utilizado oito séries de Sb^v. Os níveis de TNF- α antes do tratamento (776 ± 342 pg/mL), caíram para 94 ± 57 pg/mL ($p < 0,05$) após 60 dias de tratamento. A associação medicamentosa da

Tabela 1. Perfil clínico dos pacientes com leishmaniose mucosa refratária

Paciente	Idade/Gênero	Leishmaniose cutânea prévia (meses)	Duração da doença mucosa (meses)	Reação de Montenegro (mm)	Séries prévias de antimônio	Doença nasal
TCM	10/F	Não	12	13	2	perfuração do septo
RJS	11/F	108	14	15	4	úlceras superficiais
MSS	23/M	120	9	25	2	deformidade da pirâmide nasal e perfuração do septo
MC	43/M	6	5	21	2	perfuração do septo
RSS	16/M	36	128	15	8	perfuração do septo
AES	21/M	36	6	27	2	úlceras profundas
RS	31/M	6	6	24	2	úlceras profundas
JTB	26/M	Não	5	15	2	úlceras profundas
JGS	51/M	132	108	13	4	perfuração do septo
LLS	58/M	360	6	14	3	úlceras profundas

Todos os pacientes apresentavam um teste cutâneo positivo para *Leishmania*, diagnóstico de leishmaniose mucosa por cultura para *Leishmania* ou histopatológico, e apresentaram falha terapêutica em pelo menos duas séries de antimônio pentavalente.

Figura 3. Aspecto clínico da leishmaniose mucosa. 3A - Leishmaniose mucosa com infiltração granulomatosa na fossa nasal direita e perfuração septal (RNF – fossa nasal direita; Se – septo; * - perfuração septal). 3B - Reepitelização completa da mucosa e da perfuração septal 90 dias após o início do tratamento no grupo da pentoxifilina (RNF – fossa nasal direita; Se – septo; LNF – fossa nasal esquerda).



pentoxifilina com antimonial foi segura e apenas um paciente apresentou náusea, sem necessidade de suspender o uso das medicações. O acompanhamento posterior dos 9 pacientes já completou 4 de evolução, sem documentação de recidiva em nenhum dos casos. Não existe nenhuma evidência de que a pentoxifilina destrua diretamente a *Leishmania in vitro* ou tenha capacidade de ativar macrófagos. Portanto, a maior contribuição da pentoxifilina na resposta terapêutica observada nesse estudo parece se dever a uma redução na reação inflamatória por inibição na produção do TNF- α e, conseqüentemente, ao dano tecidual. Além disso, o efeito vasodilatador da droga poderia permitir um maior acesso dos mecanismos de defesa e/ou do antimonial pentavalente no tecido e, por conseqüência, maior destruição da *Leishmania*.

Esses resultados positivos tornaram necessário um estudo controlado com placebo no sentido de confirmar o benefício desta associação no manejo eficiente da leishmaniose mucosa. Um ensaio clínico, duplo-cego e randomizado, foi realizado para avaliar o uso de pentoxifilina associada ao antimonial pentavalente comparado com Sb^v isolado em 23 pacientes sem tratamento prévio. Todos os pacientes do estudo apresentavam doença grave, com presença de granulação e perfuração septal, ou ulceração mucosa. Os pacientes foram tratados com Sb^v (20mg/Kg/dia) e pentoxifilina oral (400 mg, 3 vezes ao dia) por 30 dias ou Sb^v (20mg/Kg/dia) e placebo oral (3 vezes ao dia) pelo mesmo período. Todos os pacientes do grupo da pentoxifilina foram curados em até 90 dias após uma série de tratamento, enquanto 5 dos 12 pacientes do grupo placebo (41,6%) necessitaram de uma segunda série para obter a cura (Figuras 3A e 3B). O tempo de cicatrização no grupo da pentoxifilina foi de $84,5 \pm 38,7$ dias comparado a $145,8 \pm 98,6$ dias no grupo placebo ($p=0,039$). Nenhuma recidiva foi documentada em ambos os grupos após, no mínimo, um ano de acompanhamento. Esses dados demonstram que a associação da pentoxifilina ao tratamento padrão com antimonial pentavalente na LM acelera o tempo de cura da doença, evitando o uso de séries adicionais de Sb^v ao curar 100% dos casos.

Esses resultados demonstram que a pentoxifilina em associação com Sb^v foi capaz de curar pacientes com uma forma refratária de LM de maneira segura e eficiente, dado confirmado por estudo controlado com placebo em pacientes com doença grave, no qual a primeira série de tratamento com a associação curou todos os casos. Esse fato merece ser ressaltado já que a LM muitas vezes está associada a uma alta falha terapêutica e que a anfotericina B, droga de segunda escolha nessa situação, possui inúmeros efeitos colaterais, exigindo hospitalização geralmente prolongada. Nossos dados permitem a recomendação de que todos os pacientes com o quadro de LM grave ou não responsiva ao uso inicial de monoterapia com Sb^v sejam tratados com a associação de antimonial e pentoxifilina, antes do uso de outras drogas. Adicionalmente, a comprovação de que a imunoterapia, tendo como o alvo o TNF- α , na LM é eficaz, abre perspectivas para a realização de outros ensaios terapêuticos com outros medicamentos de ação semelhante, ou a própria pentoxifilina, em associação com Sb^v em doses menores, com o benefício de maior praticidade assistencial na zona rural e menor toxicidade para os pacientes. Esta contribuição pode ser inestimável para o controle desta doença intrigante e grave que atinge uma parcela considerável de indivíduos em idade produtiva no meio rural, onde a carência de assistência médica é uma realidade.

Referências Bibliográficas

1. Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, Ribeiro de Jesus A, Mobashery N, Santos JB, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1735-1737, 1999.
2. Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najar E, Alvarez E, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases* 33(11): 1847-1851, 2001.

3. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-6740, 2002.
4. Bittencourt AL & Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 51-56, 1991.
5. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-194, 1996.
6. Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *Journal of Infectious Diseases*, 179:1485-94, 1999.
7. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JLM, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 135: 4144-8, 1985.
8. Castés M, Trujillo O, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biological Research* 26: 233-238, 1993.
9. Cox JT, Petry KU, Rylander E, Roy M.J Using imiquimod for genital warts in female patients. *Womens Health (Larchmt)* 13(3): 265-271, 2004.
10. Da-Cruz AM, Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SCF, Coutinho SG. Tumor Necrosis Factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.
11. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM & Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 110: 192-198, 1991.
12. Falcoff E, Taranto NJ, Remondegui CE, Dedet JP, Canini LM, Ripoll CM, Dimier-David L, Vargas F, Giménez LP, Bernabó JG, Bottasso AO. Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon-gamma and pentavalent antimonial compounds. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 95-97, 1994.
13. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 34: E54-8, 2002.
14. Herwaldt BL & Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46: 296-306, 1992.
15. Jaschke E, Zabernigg A, Gattinger C. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *International Journal of Dermatology* 38: 380-386, 1999.
16. Jones TC. The effects of rhGM-CSF on macrophage function. *European Journal of Cancer* 29: 10-13, 1993.
17. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 87-89, 2001.
18. Lieschke GL, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. *New England Journal of Medicine* 327: 99-106, 1992.
19. Liew FY. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and auto-immune diseases. *Immunology Letter* 43: 95-98, 1994.
20. Marsden, PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27: 93-101, 1994.
21. Martin-Garcia RF. New insights into imiquimod's mechanisms of action. *Drugs Dermatology* 3(3): 247-249, 2004.
22. Metcalf D & Burgess AW. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *Journal of Cellular Physiology* 111: 275-283, 1982.
23. Nabors GS & Farrell JP. Depletion of IL-4 in BALB/c mice with established *L. major* infections increases the efficacy of antimony therapy and promotes Th1 like responses. *Infection & Immunity* 62: 5498-5504, 1994.
24. Nabors GS, Afonso LCC, Farrell JP, Scott P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *L. major* infection in mice is induced by combined therapy with IL-12 and pentostam. *Proceedings of National Academy Science USA* 92: 3142-3146, 1995.
25. Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Barreto AC, Badaró R, Johnson WD, Jones TC. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 84: 367-370, 1990.
26. Oppenheim JJ & Ruscetti FW. Cytokines In: Stites DP, Terr IA, Parslow TG (ed.), *Medical Immunology*, 9th ed., Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 146-168, 1997.
27. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F & Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* 91: 1390-1395, 1993.

28. Ribeiro de Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 143-8, 1998.
29. Saenz RE, de Rodrigues CG, Johnson CM, Berman JD. Efficacy and toxicity of pentostam against panamensis mucosal leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 394-398, 1991.
30. Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline. *Journal Am Acad Dermatology* 30: 603-621, 1994.
31. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JAC, Miguel CP, Viana SM, Sarno EN. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *Journal of Infectious Diseases* 169: 408-414, 1993.
32. Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, Magalhaes A, Salgado K, Carvalho EM, Almeida RP. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Infectious Diseases* 190(10): 1793-1796, 2004.
33. Sarno EN, Grau GE, Vieira IMM, Nery JAC. Serum levels of TNF α and IL-1 during leprosy reactional states. *Clinical Experimental Immunology* 84: 103-108, 1991.
34. Stanley IJ, Burgess AW. GM-CSF stimulates the synthesis of membrane and nuclear proteins in murine neutrophils. *Journal Cellular Biochemistry* 23: 241-258, 1983.
35. Talhari S, Orsi AT, Talhari AC, Souza FH, Ferreira LC. Pentoxifylline may be useful in the treatment of type 2 leprosy reaction. *Leprosy Rev* 66: 261-263, 1995.
36. Ward A & Clissold SP. Pentoxifylline: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 34: 50-98, 1987.
37. Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology* 187: 447-463, 1993.