

RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania (v) braziliensis* COM IgG+ anti-*Toxoplasma gondii*

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC) e a toxoplasmose representam duas doenças negligenciadas e caracterizam-se como um relevante problema de saúde pública. A LC causada por *L. braziliensis* geralmente se apresenta como uma ou mais úlceras com bordas elevadas e bem delimitadas. A proteção na infecção por *Leishmania* está associada com a produção de IFN- γ , citocina envolvida na ativação de macrófagos e subsequente destruição do parasita. Essa resposta Th1 é importante para o controle da multiplicação da leishmania. Entretanto, a superprodução de citocinas inflamatórias como observada na LC causada por *L. braziliensis*, tem sido associada ao dano tecidual, desenvolvimento das lesões cutâneas e baixa resposta a terapia. Neste estudo, avaliamos se a infecção crônica pelo *T. gondii* modula a resposta inflamatória de pacientes com LC influenciando na apresentação clínica ou desfecho terapêutico. **Material e Métodos:** Uma Coorte prospectiva com 122 pacientes com LC ativa foi realizada para avaliar a apresentação clínica e resposta terapêutica. Adicionalmente, foi realizado um estudo de corte transversal para avaliar a resposta imune. Foi realizado sorologia para determinação dos grupos IgG positivo e negativo para *T. gondii*. Foram analisados os níveis de citocinas e quimiocinas em resposta ao antígeno de *Leishmania* de Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e em cultura de biópsias sem estímulo por ELISA antes de iniciar a terapia. Todos os pacientes foram tratados com antimonial pentavalente e foi considerado como critério de cura a completa cicatrização da lesão 90 dias após o tratamento. **Resultados:** Em nosso estudo, 71,3% dos pacientes com LC eram soropositivos para *T. gondii*. Foi observada uma maior taxa de cura e menor tempo de cicatrização da lesão em pacientes com LC e IgG+ para *T. gondii*. Houve diminuição nos níveis de CXCL9, CXCL10 e IL-17 em sobrenadantes de CMSP estimuladas com SLA de pacientes com LC e sorologia positiva para *T. gondii*. Pacientes com sorologia positiva que curaram a terapia exibiram altos níveis IL-10 enquanto nos indivíduos negativos para *T. gondii* encontramos um aumento na produção de IL-1 β no grupo de falha terapêutica. Foi observado na lesão de pacientes LC com IgG positivo para *T. gondii* um aumento na produção de CXCL9 e IFN- γ e diminuição da IL-17 e IL-1 β . **Conclusão:** Dessa forma, esse trabalho mostra que a infecção crônica por *T. gondii* modula a resposta imune de pacientes com LC, contribuindo para a cura terapêutica.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, citocinas, quimiocinas, *Leishmania braziliensis*, *Toxoplasma gondii*, Sorologia.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania (v) braziliensis* WITH *anti-Toxoplasma gondii IgG+*

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) and toxoplasmosis represent two neglected diseases and are characterized as a relevant public health problem. CL caused by *L. braziliensis* usually presents as one or more ulcers with raised, well-defined borders. Protection against *Leishmania* infection is associated with the production of IFN- γ , a cytokine involved in macrophage activation and subsequent destruction of the parasite. This Th1 response is important for controlling the multiplication of leishmania. However, the overproduction of inflammatory cytokines as observed in CL caused by *L. braziliensis* has been associated with tissue damage, development of skin lesions and poor response to therapy. In this study, we evaluated whether chronic *T. gondii* infection modulates the inflammatory response of patients with CL, influencing the clinical presentation or therapeutic outcome. **Material and Methods:** A prospective cohort of 122 patients with active CL was performed to assess clinical presentation and therapeutic response. Additionally, a cross-sectional study was performed to assess the immune response. Serology was performed to determine the positive and negative IgG groups for *T.gondii*. Levels of cytokines and chemokines in response to *Leishmania* antigen from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) and in cultured biopsies without challenge were analyzed by ELISA prior to initiating therapy. All patients were treated with pentavalent antimony and the complete healing of the lesion 90 days after treatment was considered as a cure criterion. **Results:** In our study, 71.3% of patients with CL were seropositive for *T. gondii*. A higher cure rate and shorter wound healing time were observed in patients with CL and IgG+ for *T. gondii*. There was a decrease in the levels of CXCL9, CXCL10 and IL-17 in SLA-stimulated PBMC supernatants from patients with CL and positive serology for *T. gondii*. Patients with positive serology who were cured by therapy showed high levels of IL-10, while in individuals negative for *T. gondii*, we found an increase in IL-1 β production in the treatment failure group. An increase in the production of CXCL9 and IFN- γ and a decrease in IL-17 and IL-1 β was observed in the lesions of LC patients with positive IgG for *T.gondii*. **Conclusion:** Thus, this work shows that chronic infection by *T. gondii* modulates the immune response of patients with CL, contributing to therapeutic cure.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, cytokines, chemokines, *Leishmania braziliensis*, *Toxoplasma gondii*, Serology.

RESULTADOS

Figura 1. Prevalência de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes com leishmaniose cutânea de Corte de Pedra- Bahia.

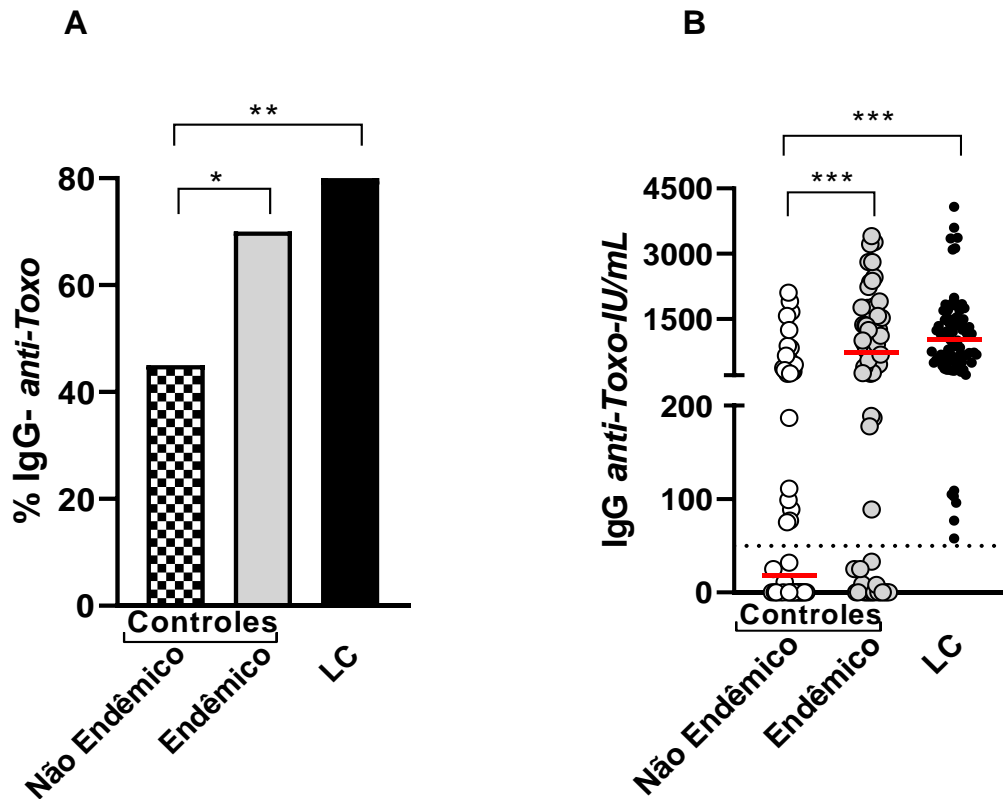


Figura 1. A Prevalência de IgG anti-*T. gondii* em Corte de Pedra foi quantificada no soro ou plasma. Na figura 1A representa a frequência de indivíduos com positividade para IgG anti-*T. gondii* e a 1B a titulação de IgG entre os grupos. Controle não endêmico (n=48); Controle endêmico (n=63) e pacientes com LC (n=122). A linha preta pontilhada representa o valor do Cut off = 50 IU/mL. Os dados são apresentados como frequência e mediana. teste exato de Fisher para prevalência e Teste de Kruskal wallis para os títulos de IgG. Significância estatística, respectivamente, *p < 0.05; **p < 0.01 e ***p < 0.001.

Tabela 1. Características Clínicas e Demográficas dos Pacientes com Leishmaniose Cutânea

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e resposta ao tratamento em pacientes com Leishmaniose Cutânea

Características	IgG+ <i>anti-T.gondii</i> n = 87 (%)	IgG- <i>anti-T.gondii</i> n = 35 (%)	p-valor
Gênero (n=122)			
Masculino	60 (68,9)	29 (82,8)	0,17 ⁺⁺
Idade⁺	29 (15-56)	30(15-57)	0,8 ^{**}
Informações clínicas (n=121)			
Dias de sintomas apresentados ⁺	41 (10-110)	33 (09-60)	0,13 ^{**}
Maior tamanho da lesão (mm) ⁺	20 (06-15)	17 (08-60)	0,41 ^{**}
Área da lesão (mm ²) ⁺	204,6 (113,1-420,7)	176,7 (81,6-312,4)	0,44 ^{**}
Linfadenopatia	68 (78,1%)	28 (80%)	0,8 ⁺⁺
Cura no dia 60	40 (45,9%)	8 (22,8%)	*0,03
Cura no dia 90	61 (70,1%)	15 (42,8%)	*0.009
Tempo para cura (dias)	81,5	110,0	** 0. 02

LC: Paciente com Leishmaniose Cutânea. *1 paciente sem informação de idade. ⁺Mediana (intervalos interquartílicos). mm milímetros. Significância estatística p<0.05*. ⁺⁺ Teste exato de Fisher. ^{**} Teste de Mann-Whitney

Figura 2. Análise Kaplan-Meier das diferenças do tempo de cura de pacientes com Leishmaniose Cutânea e IgG positivo e IgG negativo anti-*T. gondii*.

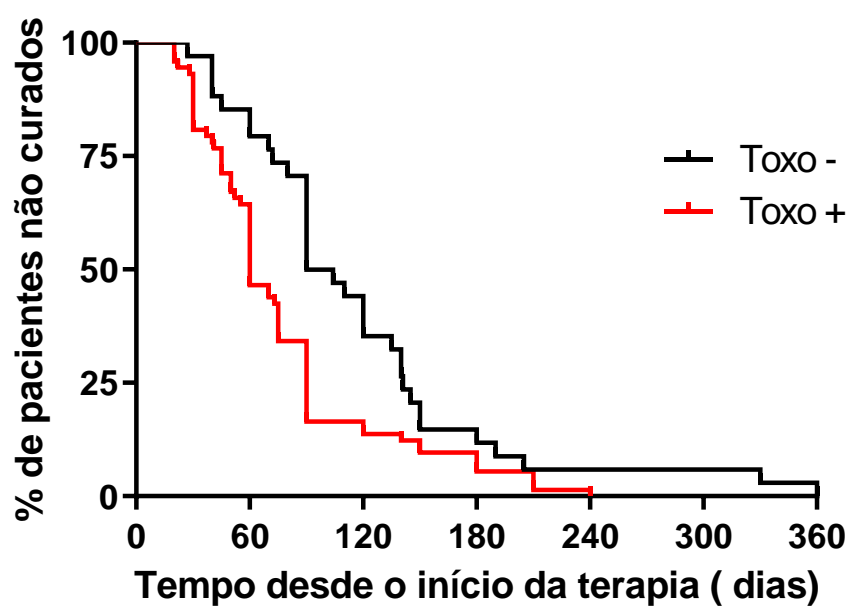


Figura 2. Análise de Kaplan-Meier estimando da proporção de pacientes com LC que não curaram no grupo IgG- e IgG+ anti-*Toxoplasma gondii*. Pacientes com LC IgG- (n = 34) e IgG+ (n = 73) anti-*Toxoplasma gondii* foram tratados com antimonial pentavalente na dose de 20 mg/kg/dia por 20 dias.

Figura 3. Produção de CXCL-9, CXCL10, IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-10 e Granzima B em Pacientes com Leishmaniose Cutânea com IgG⁺ *anti-Toxoplasma gondii*.

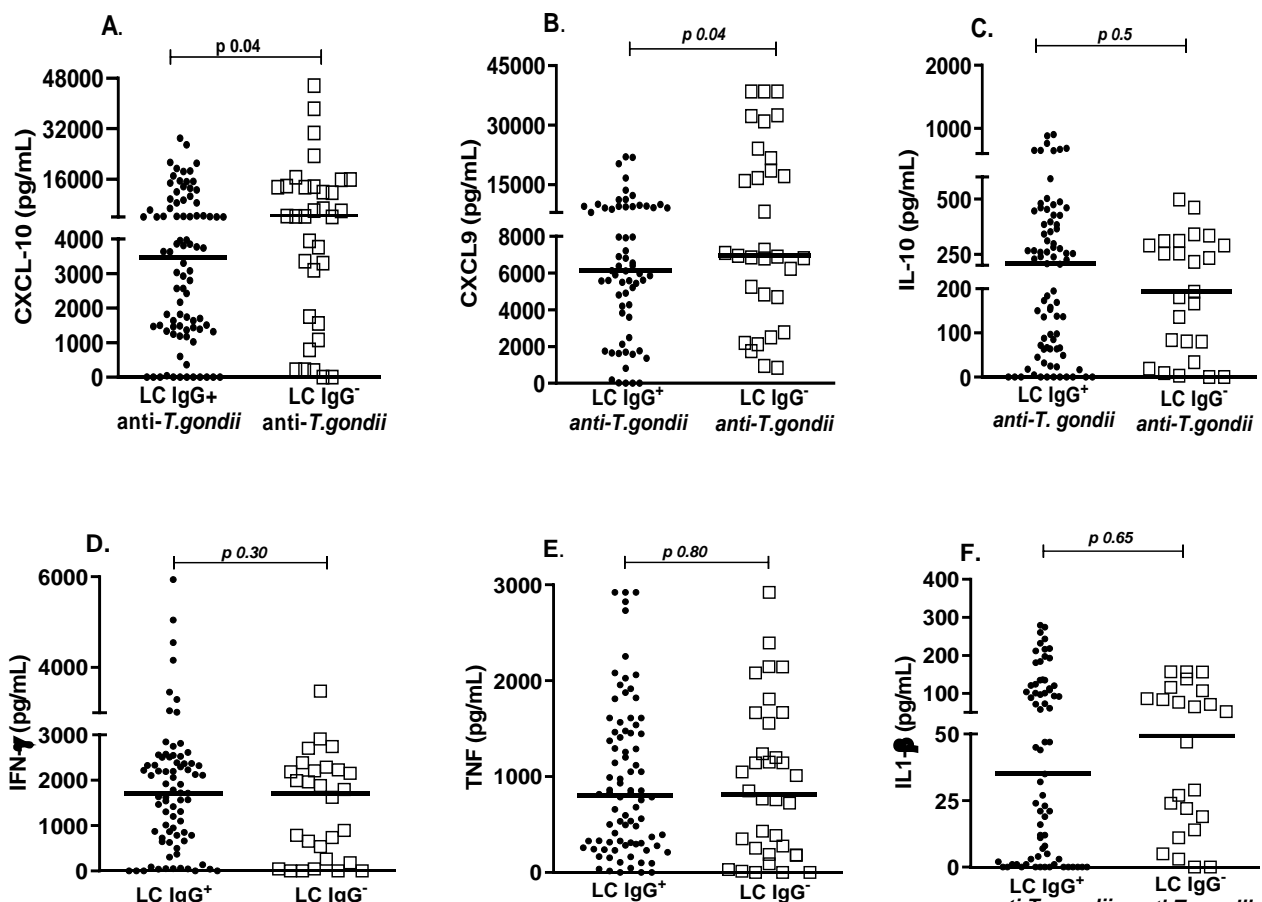


Figura 3. Perfil de citocinas, quimiocinas e Granzima B de pacientes com LC. A produção de citocinas e quimiocinas e Granzima B foi avaliada em CMSP estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (5µg/mL) por 72 horas. A produção das quimiocinas (A e B) e das citocinas (C, D, E F e G) e Granzima B (I) de pacientes IgG⁺ anti- *T. gondii* (n=93) e pacientes IgG⁻ anti-*T.gondii* (n=36) foram determinados a partir da técnica de ELISA, e os resultados expressos em pg/mL. Teste Mann Whitney.

Figura 4. Avaliação da infectividade e destruição de *Leishmania braziliensis* em macrófagos de indivíduos com leishmaniose cutânea e IgG⁺ anti-*Toxoplasma gondii*.

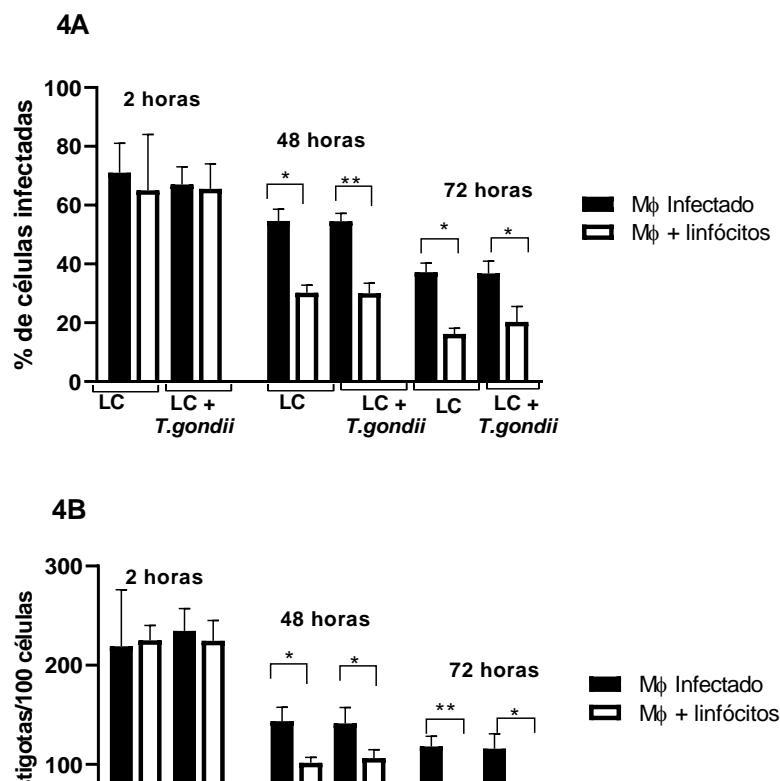


Figura 4. Taxa de infecção em macrófagos e macrófagos co-cultivados com linfócitos autólogos de pacientes com LC e LC soropositivos anti-*Toxoplasma gondii*. (3A) Frequência de células infectadas em cultura nos tempos de 2, 48 e 72 horas. (3B) Número de amastigotas por 100 macrófagos em cultura celular nos tempos de 2, 48 e 72 horas. MΦ: Macrófagos. Valores com significância estatística são indicados com *P < 0.05; **P < 0.01.

Figura 5. Produção de Citocinas, Quimiocinas e Granzima B de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com IgG negativo para *Toxoplasma gondii* de acordo com desfecho terapêutico.

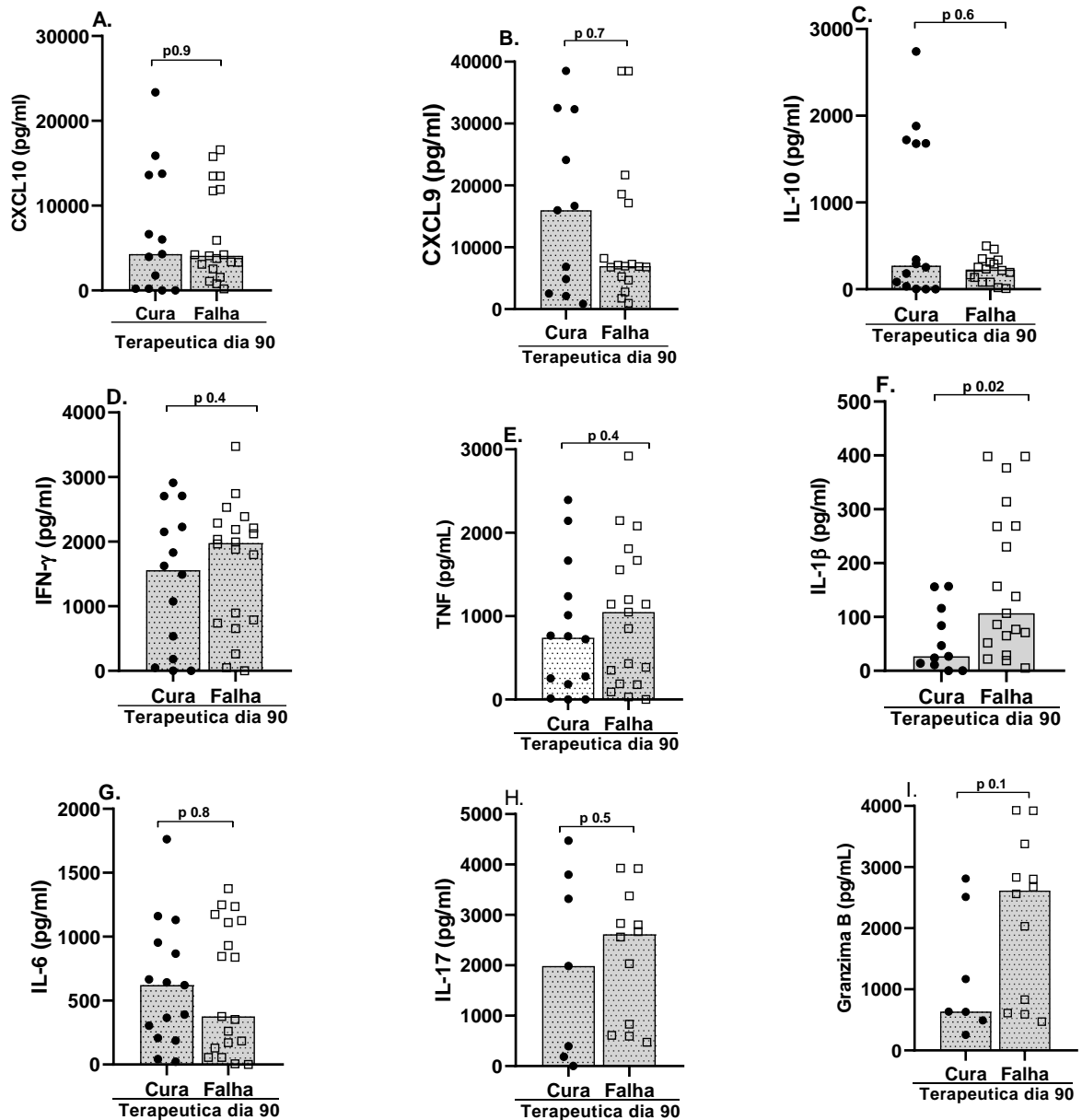


Figura 5. Produção de CXCL9-, CXCL-10, IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-10 e Granzima B de pacientes com LC e IgG- para *T. gondii* de acordo com o desfecho terapêutico. CMSP foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (5 μ g/mL) por 72 horas. E a produção das quimiocinas (A e B) e das citocinas (C, D, E F, G, H e I) de pacientes com LC IgG- para *T. gondii* que curaram (n=13) e que falharam (n=18) foram determinadas a partir da técnica de ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL. Teste Mann Whitney.

Figura 6. Produção de Citocinas, Quimiocinas e Granzima B de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com IgG positivo para *Toxoplasma gondii* de acordo com desfecho terapêutico.

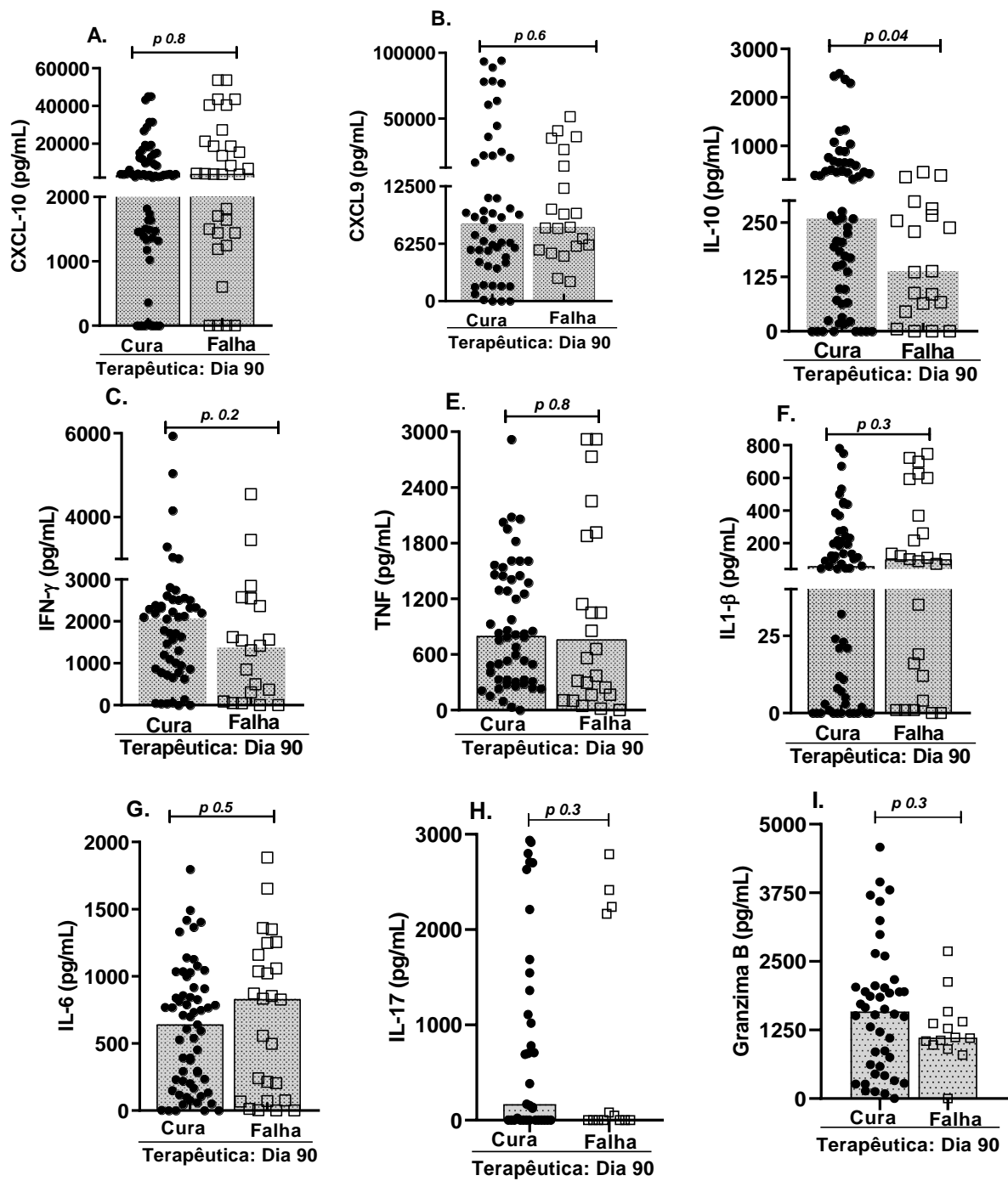


Figura 7. Produção de Citocinas, Quimiocinas e Granzima B em cultura de células da Lesão de Pacientes com Leishmaniose Cutânea e IgG+ *anti-T.gondii*.

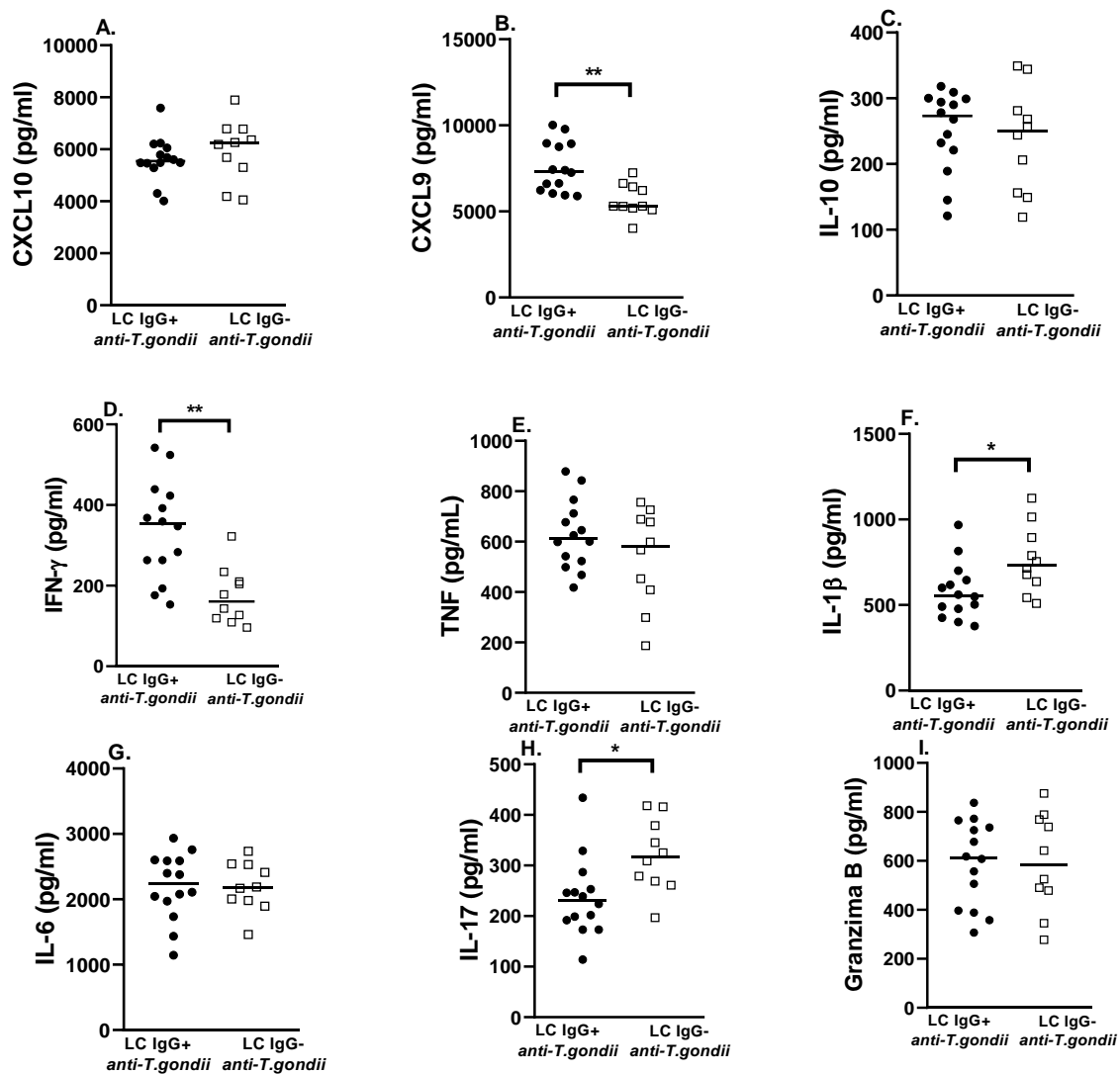


Figura 7. Produção de CXCL9, CXCL10, IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-10 e Granzima B de células da lesão pacientes com LC IgG⁺ para *T. gondii*. Lesões de pacientes com LC e IgG⁺ (n=14) ou IgG⁻ (n=10) para *T. gondii* foram mantidas em cultura por 72 horas. A produção das quimiocinas (A e B) e das citocinas (C, D, E F e G) foram determinados a partir da técnica de ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL. Valores com significância estatística são indicados como: * P<0,05; ** P<0,01. Teste Mann Whitney.