



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

MEDICINA

GABRIEL FREIRE CARVALHO

**GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM HUMANOS:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Salvador – Bahia

2022

GABRIEL FREIRE CARVALHO

**GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM HUMANOS:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado ao curso de graduação
em Medicina da Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública como
requisito da disciplina de
Introdução à Metodologia da
Pesquisa

Orientador: Tarcísio Vila Verde
Santana de Almeida

Salvador – Bahia

2022

GABRIEL FREIRE CARVALHO

**GM-CSF NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM HUMANOS:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado ao curso de graduação em
Medicina da Escola Bahiana de Medicina
e Saúde Pública como requisito da
disciplina de Introdução à Metodologia
da Pesquisa

Orientador: Tarcísio Vila Verde Santana
de Almeida

Salvador, _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Avaliador

Prof. Avaliador

Prof. Avaliador

RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Tegumentar Cutânea é uma zoonose de grande impacto na Saúde Pública mundial. No Brasil, ela se constitui uma doença endêmica que afeta regiões de maneira desigual, e que apesar de haver tratamento, não se tem tido grandes avanços em sua terapêutica ao longo das décadas. Algumas terapias alternativas vêm sendo testadas, com resultados conflitantes entre os estudos. Dentre essas, o GM-CSF tópico tem apresentado um potencial curativo e leishmanicida que auxilia o tratamento padrão e por isso justifica o embasamento de pesquisas sobre a sua eficácia. **Objetivo:** Avaliar o GM-CSF como coadjuvante para o tratamento de Leishmaniose Cutânea em humanos. **Métodos:** O estudo é uma revisão sistemática, cujas bases de dados utilizadas foram PubMed/MEDLINE e Cochrane. Os artigos escolhidos foram Ensaio Clínico Randomizado e os descritores utilizados foram: “Cutaneous Leishmaniasis”, “GM-CSF”, “Antimonials” e “Treatment”, sendo o resultado da busca somando-se descritores com operadores booleanos: “Cutaneous Leishmaniasis AND GM-CSF AND Antimonials AND Treatment”. **Resultados:** Foram achados 13 artigos na PubMed e 6 na Cochrane, dos quais 4 foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e submetidos a avaliação pela Escala de Jadad, sendo, portanto, os 4 incluídos na revisão sistemática. Dentre estes estudos, 2 demonstraram resultados positivos no uso do GM-CSF associado com o antimônio pentavalente, no entanto, ambos tinham um tamanho amostral muito pequeno que não sustentavam a conclusão do estudo. Os outros dois estudos tinham um tamanho amostral maior, porém os autores não conseguiram demonstrar diferenças estatísticas significativas entre os grupos que usaram o GM-CSF associado com miltefosine e os que não utilizaram. **Conclusão:** Diante dos resultados, evidências que respaldem a utilização do GM-CSF como terapia coadjuvante para a Leishmaniose Tegumentar Cutânea ainda são escassas. Portanto, é importante que haja um maior número de estudos robustos, com tamanho amostral suficiente, para validá-lo como uma alternativa terapêutica à terapia clássica.

Palavra-chave: Leishmaniose Cutânea; GM-CSF; Antimoniais; Tratamento.

ABSTRACT

Introduction: Cutaneous Tegumentary Leishmaniasis is a zoonosis of great impact on Public Health worldwide. In Brazil, it is an endemic disease that affects regions unequally, and despite having treatment, there have been no major advances in its therapy over the decades. Some alternative therapies have been tested, with conflicting results among studies. Among these, topical GM-CSF has shown a curative and leishmanicidal potential that helps the standard treatment and therefore justifies the basis of research on its effectiveness. **Objective:** To evaluate GM-CSF as an adjunct for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis in humans. **Methods:** The study is a systematic review, whose databases used were PubMed/MEDLINE and Cochrane. The articles chosen were Randomized Clinical Trials and the descriptors used were: “Cutaneous Leishmaniasis”, “GM-CSF”, “Antimonials” and “Treatment”, being the search result adding descriptors with Boolean operators: “Cutaneous Leishmaniasis AND GM-CSF AND Antimonials AND Treatment”. **Results:** Thirteen articles were found in PubMed and 6 in Cochrane, of which 4 were selected according to the inclusion and exclusion criteria and submitted to evaluation by the Jadad Scale, therefore, the 4 were included in the systematic review. Among these studies, 2 showed positive results in the use of GM-CSF associated with pentavalent antimony, however, both had a very small sample size that did not support the conclusion of the study. The other two studies had a larger sample size, but the authors were unable to demonstrate statistically significant differences between the groups that used GM-CSF associated with miltefosine and those that did not. **Conclusion:** Given the results, there is still evidence that the use of GM-CSF was affected as adjunctive therapy for Cutaneous Tegumentary Leishmaniasis. Therefore, there is a greater number of robust studies, with sufficient size, to validate it as a therapeutic alternative to classical therapy.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; GM-CSF; Antimonials; Treatment.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	8
3 METODOLOGIA	8
3.1 Desenho de estudo	8
3.2 Estratégia de busca	8
3.3 Critérios de inclusão e exclusão	8
3.4 Identificação e seleção dos estudos	9
3.5 Extração dos dados	9
3.6 Avaliação da qualidade metodológica	9
3.7 Aspectos éticos	9
4 REVISÃO DE LITERATURA	10
4.1 Leishmaniose Tegumentar Americana	10
4.2 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar	10
4.3 Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar e suas formas clínicas	11
4.4 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar	14
5 RESULTADOS	15
5.1 Seleção dos estudos	15
5.2 Características gerais dos estudos	15
5.3 Descrição dos estudos e seus resultados	17
5.4 Avaliação de vieses dos estudos	20
6 DISCUSSÃO	21
7 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO:

As Leishmanioses são zoonoses causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e constituem um importante problema de Saúde Pública mundialmente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em média haja 350 milhões de pessoas que estão em áreas de risco para contraírem o parasito, sendo que aproximadamente 2 milhões de pessoas desenvolvem alguma forma da doença, que costuma ser dividida em dois tipos principais: Tegumentar e visceral, sendo a Tegumentar subdividida em cutânea, mucocutânea, disseminada e cutânea difusa (1) (2).

No Brasil, a Leishmaniose tegumentar (LT) é uma das doenças dermatológicas que mais produz impactos sociais, econômicos e psicológicos principalmente por conta de sua capacidade de gerar deformidades no Ser Humano, especialmente no rosto, além de levar a custos excessivos ao Estado devido ao absenteísmo de trabalhos que ela provoca, ter um longo tempo de cura e a sua forma de tratamento mais utilizada (antimônios pentavalentes) requerer aplicação intravenosa em unidade de saúde (3). Ela é uma afecção que está distribuída por todo território nacional, prevalecendo em todas as regiões do país, tendo um coeficiente de detecção médio anual de 18,5 casos/100 mil habitantes entre os anos de 1985 e 2005 (4).

É nessa perspectiva que se demonstra a necessidade de se identificar os casos de LT e assim tratá-los da devida maneira. Dentre as formas de tratamentos atuais, os antimoniais pentavalentes, como já foi mencionado, são as drogas mais utilizadas, como o Glucantime® e o Pentostam®. No entanto, tais medicamentos são usados desde 1945, e costumam causar efeitos tóxicos importantes, além de serem custosos, visto que são administrados por via endovenosa e o tratamento costuma ser demorado, podendo ainda haver refratariedade das lesões (5)

Visto que, a terapia clássica apresenta limitações e a resposta imune exacerbada está diretamente ligada à patogênese das lesões na LT, estratégias terapêuticas que visam a modulação dessa resposta podem constituir uma alternativa viável para o tratamento da doença. Nesse sentido, imunomoduladores têm sido utilizados em associação com o antimonial ou outras drogas como uma nova abordagem para a terapia da LT (6) (7) (8).

Diante desse contexto, surgiram vários ensaios clínicos randomizados que buscavam atestar a eficácia das terapias alternativas imunomoduladoras promissoras para a Leishmaniose Tegumentar, mais especificamente a cutânea. Dentre tais alternativas terapêuticas, o GM-CSF tem demonstrado potencial imunomodulador e curativo quando associado a drogas já comumente usadas, baseando-se principalmente em estudos experimentais e ECRs. Assim, com o intuito de sintetizar e avaliar os resultados, se faz necessário uma pesquisa de revisão sistemática que aborde os estudos clínicos com GM-CSF para serem avaliados, e com isso entender se há um benefício real para o paciente na sua utilização.

2. OBJETIVO

Avaliar o GM-CSF como coadjuvante para o tratamento de Leishmaniose Cutânea em humanos.

3. METODOLOGIA:

3.1. Desenho do estudo

O estudo é uma Revisão Sistemática, se caracterizando como secundário quanto a base de dados colhidos, com foco em trabalhos clínicos.

3.2. Estratégia de busca

A coleta dos dados foi realizada nas bases de dados eletrônicas PubMed/MEDLINE e Cochrane Library, utilizando-se de descritores em saúde que incluíram trabalhos em inglês e português. A estratégia de busca se baseou na estratégia PICO e utilizou-se das seguintes palavras-chave para cada parte:

P – Cutaneous Leishmaniasis

I – GM-CSF.

C – Antimonials

O – Treatment

O resultado da busca juntando as palavras-chaves e os operadores booleanos ficou: Cutaneous Leishmaniasis AND GM-CSF AND Antimonials AND Treatment.

3.3. Critérios de inclusão e exclusão

Os artigos coletados foram do tipo Ensaio Clínico Randomizado produzidos a partir dos anos 1999, e que estavam acessíveis a todos (open access), revisados por pares e disponíveis nas línguas inglesas ou portuguesas. Foram selecionados artigos que utilizaram o imunomodulador GM-CSF como forma de tratamento coadjuvante para Leishmaniose Cutânea em humanos e comparado com grupo controle que se utilizou de Antimônio Pentavalente.

Foram excluídos artigos de revisão, experimentais, trabalhos com não-humanos, não-randomizados, estudos que não respondessem ao objetivo da pesquisa, títulos ou resumos que não abordassem a temática central do trabalho e estudos que falassem sobre outros tipos de leishmanioses que não a cutânea.

3.4. Identificação e seleção dos estudos

Os trabalhos foram identificados por dois autores que realizaram, de forma independente, a leitura dos seus títulos e resumos, avaliando-os conforme critérios de inclusão e exclusão. Os trabalhos que não apresentaram resumos e não foram excluídos por título, assim como os artigos cujo resumo não era suficiente para avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, foram triados para leitura do texto completo, para definição de sua elegibilidade.

3.5. Extração dos dados

Foram extraídos dos estudos dados como nome dos autores, ano e revista de publicação, desenho do estudo, amostra utilizada, descrição dos participantes, critérios utilizados para diagnóstico de LC, intervenção realizada, desfecho do tratamento, critérios e taxas de cura e tempo de cicatrização da lesão.

3.6. Avaliação da qualidade metodológica

Após leitura dos artigos selecionados, foi utilizado a Escala de Jadad (0 a 5 pontos) para avaliar a qualidade dos ensaios clínicos randomizados, e considerou-se satisfatório aqueles que alcançassem pelo menos 3 pontos (maior ou igual a 3 pontos = menor risco de viés; menor que 3 pontos = maior risco de viés). A distribuição dos pontos dessa escala se dá da seguinte maneira:

Houve randomização? Sim = 1 ponto; de boa qualidade (descrito) = 2 pontos; de má qualidade = -1 ponto.

Houve cegamento? Sim = 1 ponto; boa qualidade (descrito) = 2 pontos; de má qualidade = -1 ponto

Houve detalhamentos sobre o acompanhamento de cada caso? Sim = 1 ponto; não = 0 pontos (9)

3.7. Aspectos Éticos

Por ser uma revisão sistemática, não foi necessária aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença parasitária não contagiosa que afeta pele e mucosas e é causada por protozoários que pertencem ao gênero *Leishmania* e à família Trypanosomatidae, sendo que existe uma variedade considerável de espécies capazes de gerar a doença no homem, apesar de haver também espécies que parasitam animais (10,11). As espécies que parasitam humanos mais prevalentes no Brasil são a *L. Braziliensis* e a *L. guyanensis* (12). Estes parasitos são intracelulares obrigatórios e possuem duas formas principais: amastigota e promastigota. A primeira é uma forma aflagelada que parasita tecidos dos hospedeiros humanos, enquanto a segunda é flagelada e está presente no tubo digestivo do inseto vetor (2). A transmissão do parasito ao humano (hospedeiro definitivo) se dá através da picada de insetos hematófagos (hospedeiros intermediários) conhecidos genericamente como flebotomíneos, sendo que pelo menos 35 espécies destes invertebrados estão envolvidas no ciclo de transmissão. Estes insetos, em geral, se infectam ao se alimentar do sangue de animais que funcionam como reservatórios dos protozoários. Nos flebotomíneos, como já foi mencionado, o protozoário se encontra na forma promastigota, e ao ocorrer a picada nos mamíferos, os flagelos da *Leishmania* ajudam ao parasita se mover, e alcançar a corrente sanguínea, parasitando principalmente macrófagos, na pele, mucosas e vísceras. Nestes locais, os protozoários passam então a se multiplicar por divisão binária sob a forma amastigota. Com isso, outros insetos não infectados ao fazerem o repasto sanguíneo se alimentam do sangue infectado dos vertebrados com células contendo amastigotas e estas então alcançam o tubo digestivo deles onde são transformadas em promastigotas, fazem divisão binária, fechando o ciclo de transmissão (10,11).

4.2. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar

O diagnóstico engloba a forma clínica e laboratorial. No primeiro caso, devido a grande variação nas formas que essa doença pode assumir, é necessário avaliar a localização das lesões, o tamanho que elas possuem, a quantidade delas e o padrão das lesões, sendo que a partir disso é possível classificar o tipo de Leishmaniose e consequentemente realizar o seu diagnóstico clínico. Vale dizer que o diagnóstico clínico é casado com o epidemiológico, visto que a suspeita de Leishmaniose está diretamente associada a presença dessa doença no meio em que o paciente está inserido (2,4,10). Apesar disso, não se exclui a necessidade de estudos laboratoriais para se confirmar o diagnóstico clínico. Dentre os exames disponíveis, testes imunológicos como os sorológicos e de reação intradérmica de Montenegro podem ser utilizados, apesar de serem muito sensíveis e pouco específicos. O diagnóstico

de certeza pode ser dado por meio da avaliação parasitológica direta ou indireta (como a reação imunofluorescente) do agente, sendo que a direta é largamente mais utilizada, na qual retira-se um fragmento da lesão (por meio de escarificação, biópsia com impressão por aposição ou punção aspirativa) que é enviado para análise histopatológica e verificado a presença de amastigotas no tecido. É importante ressaltar que nesse caso, quanto mais tempo se passa a partir do início da lesão cutânea, menores são as chances de o resultado da avaliação histopatológica ser positiva. Devido a isso, considera-se que a sensibilidade destes testes é baixa, porém a especificidade é alta. Técnicas moleculares também podem ser usadas para o diagnóstico, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), porém o custo é elevado e costuma ser mais utilizado em pesquisas científicas (2,13).

4.3. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar e suas formas clínicas

Quando o parasita adentra o homem, a principal linha de defesa são as células do sistema imune inato por meio do reconhecimento dos Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através dos Receptores semelhantes a Toll ou TLRs. As principais células envolvidas nesse momento são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CD), células Natural Killer (NK) e ainda citocinas, quimiocinas e moléculas do sistema complemento. O parasito por sua vez, ao ser fagocitado é capaz de sobreviver no interior dos fagócitos (macrófagos, CDs e neutrófilos) tornando parte dessas células reservatórios da infecção, além de estimular a produção de citocinas pro-inflamatórias como a IL-12 e quimiocinas que irão estimular a resposta inflamatória e recrutar outras células para o local, entre elas células NK (que liberam INF- γ e TNF- α) (14,15).

Baseado nisso, a depender de como a resposta adaptativa é organizada, pode-se desenvolver quatro formas variadas de Leishmaniose Tegumentar: cutânea, mucosa, disseminada e cutânea difusa. Dentre estas, as mais prevalentes são as duas primeiras, e elas tem relação com qual resposta será mais predominante, se Th1 (inflamatória) ou Th2, apesar de haver participação também da Treg nas duas situações. Nesse sentido, é importante ressaltar que a resposta Th1 é a mais favorável para o enfrentamento da infecção, porém uma resposta exacerbada pode trazer complicações, assim como a sua deficiência. Assim, no caso da Leishmaniose cutânea, é esperado que haja uma resposta predominantemente tipo 1, com produção elevada de IFN- γ e TNF- α e baixos níveis de IL-5 e IL-10 quando estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). Por esse motivo, a Leishmaniose cutânea se apresenta clinicamente com uma ou mais lesões ulceradas com fundo granuloso e bordas elevadas, restritas ao local de infecção, com intenso infiltrado inflamatório. Já a Leishmaniose mucosa, também possui uma resposta predominantemente tipo 1, porém é ainda mais exacerbada do que na forma cutânea, com produção de IFN- γ e TNF- α em maior concentração quando estimuladas com SLA, além de menor

produção de IL-10. Logo, a forma clínica em que a leishmaniose mucosa se apresenta costuma ter uma resposta inflamatória mais agressiva do que na cutânea, levando a uma destruição das mucosas, principalmente a nasal, mas podendo afetar palato, faringe e laringe, gerando lesões desfigurantes nos rostos das pessoas. No caso da Leishmaniose disseminada, o que se tem é uma baixa resposta Th1 e elevada resposta tipo 2, com produção menor de IFN- γ e TNF- α quando comparado a forma cutânea e maior liberação de IL-10, todos sob o estímulo da SLA. Isto favorece a disseminação hematogênica do parasito visto que a resposta imunológica inflamatória não é suficiente para impedir que o protozoário se disperse. Assim, a forma clínica na qual a leishmaniose disseminada se apresenta costuma haver febre (sintoma sistêmico), além de múltiplas lesões espalhadas pelo corpo, que podem ser acneiforme nodulares ou ulceradas. Por fim, a Leishmaniose cutânea difusa representa o que há de mais extremo quando se fala em resposta predominantemente tipo 2, pois praticamente não há resposta contra o parasita, havendo pouca ou nenhuma produção de IFN- γ e grandes quantidades de IL-10 e IL-4. A sua apresentação clínica costuma ser caracterizada por nódulos espalhados por todo o corpo e podendo haver sintomas parecidos com os observados na leishmaniose visceral (16) (1).

	Resposta tipo 1	Treg	Resposta tipo 2	Consequência
LC	++++	++	+	Lesão tecidual mediada por citocinas pro-inflamatórias
LM	+++++	-	+/-	Lesão tecidual mediada por citocinas pro-inflamatórias
ID	+++	+++	++	Disseminação c/ controle da multiplicação do parasito
LCD	-	+++	++++	Multiplicação e disseminação do parasito

Figura 1 – Tipos de resposta inflamatória baseado na forma clínica da Leishmania Tegumentar e suas consequências. LC: Leishmania Cutânea; LM: Leishmania Mucosa; LD: Leishmania Disseminada; LCD: Leishmania Cutânea Difusa. Fonte: (1)



Figura 2 – Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar – De cima para baixo: Leishmaniose cutânea, Leishmaniose mucosa, Leishmaniose disseminada e Leishmaniose cutânea difusa. Fonte: Ministério da Saúde, 2010 (adaptado).

4.4. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar

O padrão-ouro, no momento, são os antimoniais pentavalentes, sendo dois tipos principais utilizados: antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio. O mecanismo de ação desses fármacos ainda segue pouco conhecido, estando sua atividade leishmanicida ligada a inibição de processos celulares como glicólise e oxidação de ácidos graxos, o que leva a uma redução de ATP e GTP, substratos usados para a manutenção das células e conseqüentemente dos parasitos. Porém o tratamento é custoso, causa muitos efeitos colaterais graves aos pacientes, tendo eficácia mais baixa no tratamento da Leishmaniose mucosa, forma clínica com alta taxa de refratariedade. Assim, quando os antimônios não são bem tolerados ou não houve melhora dos sintomas, é prescrita anfotericina B como segunda escolha e pentamidina como terceira. No entanto, tais medicamentos também possuem limitações quanto a sua eficácia, e por esse motivo surgiram uma série de estudos buscando alternativas a essas terapias tradicionais visando a modulação da resposta imune sem atrapalhar a sua ação através de fármacos como a Pentoxifilina, Imiquimode, GM-CSF, miltefosine e outros (1,2). Em se tratando especificamente do GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), tem-se que é uma glicoproteína monomérica que é secretada por várias células (macrófagos, células T, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e outros), sendo que ela funciona como uma citocina, estimulando células-tronco da medula a produzirem granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monócitos (macrófagos e células dendríticas). Assim, ao aumentar a produção de células brancas, principalmente macrófagos, estimula a resposta imunológica contra invasores no sítio de infecção. Além disso, o GM-CSF também é capaz de melhorar a migração de células brancas maduras para os locais de infecção, o que ajuda no processo de destruição do protozoário da Leishmania, especialmente na forma cutânea (17,18). Ademais, há evidências de que o GM-CSF possui propriedades terapêuticas fundamentais no processo de cicatrização de feridas de diferentes etiologias como úlcera venosa crônica em pernas, úlceras de pressão, feridas leprosas, dentre outras (19). Nesse sentido, surgiu-se a hipótese de se testar o GM-CSF como tratamento coadjuvante para curar lesões de pele causadas por Leishmaniose Cutânea, tanto devido a sua propriedade leishmanicida, quanto pelo seu potencial cicatrizador (16). Sendo assim, o presente estudo se propôs analisar ECRs que se utilizaram do GM-CSF como método de tratamento coadjuvante, a fim de avaliar seus benefícios quando associados a outras drogas de primeira linha no tratamento da Leishmaniose Cutânea (4,5).

5. RESULTADOS

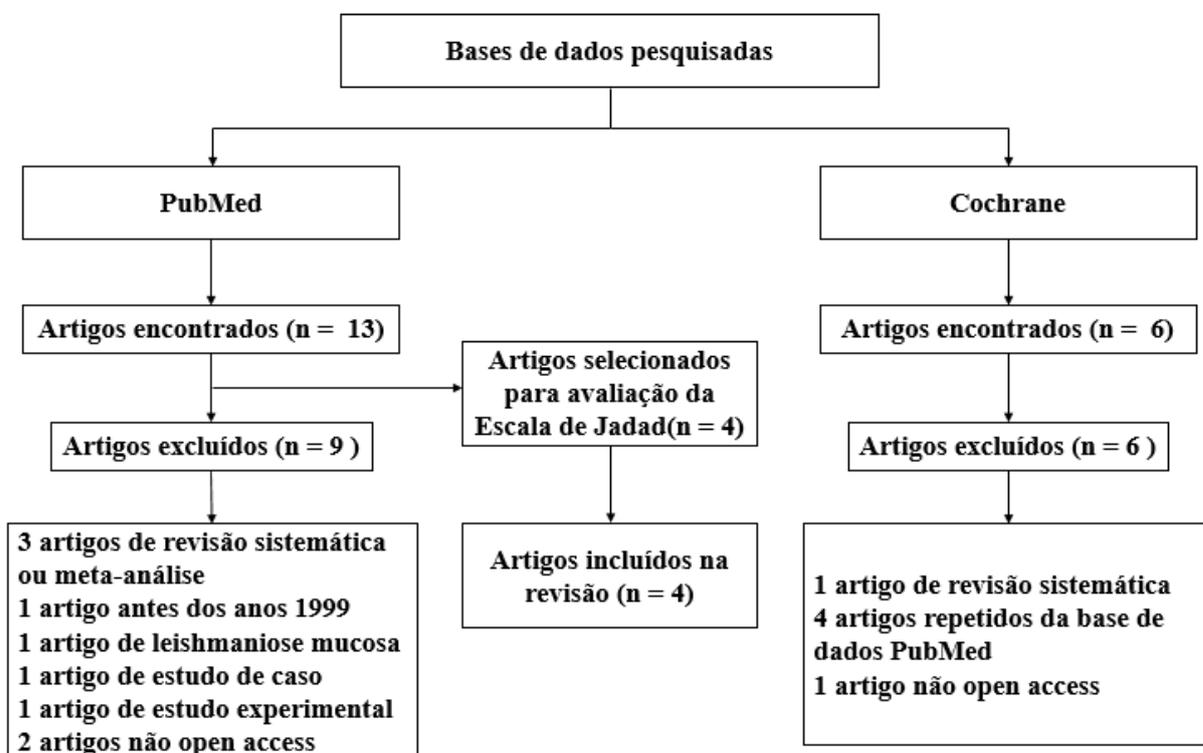
5.1. Seleção dos estudos

Após a realização da busca com as palavras-chaves nas bases de dados escolhidas, foram achados 13 artigos na PubMed/MEDLINE e 6 artigos na Cochrane. Na primeira base, foram excluídos 3 artigos por serem de revisão sistemática ou meta-análise, 1 artigos por terem sido publicados antes dos anos 1999, 1 artigo por ser de estudo experimental, 1 por se tratar de leishmaniose mucosa, 1 por ser um estudo de caso e 2 por não serem open access. Já na segunda base de dados, foram achados 6 resultados, sendo excluído 1 por se tratar de uma revisão sistemática, 4 por serem artigos repetidos da base de dados PubMed/MEDLINE e 1 por não estar aberto ao acesso. Resultando assim, em um total de 4 artigos coletados ao juntar as duas bases, os quais foram lidos na íntegra e avaliados em termos de qualidade segundo a Escala de Jadad, como descritos no **Quadro 1**, sendo que após a avaliação, os quatro artigos foram incluídos na revisão (**Figura 1**).

5.2. Características gerais dos estudos

Todos os artigos são ensaios clínicos randomizados publicados entre os anos 1999 e 2022, em inglês, e com duração variável (até 39 meses). Os quatro trabalhos foram realizados no Brasil, em dois estados: Amazonas (Manaus e regiões) e Bahia (Corte da Pedra e Jequiriça). Dois artigos foram publicados pela The Journal of Infectious Disease (médio impacto), 1 pela International Journal of Infectious Disease (Baixo impacto) e 1 pela Clinical Infectious Disease (alto impacto). A **Tabela 1** sintetiza as características descritas.

Figura 1. Fluxograma da seleção de estudos



Fonte: Elaboração dos autores.

Quadro 1. Avaliação da qualidade dos estudos segundo a Escala de Jadad

Escala de Jadad				
Autor/ano	ALMEIDA et al./1999	SANTOS et al./2004	MENDES et al./2020	MACHADO et al./2021
Houve randomização?	1	2	2	2
Houve cegamento?	2	2	1	1
Houve detalhamento sobre acompanhamento dos casos?	1	1	1	1
Total de pontos	4	5	4	4

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 1. Características dos estudos

Autor/ano	Idioma	Local	Duração (meses)	Periódico	Fator de impacto (2020)
ALMEIDA <i>et al.</i> /1999	inglês	Corte de Pedra	-	<i>The journal of Infectious disease</i>	5.226
SANTOS <i>et al.</i> /2004	inglês	Corte de Pedra	-	<i>The journal of Infectious disease</i>	5.226
MENDES <i>et al.</i> /2020	inglês	Manaus	20	<i>Internacional Journal of Infectious disease</i>	3.623
MACHADO <i>et al.</i> /2021	inglês	Corte de Pedra/ Jequiriça	39	<i>Clinical Infectious Disease</i>	9.079

Fonte: Dados retirados dos próprios artigos selecionados e do site da Elsevier.

5.3. Descrição dos estudos e seus resultados

Os quatro estudos avaliaram o GM-CSF associado a duas medicações: miltefosine oral (50%) e antimônio pentavalente parenteral (50%). Nesse sentido, o trabalho randomizado e duplo-cego de ALMEIDA *et al.* traz uma amostra de 20 pacientes com idades entre 10 e 50 anos que possuíam uma única úlcera típica de Leishmaniose Cutânea por mais de 60 dias, e que tiveram seus diagnósticos confirmados por sorologia, avaliação histopatológica ou teste de intradermorreação. Assim, os pacientes foram divididos em dois grupos de dez, sendo que o grupo intervenção fez uso de 2 injeções locais e intradérmicas de rhGM-CSF (200µg), no local da ferida, sendo a primeira ao iniciar o estudo e a segunda após 1 semana. Enquanto isso, o grupo controle recebeu 2 injeções intradérmicas de solução salina. Os pacientes dos dois grupos fizeram uso de antimônio pentavalente (estibogluconato de sódio) intravenoso na dosagem de 20 mg/kg de peso corporal diariamente por 20 dias. Em seguida, foram avaliados nos dias 30, 60, 90, 120 e 180, sendo a cura considerada a partir da reepitelização completa da ferida. Como resultado, no grupo intervenção (GM-CSF + antimônio), o tempo de cura da lesão foi mais rápido do que no grupo controle (49 +/- 32.8 vs 110 +/- 61.6 dias, sendo que no primeiro grupo 70% dos pacientes se curaram das lesões com menos de 40 dias do início da terapia, enquanto no grupo controle apenas 10% conseguiram se curar dentro desse tempo [RR = 0.33; IC 95% (0,13 – 0.88)]. Além disso, notou-se que no dia 110, todas as pessoas do grupo GM-CSF já estavam com as feridas cicatrizadas, em vista que no grupo placebo, apenas 50% estavam curadas por volta do dia 120. No grupo controle, todas as pessoas estavam curadas no dia 270 (20).

Já o trabalho de SANTOS *et al.* foi randomizado, duplo-cego, controlado e realizado com uma amostra de 20 pacientes (inicialmente eram 22, mas por erro de uso das compressas 2 foram excluídos) com idades entre 15 e 50 anos, os quais possuíam diagnóstico de Leishmaniose Cutânea dentro de 60 dias do início da lesão, e que foram confirmados por exame parasitológico ou por pelo menos 2 dos seguintes exames: exame histopatológico compatível, exame sorológico e reação de Montenegro. Os pacientes foram divididos nos grupos GM-CSF e no grupo placebo, sendo 10 em cada. No primeiro, os participantes fizeram uso de GM-CSF tópico no local da ferida a uma concentração de 10 µg/mL e aplicados por funcionários do posto de saúde onde acontecia o estudo, sendo que para a realização da aplicação as feridas foram limpas com solução NaCl 0.9%, e aspergido 1 mL do GM-CSF por 10 cm² de área ulcerada, promovendo uma concentração final dessa medicação em torno de 1 – 2µg/cm². Em seguida, um adesivo hidrofóbico não-compressivo foi fixado sobre a área com uma bandagem de algodão e uma de compressão curta, sendo trocado e reaplicado o GM-CSF 3 vezes na semana (segundas, quartas e sextas) por 3 semanas. No segundo grupo (placebo), todos os pacientes passaram pelos mesmos procedimentos, com a diferença que no lugar do GM-CSF havia um sal. Os participantes dos dois grupos receberam tratamento com antimônio pentavalente intravenoso (antimoniato de meglumina) diariamente por 20 dias a uma dose de 20 mg/kg de peso corporal. Durante os primeiros 6 meses, os pacientes foram avaliados quinzenalmente, sendo que após esse tempo, passaram a ser avaliados a cada 2 meses até o período completo de 1 ano. A cura foi considerada a partir da reepitelização completa da ferida. Com isso, percebeu-se que no grupo GM-CSF a cura foi mais rápida do que no grupo placebo (média +/- Desvio padrão – 43 +/- 14 vs 104 +/- 79 dias), e que no dia 60, as úlceras dos 10 pacientes do grupo intervenção tinha sido cicatrizadas, enquanto no grupo controle apenas 5 dos 10 (50%) tinham alcançado a reepitelização completa até esse período. O risco relativo para cura completa no dia 60 foi de 2 para os pacientes do grupo intervenção vs controle (IC 95%, 1.07 – 3.10)]. Neste estudo, no dia 90, 20% dos participantes do grupo controle necessitaram de uma segunda rodada de antimônio devido a refratariedade das lesões ulceradas. Já no grupo GM-CSF não houve essa necessidade. No grupo placebo, todas as pessoas estavam curadas por volta do dia 250 (21).

O estudo desenvolvido por MENDES *et al.* também foi descrito como randomizado, duplo-cego, placebo controlado com uma amostra de 150 pessoas com idades que variavam de 18 a 65 anos, havendo 7 perdas de seguimento ao longo do estudo. O diagnóstico de Leishmaniose Cutânea foi determinado pela presença de pelo menos uma lesão ulcerada em qualquer parte do corpo juntamente com a detecção de amastigotas obtidas a partir de amostras de tecidos retiradas das bordas das feridas. Os pacientes apresentavam o início da lesão ulceradas dentre 30 a 90 dias. Sendo assim, os 150 participantes foram divididos em 3 grupos, cada um contendo 50 pacientes: grupo 1 foi tratado com Miltefosine oral a uma dose de 2,5

mg/Kg de peso corporal - dose diária máxima dessa substância de 150 mg – sendo que foi prescrito para se tomar 3 vezes ao dia, durante um período de 28 dias. Associado ao Miltefosine oral, os pacientes do grupo 1 também fizeram uso de um gel de policarbofil duas vezes ao dia pelo mesmo período (28 dias), sendo esse gel considerado placebo no experimento. No grupo 2, os participantes fizeram uso da miltefosine no mesmo regime do primeiro grupo concomitantemente com o gel de policarbofil contendo GM-CSF (concentração de 10 µg/g), e sendo aplicado no local da ferida pelo próprio paciente 2 vezes ao dia por 28 dias. Os participantes foram instruídos a limparem as úlceras com água e sabão antes da aplicação do gel. Já o grupo 3, foi tratado com antimoniato de meglumina em uma dose diária intravenosa de 20 mg/Kg por 20 dias. A cura foi determinada pela completa reepitelização do tecido ulcerado nos dias 90 (cura primária) e 180 (cura final). A taxa de cura aos 90 dias medidos nos 3 grupos foram: 66% - grupo 1 (M + P); 58% - grupo 2 (M + GM); 52% - grupo 3 (antimoniato de meglumina), todas com $p > 0,05$. Ao se avaliar o dia 180, a porcentagem de curados não aumentou nos grupos 1 e 2 (66% e 58% respectivamente) e no terceiro grupo caiu de 52% para 50%, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dias 90 e 180. Adicionalmente não foi observada diferença no tempo de cura entre os 3 grupos que apresentaram a seguinte mediana: 45 +/- 22.48 (M+P); 48 +/- 24 (M + GM); 37 +/- 14 (antimoniato de meglumina). Nesse estudo não houve cura de todos os participantes em nenhum dos grupos estudados (12).

Por fim, o ensaio produzido por MACHADO *et al.* descrito como randomizado e duplo-cego, realizou sua pesquisa com 133 pessoas com idades entre 18 e 65 anos, havendo 6 perdas de seguimento ao longo do estudo. A leishmaniose cutânea foi diagnosticada pela presença de 1 ou mais lesões ulceradas, com confirmação laboratorial por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou observação de amastigotas em análise histopatológica. As lesões deveriam ter aparecido entre 30 e 90 dias da avaliação inicial. Os participantes foram divididos em 3 grupos semelhantes ao estudo de MENDES *et al.*, sendo, portanto, definidos da seguinte maneira: **Sb(v) – grupo controle** que se utilizou de antimoniato de meglumina parenteral a uma dosagem de 20 mg/kg/dia por 20 dias; **grupo Miltefosine oral + GM-CSF tópico (M + GM)** – no qual foram prescritos miltefosine em cápsulas de 50 mg a uma dosagem de 2,5 mg/kg para serem usados 2 ou 3 vezes ao dia por 28 dias consecutivos, junto com o GM-CSF tópico em forma de gel (10 µg/g) para serem usados sobre a lesão ulcerada duas vezes ao dia pelo mesmo período do miltefosine; **grupo Miltefosine + placebo (M + P)** – os pacientes usaram tanto o miltefosine quanto o gel placebo exatamente da mesma maneira que o grupo (M + GM). Assim, os autores identificaram que aos 90 dias a taxa de cura dos grupos (M + GM), (M + P) e Sb(v) foram 80,5%, 78,7% e 46,6%, respectivamente. Enquanto no dia 180, a cura foi calculada em 75,6% no (M + GM), 76,6% no (M + P) e 44,4% no Sb(v). Além disso, foi comparado o grupo controle Sb(v) tanto com o grupo (M + GM) quanto (M + P), e foi descrito que nas duas situações o grupo controle teve

um tempo de cura maior: Sb(v) – 112 +/- 69.7 dias; (M + GM) – 70 +/- 37.8 dias; (M + P) – 72 +/- 42.8 dias) sendo que a comparação entre Sb(v) e (M + GM) teve valor de $p = 0.001$ e entre Sb(v) e (M + P) $p = 0.013$. Neste estudo, houve descrição de que todos os participantes dos grupos (M + P) e (M + GM) foram curados por volta do dia 200, enquanto no grupo Sb(v) por volta do dia 300. A **Tabela 2** sintetiza a descrição dos estudos e seus resultados.

Tabela 2. Descrição dos estudos e seus resultados

Autor	Amostra	Grupo Experimental 1	Grupo Experimental 2	Grupo Controle	Dosagem GM-CSF	Crterios de Cura	Resultados
ALMEIDA <i>et al.</i>	20	GM-CSF intradrmico + Antimnio pentav.	-	Antimnio pentav. + Placebo (sal)	2 injees locais de 200 µg	Reepitelizao completa	GM-CSF > Placebo
SANTOS <i>et al.</i>	20	GM-CSF ttopico + Antimnio pentav.	-	Antimnio pentav. + placebo (sal)	1 a 2 ml da soluo ttopica 3x/semana por 3 semanas	Reepitelizao completa	GM-CSF > Placebo
MENDES <i>et al.</i>	150	Miltefosine oral + GM-CSF ttopico	Miltefosine oral + Placebo	Antim. Pentav.	2 aplicaes diarias por 28 dias	Reepitelizao completa	GM-CSF = Placebo
MACHADO <i>et al.</i>	133	Miltefosine oral + GM-CSF ttopico	Miltefosine oral + placebo	Antim. Pentav.	2 aplicaes diarias por 28 dias	Reepitelizao completa	GM-CSF = Placebo

Fonte: Extraído dos artigos selecionados.

5.4. Avaliao de vieses dos estudos

Apesar dos estudos terem passado pelo critrio avaliativo da Escala de Jadad, esse dispositivo por si s no capaz de eliminar a avaliao dos inmeros vieses o qual um estudo pode cometer. Nesse sentido, ao avaliar o trabalho de ALMEIDA *et al.* foi percebido que ele no descreve adequadamente a randomizao, o que no nos assegura de que no possa ter acontecido um vies de seleao (risco de vies incerto). Alm disso, apesar dos autores descreverem o desfecho dos 20 participantes em cada grupo, no ficou claro se houve alguma perda de seguimento, o que poderia incorrer em um vies de atrito (risco incerto desse vies). J no trabalho de MENDES *et al.* notou-se que devido ao fato de um dos tratamentos ser feito de uma forma diferente dos demais (grupo controle), ficou-se impossibilitado de manter totalmente o cegamento, incorrendo num vies de performance, que inclusive descrito pelos autores. Outro possvel vies nesse estudo seria o de aderncia, visto que nos grupos experimentais, o tratamento foi realizado pelo prprio paciente, e por isso incerto se o tratamento aconteceu de maneira adequada e respeitando os horrios. O trabalho

de MACHADO *et al.* sofre dos mesmos riscos de vieses que o de MENDES *et al.* com o diferencial de que em se tratando do viés de performance no grupo controle, eles alegaram que instruíram a médicos e pacientes não trocarem nenhuma informação entre si.

6. DISCUSSÃO:

O presente estudo buscou evidências em ensaios clínicos randomizados, disponibilizados em bases de dados, que pudessem atestar a eficácia do imunomodulador GM-CSF como tratamento coadjuvante para Leishmaniose Cutânea, que é um princípio ativo cujo potencial leishmanicida tem sido observado em múltiplos estudos experimentais ao aumentar a capacidade de Killing Intracelular dos macrófagos, através, principalmente, do IFN- γ (22). As drogas usadas como tratamento primário dos estudos avaliados foram antimônio pentavalente e miltefosine. Nessa busca, foram achados quatro artigos tratando do tema, sendo dois estudos associando o GM-CSF com antimônio pentavalente e outros dois com miltefosine. Dos quatro ensaios, apenas dois deles, os que usaram Antimônio pentavalente, demonstraram vantagem na associação com a droga avaliada, enquanto o restante não conseguiu obter diferenças estatísticas significativas nos grupos comparados.

Nessa perspectiva, diferentemente do trabalho de ALMEIDA *et al* (5), que apesar de reconhecer a necessidade de novos estudos, considerava o GM-CSF como uma droga promissora e com bons resultados, nesta revisão sistemática se considera que baseado nesses quatro estudos publicados e avaliados, não é possível atestar a eficácia do GM-CSF no tratamento para Leishmaniose Cutânea e conseqüentemente a sua utilização. Isto porque os estudos que evidenciaram benefícios no uso do GM-CSF (ALMEIDA *et al* e SANTOS *et al*), tem uma amostra muito pequena, incorrendo no maior risco de erros aleatórios (erro tipo 1). Enquanto os de maiores tamanhos amostrais (MENDES *et al* e MACHADO *et al*), e com maior confiabilidade, não conseguiram comprovar diferenças estatísticas entre o grupo que usou o miltefosine associado com o GM-CSF e o com placebo, além de também apresentarem alguns erros sistemáticos relevantes, como já mencionado na avaliação de vieses nos resultados. Apesar disso, é importante destacar que nos dois primeiros estudos a droga usada associada com GM-CSF foi o antimônio pentavalente ao invés do miltefosine (como nos dois últimos), e por conta disso seria necessário estudos com amostras maiores e mais confiáveis utilizando-se desse medicamento, pois pode ser possível que a associação de antimônio pentavalente e GM-CSF seja mais relevante do que a de GM-CSF + miltefosine. Um outro racional importante a ser considerado é que no estudo de ALMEIDA *et al*, o GM-CSF utilizado foi aplicado de forma intradérmica, o que poderia favorecer uma maior concentração da droga na região afetada e com isso aumentar o seu potencial curativo. Com relação às espécies da Leishmania, o estudo de MENDES *et al* se utiliza de um parasita diferente dos demais estudos, que é o *Leishmania guyanensis*, enquanto os outros trabalharam

com o *Leishmania brasiliensis*, e isto é relevante pois é possível que determinadas espécies de *Leishmania* pode ser mais ou menos suscetível às medicações utilizadas.

O Ministério da Saúde Brasileiro está de acordo com a conclusão desta revisão, visto que em seu Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana orienta que apesar do GM-CSF ser usado em alguns pacientes refratários ao tratamento convencional, não existe respaldo científico suficiente para indicar o seu uso no tratamento dessa doença (4). De forma similar, a Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) lançou um guia de recomendação para tratamento da Leishmaniose Tegumentar (*Leishmaniasis em las Américas: recomendaciones para el tratamiento*), que lista algumas medicações com diferentes níveis de evidência, mas que dentre elas não se inclui o GM-CSF devido justamente à escassez de evidências científicas para respaldá-la (23).

Esta revisão tem como limitação o fato de haver muito poucos estudos realizados sobre o tema, além de boa parte dos que já foram feitos não serem de acesso livre, requerendo pagamento de plataformas para ter acesso. Além disso, os estudos produzidos têm entre si algumas diferenças metodológicas que dificulta a comparação entre eles. Sendo assim, uma avaliação mais fidedigna da eficácia do GM-CSF no tratamento coadjuvante da Leishmaniose Cutânea se torna difícil. Muito dessa limitação deve-se ao fato dessa doença ser negligenciada, o que promove um baixo investimento financeiro e intelectual em pesquisas científicas voltadas para a solução do problema.

7. CONCLUSÃO:

Diante dos resultados, evidências que respaldem a utilização do GM-CSF como terapia coadjuvante para a Leishmaniose Tegumentar Cutânea ainda são escassas. Portanto, é importante que haja um maior número de estudos robustos, com tamanho amostral suficiente, para validá-lo como uma alternativa à terapia clássica.

8. REFERÊNCIAS:

1. Carvalho LP, Passos ST, Ribeiro Jesus A, Carvalho EM. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar Immunopathogenesis of Tegumentary Leishmaniasis. Vol. 75, Gaz. méd. Bahia. 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 2017. 189 p.
3. Machado PRL, Prates FVO, Boaventura V, Lago T, Guimarães LH, Schriefer A, et al. A Double-blind, Randomized Trial to Evaluate Miltefosine and Topical Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil. Clin Infect Dis. 2021 Oct 5;73(7):e2465–9.

4. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. atual. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. 1–180 p.
5. Almeida OLS, Santos JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):497–506.
6. ALMEIDA RP, BRITO JS, MACHADO RP. Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Gazeta Médica da Bahia*. 2005;75(1):83–91.
7. Machado PRL, Lassa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: A randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. 2007 Mar 15;44(6):788–93.
8. 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 [Internet]. 2001. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/33/11/1847/444872>
9. Soares Feitosa G. O Escore de Jadad-Uma Luta Contra o Viés de Publicação [Internet]. Vol. 2. Salvador; 2017. Available from: www.researchtrends.com/
10. Neves P.D., Linardi M.P., Vitor A.W.R. PARASITOLOGIA HUMANA Atheneu. 13 Ed. 2016.
11. Veronesi R., Foccacia R., Dyetze R. VERONESI - Doenças Infecciosas e Parasitárias (8ª ed.).
12. Mendes L, Guerra JO, Costa B, Silva AS da, Guerra M das GB, Ortiz J, et al. Association of miltefosine with granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: A randomized and controlled trial. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021 Feb 1;103:358–63.
13. Pena HP, Belo VS, Xavier-Junior JCC, Teixeira-Neto RG, Melo SN, Pereira DA, et al. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. Vol. 25, *Tropical Medicine and International Health*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 1168–81.
14. Dubie T, Mohammed Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. *J Immunol Res*. 2020;2020.
15. Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. Vol. 34, *Seminars in Immunopathology*. 2012. p. 735–51.
16. Peixoto F, Nascimento MT, Costa R, Silva J, Renard G, Guimarães LH, et al. Evaluation of the Ability of Miltefosine Associated with Topical GM-CSF in Modulating the Immune Response of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol Res*. 2020;2020.

17. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Not just another haematopoietic growth factor. *Medical Oncology*. 2014 Jan 1;31(1).
18. Gasson JC. BLOOD Molecular Physiology of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor EMATOPOIESIS IS A quantitatively imposing pro [Internet]. 1991. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/77/6/1131/604687/1131.pdf>
19. Hu X, Sun H, Han C, Wang X, Yu W. Topically applied rhGM-CSF for the wound healing: A systematic review. *Burns*. 2011 Aug 1;37(5):729–41.
20. Almeida R, Oliveira A d', Machado P, Bacellar O, Ko AI, de Jesus AR, et al. Randomized, Double-Blind Study of Stibogluconate Plus Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor versus Stibogluconate Alone in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis [Internet]. 1999. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/180/5/1735/811352>
21. Santos JB, Ribeiro De Jesus L, Machado PR, Salgado T, 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 [Internet]. 2004. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/190/10/1793/2191608>
22. Weiser WY, van Niel A, Clark SC, David JR, Remold HG. RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE/MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR ACTIVATES INTRACELLULAR KILLING OF LEISHMANIA DONOVANI BY HUMAN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES. 1987.
23. Paho, Who. TREATMENT RECOMMENDATIONS LEISHMANIASIS IN THE AMERICAS. 2018.