

# **PENTAVALENT ANTIMONY ASSOCIATED WITH G-CSF IN THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*.**

Carvel Suprien<sup>1</sup>, Luiz H. Guimarães<sup>4,5</sup>, Lucas P. de Carvalho<sup>1,2,3,4</sup>, Edgar M. de Carvalho<sup>1,2,3,4</sup> Paulo R. L. Machado<sup>\*1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>2</sup> Immunology Service of the Professor Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>3</sup> Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>4</sup> National Institutes of Science and Technology in Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology, Brazil

<sup>5</sup> Federal University of Southern Bahia, Ilhéus, Bahia, Brazil

## **I. RESUMO**

### **Associação Do Glucantime e G-CSF No Tratamento Da Leishmaniose Cutânea Causada Por *Leishmania (Viannia) Braziliensis*.**

**Objetivo:** Comparar a eficácia do antimoniato de meglumina (Sb<sup>v</sup>) (Glucantime<sup>TM</sup>, 20mg/kg/dia por via intravenosa por 20 dias) associado ao G-CSF versus Sb<sup>v</sup> (mesmo esquema) associado ao placebo no tratamento de Leishmaniose Cutânea (LC).

**Métodos:** estudo piloto, duplo-cego controlado, randomizado, realizado no centro de referência em leishmaniose em Corte de Pedra, Bahia, Brasil, com 32 pacientes com idade entre 18 e 50 anos com LC ulcerado localizado (até 3 lesões) confirmada por PCR positiva ou presença de amastigotas no tecido biopsiado no anatomopatológico para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. G-CSF (Filgrastine® ampola de 300 mcg/1mL) ou placebo (solução salina a 0,9%) foi

aplicado por infiltração intralesional de 0,1 mL em 4 pontos equidistantes na borda da maior úlcera no dia 0 e no dia 15. Todos os pacientes receberam o Sb<sup>v</sup> na dose de 20 mg/kg/dia por via intravenosa durante 20 dias. A determinação dos níveis de citocinas (IL-1  $\beta$ , TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10) foi realizada em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimuladas com antígeno solúvel de Leishmania na concentração de 5  $\mu$ g/ml. nos dias 0 e 15 (durante o tratamento). A cura foi definida como cicatrização completa sem elevação das bordas da úlcera no dia 90 após o início da terapia. A falha foi definida pela presença de uma úlcera ativa ou cicatriz com bordas elevadas no dia 90.

**Resultados:** O sexo masculino predominou no grupo G-CSF (59%), enquanto o grupo controle apresentou maior frequência de mulheres (53,3%), mas não foi significativa. A maioria das lesões localizavam-se nos membros inferiores em ambos os grupos. A taxa de cura no D90 no grupo G-CSF foi de 53% e no grupo placebo foi de 47%. Na avaliação final no D180 houve um discreto aumento de cura no grupo G-CSF em relação ao grupo placebo (65% versus 47%). Adicionalmente, o grupo G-CSF apresentou um tempo de cicatrização menor, embora não significativa. Das citocinas que avaliamos (IL-1 $\beta$ , TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10) não vivemos diferenças estatísticas entre os grupos, mas podemos observar que houve uma diminuição do nível de TNF, apesar de não foi significativa.

**Conclusão:** Embora a associação do G-CSF ao Sb<sup>v</sup> no tratamento da LC não tenha sido capaz de alterar significativamente a taxa de cura e o tempo de cicatrização, o potencial benefício desta combinação merece investigações

adicionais. O uso de doses maiores ou outras vias de aplicação do G-CSF num maior número de pacientes, deve contribuir para uma resposta definitiva.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose cutânea, tratamento, fator estimulador de colônias de granulócitos, antimônio pentavalente, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

## Summary

### **Pentavalent Antimony Associated With G-Csf in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis*: a pilot study**

Objective: To compare the effectiveness of meglumine antimoniate (Sb<sup>v</sup>) (Glucantime™, 20mg/kg/day intravenously for 20 days) associated with G-CSF and the use of Sb<sup>v</sup> (same scheme) plus placebo in the treatment of cutaneous leishmaniasis (CL).

Methods: Thirty-two patients aged between 18 and 50 years with localized ulcerated LC (up to 3 lesions) with positive PCR for *L. braziliensis* were included in the study. G-CSF or placebo (0.9% saline solution) was applied by

intralesional infiltration of 0.1 mL at 4 equidistant points on the edge of the largest ulcer on day 0 and day 15. Cytokine levels (IL-1  $\beta$ , TNF, IFN- $\gamma$  and IL-10) were determined in culture supernatant of mononuclear cells stimulated with soluble Leishmania antigen at a concentration of 5  $\mu$ g/ml.m. on days 0 and 15 (during treatment). Healing was defined as complete healing without elevation of the ulcer edges by day 90 after initiation of therapy. Failure was defined by the presence of an active ulcer or scar with raised edges at day 90.

Results: Males predominated in the G-CSF group (59%), while the control group had a higher frequency of females (53.3%). Most of the lesions were located in the lower limbs. The study showed no differences in therapeutic outcome between the two groups. The cure rate in the G-CSF group was 53% and in the placebo group it was 47%, however at the final evaluation on day 180 there was an increase in cure in the G-CSF group compared to the placebo group (65% versus 47%), but it was not significant.

Conclusion: The association of G-CSF and Sb<sup>v</sup> in the treatment of CL was not able to significantly change the cure rate when compared to the control group, probably due to insufficient sample size. The continuation of this study in a larger number of patients may be necessary to prove the effectiveness of the association of G-CSF in the treatment of CL.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, treatment, granulocyte colony-stimulating factor, pentavalent antimony, Leishmania (Viannia) braziliensis.

Tabela 2. Aspectos clínicos, demográficos e laboratoriais de pacientes com LC tratados com Sb<sup>v</sup> + G-CSF ou Sb<sup>v</sup> + placebo.

| Variáveis                              | Sb <sup>v</sup> + G-CSF (Grupo A) n = 17 | Sb <sup>v</sup> + placebo (Grupo B) n = 15 | valor-p  |
|--|--|--|----------|
| <b>Sexo masculino</b>                  | 10 (59%)                                 | 07 (47%)                                   | 0,37 *   |
| <b>Idade (ano, média + DP)</b>         | 31,58 ± 10,8                             | 32,86 ± 12,8                               | 0,94**   |
| <b>Duração da doença</b>               |  |  |          |
| <b>30-60 dias</b>                      | 16 (94%)                                 | 14 (93%)                                   | 0,72*    |
| <b>&gt; 60 – 90 dias</b>               | 1 (6%)                                   | 1 (7%)                                     |          |
| <b>Localização da maior lesão</b>      |  |  |          |
| <b>segmento cefálico</b>               | 0 (0%)                                   | 0 (0%)                                     | 0,25 *   |
| <b>Tronco</b>                          | 0 (0%)                                   | 2 (13%)                                    |          |
| <b>Extremidades superiores</b>         | 4 (23,5%)                                | 2 (13%)                                    |          |
| <b>Extremidades inferiores</b>         | 13 (76,5%)                               | 11 (73%)                                   |          |
| <b>Número de lesões</b>                |  |  |          |
| <b>Lesão única</b>                     | 13 (76,5%)                               | 9 (60%)                                    |          |
| <b>Duas lesões</b>                     | 3 (18%)                                  | 5 (33%)                                    | 0,57 *   |
| <b>Três lesões</b>                     | 1 (6%)                                   | 1 (7%)                                     |          |
| <b>Maior diâmetro (mm<sup>2</sup>)</b> | 27,18 ± 6,7                              | 27,47 ± 7,0                                | 0,90 *** |
| <b>Linfadenopatia (%)</b>              | 12 (71%)                                 | 9 (60%)                                    | 0,39 *   |
| <b>PCR positivo</b>                    | 16 (94%)                                 | 15 (100%)                                  | 0,53 *   |
| <b>IDRM positivo (%)</b>               | 16 (94%)                                 | 15 (100%)                                  | 0,53 *   |

M, Mediana; DP, desvio padrão. F: Feminino; M: Masculino; \*\*\* Teste não paramétrico Mann-Whitney U; \* Teste Exato de Fisher; \*\* Teste T de Student

Tabela 3. Resposta terapêutica de pacientes com LC tratados com Sb<sup>v</sup> e G-CSF ou Sb<sup>v</sup> e placebo.

| <b>Resultado Terapêutico</b>              | <b>Sb<sup>v</sup> + G-CSF<br/>(Grupo A) n = 17</b> | <b>Sb<sup>v</sup> + placebo<br/>(Grupo B) n = 15</b> | <b>valor-p</b> |
|---|--|--|----------------|
| <b>Taxa de Cura no D90 (%)</b>            | 9 (53%)  | 7 (47%)  | 0,50 *         |
| <b>Taxa de cura final (D180) (%)</b>      | 11 (65%)   | 7 (47%)  | 0,40 *         |
| <b>Resgate de terapia (%)</b>             | 6 (35%)  | 7 (47%)  | 0,55 *         |
| <b>Tempo de cicatrização (d) (M ± SD)</b> | 90 (57,5-135)                                      | 150 (50-210)   | 0,77 **        |
| <b>Recidiva (%)</b>                       | 1 (6%)   | 1 (7%)   | -              |
| <b>Uso irregular (%)</b>                  | 0  | 0  | -              |

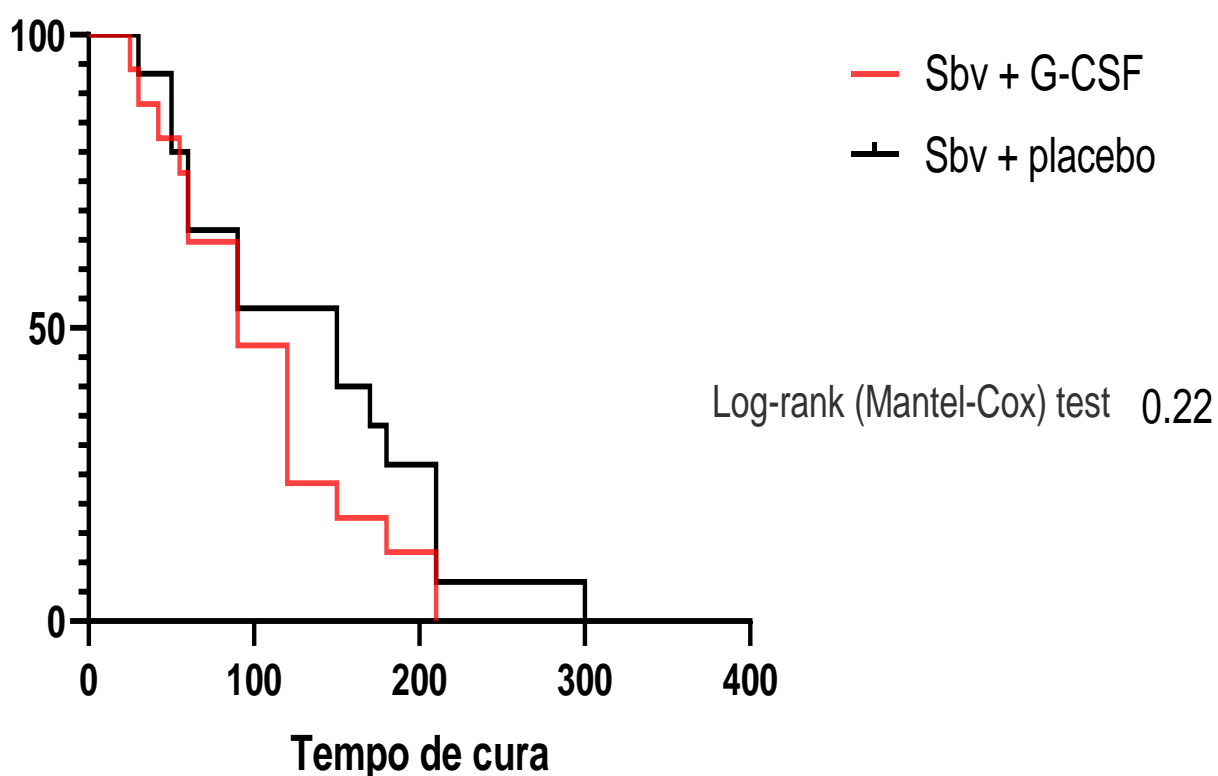
M, Mediana; DP, desvio padrão; \*\*teste Mann-Whitney U; \*Teste Exato de Fisher;

Tabela 4. Efeitos adversos: frequência e graduação CTCEA por grupo de tratamento nos pacientes tratados para LC com G-CSF e placebo.

| Efeito adverso      | Sb <sup>v</sup> + G-CSF<br>(17) |            | Sb <sup>v</sup> + placebo<br>(15) |            |
|---------------------|---------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|
|                     | Frequência (%)                  | Grau CTCEA | Frequência (%)                    | Grau CTCEA |
| Mialgia e Artralgia | 12                              | 1:2 casos  | 27                                | 1:5 casos  |
| Dor no local        | 23,5                            | 1:1 casos  | 20                                | 1:1 casos  |
| Cefaleia            | -                               |            | 13,3                              |            |
| Febre               | 6                               | 1:1 casos  | 7                                 | 1:1 casos  |
| Calafrios           | -                               |            | -                                 |            |
| Náuseas             | -                               |            | 7                                 | 1:1 casos  |
| Vômitos             | -                               |            | -                                 |            |

**Gráfico 1.** Tempo de cicatrização (cura final D180 dos pacientes no grupo G-CSF e placebo).

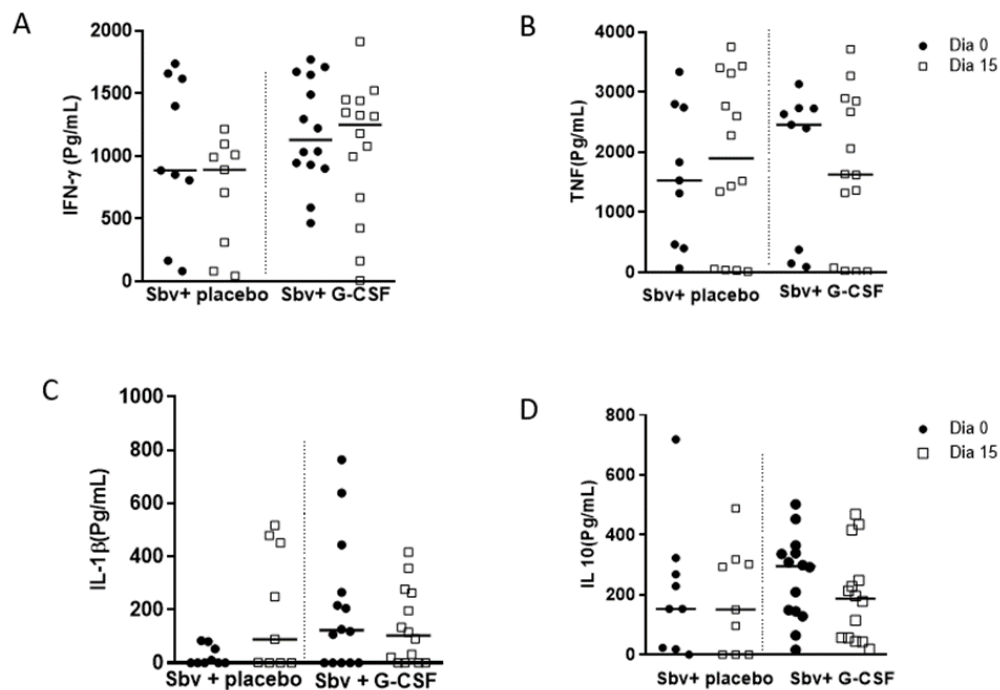
Na avaliação no dia 90 após o início da terapia, 53% dos pacientes no grupo Sb<sup>v</sup> + placebo permaneceram com úlceras ativas em comparação com 35% no grupo Sb<sup>v</sup> + G-CSF (P = 0,22, teste log-rank para tendência; gráfico 1).



Curva de Kaplan-Meier comparando o tempo de cura nos dois grupos do tratamento da leishmaniose cutânea. O tempo de cura é o número de dias necessários para a cura completa das úlceras, sem qualquer sinal de atividade clínica, como inflamação ou bordas elevadas. P = 0,22; teste log-rank para tendência. Abreviaturas: G-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos; Sb<sup>v</sup>, antimônio pentavalente.



**Gráfico 2:**



Produção de citocinas de pacientes com LC durante o tratamento com  $Sb^V$  associado ao G-CSF (N=14) ou  $Sb^V$  mais placebo (N=09). (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-1 $\beta$ , (D) IL-10, os níveis de citocinas foram determinados por ELISA em sobrenadantes de cultura estimulada por SLA nos dias 0 e 15. Teste de Willcoxon e teste U de Mann Whitney. ( $P < 0,05$ ).