



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

MICAELA GOMES ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS NATURAL KILLER E  
NATURAL KILLER T LIKE E SEUS MARCADORES DE  
CITOTOXICIDADE APÓS ESTIMULAÇÃO ANTIGÊNICA  
ESPECÍFICA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Recife  
2024

MICAELA GOMES ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS NATURAL KILLER E  
NATURAL KILLER T LIKE E SEUS MARCADORES DE  
CITOTOXICIDADE APÓS ESTIMULAÇÃO ANTIGÊNICA  
ESPECÍFICA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Carolina  
Accioly Brelaz de Castro

Coorientador: Dr. Marton Kaique de  
Andrade Cavalcante

Recife  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Alves da Silva, Micaela .

Avaliação do perfil de células natural killer e natural killer t like e seus marcadores de citotoxicidade após estimulação antigênica específica em pacientes com leishmaniose tegumentar americana / Micaela Alves da Silva. - Recife, 2024.

90 p. : il., tab.

Orientador(a): Maria Carolina Brelaz de Castro

Coorientador(a): Marton Kaique de Andrade Cavalcante

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Citometria de fluxo. 3. NK. 4. Citotoxicidade. 5. Imunofenotipagem. I. Brelaz de Castro, Maria Carolina. (Orientação). II. de Andrade Cavalcante, Marton Kaique. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MICAELA GOMES ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS NATURAL KILLER E  
NATURAL KILLER T LIKE E SEUS MARCADORES DE  
CITOTOXICIDADE APÓS ESTIMULAÇÃO ANTIGÊNICA ESPECÍFICA  
EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Biomedicina da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
pré-requisito à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 21/03/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro  
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ UFPE

---

MSc. Ailton Álvaro da Silva  
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ UFPE

---

Dra. Patrícia d'Emery Alves Santos  
Instituto Keizo Asami – iLIKA UFPE

Dedico este trabalho à força inspiradora daqueles que enfrentam desafios com resiliência. Aos pacientes que lidam com a complexidade da LTA e aos pesquisadores que dedicam suas vidas em busca de soluções.

## **AGRADECIMENTOS**

Neste trajeto repleto de descobertas e aprendizados, há pessoas a quem dedico minha gratidão sincera e afetuosa:

A minha orientadora inspiradora, Maria Carolina Accioly, e ao meu coorientador Marton Kaique, por me abrirem as portas do LIBM, onde encontrei minha voz como cientista.

A incrível equipe do LIBM, em especial a Allana Maria, que sempre tem a música ideal da Taylor Swift para acompanhar um experimento de ELISA.

A dedicada Larissa Layne, que me ensinou como separar PBMC corretamente e que mesmo longe esteve sempre disposta a tirar minhas dúvidas.

Às pessoas que transformam nosso espaço de pesquisa em um ambiente acolhedor: Aline Andrade, Aline Moura, Ailton Álvaro, Ana Bárbara, Cibele Carine, Danielle Santana, Fábio Galvão e Policarpo Sales.

Gostaria de agradecer também ao CNPq por financiar esse e alguns trabalhos anteriores.

A minha família, que à sua maneira, sempre me envolveu com apoio. Especialmente a minha irmã, Carolayne Matos, que sempre me enxergou como inteligente e capaz, assim como você, irmã.

Aos colegas de curso, alguns dos quais eu serei eternamente grata por conhecer. Especialmente, a Maria Anndressa, pesquisadora, amiga e parceira. Você me inspira todos os dias.

Por fim, minha gratidão a todos os artistas cujas músicas me acompanharam na minha jornada acadêmica e na escrita deste trabalho, especialmente ao Seventeen, suas melodias foram uma companhia valiosa, me ajudando a superar os desafios ao longo do caminho.

"Como você anda até o fim do mundo? Um passo de cada vez". - A vida invisível de Addie Larue, V. E. Schwab.

SILVA, Micaela. **Avaliação do perfil de células Natural Killer e Natural Killer T like e seus marcadores de citotoxicidade após estimulação antigênica específica em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2024. 89. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa com ampla ocorrência em vários continentes, causando deformidades e afetando mais de 12 milhões de indivíduos globalmente. Sua alta incidência está ligada a condições socioeconômicas precárias e fatores como mudanças climáticas e urbanização. É causada por parasitas do gênero *Leishmania* e pode afetar a pele e mucosas de maneira severa. O sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel importante na resposta à infecção por *Leishmania spp*. Células como a *Natural Killer* (NK) e *Natural Killer T* (NKT) têm sido objeto de estudo acerca do seu real papel na LTA, já que sua função nesse contexto ainda não está completamente esclarecida. Enquanto algumas pesquisas sugerem um papel protetor das células NK, outras indicam sua possível influência na exacerbação das lesões. Moléculas de ativação, como NKG2D, NKp46 e CD127, também influenciam a resposta imune e na atividade dessas células em diversas infecções. Este trabalho buscou avaliar o perfil das células NK e NKT like, bem como destas moléculas de ativação, em pacientes com LTA. O objetivo foi entender melhor o desenvolvimento da doença e fornecer informações para diagnóstico, tratamento e manejo clínico mais eficazes. Pacientes com LTA foram acompanhados ao longo do tempo, e a resposta imunológica de suas células NK e NKT like foi analisada antes e após a cicatrização das lesões. Para o estudo, foi formado um grupo de pacientes com lesão ativa (AT, N=11), um grupo de pacientes com cura clínica (PT, N = 5), e um grupo controle de indivíduos saudáveis (CT, N = 11). Foram realizados exames laboratoriais para confirmar a doença. As células mononucleares do sangue periférico dos pacientes foram estimuladas com o antígeno de *Leishmania braziliensis* para observar a resposta imunológica. Foram realizadas análises por citometria de fluxo para identificar e quantificar as populações celulares de NK e NKT like, bem como para avaliar a expressão dos marcadores CD127, NKp46 e NKG2D nas amostras. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7, o teste Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal foram analisados através do teste t student e os que não apresentaram normalidade o teste U de Mann-Whitney foi empregado. Todas as conclusões foram baseadas no nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Foi possível observar uma prevalência de mulheres com lesão ativa com média de 36 anos residentes de áreas endêmicas. Após cultivo com antígenos de *Leishmania braziliensis* foi possível observar que a população de células NK (CD16-) foi maior na população controle, mas seu perfil nos pacientes demonstrou ser mais citotóxico pelo aumento da expressão dos marcadores CD127 e NKG2D. Os grupos AT e PT

também demonstram aumento dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 na população de células NK (CD16+). Sugerindo que pacientes previamente expostos apresentam um perfil citotóxico mais proeminente e o provável envolvimento da IL-7 na ativação e sobrevivência das células NK e NKT por conta do aumento dos marcadores citados. Foi possível observar aumento de células NKT CD8+ com uma maior expressão de NKp46 no grupo PT e aumento de CD127 nos grupos AT e PT . Já as células NKT CD4+ dos pacientes AT e PT demonstraram aumento do NKp46. A ativação desses perfis celulares e o aumento dos marcadores de citotoxicidade são importantes indicadores da ativação das células mediante a infecção pelo parasita e sua conseqüente eliminação. Os resultados deste estudo contribuirão para o entendimento mais aprofundado da resposta imune na LTA, facilitando o desenvolvimento de futuras terapias para a doença.

**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea. Citometria de fluxo. Citotoxicidade. NK. Imunofenotipagem.

SILVA, Micaela. **Assessment of the profile of Natural Killer and Natural Killer T-like cells and their cytotoxicity markers after specific antigen stimulation in patients with American Cutaneous Leishmaniasis.** 2024. 89. Undergraduate thesis (Graduation in Biomedicine) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2024.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an infectious disease with widespread occurrence on several continents, causing deformities and affecting more than 12 million individuals globally. Its high incidence is linked to precarious socioeconomic conditions and factors such as climate change and urbanization. It is caused by parasites of the *Leishmania* genus and can severely affect the skin and mucous membranes. The host's immune system plays a crucial role in the response to infection by *Leishmania* spp. Cells such as Natural Killer (NK) and Natural Killer T (NKT) have been the object of study regarding their real role in CL, as their function in this context is not yet completely understood. While some research suggests a protective role for NK cells, others indicate their possible influence on the exacerbation of injuries. Activation molecules, such as NKG2D, NKp46 and CD127, also influence the immune response and the activity of these cells in various infections. This work sought to evaluate the profile of NK and NKT like cells, as well as these activation molecules, in patients with CL. The objective was to better understand the development of the disease and provide information for more effective diagnosis, treatment and clinical management. Patients with CL were followed over time, and the immunological response of their NK and NKT like cells was analyzed before and after the lesions healed. For the study, a group of patients with active lesions (AT, N = 11), a group of patients with clinical cure (PT, N = 5), and a control group of healthy individuals (CT, N = 11) were formed. Laboratory tests were carried out to confirm the disease. The patients' peripheral blood mononuclear cells were stimulated with the *Leishmania braziliensis* antigen to observe the immunological response. Flow cytometry analyzes were performed to identify and quantify NK and NKT like cell populations, as well as to evaluate the expression of CD127, NKp46 and NKG2D markers in the samples. Statistical analysis of the data was performed using the GraphPad Prism 7 software, the Shapiro-Wilk test was applied to verify the normality of the data. Data with normal distribution were analyzed using the student t test and those that did not present normality the Mann-Whitney U test was used. All conclusions were based on a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). It was possible to observe a prevalence of women with active lesions with an average of 36 years living in endemic areas. After cultivation with *Leishmania braziliensis* antigens, it was possible to observe that the population of NK cells (CD16-) was higher in the control population, but their profile in patients proved to be more cytotoxic due to the increased expression of the CD127 and NKG2D markers. The AT and PT groups also demonstrate an increase in the markers NKp46, NKG2D and CD127 in the NK cell population (CD16+). Suggesting that previously exposed patients present a more prominent cytotoxic profile and the probable involvement of

IL-7 in the activation and survival of NK and NKT cells due to the increase in the aforementioned markers. It was possible to observe an increase in CD8+ NKT cells with a greater expression of NKp46 in the PT group and an increase in CD127 in the AT and PT groups. CD4+ NKT cells from patients AT and PT demonstrated an increase in NKp46. The activation of these cellular profiles and the increase in cytotoxicity markers are important indicators of cell activation upon infection by the parasite and its consequent elimination. The results of this study will contribute to a deeper understanding of the immune response in CL, facilitating the development of future therapies for the disease.

**Key words:** Cutaneous leishmaniasis. Flow cytometry. Cytotoxicity. NK. Immunophenotyping.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Status de endemidade da Leishmaniose cutânea no mundo, 2021.	18
<b>Figura 2</b> - Número de casos de Leishmaniose cutânea por região do Brasil no período de 2012 a 2021	19
<b>Figura 3</b> - Diferentes formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp.	21
<b>Figura 4</b> - Ciclo de transmissão da LTA	23
<b>Figura 5</b> - Diferentes formas clínicas da LTA.	25
<b>Figura 6</b> - Vias de regulação das Células NK	34
<b>Figura 7</b> - Vias de ativação das células NKT.	36
<b>Figura 8</b> - Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária após separação das células únicas	43
<b>Figura 9</b> - Estratégia de análise das células NK.	43
<b>Figura 10</b> - Estratégia de análise das células NKT.	44
<b>Figura 11</b> - Percentual de células NK CD16- e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10 µg/ml de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> por 72h	50
<b>Figura 12</b> - Percentual de células NK CD16+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10 µg/ml de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> por 72h	51
<b>Figura 13</b> - Percentual de células NKT CD8+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10 µg/ml de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> por 72h	53
<b>Figura 14</b> - Percentual de células NKT CD4+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10 µg/ml de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> por 72h.	54
<b>Figura 15</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo CD56 (PE)	71
<b>Figura 16</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo CD16 (PECY 7)	71
<b>Figura 17</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo CD4 (PERCPCY 5.5)	72
<b>Figura 18</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo CD8 (APC)	72
<b>Figura 19</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo NKp46 (BB515)	73
<b>Figura 20</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo CD127 (BV421)	73
<b>Figura 21</b> - Fluorescence Minus One do anticorpo NKG2D (PECF594)	74

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Principais características do grupo de estudo

47

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Principais tratamentos para LTA	30
<b>Quadro 2</b> - Resultados dos testes laboratoriais realizado em pacientes com LTA 49	
<b>Quadro 3</b> - Relação dos achados encontrados no estudo	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Cluster Of Differentiation - Grupamento de Diferenciação
DCs	Dendritic cells - Células Dendríticas
IFI	Imunofluorescência indireta
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LGO	Lipofosfoglicanos
MHCII	Major Histocompatibility Complex - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe 2
MS	Ministério da Saúde
NETs	Neutrophil Extracellular Traps - Armadilhas extracelulares
NKT	Natural Killer T
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide - Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell - Células Mononucleadas do Sangue Periférico
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase
PGE2	Prostaglandina
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificações
SUS	Sistema Único de Saúde
TCR	T Cell Receptor - Receptor de Célula T
TLR	Toll Like Receptors - Receptores do Tipo Toll
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alfa - Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta - Fator de Crescimento Transformador Beta

## SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>12</u>
<u>2 JUSTIFICATIVA</u>	<u>15</u>
<u>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>16</u>
<u>3.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos</u>	<u>16</u>
<u>3.2 Agente etiológico e Vetores da LTA</u>	<u>20</u>
<u>3.3 Transmissão e ciclo</u>	<u>22</u>
<u>3.4 Formas Clínicas</u>	<u>23</u>
<u>3.5 Diagnóstico</u>	<u>25</u>
<u>3.6 Tratamento</u>	<u>26</u>
<u>3.7 Resposta imune na Leishmaniose</u>	<u>31</u>
<u>3.7.1 Células Natural Killer (NK) na Resposta Imune Inata</u>	<u>32</u>
<u>3.7.2 Células Natural Killer T (NKT) na Resposta Imune Adaptativa</u>	<u>35</u>
<u>3.8 Marcadores de ativação</u>	<u>36</u>
<u>4 OBJETIVOS</u>	<u>37</u>
<u>4.1 Objetivo Geral</u>	<u>37</u>
<u>4.2 Objetivos Específicos</u>	<u>38</u>
<u>5 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>38</u>
<u>5.1 Caracterização do estudo</u>	<u>39</u>
<u>5.2 Processo de seleção da população estudada</u>	<u>39</u>
<u>5.3 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes</u>	<u>39</u>
<u>5.4 Cultura de L. (V.) braziliensis e obtenção de antígeno total</u>	<u>40</u>
<u>5.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos pacientes selecionados</u>	<u>40</u>
<u>5.6 Cultura celular</u>	<u>41</u>
<u>5.7 Citometria de fluxo</u>	<u>42</u>
<u>5.7.1 Metodologia de análise</u>	<u>42</u>
<u>5.8 Análise estatística</u>	<u>45</u>
<u>5.9 Aspectos éticos</u>	<u>45</u>
<u>6 RESULTADOS</u>	<u>45</u>
<u>6.1 Caracterização da população estudada</u>	<u>46</u>
<u>6.2 Percentual de células NK CD16- e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após cultura celular</u>	<u>49</u>
<u>6.3 Percentual de células NK CD16+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após cultura celular</u>	<u>50</u>
<u>6.4 Percentual de células NKT CD8+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após cultura celular</u>	<u>51</u>
<u>6.5 Percentual de células NKT CD4+ e a expressão dos marcadores NKp46,</u>	

NKG2D e CD127 após cultura celular	53
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICES	70
APÊNDICE A	70
ANEXOS	75
ANEXO A	75
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PAIS OU RESPONSÁVEIS	76
ANEXO B	78
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MAIOR DE 18 ANOS	78
ANEXO C	80
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS	80
ANEXO D	82
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE	82
ANEXO E	84
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	84

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar é uma doença globalmente distribuída, especialmente nas Américas, Norte e Oeste da África, África Oriental e Sudeste Asiático, afetando mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Sua gravidade é destacada devido à capacidade de causar deformidades, tornando-a uma das principais doenças infecciosas, conforme relatório da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2022). A incidência da doença está intimamente ligada a condições socioeconômicas precárias, embora fatores como mudanças climáticas, urbanização e diversidade de reservatórios e espécies de protozoários também contribuam para a disseminação e proliferação do parasita (SILVA et al., 2022; OPAS, 2022; ABRAÃO, 2020).

A elevada incidência da leishmaniose está intrinsecamente atrelada a um contexto socioeconômico precário (SILVA et al., 2022). No entanto, diversos fatores contribuem para o agravamento da situação, tais como mudanças climáticas, processos de urbanização e a diversidade de reservatórios e espécies de protozoários. Esses elementos desempenham um papel crucial na disseminação e proliferação do parasita, ao facilitarem adaptações no habitat do vetor (SILVA et al., 2022; OPAS, 2022; ABRAÃO, 2020).

Apesar da sua distribuição em todo o território nacional, a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta uma prevalência maior nas regiões Norte e Nordeste do país. No ano de 2022, foram notificados 14.271 casos da doença no Brasil, sendo a região Norte responsável pelo maior número de notificações, com 3.070 casos registrados (SINAN, MS, 2022). A faixa etária mais acometida é composta principalmente por adultos entre 29 e 39 anos, e observa-se uma maior prevalência da doença no sexo masculino (SINAN, MS, 2022).

A resposta imunológica à infecção por *Leishmania* sp pode ser mediada por mecanismos da imunidade inata e adaptativa. Após a inoculação do parasita na pele do hospedeiro, células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são recrutadas e realizam a fagocitose dos parasitas (GABRIEL et al., 2019). Além disso, ocorre a ativação do sistema complemento como parte da resposta imunológica (DUBIE; MOHAMMED, 2020; GABRIEL et al., 2019). Outras células também estão

envolvidas nesta resposta da imunidade inata, como as células Natural Killer (NK), que desempenham um importante papel a ser explorado.

As células NK são conhecidas por expressarem marcadores de superfície específicos, como CD16+ e CD56+ e a ausência do marcador CD3 (ZHANG; TIAN, 2017; SIVORI et al., 2019). Elas podem ser divididas em subtipos com diferentes características funcionais baseados por exemplo na intensidade de expressão das moléculas de adesão CD56 (molécula de adesão de células neurais, NCAM), como as células CD3-CD56<sup>bright</sup>, que são responsáveis pela produção de citocinas e migram predominantemente para órgãos linfóides, e as células CD3-CD56<sup>dim</sup>, que têm uma função efetora de matar células infectadas e migram preferencialmente para locais inflamatórios (CAMPOS et al., 2017; SIVORI et al., 2019; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020). Além disso, um subconjunto das células NK, conhecido como células Natural Killer T (NKT), expressa tanto CD56 quanto CD3 em sua superfície (CAMPBELL; HASEGAWA, 2013; KHAN; AROOJ; WANG, 2020).

A função das células NK, NK T, suas citocinas e moléculas de ativação na imunidade à leishmaniose tegumentar tem sido objeto de discussão, mas não estão completamente esclarecidas. As células NK são reconhecidas por sua capacidade de induzir lise direta de células com fenótipo alterado e por sua habilidade de produzir citocinas (BOGDAN et al., 2015; SIVORI et al., 2019). Alguns estudos sugerem um papel protetor na leishmaniose, com contribuição na lise dos macrófagos infectados (ARANHA et al., 2005; LIEKE et al., 2011). Por outro lado, há evidências que indicam que as células NK podem contribuir para a exacerbação das lesões (CAMPOS et al., 2020; SERRANO-COLL et al., 2021). No entanto, outros autores não encontraram um papel claro, seja protetor ou patológico, para essas células (CUNHA et al., 2016).

Moléculas citotóxicas, como CD127, NKp46 e NKG2D, são alvos que merecem investigação quanto à sua participação no contexto da LTA. O receptor NKG2D está presente em células com características citotóxicas, principalmente nas células NK e NKT, e participa tanto da resposta imune inata quanto adaptativa (LIU et al., 2019). Seus ligantes normalmente estão presentes em baixos níveis, mas situações estressoras, como infecções, podem levar à regulação positiva dessas moléculas. NKG2D e seus ligantes estão envolvidos na produção de citocinas e moléculas citotóxicas, e podem atuar como a “chave mestra” das células NK,

modulando respostas inibitórias ou de ativação (WENSVEEN et al., 2018; LIU et al., 2019; FUERTES, DOMAICA, ZWIRNER., 2021).

Assim como o NKG2D, o receptor NKp46 desempenha um papel fundamental na citotoxicidade e produção de citocinas, sendo um dos principais constituintes do conjunto de receptores naturais de citotoxicidade expressos por células NK (DUEV-COHEN et al., 2020). Além disso, o CD127, que é um receptor para a interleucina 7 (IL-7), está presente em células T ativadas, macrófagos e células B imaturas, e desempenha um papel importante na maturação e aumento de sobrevivência dos linfócitos (WANROOIJ et al., 2018).

Essas moléculas possuem o potencial de influenciar significativamente as respostas imunológicas envolvendo as células NK. Compreender as interações dessas moléculas em pacientes com LTA pode fornecer informações sobre os mecanismos que regulam a resposta imune nesses indivíduos.

Dessa maneira a LTA representa um problema de saúde pública global. O combate à infecção requer um entendimento aprofundado da resposta imunológica, com destaque para a caracterização das células NK e NKT e o estabelecimento de marcadores imunológicos confiáveis para que haja o aprimoramento do diagnóstico, prognóstico e do tratamento da doença.

## 2 JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença de manifestações clínicas diversas, afetando especialmente indivíduos com menor status socioeconômico em países menos desenvolvidos. No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas, sendo Pernambuco uma área de destaque com mais de 60% dos casos concentrados na região da Zona da Mata (ARAÚJO et al., 2022; DANTAS-TORRES et al., 2017). As formas clínicas variam desde pequenos nódulos cutâneos até a destruição das mucosas, com as formas cutâneas sendo as mais prevalentes (MOKNI, 2019; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A resposta imunológica do hospedeiro desempenha um papel fundamental na cura ou progressão da LTA. Essa resposta é mediada por uma complexa rede de componentes imunes, envolvendo tanto a resposta inata quanto a adaptativa (GABRIEL et al., 2019; DUBIE; MOHAMMED, 2020). A presença de células efetoras, como as células NK e os NKT like, é crucial para o controle ou desenvolvimento da leishmaniose (CAMPOS et al., 2019; CUNHA et al., 2020). Essas células desempenham um papel importante na produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores de citotoxicidade, embora seu papel específico na infecção por *L. braziliensis* ainda não seja totalmente esclarecido (ZHANG; TIAN, 2017).

Portanto, compreender a resposta imune do hospedeiro na LTA e caracterizar adequadamente as células NK e NKT like são aspectos críticos para estabelecer marcadores imunológicos e desenvolver abordagens terapêuticas eficazes para a doença. Além disso, a complexidade da LTA demanda a integração de métodos clínicos e laboratoriais modernos para a definição de critérios precisos de cura ou progressão da doença (DUBIE; MOHAMMED, 2020). Sendo assim, é necessário um maior esforço de pesquisas que elucidem completamente o papel das células efetoras na resposta imunológica à infecção por *L. braziliensis* e explorar novas estratégias de controle da doença.

A toxicidade desempenha um papel importante no desenvolvimento da leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*, e as células NK desempenham um papel relevante no decorrer da infecção causada pelos parasitas (CUNHA et al., 2016; FARIA et al., 2009; FERRAZ et al., 2017). Adicionalmente, as células NK têm

sido associadas a características de memória imunológica, compartilhando semelhanças com a resposta imune adaptativa (BOGDAN et al., 2015; KHAN; AROOJ; WANG, 2020). O estudo e a caracterização das células NK incluindo a influência de moléculas de ativação e de suas respostas adaptativas representam aspectos importantes para o desenvolvimento de futuras terapias imunológicas para a doença.

Assim, a avaliação do perfil das células NK, NKT, suas citocinas e moléculas de ativação, como CD127, NKp46 e NKG2D envolvidas em pacientes com LTA desempenha um papel significativo na compreensão do desenvolvimento da doença, fornecendo *insights* importantes para o diagnóstico, tratamento e manejo clínico mais eficaz. A investigação desses mecanismos imunes permitirá uma abordagem mais abrangente no estudo da resposta imune à infecção por *L. braziliensis* e contribuirá para o avanço dos conhecimentos sobre essa condição.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos

A leishmaniose cutânea é uma doença que apresenta uma ampla ocorrência em vários continentes, com destaque para as Américas, o Norte e Oeste da África, a África Oriental e o Sudeste Asiático. Essa enfermidade afeta globalmente mais de 12 milhões de indivíduos e devido à sua alta capacidade de causar deformidades e seu elevado índice de detecção figura como uma das principais doenças infecciosas, conforme relatório da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2022).

A elevada incidência da leishmaniose está intrinsecamente atrelada a um contexto socioeconômico precário. No entanto, diversos fatores contribuem para o agravamento da situação, tais como mudanças climáticas, processos de urbanização e a diversidade de reservatórios e espécies de protozoários. Esses elementos desempenham um papel crucial na disseminação e proliferação do parasita, ao facilitarem adaptações no habitat do vetor (SILVA et al., 2022; OPAS, 2022; ABRAÃO, 2020).

A leishmaniose é uma doença complexa que envolve uma ampla variedade de agentes causadores e vetores. Existem mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* que podem causar a doença, e mais de 30 espécies de flebotomíneos que atuam como vetores (MORALES, 2019). Além dos fatores genéticos e das características individuais, como a eficácia do sistema imunológico do hospedeiro, a diversidade de espécies e tipos de parasitas pode levar a diferentes respostas do sistema imunológico e, conseqüentemente, a diferentes manifestações clínicas da doença (COSTA-DA-SILVA, 2022).

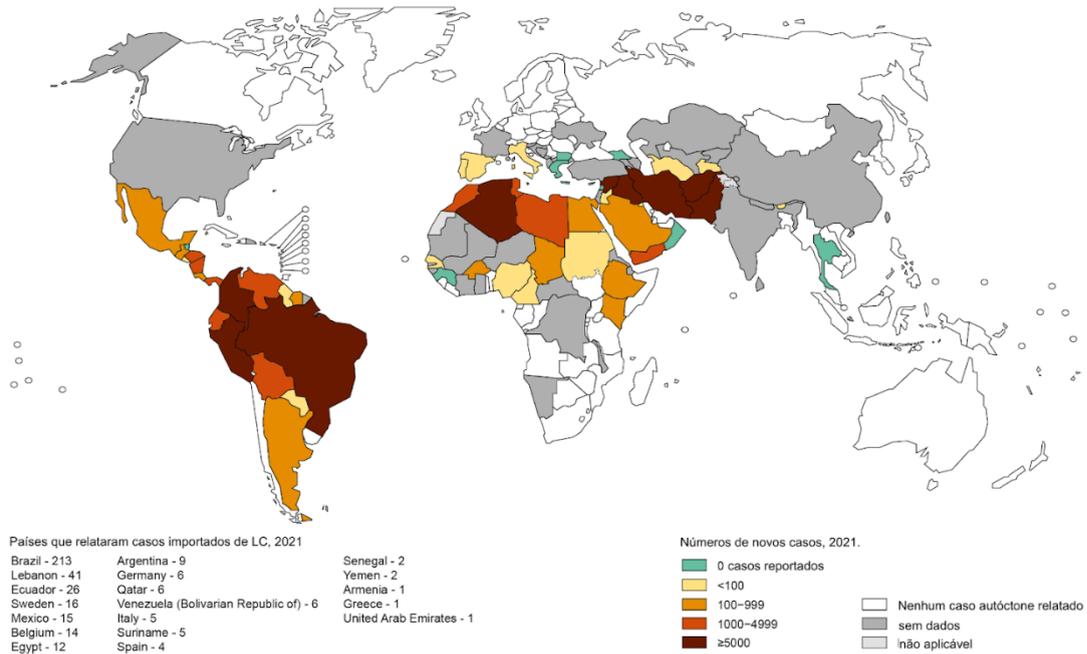
Em termos gerais, a leishmaniose se manifesta em duas formas clínicas distintas: leishmaniose cutânea e visceral. As formas cutânea difusa e mucocutânea são derivações clínicas da leishmaniose cutânea (MORALES, 2019). A leishmaniose cutânea se caracteriza pelo surgimento de nódulos ulcerados com bordas elevadas. Por outro lado, a forma cutânea difusa está associada a estados de imunossupressão e se caracteriza pelo aparecimento de nódulos não ulcerados que indicam uma resposta imunológica celular deficiente (MEHMET, BURAK, SONER, 2020).

A forma mucocutânea da doença afeta principalmente as áreas de mucosa, como nariz, lábios e palato, e pode ser debilitante, causando estigmatização social devido às lesões agressivas (OVALLOS, 2020). A forma visceral da doença, conhecida como leishmaniose visceral, é principalmente causada pelo protozoário *L. infantum* ou *chagasi* em crianças e *L. donovani* em adultos. Essa forma é grave, com uma alta taxa de mortalidade, e os sintomas variam de acordo com o órgão afetado, incluindo anorexia, tosse, palidez e aumento dos órgãos internos (SILVA et al., 2023; MEHMET, BURAK, SONER, 2020).

Entre os anos de 2001 a 2021, estima-se que os casos notificados de leishmaniose cutânea e mucocutânea nas Américas tenham afetado aproximadamente 1.105.545 indivíduos. Esse número expressivo representa mais de 50 mil casos anuais, além disso a leishmaniose cutânea é considerada endêmica em 19 países, incluindo o Brasil (OPAS, 2022).

No continente americano, o Brasil se destaca como o país com maior número de casos reportados de leishmaniose cutânea, seguido pela Colômbia e Peru. A doença, classificada como de notificação compulsória, é conhecida também como leishmaniose tegumentar americana, devido às suas características clínicas que comumente provocam lesões ulcerativas na pele dos indivíduos acometidos pela doença (GUERRA et al., 2015). A Figura 1 ilustra a distribuição global dos países afetados pela leishmaniose cutânea.

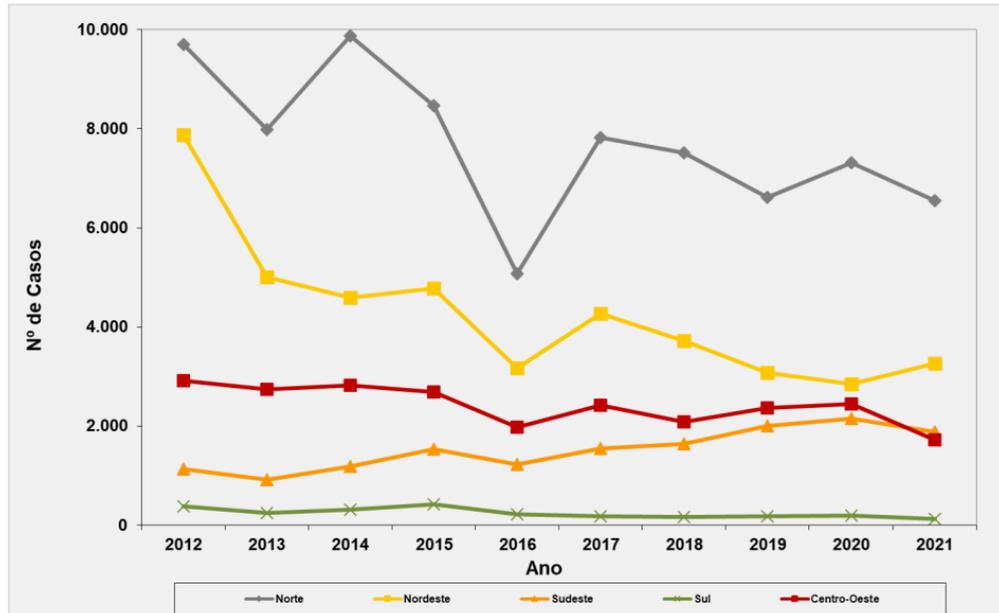
**Figura 1 - Status de endemidade da Leishmaniose cutânea no mundo, 2021.**



Fonte: OMS, 2022.

Apesar da sua distribuição em todo o território nacional, a LTA apresenta uma prevalência maior nas regiões Norte e Nordeste do país (Figura 2). No ano de 2022, foram notificados 14.271 casos da doença, sendo a região Norte responsável pelo maior número de notificações, com 3.070 casos registrados (SINAN, MS, 2022). Entre os anos de 2018 a 2022 houve 1.349 casos em Pernambuco de LTA confirmados e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2023).

**Figura 2** - Número de casos de Leishmaniose cutânea por região do Brasil no período de 2012 a 2021



Fonte: SVS/MS.

A faixa etária mais acometida é composta principalmente por adultos entre 29 e 39 anos, e observa-se uma maior prevalência da doença no sexo masculino (SINAN, MS, 2022). De acordo com Ursine e colaboradores (2019), a maior prevalência da doença nesse grupo pode ser explicada pelo fato de serem os principais indivíduos a realizarem atividades rurais, expondo-os ao vetor da doença comumente encontrado em locais de mata e selvas (URSINE, 2019). Os casos que afetam crianças e mulheres estão mais relacionados ao ambiente domiciliar podendo indicar transmissão intradomiciliar e peridomiciliar (ABRAÃO, 2020; GIL, 2010). Entretanto, é válido salientar que o desenvolvimento e agravamento da doença se dá por diversos fatores, incluindo características intrínsecas dos indivíduos, como a resposta imunológica (VOLPEDO et al, 2021).

A LTA apresenta um padrão de transmissão silvestre nas Américas e está associada a riscos ocupacionais (TEMPONI, 2018) em áreas de trabalho que ocorrem em ambientes como matas e selvas. Algumas das principais atividades econômicas nas regiões Norte e Nordeste são relacionadas a ecoturismo, agricultura e extrativismo mineral (LOBÃO, 2018) o que corrobora com os achados que relacionam a predisposição de contrair leishmaniose, pois aproximam os indivíduos do vetor.

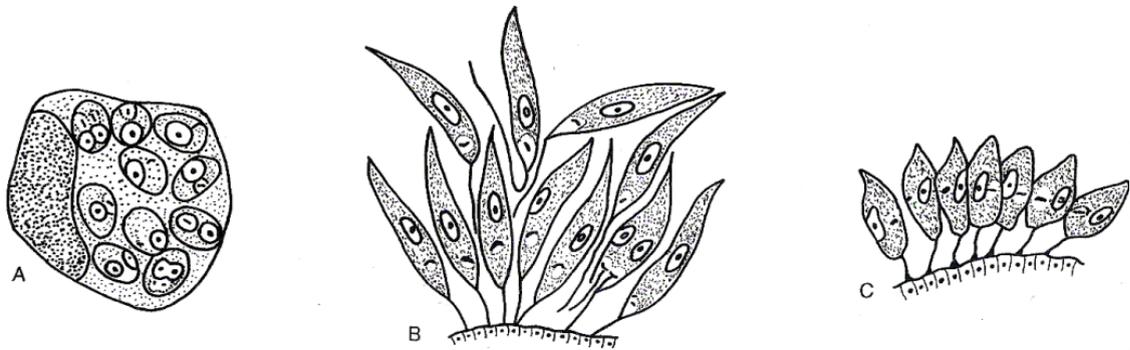
Adicionalmente, a pandemia de COVID-19 concentrou a maior parte dos recursos e atenção na área da saúde nos últimos anos. Isso resultou em uma redução da ênfase na atenção básica às doenças endêmicas no Brasil, como a LTA (ANDRADE et al., 2021). Paralelamente, o estudo conduzido por Andrade e seus colaboradores (2021) demonstrou que a pandemia estimulou a migração de pessoas dos centros urbanos para áreas remotas e florestas, o que pode tê-las aproximado dos vetores da doença, levando, assim, a um aumento nos casos.

O habitat usual do mosquito vetor do gênero *Lutzmyia*, conhecido popularmente como mosquito palha, no Brasil é em zonas de matas e selvas, onde comumente ocorre a transmissão para humanos e outros animais. No entanto, esse padrão de transmissão tem sido afetado por mudanças ecológicas, como o desmatamento e a expansão das cidades para áreas rurais, o que tem levado cada vez mais ao aumento da transmissão em áreas periurbanas (OMS, 2017; VASCONCELOS, 2018).

### 3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETORES DA LTA

A *Leishmania* é um microrganismo que pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, destacando-se por seus flagelos e pela presença de cinetoplasto. Estes protozoários infectam células do sistema fagocítico, principalmente macrófagos. Suas fases evolutivas incluem as formas amastigotas (Figura 3A), frequentemente encontradas no interior de macrófagos e células fagocíticas do sistema imune como neutrófilos e células dendríticas. Essas formas possuem uma configuração esférica ou ovóide, desprovida de flagelo, e varia em tamanho de acordo com a espécie. Em contrapartida, as formas promastigotas (Figura 3B) e paramastigotas (Figuras 3C) exibem uma morfologia mais alongada, com um flagelo livre emergindo de sua parte anterior como é possível observar na figura 03. As formas paramastigotas se encontram aderidas ao epitélio do intestino dos vetores (figura 3C) enquanto as formas promastigotas livres migram para diferentes locais do intestino (NEVES, 2022).

**Figura 3** – Diferentes formas evolutivas da *Leishmania* spp.



Fonte: NEVES, 2005. A – Amastigotas no interior de macrófagos, B – Promastigota e C – paramastigotas aderidas ao epitélio.

Estas últimas são localizadas aderidas ou livres no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. A diversidade de espécies causadoras da forma tegumentar é ampla, com destaque para *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (OMS, 2017, NEVES, 2022).

Os flebotomíneos desempenham um papel fundamental como vetores da *Leishmania* spp, não apenas abrigando o parasita e garantindo a continuidade de seu ciclo biológico, mas também servindo como principais agentes transmissores. Pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*, esses insetos vetores são popularmente conhecidos como “mosquito-palha”, “tutuquira” e “birigui”. Entre as espécies mais relevantes para a transmissão da LTA estão *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (OMS, 2017; NEVES, 2022).

### 3.3 TRANSMISSÃO E CICLO

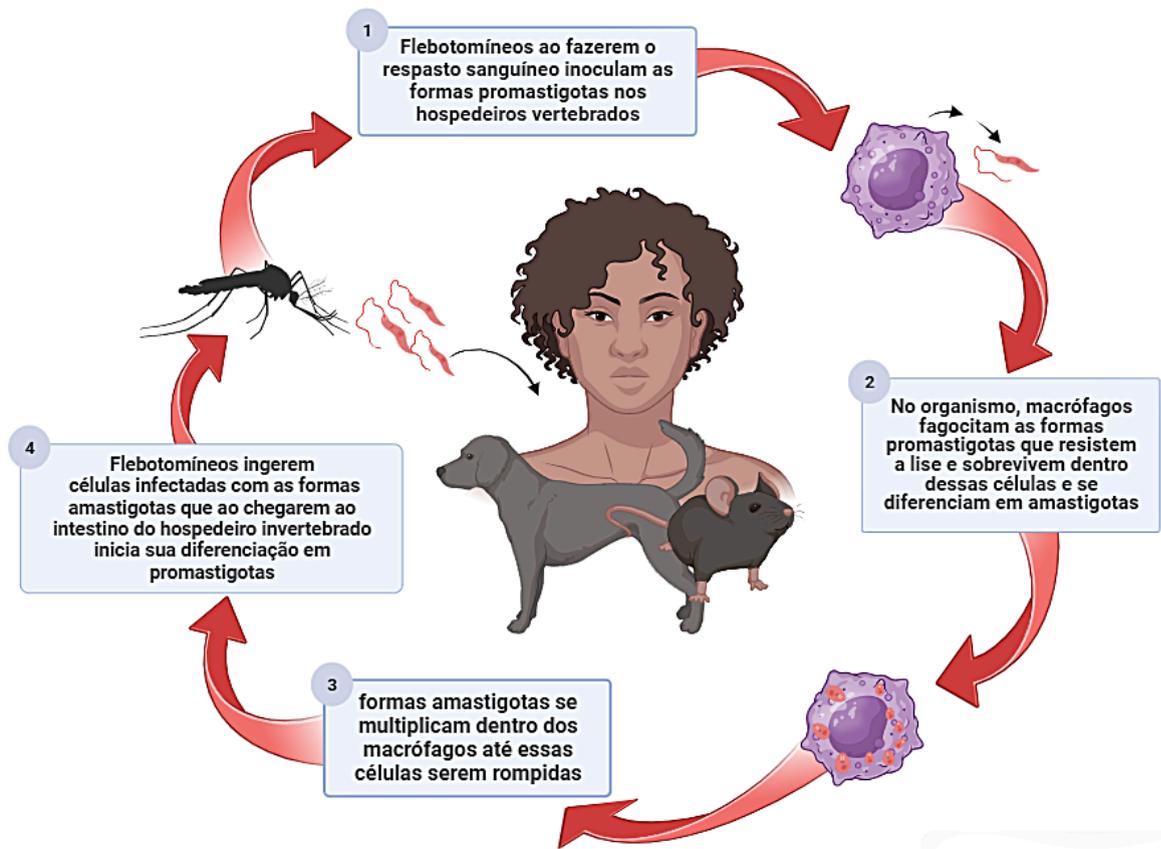
A transmissão da LTA ocorre através de vetores flebotomíneos, podendo ser classificada como antroponótica ou zoonótica. Ainda que seja predominantemente transmitida por esses insetos, casos de transmissão direta entre seres humanos foram documentados, envolvendo a contaminação por objetos perfurocortantes,

transfusões sanguíneas e até mesmo a transmissão vertical de mãe para o feto (MEHMET, BURAK, SONER, 2020).

A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório, caracterizado por um ciclo heterógeno que requer a participação de dois ou mais hospedeiros para completar seu ciclo de vida. As formas amastigotas são localizadas preferencialmente nas células fagocíticas, onde sobrevivem e proliferam, principalmente nos macrófagos presentes na pele. Por outro lado, as formas promastigotas são encontradas no inseto vetor.

A infecção se inicia quando a fêmea do vetor, durante o repasto sanguíneo, inocula as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, que pode incluir seres humanos, mamíferos silvestres como roedores e gambás, além de animais domésticos como cães. Essas formas são então fagocitadas pelos macrófagos, passam pela diferenciação em amastigotas e se multiplicam em seu interior. A infecção do vetor ocorre quando células contendo formas amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo (NEVES, 2022; VRIES, SCHALLING, 2022). O ciclo de transmissão da LTA pode ser observado também na figura 04.

**Figura 4:** Ciclo de transmissão da LTA



Fonte: A autora, 2023. Feito pelo Biorender.

### 3.4 FORMAS CLÍNICAS

As variadas manifestações clínicas da LTA são influenciadas de maneira significativa pela resposta imune dos indivíduos e pela espécie específica de *Leishmania* envolvida. As principais apresentações clínicas incluem a leishmaniose cutânea, a leishmaniose cutâneo-mucosa e a leishmaniose cutânea difusa. Na forma cutânea, observa-se a presença de úlceras isoladas, restritas à derme. O traço característico desta forma é a existência de lesões com bordas elevadas, onde a maior carga parasitária se concentra na fase inicial da enfermidade. A variante disseminada da forma cutânea ocorre como uma derivação, manifestando-se em pacientes com condições imunossupressoras, como a imunodeficiência adquirida (FERNANDES, GONÇALVES, OLIVEIRA, 2022).

A forma mucocutânea tem um início similar à variante cutânea previamente mencionada. No entanto, diferentemente da forma anterior, ela perdura com úlceras agressivas que podem afetar mucosas e cartilagens. O processo inflamatório ulcerativo se desenvolve de forma gradual e crônica, afeta predominantemente regiões de mucosas como as nasais, o palato e a úvula, e tem a capacidade de se disseminar pela face se não for tratado adequadamente (VRIES, SCHALLING, 2022).

A forma cutânea difusa se caracteriza pela manifestação de nódulos não ulcerativos em diversos locais da pele. Esses nódulos abrigam uma quantidade significativa de parasitas e esse tipo de apresentação clínica é comum entre indivíduos infectados pelo complexo *Leishmania mexicana*. Essa variante está associada a um comprometimento do sistema imunológico na eliminação dos parasitas fazendo com que os pacientes fiquem suscetíveis a novas infecções ou até mesmo ocorra metástase para diferentes locais, incluindo as mucosas (NEVES, 2022; VRIES, SCHALLING, 2022). As diferentes formas clínicas de LTA podem ser observadas na figura 05.

**Figura 5:** Diferentes formas clínicas da LTA.



Fonte: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, 2017. A – Forma cutânea localizada, B – forma cutânea disseminada, C – forma mucosa e D – forma cutânea difusa.

### 3.5 DIAGNÓSTICO

Conforme informações da Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde e Atenção Primária de Pernambuco (SEVS, 2023), a confirmação da leishmaniose tegumentar americana requer além de exames clínicos e epidemiológicos, a detecção do parasito por meio de exames sanguíneos e técnicas de busca direta como biópsias e escarificações. Atualmente, esses métodos são considerados padrão ouro para diagnóstico.

Além das abordagens mencionadas, a cultura em meio específico seguida de inoculação em modelos animais de laboratório como camundongos e hamsters é uma alternativa, embora pouco usual devido à sua demora, custo e complexidade. Exames histopatológicos, reação em cadeia da polimerase (PCR) e abordagens indiretas, como testes imunológicos como a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM), também podem ser úteis, sendo

o último menos adotado devido à sua falta de especificidade (VASCONCELOS, 2018; CLEMENTINO, 2023).

Técnicas utilizando a citometria de fluxo para o diagnóstico vem sendo o foco de diversas pesquisas em busca do aprimoramento da detecção do parasita e de técnicas com alto desempenho que forneçam análises mais rápidas e específicas. Pedral Sampaio et al em 2016 demonstraram a efetividade do método utilizando-se da citometria e de microesferas de poliestireno revestidas com antígenos solúveis de *Leishmania braziliensis* em relação a sua sensibilidade comparado com o ELISA, entretanto a técnica demonstrou baixa especificidade por não conseguir distinguir amostras de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* de pacientes infectados.

É válido destacar que tanto o diagnóstico quanto o tratamento da LTA são disponibilizados gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS). No processo de diagnóstico, é fundamental a realização de exames diferenciais para descartar outras doenças que também se manifestam com lesões dérmicas, como sífilis, hanseníase, esporotricose, entre outras (VASCONCELOS, 2018; SES, 2021).

### 3.6 TRATAMENTO

Os medicamentos atualmente empregados no tratamento da leishmaniose tegumentar americana consistem em compostos antimoniais, como o antimônio pentavalente, estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina. Entretanto, o uso desses medicamentos é acompanhado por uma série de efeitos adversos, como nefrotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, dispneia entre outros (Fiocruz, 2024). No Brasil, o fármaco de preferência é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). A OMS recomenda uma dosagem calculada em miligramas de antimônio por quilograma de peso corporal ( $Sb^{+5}/kg/dia$ ), administrada diariamente por via intravenosa. Recomenda-se de 10 a 20mg de antimônio pentavalente/kg/dia por 20 dias (SVS, 2017).

O antimoniato de meglumina (Glucantime®) é vendido em frascos de 5mL contendo cerca de 1,5g da substância em seu estado bruto. Além do tratamento da leishmaniose tegumentar americana, o antimonial pentavalente pode ser utilizado em também na forma visceral da doença.

Visando minimizar os efeitos adversos das terapias convencionais com antimoníaco sistêmico, foi então desenvolvida a terapia intralesional com antimoníacos. A dose recomendada é de 1 a 5ml aplicada em cinco locais distintos da lesão por cerca de uma semana até a cicatrização. Essa é indicada pela OMS para lesões menores que 4cm e que não tenham gerado comprometimento de outras estruturas. A vantagem desse método é principalmente a baixa toxicidade e baixo custo quando comparado com os medicamentos sistêmicos. O tratamento intralesional não abrange todos os tipos de LTA, variando de acordo com o perfil infiltrativo de cada lesão. Efeitos adversos como prurido, irritação, dor e eritema podem ser observados (ARONSON, JOYA, 2019; TOVAR, SACRISTE, JUAREZ, ARENAS, 2020).

De acordo com os autores Chakravarty, Joya e colaboradores, 2019, a eficácia do antimônio pentavalente intralesional para a LTA do velho mundo (Eurásia e África) foi de 75%, podendo ser maior quando combinada com a crioterapia. Houve 83% de eficácia com o estibogluconato de sódio e 68% com antimoníaco de meglumina. Já no novo mundo (Américas) as porcentagens para a eficácia do antimônio pentavalente, estibogluconato de sódio e antimoníaco de meglumina foram respectivamente de 77%, 61% e 82% (CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019; ARONSON, JOYA, 2019).

Como alternativas de segunda linha, o isotionato de pentamidina e a anfotericina B são empregados, porém, carregam consigo efeitos colaterais severos, como hepatotoxicidade e neurotoxicidade (FIOCRUZ, 2023; OMS, 2017). Apesar de ser categorizada como um antibiótico macrolídeo, a anfotericina B apresenta propriedades antifúngicas e leishmanicidas relacionadas ao ergosterol, o componente principal presente na membrana dos parasitas. Ao se ligar à molécula de ergosterol, a anfotericina B induz a liberação de íons através da formação de poros, alterando a permeabilidade da membrana do parasita e resultando em sua morte (SHIRZADI, 2019).

Por essa razão, é utilizada como um fármaco de segunda escolha podendo ser utilizada por via intralesional ou intravenosa. No entanto, sua principal desvantagem reside na elevada toxicidade. Com o objetivo de minimizar esses efeitos adversos, foram desenvolvidas novas formulações lipídicas, incluindo a anfotericina lipossomal, a anfotericina para dispersão de colesterol e a anfotericina

complexa lipídica (TOVAR, SACRISTE, JUAREZ, ARENAS, 2020; AZIM, KAHN, ULLAH, 2021).

Uma alternativa é a miltefosina que é atualmente a única droga oral aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos que possui ações leishmanicidas significantes. Entre os efeitos adversos estão reações gastrointestinais frequentes, anormalidades renais e hepáticas além de ser um medicamento teratogênico devendo ser evitado por mulheres grávidas (SOTO, BERMAN, 2021).

Existe também como tratamento a opção de termoterapia ou terapia térmica, que pode ser feita através de lasers, infravermelho ou com estímulos elétricos diretos. Baseada em estudos que demonstraram a inibição do crescimento das *Leishmania spp* intramacrófagos em temperaturas acima de 39 graus (SACKS, BARRAL, NEVA, 1983; BERMAN, NEVA, 1981) a termoterapia utiliza-se da técnica de radiofrequência que proporciona vantagens já que as ondas penetram até 4mm na lesão objetivando eliminar apenas os parasitas e não machucando a pele ao redor (GONCALVES, NERY, 2018; TOVAR, SACRISTE, JUAREZ, ARENAS, 2020). As terapias a lasers destroem os parasitas através da termólise dos mesmos e como é uma terapia local, possui poucos efeitos adversos.

Atualmente existem pesquisas e testes com vários tipos de lasers. O laser de CO<sub>2</sub> por exemplo é utilizado em potências de 30w com pulsos de 0,01 a 1 segundo de modo contínuo. Outros tipos de lasers como o de argônio, de vidro de érbio, de granada ítrio alumínio dopado com neodímio e o laser corante pulsado vem sendo testados e há relatos na literatura para aqueles pacientes que possuem contra-indicações aos tratamentos convencionais ou que não respondem a eles. Entre seus efeitos adversos, foi visto alterações como hiperpigmentação e cicatrizes hipertróficas (TOVAR, SACRISTE, JUAREZ, ARENAS, 2020).

O laser pode ser aplicado localmente e o aparelho carregado de maneira portátil, entretanto sua grande desvantagem são os elevados custos dos equipamentos. É recomendada para lesões causadas por qualquer espécie do gênero *Leishmania* e pode ser uma alternativa para o tratamento de LTA em gestantes e para os pacientes que possuem contra-indicações ao tratamento sistêmico com antimoniais e anfotericina b, como pacientes com doenças hepáticas, renais e cardiovasculares (GONCALVES, NERY, 2018). É um método que visa a eliminação de parasitas em lesões mais basais, podendo não ser efetiva caso haja

comprometimento de linfonodos por exemplo. (TOVAR, SACRISTE, JUAREZ, ARENAS, 2020, PRADHAN et al, 2022)

Já a crioterapia utiliza-se das baixas temperaturas para a eliminação dos parasitas que são termo sensíveis a temperaturas abaixo de zero. É utilizado nitrogênio líquido abaixo de 196 graus diretamente nas lesões, visando a lise direta desses parasitas que causa a ativação da resposta imune celular por conta da liberação de moléculas antigênicas (ARONSON, JOYA, 2019). A recomendação é que sejam aplicados por 15 a 20 segundos em um espaço cerca de 1-2mm a mais da lesão e que seja repetido três vezes por sessão a cada 3 semanas (TOVAR, SACRISTE, JUAREZ, ARENAS, 2020).

Assim como a termoterapia, a crioterapia conta com a vantagem de ter poucos efeitos adversos e ainda possuir um baixo custo. Entretanto, a eficácia desse tipo de terapia parece ter porcentagem não muito bem esclarecida, podendo ter uma alta variação. A crioterapia combinada com os a terapia intralesional é mais eficaz do que o uso individual da terapia intralesional (MADUSANKA, SILVA, KARUNAWEEERA, 2022).

Devido à complexidade da leishmaniose tegumentar, diversos estudos indicam a eficácia do uso de terapias combinadas como uma opção para a melhor eliminação do parasita, redução dos efeitos adversos e prevenção do subsequente desenvolvimento de mecanismos de resistência do parasita (MOMENI, REISZADAE, AMINJAVAHERI, 2019; ASILIAN et al., 2003). Uma dessas combinações inclui o uso conjunto de Glucantime e alopurinol, que demonstrou eficácia no tratamento da leishmaniose tegumentar causada por *L. tropica*, quando comparada aos resultados obtidos com os medicamentos testados isoladamente (ESFANDIARPOUR, ALAVI, 2002). Resultados semelhantes foram observados ao combinar a terapia com antimonial Glucantime com a crioterapia (SALMANPOUR, RAZMAVAR, ABTAHI, 2006).

As diferentes abordagens de tratamento e suas combinações são influenciadas pelas espécies do parasita, a apresentação clínica da doença e até mesmo pela endemicidade da região (MADUSANKA, SILVA, KARUNAWEEERA, 2022). Portanto, a busca por novas terapias e medicamentos é essencial para garantir uma abordagem eficaz e o controle da doença, evitando recidivas.

**Quadro 1** - Principais tratamentos para LTA.

<b>Droga/Método</b>	<b>Via de Administração</b>	<b>Dose</b>	<b>Efeitos Adversos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Antimoniais Pentavalentes</b>	IM, IV ou IL	20mg/kg/dia por 28-30 dias	Cardiotoxicidade, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade	Fácil disponibilidade em áreas endêmicas; baixo custo	Duração prolongada, dor, resistência à droga, efeitos adversos graves
<b>Anfotericina B</b>	IV	0.75-1mg/kg/dia por 15-20 dias	Toxicidade renal, hipocalcemia	Resistência primária não é comum	Requer hospitalização por administração, nefrotoxicidade
<b>Anfotericina B lipossomal</b>	IV	10-30 mg/kg dose total	Calafrios, leve nefrotoxicidade	Alta eficácia, baixa toxicidade	Alto custo, necessidade de infusão intravenosa lenta
<b>Miltefosina</b>	Oral	100-150 mg/dia por 28 dias	Irritação gastrointestinal, toxicidade renal e hepática, teratogenicidade	Eficaz	Alto custo, possivelmente teratogênico, resistência à droga
<b>Termoterapia</b>	Local	-	Dor, irritação, queimação, hiperpigmentação, cicatrizes hipertróficas	Poucos efeitos adversos	Alto custo, efetiva em lesões mais basais
<b>Crioterapia</b>	Local	Sessões a cada 3 semanas	Dor, irritação, queimação	Poucos efeitos adversos, curta duração	Efetiva em lesões mais basais

FONTE: Adaptado de Pradhan et al. IM, intramuscular, IV, intravenoso, IL, intralesional.

### 3.7 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE

O desencadeamento da resposta imune em relação à *Leishmania* tem início no momento da inoculação do parasita pelo vetor. A saliva do próprio flebótomo possui moléculas antigênicas como as proteínas PpSP15 e PpSP9 que são capazes de estimular a resposta imune inata local, além de atuar como agente vasodilatador, promovendo a dispersão das formas promastigotas no momento da infecção. Paralelamente, essa saliva também desencadeia a ativação do sistema complemento, facilitando a fagocitose (PINHEIRO, GRANZOTO, 2023, LAJEVARDI et al, 2022).

O sistema complemento e os receptores inatos, como os receptores do tipo Toll (TLR), reconhecem inicialmente o parasita. Posteriormente, células do sistema imune, como neutrófilos, células dendríticas e principalmente macrófagos, realizam a fagocitose do parasita. Nessas células, o parasita resistente a fagocitose sobrevive nos vacúolos parasitóforos, multiplicando-se e evitando a detecção pelo sistema imune em sua forma amastigota (CHIMAL, RUIZ, BECKER, 2017).

Diversas moléculas participam do mecanismo de infecção, como lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas GP63, fosfatases ácidas, nucleotidases e carboidratos presentes na superfície do parasita. Essas moléculas contribuem para inibir a função efetora dos macrófagos, auxiliando na fixação e internalização do parasita, sendo essenciais para a sobrevivência dos parasitas (GABRIEL et al., 2019). Além disso, o LPG, ao se ligar ao TLR das células NK, estimula a produção de IFN- $\gamma$ . Esse mesmo composto também induz a produção de interleucina 12 (IL-12) pelas células dendríticas, aumentando a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade do Tipo II (MHCII). As células dendríticas desempenham um papel crucial ao ativar a diferenciação das células NKT, conduzindo assim a uma resposta imune adaptativa (CHIMAL, RUIZ, BECKER, 2017).

A resolução efetiva da infecção e a consequente eliminação do parasita estão correlacionadas com o perfil de resposta imune do tipo T Helper (Th1). Esse perfil envolve a ativação de células T auxiliar CD4+ efectoras e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, o perfil de

resposta imune do tipo Th2 é uma resposta com característica anti-inflamatória que está mais associado à sobrevivência do parasita, resultando na falha de sua eliminação pelo hospedeiro. Nesse padrão de resposta, às citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  desempenham um papel preponderante (NEVES, 2022; ROCHA, 2020).

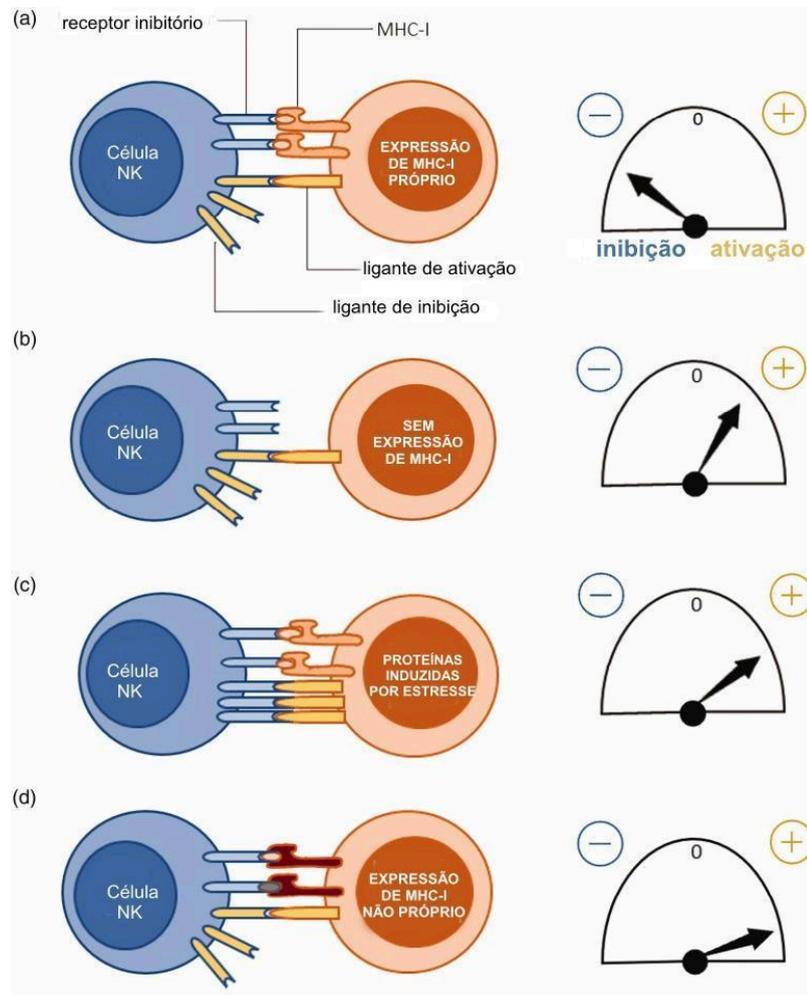
O recrutamento de diversos tipos celulares para o local da infecção é uma etapa crucial. Neutrófilos, por exemplo, podem eliminar as formas promastigotas através da formação de armadilhas extracelulares (NETs) ou netose que são a liberação de estruturas como elastases e mieloperoxidases capazes de lisarem os parasitas (LUIZ, 2023). Neutrófilos em apoptose sinalizam para que haja o aumento da fagocitose pelas células dendríticas, que também são recrutadas por quimiocinas liberadas no ambiente.

Os monócitos, por sua vez, realizam diapedese do sangue para os tecidos lesionados, eliminando o parasita através da produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, essas células se diferenciam em células dendríticas e nos linfonodos estimulam a diferenciação de células Th1 por meio da produção de interleucina-12 (IL-12). As células Th1 migrarão então para o local de infecção, contribuindo para a eliminação do parasita através da produção de óxido nítrico (NO), IFN- $\gamma$  e prostaglandina (PGE2), entre outros mediadores (SCOTT, NOVAIS, 2016).

### 3.7.1 Células Natural Killer (NK) na Resposta Imune Inata

As células Natural Killer (NK), compreendendo de 5% a 20% das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC), desempenham um papel proeminente na imunidade inata. Elas se destacam por sua atividade citotóxica, dispensando a necessidade de sensibilização prévia, e são capazes de desencadear a morte celular por meio de mecanismos citotóxicos naturais, produção de citocinas e atividades citotóxicas dependentes de anticorpos (COVRE et al., 2020). Essas células podem ser subdivididas em diferentes subgrupos, sendo o principal deles o constituído por células CD3<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, responsável pela secreção de citocinas, e o subtipo CD3<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>, com características predominantemente citotóxicas (ARACHCHIGE, 2021).

O controle da atividade das células NK é regulado por intrincados mecanismos de inibição e ativação, conferindo-lhes a precisão de identificar e eliminar células sob estresse (ARACHCHIGE, 2021). Seus receptores possuem uma estrutura com domínio extracelular, onde ocorre o acoplamento com o ligante, e uma porção intracelular composta por proteínas transmembranares (KUMAR, 2018, ARACHCHIGE, 2021). Esses receptores são variados em número e estrutura, desempenhando o papel de traduzir os sinais inibitórios e ativadores provenientes de seus ligantes externos. Em circunstâncias normais, não patológicas, os sinais inibitórios predominam, mantendo as células NK em estado inativo. No entanto, em situações de estresse celular, como durante infecções, os sinais de ativação se sobressaem (figura 6) (UMAR, 2018, WANG, MALARKANNAN, 2020). Células saudáveis exibem moléculas de MHC de classe I em sua superfície. As células NK, ao reconhecerem a expressão desse marcador, são inibidas de eliminar as células que apresentam o MHC de classe I em sua superfície (Figura 6A) (PAUL; LAL, 2017). Em contrapartida, células infectadas por vírus e outros microrganismos, como parasitas, assim como células estressadas, diminuem ou perdem a capacidade de expressar esse marcador, levando à lise mediada por células NK (Figura 6B) (PAUL; LAL, 2017). Além disso, citocinas como IL-2, IL-15 e IL-18 também influenciam a atividade citotóxica das células NK, amplificando sua função efetora (WANG, MALARKANNAN, 2020).

**Figura 6:** Vias de regulação das Células NK

Fonte: ARACHCHIGE, 2021.

A atividade citotóxica das células NK também pode ser desencadeada pela interação entre anticorpos e receptores Fc, desencadeando uma cascata de sinalização que resulta na liberação de compostos bioativos (CAMPOS et al., 2017). Contudo, o seu principal mecanismo de ação reside na liberação de grânulos líticos, componentes essenciais para sua atividade. Esses grânulos, contendo perforina, granzima e granulicina, desencadeiam a lise osmótica ou necrose (por perforina) e morte celular (por granzima). Essa morte celular é promovida através da formação de poros na membrana da célula alvo, tornando-a permeável às granzimas liberadas, o que resulta na fragmentação do DNA e, por conseguinte, na morte celular (CAMPOS et al., 2017, PRAGER, WATZL, 2019).

A complexidade das células NK abrange diversas formas de ação e reconhecimento celular, assim como seu mecanismo de autotolerância. Essa sofisticação torna as células Natural Killer um alvo instigante de pesquisa a ser explorado. Apesar de ainda haver controvérsias sobre seu papel na LTA, estudos apontam para seu potencial protetor, enquanto outras perspectivas indicam uma contribuição menor ou mesmo um papel que pode agravar o quadro clínico (GABRIEL et al., 2019).

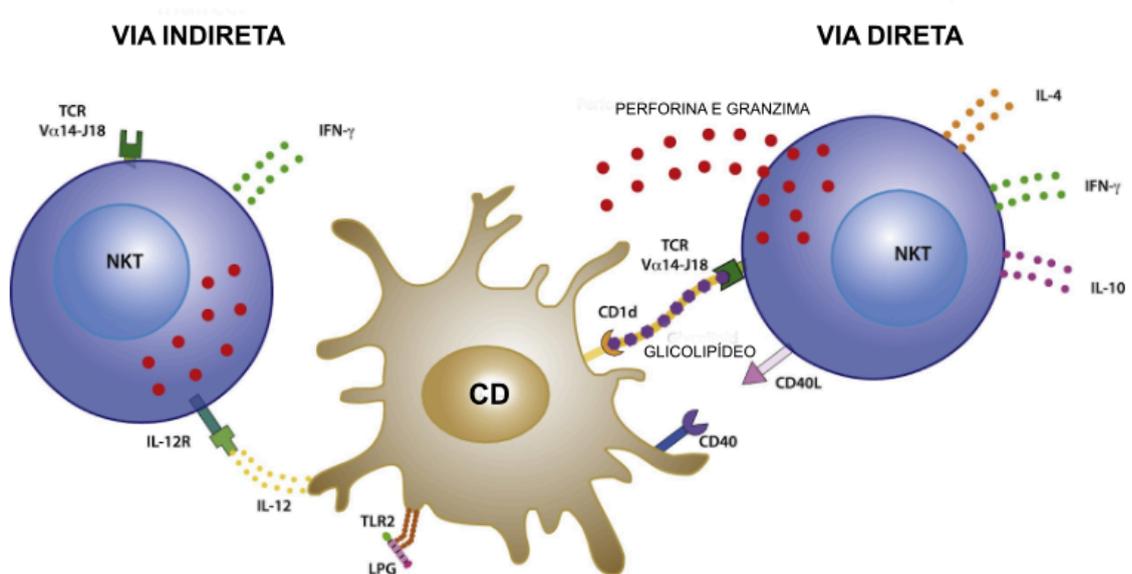
### 3.7.2 Células Natural Killer T (NKT) na Resposta Imune Adaptativa

As células NK T são um tipo de célula que coexpressa marcadores tanto de células T quanto de células NK. Elas pertencem à categoria de células T não convencionais, formando uma parcela minoritária, representando menos de 1% da população das células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs). Suas características permitem reconhecer antígenos glicolipídeos via CD1 através das células apresentadoras de antígenos.

Um ponto marcante dessas células é a sua conexão entre imunidade inata e adaptativa, unindo características citotóxicas a capacidades de produzir citocinas como o IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13. A classificação dessas células pode ser realizada com base nos polimorfismos em suas cadeias alfa do Receptor de Célula T (TCR). O tipo 1, denominado de células NK T de cadeia invariante (iNKT), apresenta uma baixa diversidade dessa cadeia. Dentre os subtipos de células NKT, as iNKT são as mais amplamente estudadas e documentadas (SEO et al., 2019; PELLICI, KOAY, BERZINS, 2020).

A ativação das células NKT na leishmaniose pode ocorrer por meio de dois mecanismos: a ligação do TCR (Via direta) ao CD1d e a influência de citocinas (via indireta) secretadas pelas células dendríticas (DCs) (Figura 7). A primeira opção parece ser a mais provável no contexto da leishmaniose. Semelhante ao cenário das células NK, o papel das NKT na LTA ainda é pouco estudado. A pesquisa em infecções humanas ainda é limitada, já que a função das células NKT é altamente influenciada por variáveis como a localização da infecção, espécie e cepa de *Leishmania* envolvida, além do número de parasitas presentes (CHIMAL, RUIZ, BECKER, 2017)

**Figura 7:** Vias de ativação das células NKT.



Fonte: CHIMAL, RUIZ, BECKER, 2017. Diferentes formas de ativação das células NKT, na via indireta sua ativação ocorre através de citocinas secretadas por células dendríticas. Na via direta há ligação do CD1d ao TCR da célula NKT.

### 3.8 MARCADORES DE ATIVAÇÃO

O grupo de receptores de citotoxicidade naturais das células NK, constituídos por NKp46, NKp30 e NKp44, junto com o receptor transmembrana NKG2D, são os principais ativadores envolvidos na efetiva lise realizada pelas células NK. A ação citotóxica das NK tem início após o reconhecimento dos ligantes pelos referidos receptores (ARACHCHIGE, 2021; CAMPOS et al., 2017).

O receptor NKG2D está presente nas células NK e NKT desde seus estágios iniciais de desenvolvimento. Sob condições normais, seus ligante são expressos em níveis baixos, porém o estresse celular pode aumentar essa expressão (WENSVEEN, JELECIC, POLIC, 2018).

O papel do NKG2D em infecções intracelulares é reconhecido como um importante mecanismo de neutralização empregado pelas células NK nesses tipos de infecção, embora possa ser subjogado por fatores patogênicos. Seu impacto regulador é mais proeminente em ambientes inflamatórios, gerenciando a sinalização e afetando a expressão de diversos receptores em diferentes estágios do ciclo celular (HAMERMAN, OGASAWARA, LANIER, 2005;).

Além do NKG2D, outros marcadores como o NKp46 e CD127 desempenham um papel relevante na ativação das células NK. O NKp46 integra o conjunto de receptores de citotoxicidade naturais (NCR), pertencentes à família das imunoglobulinas. É uma glicoproteína de membrana que está presente na superfície de células NK ativadas e não ativadas (YAMAMOTO et al, 2022, MANDELBOIM, PORGADOR, 2001). É descrito como um dos principais componentes indutores da citotoxicidade dessas células (SIVORI, 1999, 2019).

Já o CD127, encontrado em células T ativadas, macrófagos e células B imaturas, é um receptor para interleucina 7 (IL-7), desempenha um papel importante no desenvolvimento inicial de células T assim como na proliferação e sobrevivência de células T CD8+ de memória e virgens (CROWLEY, ANJO, 2012, WANROOIJ et al., 2018, MAZZUCHELLI, RIVA, DURUM, 2012). Michaud e colaboradores (2010) demonstraram a dependência das células NK da IL-7 para o aumento de sua sobrevivência, por meio da inibição da apoptose (MICHAUD et al, 2010).

A investigação do papel dessas células e em como a expressão dos seus marcadores influenciam no ambiente inflamatório causado pela doença são importantes para a compreensão da resposta imune frente à *Leishmania*. Considerando que compreender o papel das células e como ele influenciam na progressão da doença pode gerar novas perspectivas para o desenvolvimento de métodos terapêuticos mais precisos e eficientes.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de células Natural Killer e Natural Killer T e seus marcadores de citotoxicidade após estimulação antigênica específica em pacientes com Leishmaniose tegumentar americana.

### 4.2 Objetivos Específicos

- (a) Caracterizar os pacientes com leishmaniose tegumentar americana deste estudo em relação aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais;
- (b) Identificar, nas células mononucleadas do sangue periférico dos pacientes com LTA e após cura clínica, as células NK e NKT, bem como seus marcadores de citotoxicidade NKG2D, NKp46 e CD127, após estimulação antigênica específica por imunofenotipagem;
- (c) Avaliar a alteração dos marcadores imunológicos NKG2D, NKp46 e CD127, nos pacientes com LTA durante o tratamento com Glucantime®;

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

No estudo foram realizadas comparações entre o grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesão ativa (AT, N = 11) e pacientes com cura clínica (PT, N = 5), obtida por meio de tratamento com Glucantime®, no período de 2 a 48 meses. Além disso, um grupo controle (CT, N = 11) foi formado por sujeitos sem histórico prévio da doença. Todos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência.

### 5.2 PROCESSO DE SELEÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A população estudada foi composta por pacientes oriundos de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar americana (LTA) em Pernambuco. Todos os pacientes passaram por avaliação médica com um dermatologista para confirmar o diagnóstico. Foi fornecida explicação detalhada do objetivo do estudo aos pacientes, e eles foram acompanhados para realizar coletas de sangue antes e/ou após a cicatrização de sua (s) lesão (ões), seja por meio do tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) sob supervisão médica.

O grupo controle foi constituído por indivíduos considerados saudáveis, sem evidência clínica da doença ou de cicatriz característica da LTA, residentes em área não endêmica e que não receberam transfusão sanguínea. A coleta de sangue foi realizada somente após a obtenção do consentimento informado de todos os indivíduos, por meio da assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE, Anexos A, B, C e D), em conformidade com a aprovação do projeto na Plataforma Brasil sob o CAAE: 11083812.7.0000.5190 (Anexo E).

### 5.3 EXAMES LABORATORIAIS DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

Em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ), os pacientes foram submetidos a diversos

procedimentos laboratoriais para confirmar a doença. Os exames incluíram a realização de pesquisa direta em material obtido através de escarificação da borda da lesão, imunofluorescência indireta (IFI) e a Realização da reação em cadeia de polimerase (PCR).

#### 5.4 CULTURA DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* E OBTENÇÃO DE ANTÍGENO TOTAL

As formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2903, foram cultivadas *in vitro* e expandidas em meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) até atingirem a fase de crescimento exponencial.

A massa parasitária foi submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) por meio de centrifugação a 2500x rpm, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o pellet celular foi ressuscitado em 750ul de tampão de lise branda e 250ul de inibidor de protease. A suspensão foi então transferida para tubos eppendorf, congelada em nitrogênio e descongelada em banho-maria sete vezes até a lise completa das células. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 4°C, 15.000x rpm por 15 minutos, e o sobrenadante coletado e armazenado.

Em seguida, a amostra foi submetida a uma dosagem proteica pelo método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981), além de passar por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme descrito por Laemmli (1970). Após esses procedimentos, as frações antigênicas foram armazenadas a –80°C até a utilização nos ensaios de cultura celular.

#### 5.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos pacientes selecionados

A obtenção das PBMC foi realizada por meio da coleta de aproximadamente 20 mililitros (20ml) de sangue em tubos de heparina utilizando o sistema a vácuo. O sangue foi diluído com o mesmo volume de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e transferido para cônicos contendo a metade do volume total de sangue

de Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia). Após a transferência, as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 400g por 35 minutos, ao fim da centrifugação foi obtido uma amostra trifásica com as camadas de plasma, PBMC e granulócitos isolados.

Com cuidado, a camada isolada de PBMC foi retirada e transferida para outro tubo cônico, onde foi submetida a duas lavagens com o meio RPMI em uma centrifugação de 300g por 10 minutos, visando a obtenção apenas das PBMCs na amostra, eliminando resquícios de outros componentes tais como o Ficoll. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o pellet celular ressuspense em 1ml do meio RPMI 1640. Para a quantificação de células em câmara de Neubauer, 10µl da amostra foram retirados e diluídos em 90µl de azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO).

Para a utilização na marcação e cultura celular, após a contagem na câmara de Neubauer, foi feito um cálculo para ajustar a concentração de células para  $1 \times 10^6$  células/ml. Uma fração das células foi usada para a marcação *ex vivo* de estudos adjacentes do grupo de pesquisa, e outra para a cultura com antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, conforme obtido de acordo com o item 5.4.

## 5.6 Cultura celular

Os volumes de PBMC, com concentrações previamente ajustadas, foram adicionados em tubos de polipropileno de 15ml (BD Falcon™) na concentração de  $1 \times 10^6$  células por tubo. O cultivo foi realizado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Foram feitas duas culturas de cada paciente, sendo a primeira estimulada com antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10 µg/ml) conforme obtido no item 5.4, e a outra sem estímulo (grupo controle). Os tubos foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 72 horas. Após o decorrer das 72 horas, as PBMCs foram centrifugadas a 300g por 10 minutos, e 600µl do sobrenadante foram coletados, adicionados em tubos eppendorf identificados, e, em seguida, armazenados a -80°C para futuras análises de citocinas. O pellet de células foi ressuspendido em 1ml de PBS, para subsequente marcação visando à análise por citometria de fluxo.

## 5.7 Citometria de fluxo

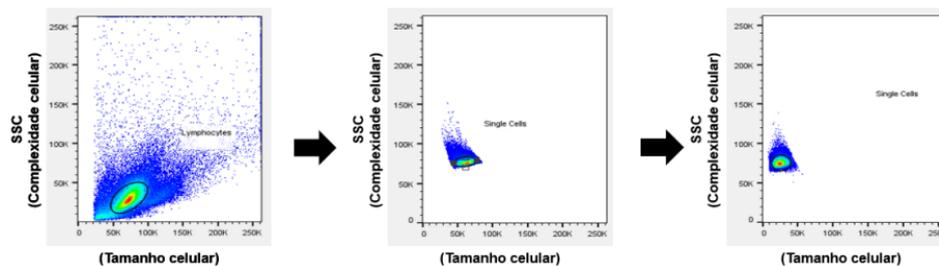
Foram conduzidas análises por citometria de fluxo com o objetivo de identificar e quantificar as populações celulares de NK e NKT, bem como avaliar a expressão dos marcadores nas amostras obtidas de acordo com o item 5.5. Foram determinadas as porcentagens de células CD3, CD4 (PERCPCY 5.5), CD8 (APC), CD16 (PECY 7), CD56 (PE) e dos marcadores NKp46 (BB515), NKG2D (PECF594) e CD127 (BV421). As PBMCs, previamente contadas ( $1 \times 10^6$  células), foram inseridas em tubos de poliestireno, suspensas em 2 ml de PBS e submetidas a uma centrifugação a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, a boca do tubo foi seca e, em seguida, foram adicionados 100µl de PBS. As PBMCs foram incubadas com os anticorpos de superfície (anti-CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD127, NKp46 e NKG2D) por 30 minutos a 8°C, protegidas da luz. Após o tempo decorrido, as células foram lavadas com 2 ml de PBS e centrifugadas novamente a 300g por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 300µl de PBS. As amostras foram analisadas (300.000 eventos/tubo) em um citômetro de fluxo (BD FACS ARIA III) e posteriormente analisadas por meio do software FlowJo (Tree Star Inc®).

### 5.7.1 Metodologia de análise

A priori foram determinados sítios para selecionar apenas a região com presença de células linfocitárias de interesse, utilizando filtros de Dispersão Frontal (FSC-H,W e A) e Dispersão lateral (SSC- H, W e A) para selecionar a região linfocitária e excluir células em dupla (figura 08). Após essa seleção, gráficos de fluorescência foram criados juntamente com seus histogramas associados, utilizando quadrantes e regiões de interesse para a análise. Os quadrantes foram determinados com base na população negativa, nas titulações de anticorpos e em controles utilizando todos os anticorpos exceto um (Fluorescência Menos Um - FMO). Os percentuais de cada região contendo a população de linfócitos foram as consideradas para a análise de fluorescência. Para as células NK, após a delimitação a zona linfocitária, foi verificada a presença do marcador CD3, conforme demonstrado no histograma (FIGURA 09). Para uma análise mais precisa das

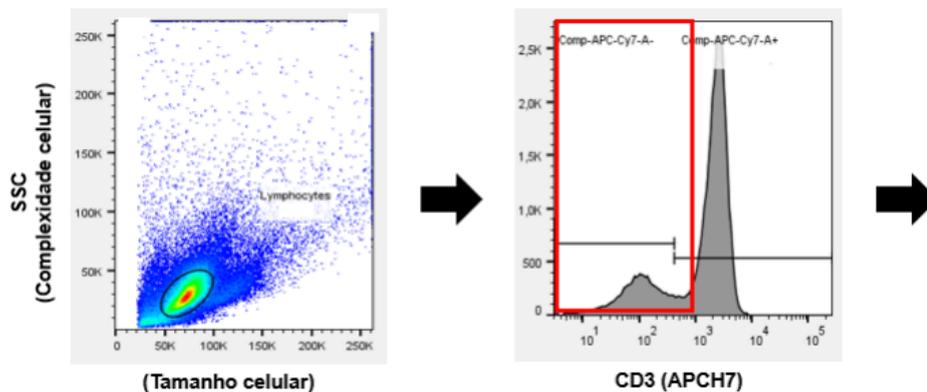
células NK (CD3-), foram identificadas as células duplamente positivas para os marcadores de superfície CD16 e CD56 (FIGURA 09). A partir dessa população filtrada, foram verificados os percentuais dessas células que expressavam os marcadores NKG2D, NKp46 e CD127 (FIGURA 09). Na análise das células NKT, foram delimitadas regiões linfocitárias e, em seguida, identificada a população que expressava o marcador CD3, conforme observado no histograma (FIGURA 10). A partir dessa identificação, foram feitas as análises para os marcadores CD16 e CD56 (FIGURA 10), e em seguida foram verificados a presença da expressão dos marcadores CD4, CD8, NKG2D, NKp46 e CD127 (FIGURA 10).

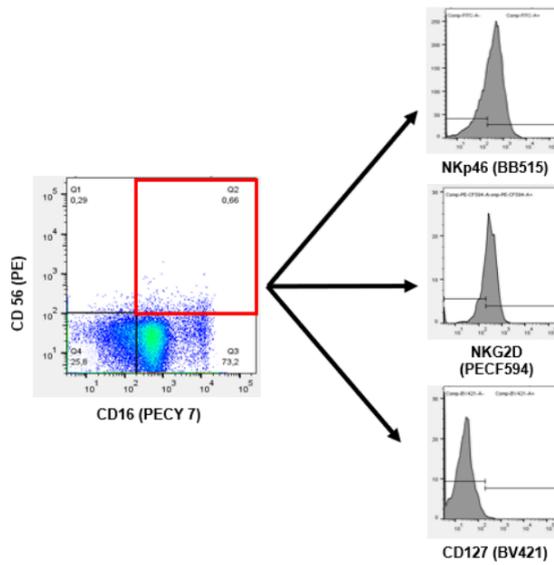
**Figura 8** - Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária após separação das células únicas



FONTE: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

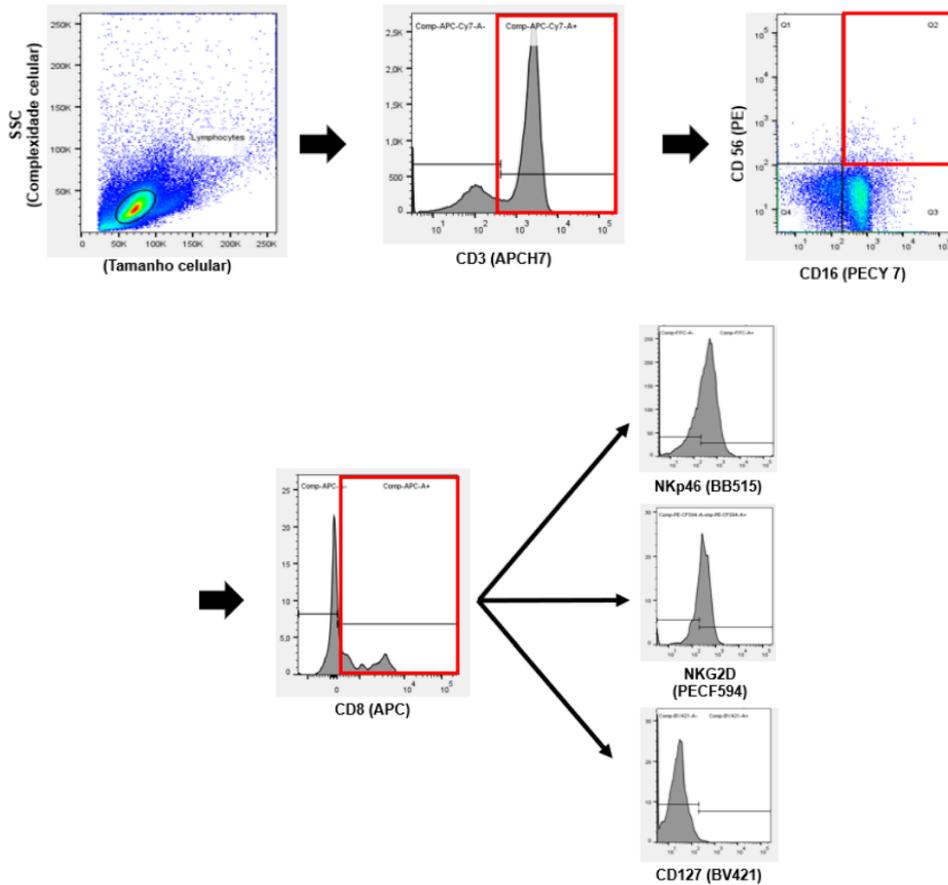
**Figura 9** - Estratégia de análise das células NK.





FONTE: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

Figura 10 - Estratégia de análise das células NKT.



FONTE: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

## 5.8 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism 7. Inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Aos dados que apresentaram distribuição normal, foi empregado o teste t de Student. Àqueles que não apresentarem normalidade, o teste U de Mann-Whitney foi utilizado. Todas as conclusões foram baseadas no nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  = estatisticamente significativo).

## 5.9 Aspectos éticos

O presente projeto é um desdobramento do projeto “Caracterização da resposta imunológica de pacientes portadores da leishmaniose tegumentar americana ativa e após a cura clínica” já aprovado no comitê de ética (CAAE: 11083812.7.0000.5190) (Anexo E).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O grupo de pacientes AT incluiu 11 indivíduos que apresentaram lesões ativas, com diagnóstico confirmado conforme descrito no tópico 5.3. A idade média dos pacientes com lesão ativa foi de 36 anos, com um desvio padrão de  $\pm 17,15$ . A proporção entre homens e mulheres foi de 4 homens para 7 mulheres. A média da duração da doença para os pacientes com lesão ativa foi de 1 mês e 9 dias, com um desvio padrão de  $\pm 1$  mês e 3 dias. O número médio de lesões foi de 1,25, com um desvio padrão de 0,43. As lesões estavam distribuídas entre a face (8,33%), membros superiores (41,67%) e membros inferiores (50%). Os municípios de residência desse grupo foram Aldeia (2), Igarassu (6) e Moreno (3). Sendo Igarassu o município com o maior quantitativo de indivíduos com a doença (Tabela 1).

O grupo PT incluiu 5 indivíduos após tratamento, com confirmação de cura clínica. A idade média do grupo foi de 42 anos, com um desvio padrão de  $\pm 27,47$ . A proporção entre homens e mulheres foi de 3 homens para 2 mulheres. O período médio pós-tratamento foi de 2 meses e 8 dias, com um desvio padrão de  $\pm 1$  mês e 4 dias. O número médio de cicatrizes foi de 5,5, com um desvio padrão de  $\pm 6,36$ . As cicatrizes estavam distribuídas principalmente nos membros superiores (80%) e, em menor medida, nos membros inferiores (20%). Ipojuca (1), Jaboatão dos Guararapes (1) e Moreno (3) foram os municípios de residência dos indivíduos desse grupo (Tabela 1).

O grupo controle (CT) consistiu em 11 indivíduos saudáveis provenientes de áreas não endêmicas, sem histórico prévio de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A idade média desse grupo foi de 28,81, com um desvio padrão de  $\pm 10,15$ , e a proporção entre homens e mulheres foi de 6 homens para 5 mulheres (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais características do grupo de estudo

<i>Características</i>	<i>Grupo de Estudo</i>		
	<i>AT</i>	<i>PT</i>	<i>CT</i>
<b>Número</b>	11	5	11
<b>Idade (Média)</b>	36	42	28,81
<b>Desvio padrão</b>	(17,15)	(27,47)	(10,15)
<b>Razão H/M*</b>	4/7	3/2	6/5
<b>Duração média da doença/Período pós-tratamento</b>	1 mês e 9 dias	2 meses e 8 dias	-
<b>Desvio padrão</b>	(1 mês e 3 dias)	(1 mês e 4 dias)	
<b>No. médio de lesões/cicatrizes</b>	1,25	5,5	-
<b>desvio padrão</b>	(0,43)	(6,36)	
<b>Local das lesões/cicatrizes</b>	Face (8,33%)	Face (0%)	-
	MMSS (41,67%)	MMSS (80%)	
	MMII (50%)	MMII (20%)	
<b>Município de residência</b>	Aldeia (2)	Ipojuca (1)	
	Igarassu (6)	Jaboatão dos Guararapes	
	Moreno (3)	(1)	
		Moreno (3)	

**Principais características do grupo de estudo (Continuação)**

<b>Ocupação</b>		
	Administradora	Agricultor (1)
	(1)	Cobrador (1)
	Agricultor	(1)
	(1)	Do lar (2)
	Aposentado	Estudante (1)
	(1)	Cobrador (1)
	(1)	
	Do lar	
	(3)	
	Estudante	
	(2)	
	Jardineiro	
	(1)	
	Merendeira	
	(1)	

FONTE: A autora. AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle; MMII: Membros inferiores; MMSS: Membros superiores.

Em parceria com o Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE todos os pacientes passaram por testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico. Foi feita a pesquisa direta em 8 pacientes e todos foram positivos. A PCR foi feita em todos e todos positivaram. Os pacientes incluídos no estudo apresentaram positividade em pelo menos um dos testes (Quadro 2).

**Quadro 2** – Resultados dos testes laboratoriais realizados em pacientes com LTA.

<b>Pacientes</b>	<b>Pesquisa direta</b>	<b>PCR</b>
<b>Total</b>	8/8	16/16

Fonte: elaborada pela autora, 2024. PCR: Reação em cadeia polimerase.

## 6.2 PERCENTUAL DE CÉLULAS NK CD16<sup>-</sup> E A EXPRESSÃO DOS MARCADORES NKp46, NKG2D E CD127 APÓS CULTURA CELULAR

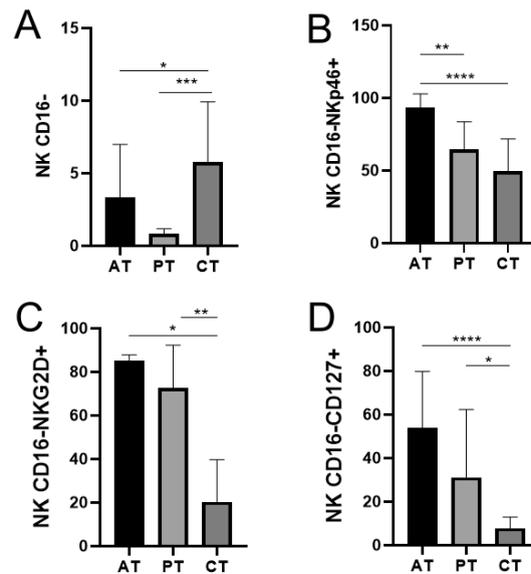
O grupo AT não apresentou diferenças significativas no percentual de células NK (CD3-CD16-CD56<sup>+</sup>) em comparação com o grupo PT (Figura 11A). Entretanto, o grupo CT, ao ser comparado com os grupos AT ( $p=0.0294$ ) e PT ( $p=0.0002$ ), revelou um aumento significativo no percentual da população de células NK após estimulação antigênica (Figura 11A).

No que diz respeito ao marcador NKp46, o grupo AT exibiu um percentual estatisticamente superior em comparação com o grupo PT ( $p=0.0032$ ) e o grupo CT ( $p<0.0001$ ) (Figura 11B).

O percentual do marcador NKG2D no grupo AT foi significativamente maior em relação ao grupo CT ( $p=0.0190$ ) (Figura 11C). Por sua vez, o grupo PT exibiu um percentual superior desse marcador em comparação com o grupo controle ( $p=0,0027$ ) (Figura 11C).

Quanto ao marcador CD127, o grupo AT apresentou um percentual superior quando comparado ao grupo CT ( $p<0,0001$ ) (Figura 11D). No grupo PT, o percentual foi maior em relação ao grupo CT ( $p=0.0350$ ) (Figura 11D).

**Figura 11:** Percentual de células NK CD16- e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10 µg/ml de antígeno de *Leishmania braziliensis* por 72h



Fonte: elaborada pela autora, 2024.

AT: antes do tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: controle. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representados pelo símbolo "\*".

### 6.3 PERCENTUAL DE CÉLULAS NK CD16+ E A EXPRESSÃO DOS MARCADORES NKp46, NKG2D E CD127 APÓS CULTURA CELULAR

A população de células NK (CD3-CD16+CD56+) não exibiu diferenças significativas em nenhum dos grupos do estudo (Figura 12A).

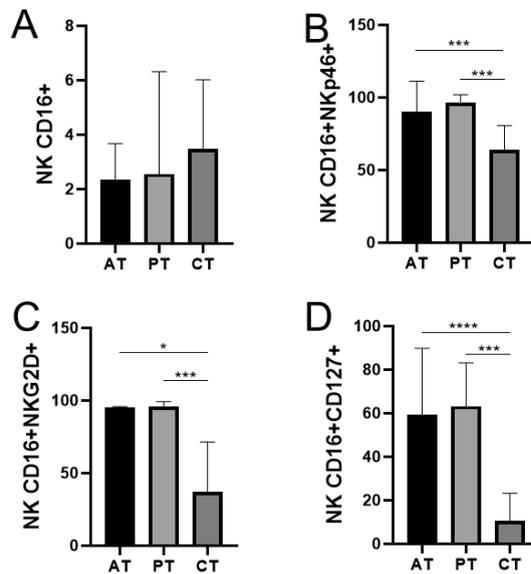
No que diz respeito ao marcador NKp46+, o grupo AT revelou um aumento significativo em comparação com o grupo CT ( $p=0.0003$ ). O grupo PT também apresentou um aumento em relação ao grupo CT ( $p=0.0002$ ) (Figura 12B).

O percentual do marcador NKG2D no grupo PT demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo CT ( $p=0.0005$ ). Além disso, o grupo AT mostrou-se

aumentado em comparação com o controle ( $p=0.0190$ ) (Figura 12C).

Quanto ao marcador CD127, o grupo AT, ao ser comparado com o CT ( $p<0.0001$ ), demonstrou aumento. Da mesma forma, o marcador também se mostrou aumentado no grupo PT em comparação com o grupo CT ( $p=0.0009$ ) (Figura 12D).

**Figura 12:** Percentual de células NK CD16+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno de *Leishmania braziliensis* por 72h



Fonte: elaborada pela autora, 2024.

AT: antes do tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: controle. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representados pelo símbolo “\*”.

#### 6.4 PERCENTUAL DE CÉLULAS NKT CD8+ E A EXPRESSÃO DOS MARCADORES NKp46, NKG2D E CD127 APÓS CULTURA CELULAR

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na população global de células NKT e nas células NKT CD8+ em nenhum dos grupos analisados no estudo (Figuras 13A e 13B).

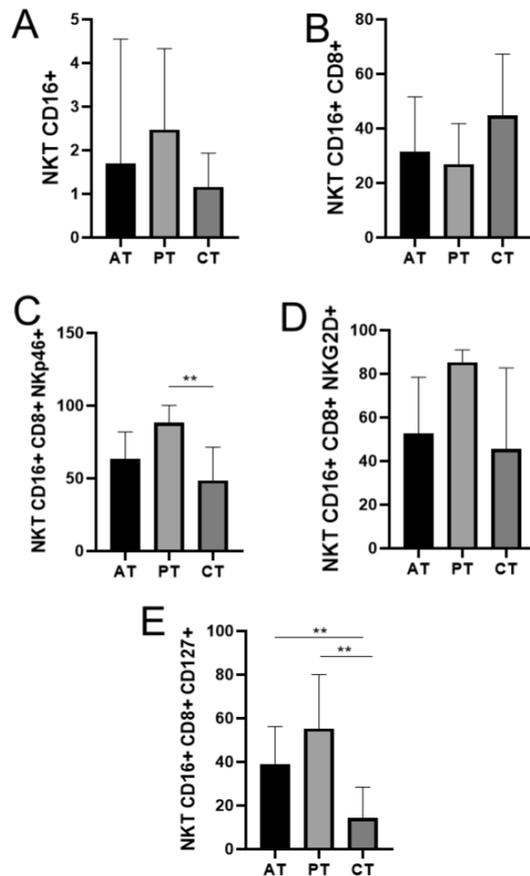
Observou-se um aumento significativo no grupo PT em comparação com o

grupo CT ( $p=0.0059$ ) em relação ao marcador NKp46 (Figura 13C).

No que diz respeito ao percentual do marcador NKG2D+ na população de células NKT CD8+, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das subpopulações analisadas (Figura 13D).

Quanto ao marcador CD127, o grupo AT demonstrou um aumento significativo em comparação com o grupo CT ( $p=0.00016$ ). Da mesma forma, o grupo PT também apresentou um aumento em relação ao grupo CT ( $p=0.0034$ ) (Figura 13E).

**Figura 13:** Percentual de células NKT CD8+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno de *Leishmania braziliensis* por 72h



Fonte: elaborada pela autora, 2024.

AT: antes do tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: controle. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representados pelo símbolo "\*\*".

## 6.5 PERCENTUAL DE CÉLULAS NKT CD4+ E A EXPRESSÃO DOS MARCADORES NKp46, NKG2D E CD127 APÓS CULTURA CELULAR

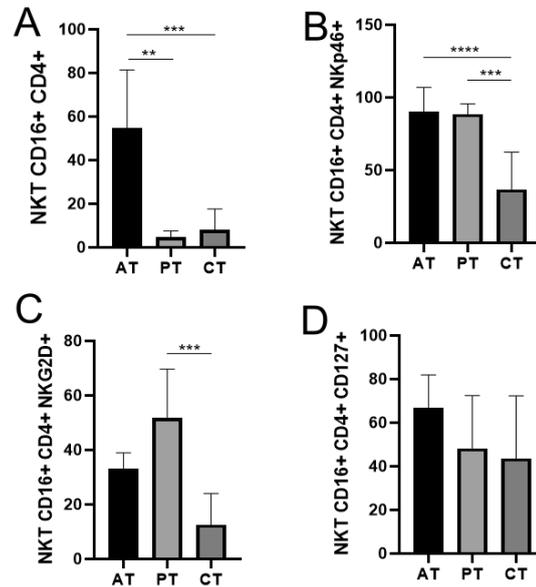
Ao examinar a população de células NKT CD4+, constatou-se um aumento significativo no grupo AT em comparação com o grupo PT ( $p=0.00087$ ) e o grupo CT ( $p=0.0003$ ) (Figura 14A).

No que se refere ao marcador NKp46+ na população de células NKT CD4+, foi evidenciado um aumento no grupo AT em comparação com o CT ( $p<0.0001$ ). Da mesma forma, o grupo PT também apresentou um aumento em relação ao CT ( $p=0.0005$ ) (Figura 14B).

Quanto ao marcador NKG2D, observou-se um aumento significativo no grupo PT em comparação com o grupo CT ( $p=0.0008$ ) (Figura 14C).

Não foram detectadas diferenças estatísticas no marcador CD127 em nenhum dos grupos analisados (Figura 14D).

**Figura 14:** Percentual de células NKT CD4+ e a expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 após estimulação com 10 µg/ml de antígeno de *Leishmania braziliensis* por 72h.



Fonte: elaborada pela autora, 2024.

AT: antes do tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: controle. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representados pelo símbolo “\*”.

## 7 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços científicos, a LTA continua sendo uma doença negligenciada e um grave problema de saúde pública que acomete milhares de pessoas anualmente (OMS, 2017).

Os pacientes do presente estudo foram todos advindos de regiões endêmicas da doença e foram submetidos a exames laboratoriais como pesquisa direta e PCR para confirmação diagnóstica. Aqueles com lesões ativas exibiram características clínicas típicas da LTA, como úlceras cutâneas com bordas elevadas, predominantemente nos membros superiores e inferiores.

Nosso estudo revelou uma maior prevalência de mulheres em relação aos homens entre os pacientes com lesão ativa, com uma média de idade de 36 anos e diversas ocupações (Tabela 1). Embora a incidência da doença afete ambos os

sexos em diferentes faixas etárias (OMS, 2017), é comum na literatura observar uma maior incidência entre homens, atribuída principalmente aos riscos ocupacionais (CUNHA et al., 2017; SOUZA et al., 2018).

A proporção distinta de gênero observada neste estudo pode ser atribuída ao tamanho limitado do espaço amostral de pacientes. A idade média de 36 anos está alinhada com a faixa etária de adultos frequentemente expostos aos ambientes de trabalho que facilita a transmissão da doença (TEMPONI, 2018). A maioria dos pacientes são residentes da cidade de Igarassu, caracterizada por extensas áreas de plantações de cana-de-açúcar e matas, ambientes propícios à presença do vetor transmissor da leishmaniose (Tabela 1) (OMS, 2017; SOUZA et al., 2018).

A LTA representa um maior risco adicional para trabalhadores envolvidos em atividades agrícolas, devido a prevalência do vetor transmissor em áreas de mata (URSINE, 2019, TEMPONI, 2018). É importante ressaltar que, embora os casos desse estudo se concentrem em áreas de mata, a ocorrência de casos em zonas urbanas é frequente, e a distribuição da doença é influenciada por vários fatores, tais como mudanças climáticas e desmatamento (ALIZADEH, 2022). A análise dos aspectos epidemiológicos juntamente com a compreensão da resposta imune presente na LTA, incluindo o papel de componentes celulares importantes na resposta contra o parasita, são fundamentais para a formulação de novas abordagens terapêuticas e tratamentos da doença.

Considerando a resposta imune, observamos inesperadamente que o percentual de células Natural Killer CD3-CD16-CD56+ após o cultivo com antígenos de *Leishmania braziliensis* foi mais elevada na população controle do estudo (Figura 11). Estudos anteriores, como a conduzida por Nysten et al. (2003), já evidenciaram a capacidade das células NK de proliferarem e responderem a formas promastigotas vivas de *Leishmania spp*, produzindo IL-12 e IFN- $\gamma$ , o que estimula a ativação de macrófagos e células dendríticas, responsáveis pela eliminação dos parasitas intracelulares (PRAJEETH et al., 2011). O perfil das células NK CD16- é considerado relativamente pequeno, com função predominante na produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-10 e IL-13 (NAGLER et al., 1989; ARACHCHIGE, 2021. SABINE et al, 2010).

Considerando essa população, a presença aumentada das células NK CD16-

no grupo controle pode indicar que essas células estariam localizadas nos locais da infecção nos pacientes, diminuindo seu percentual no sangue periférico. Ainda há a possibilidade desse grupo celular apresentar um perfil de exaustão maior nos grupos AT e PT.

Além disso, observou-se uma expressão significativamente maior do marcador NKp46 nas células NK CD16<sup>-</sup> do grupo de pacientes com lesão ativa em relação ao grupo CT e também ao grupo PT (Figura 11). Ambientes inflamatórios influenciam na expressão dessas moléculas que podem modular a sinalização das células NK e NKT (ARACHCHIGE, 2021), o que pode explicar a expressão aumentada deste marcador neste grupo. O marcador NKp46 está envolvido na modulação da citotoxicidade dessas células e na produção de citocinas (ORANGE et al, 2006), sugerindo que as células NK CD16<sup>-</sup> dos pacientes com lesão ativa após estímulo possuem uma citotoxicidade aumentada. A diminuição de NKp46 no grupo PT pode sugerir que o marcador não tenha seus mecanismos ativados com tanto vigor pela memória imunológica.

Em relação ao marcador NKG2D, esse foi significativamente mais expresso no grupo de pacientes AT e nos pacientes PT quando comparados ao controle das células NK CD16<sup>-</sup> (Figura 11). Sacramento e colaboradores em 2023, demonstraram que o gene codificador do marcador NKG2D em células T CD8<sup>+</sup>, o KLRK1, está aumentado nas lesões dos pacientes com LTA quando comparado com a pele de indivíduos saudáveis. Ainda, correlacionaram o aumento dessa expressão à atividade citotóxica da célula e à falha do tratamento (SACRAMENTO et al, 2023). NKG2D é um receptor ativador das células NK, seu aumento nesses grupos sugere a aptidão do sistema imune de reconhecer e ativar mecanismos citotóxicos nas células NK, em uma possível tentativa de eliminar o parasita, aptidão essa que permanece após o tratamento. Porém, vale salientar que a atividade citotóxica quando não regulada pode levar a uma eliminação ineficiente dos parasitas e ao aparecimento de úlceras e lesões (CAMPOS et al., 2017). A permanência da expressão do NKG2D no grupo PT após estímulos pode indicar sua importância no processo de cura, por isso seu reaparecimento quando re-estimulado.

Assim como o NKG2D, O receptor de IL-7 chamado de CD127, também desempenha um papel importante na resposta imunológica. Ele está relacionado com o estímulo da proliferação e maturação de células T CD8<sup>+</sup> e células NK

(VOSSHENRICH et al., 2005, VRANJKOVIC et al, 2007). Os grupos AT e PT expressaram CD127 em maior quantidade (Figura 11), o que sugere a atividade desse marcador, e conseqüentemente da IL-7, diante a estimulação com antígenos de *Leishmania braziliensis* quando comparados ao controle.

Quanto à população de células NK CD3-CD16+CD56+, conhecida pelo seu perfil citotóxico predominante, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 12). A ausência de diferenças estatísticas entre os grupos pode se dar pelo fato do tamanho amostral reduzido do estudo.

A expressão dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 na população de células NK CD16+ seguiu padrões semelhantes à população de células NK CD16-. Esses marcadores foram mais prevalentes nos grupos de pacientes que já haviam entrado em contato com o antígeno, ou seja, o grupo com lesão ativa e o grupo pós-tratamento. Isso sugere que os pacientes previamente expostos aos antígenos da *Leishmania braziliensis* apresentam um perfil citotóxico mais proeminente por conta do aumento dos marcadores NKp46 e NKG2D e uma expressão maior do receptor CD127 (Figura 12), sugerindo uma provável atividade da IL-7 nesses casos e uma maior ativação/sobrevivência, que juntamente com outras citocinas e tipos celulares são essenciais para eliminação e controle dos parasitas.

Assim como as células NK, as células NKT são importantes componentes na resposta imune contra doenças infecciosas, cânceres e na leishmaniose (VOGT, MATTNER, 2021., CHIMAL, RUIZ, BECKER, 2017). Em relação à população de células Natural Killer T CD8+, o grupo pós-tratamento teve uma maior expressão dos marcadores NKp46 e CD127 (Figura 13). Ferraz e colaboradores em seu estudo de 2017 sugerem que o papel do subconjunto de células NKT CD8+ é um dos principais relacionados a citotoxicidade. Em 2015, Kumari et al relata ainda que as NKT CD8+ podem ser protetoras quando em contato com as células alvos durante a resposta imune a Leishmaniose visceral. O aumento desse grupo celular na população PT pode sugerir seu papel na resposta contra o parasita mesmo após o tratamento. Além disso, o aumento de CD127 pode sugerir o papel da IL-7 na ativação desse tipo celular (VRANJKOVIC et al, 2007).

O subgrupo de células NKT CD4+ está associado à produção de citocinas do tipo Th1, Th2 e IL-10 relacionados com a eliminação de parasitas intracelulares (COFFMAN, 2006). Observou-se uma prevalência aumentada dessas células no

grupo de pacientes com lesão ativa, sugerindo seu possível envolvimento no processo de eliminação parasitária.

Em relação aos marcadores NKp46 e NKG2D, o NKp46 demonstrou-se aumentado tanto no grupo com lesão ativa quanto no grupo pós-tratamento (Figura 14). Já o marcador NKG2D mostrou aumento apenas após o tratamento (Figura 14). A maior prevalência de células NKT CD4+ com NKp46 aumentado no grupo com lesão ativa pode refletir uma resposta imune inflamatória associada à presença do parasita. Por outro lado, o aumento de ambos os marcadores no grupo pós-tratamento sugere uma possível formação de memória imune nesse grupo. Além disso, o percentual de NKT CD4+ foi maior no grupo AT quando comparado com PT (Figura 14), sugerindo uma diminuição da ativação desse grupo celular após o tratamento.

Recapitulando, foi possível observar uma predominância de mulheres com a doença, contrariando a tendência histórica de maior incidência em homens, possivelmente devido ao tamanho limitado dos grupos amostrais, a maioria sendo residentes de regiões rurais com matas, ambiente propício à presença do vetor transmissor da LTA. Outra possibilidade seria a tendência maior das mulheres em procurar o serviço de atendimento médico. Em relação às populações de celulares, as NK CD16- após estímulo com antígeno de *Leishmania braziliensis*, se demonstrou aumentada no grupo controle comparado ao demais, isso pode sugerir um redirecionamento dessa população celular em pacientes com lesões ativa. Já a expressão aumentada do marcador Nkp46 nas células NK CD16- do grupo com lesão ativa pode se correlacionar ao ambiente inflamatório e citotoxicidade aumentada. Quanto ao marcador NKG2D, foi mais expresso em pacientes com lesão ativa e pós-tratamento, podendo indicar a presença da resposta adaptativa e a possibilidade de reconhecimento e ativação de mecanismos citotóxicos das NK. Houve também uma maior expressão de CD127 nos mesmos grupos citados anteriormente, AT e PT, sugerindo uma o possível papel da IL-7 durante a infecção e o processo de cura, atuando na ativação e sobrevivência dessas células. Os marcadores NKp46, NKG2D e CD127 na população de células NK CD16+ foram mais prevalentes nos grupos com lesão ativa e pós-tratamento, sugerindo que os pacientes previamente expostos apresentam um perfil citotóxico mais proeminente e possível atividade da IL-7. Em relação as células NKT CD8+ foi observado um

aumento da expressão dos marcadores NKp46 e CD127 no grupo pós-tratamento após a estimulação antigênica, sugerindo que essas células possuem um perfil citotóxico e que um provável papel da IL-7. O aumento das células NKT CD4+ no grupo com lesão ativa sugere o possível envolvimento no processo de eliminação do parasita. Já o aumento de NKp46 tanto no grupo com lesão ativa quando no pós-tratamento, assim como o aumento de NKG2D no grupo pós-tratamento, sugere uma resposta citotóxica ativada associada ao parasita e possível formação de memória imune pós-tratamento.

## 8 CONCLUSÃO

Houve uma maior prevalência de mulheres, com média de 36 anos maioria advinda da cidade Igarassu.

A população de células NK CD16- foi maior na população controle, podendo indicar o redirecionamento dessa população celular no sangue periférico dos pacientes.

As células NK CD16- dos grupos AT e PT apresentaram uma maior citotoxicidade, pelo aumento da expressão dos marcadores NKp46 e NKG2D. A resposta imune de pacientes pós-tratamento parece se manter após tratamento, por exibir aumento desses marcadores.

Não foi possível identificar diferenças estatísticas significativas da população de células NK CD16+ nos três diferentes grupos do estudo.

Os grupos de pacientes AT e PT, demonstraram aumento dos marcadores NKp46, NKG2D e CD127 em relação as células NK CD16+ do grupo controle. Sugerindo que os pacientes previamente expostos aos antígenos da *Leishmania braziliensis* apresentam perfil citotóxico mais proeminente. O aumento de CD127 pode sugerir seu envolvimento na ativação da resposta imune.

As células NKT CD8+ do grupo pós-tratamento tiveram uma maior expressão de NKp46 e CD127, sugerindo um perfil celular mais citotóxico e o envolvimento do CD127 na ativação da resposta imune pós-tratamento.

Células NKT CD4+ em pacientes com lesão ativa possuem o marcador NKp46 aumentado, podendo estar associado a resposta inflamatória induzida pelo parasita. Além disso, as células NKT CD4+ dos pacientes PT exibiram NKG2D e

NKp46 aumentados sugerindo talvez um estabelecimento de memória imune após o tratamento com um perfil citotóxico após estimulação antigênica. A resposta imune citotóxica é importante para a eliminação do parasita, porém quando não regulada corretamente pode contribuir para o aparecimento de úlceras e lesões.

**Quadro 3** - Relação dos achados encontrados no estudo.

Populações	Grupos do estudo		
	AT	PT	CT
NK CD16-	Maior citotoxicidade pelo aumento de NKp46 e NKG2D.	Maior citotoxicidade pelo aumento de NKp46 e NKG2D.	Maior percentual das células NK CD16-. Pode indicar maior exaustão das células nos grupos AT e PT e/ou redirecionamento para local da infecção.
NK CD16+	Toxicidade aumentada por conta do aumento dos marcadores NKp46, NKG2D. E o aumento de CD127 sugere seu papel na infecção.	Toxicidade aumentada por conta do aumento dos marcadores NKp46, NKG2D. E o aumento de CD127 sugere seu papel na resposta imune pós tratamento.	Não foram observadas diferenças estatísticas relevantes.
NKT CD8+	Não foram observadas diferenças estatísticas relevantes.	Maior expressão de NKp46 sugerindo um perfil celular mais citotóxico e o envolvimento do CD127 na ativação da resposta imune pós-tratamento.	Não foram observadas diferenças estatísticas relevantes.
NKT CD4+	Marcador NKp46 aumentado.	NKG2D e NKp46 aumentados	Não foram observadas diferenças estatísticas relevantes.

Fonte: a autora, 2024.

## REFERÊNCIAS

ABRAÃO et al. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 11, e202000612. Epub. 18 nov. 2020.

ALIZADEH, Z. et al. Unraveling the role of natural killer cells in leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 114, p. 109596–109596, 1 jan. 2023.

ANDRADE, M. C. et al. COVID-19 Pandemic Causes Increased Clinic Visits with Diagnosis of Tegumentary Leishmaniasis in Brazil in 2020. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 113, p. 87–89, dez. 2021.

ARANHA, F. C. S. et al. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 4, p. 334-341, 2005.

ARAÚJO, A. et al. Definition of the main vector of cutaneous leishmaniasis: Ecology and mapping in an endemic area of Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 233, 2022.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, mar. 2019.

ASILIAN, A. et al. The efficacy of treatment with intralesional meglumine antimoniate alone, compared with that of cryotherapy combined with the meglumine antimoniate or intralesional sodium stibogluconate, in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 493–498, jul. 2003.

ÁUREA MARTINS GABRIEL et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, p. 1–16, 1 dez. 2019.

AZIM, M. et al. Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009099, 3 mar. 2021.

BERMAN, J. D.; NEVA, F. A. Effect of Temperature on Multiplication of Leishmania Amastigotes within Human Monocyte-Derived Macrophages in Vitro. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 2, p. 318–321, 1 mar. 1981.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária da Saúde. Paraná. [s.d]

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). 2022.

BUZANOVSKY, L. P., SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J., et al. Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in Brazil - a systematic literature review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, e20190291, 2019.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 7 maio 2019.

CHARLES, E. et al. CD4 T-Cell Suppression by Cells from Toxoplasma gondii-Infected Retinas Is Mediated by Surface Protein PD-L1. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3484–3492, 24 maio 2010.

CHITTAPPEN KANDIYIL PRAJEETH et al. Leishmania-Infected Macrophages Are Targets of NK Cell-Derived Cytokines but Not of NK Cell Cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2699–2708, 1 jul. 2011.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022.

CRAWLEY, A. M.; ANGEL, J. B. The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for IL-7 therapy. v. 24, n. 3, p. 231–240, 1 jun. 2012.

CUNHA, C. F. et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: Assessments in active disease, under therapy, and after clinical cure. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 4, p. 244–254, 2016.

DUBIE, T., MOHAMMED, Y. "Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection", **Journal of Immunology Research**, vol. 2020, Article ID 2496713, 12 pages, 2020.

DUEV-COHEN, A. et al. Altered NKp46 Recognition and Elimination of Influenza B Viruses. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 34, 27 dez. 2020.

FERRAZ, R. et al. CD3+CD4negCD8neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a+ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 3 maio 2017.

GALVIS OVALLOS, Fredy et al. Leishmanioses no Brasil: Aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. *Atualidades em medicina tropical no Brasil: protozoários*. Tradução Rio Branco: Stricto Sensu, 2020. Disponível em: <https://sseditora.com.br/wp-content/uploads/Atualidades-em-Medicina-Tropical-no-Brasil-Protozo%C3%A1rios.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2024.

GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, 29 mar. 2012.

GONÇALVES, S. V. C. B.; COSTA, C. H. N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: an efficacy and safety study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 347–355, 2018.

GUREL, M. S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in Dermatology**, v. 38, n. 2, p. 140–151, mar. 2020.

IRAJ ESFANDIARPOUR; ALAVI, A. Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 8, p. 521–524, 1 ago. 2002.

KUMAR, S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. **Immunology**, v. 154, n. 3, p. 383–393, 11 abr. 2018.

LAJEVARDI, M. S. et al. Structural analysis of PpSP15 and PsSP9 sand fly salivary proteins designed with a self-cleavable linker as a live vaccine candidate against cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, 19 out. 2022.

LIEKE, T. et al. The interplay between Leishmania promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of Leishmania by NK cells and modulation of NK cell activity by Leishmania promastigotes. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1898–1909, 2011.

LIU HUIFANG et al. “Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy.” **American journal of cancer research** vol. 9,10 2064-2078. 1 Oct. 2019

LUIZ, J. As armadilhas extracelulares de neutrófilos estão envolvidas na reabsorção óssea durante periodontite apical experimental. 7 jun. 2023.

MADUSANKA, R. K.; SILVA, H.; KARUNAWEEERA, N. D. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis and Insights into Species-Specific Responses: A Narrative Review. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 695–711, 22 fev. 2022.

MANDELBOIM, O. NKp46. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 12, p. 1147–1150, dez. 2001.

MAZZUCHELLI, R. I.; RIVA, A.; DURUM, S. K. The human IL-7 receptor gene: Deletions, polymorphisms and mutations. **Seminars in Immunology**, v. 24, n. 3, p. 225–230, jun. 2012.

MERCEDES BEATRIZ FUERTES; CAROLINA INES DOMAICA; NORBERTO WALTER ZWIRNER. Leveraging NKG2D Ligands in Immuno-Oncology. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 29 jul. 2021.

MICHAUD, A. et al. IL-7 Enhances Survival of Human CD56bright NK Cells. **Journal of Immunotherapy**, v. 33, n. 4, p. 382–390, maio 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília, DF; 2017

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 146, n. 3, p. 232–246, mar. 2019.

MOMENI, A.; MOHAMAD REZA REISZADAE; MALIHALSADAT AMINJAVAHERI. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a combination of allopurinol and low-dose meglumine antimoniate. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 7, p. 441–443, 1 jul. 2002.

NAGLER, A. et al. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 10, p. 3183–3191, 15 nov. 1989.

ORANGE, J. S.; BALLAS, Z. K. Natural killer cells in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 118, n. 1, p. 1–10, jan. 2006.

Organização Pan-Americana da Saúde. Informe epidemiológico das Américas, 2022.

PATRÍCIA, A. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. Sup., n. 13, p. S1535–S1541, 1 jan. 2018.

PAUL, S.; LAL, G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1124, 13 set. 2017.

PEDRAL-SAMPAIO, G. et al. Detection of IgG Anti-Leishmania Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162793, 13 set. 2016.

PESCE, S. et al. PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 4 jun. 2019.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 20 out. 2021.

PRAGER, I.; WATZL, C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 105, n. 6, p. 1319–1329, 1 jun. 2019.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. **Current Topics in Neglected Tropical Diseases**. [s.l.: s.n.].

SACKS, D. B.; BARRAL, A.; NEVA, F. A. Thermosensitivity Patterns of Old vs. New World Cutaneous Strains of Leishmania Growing within Mouse Peritoneal Macrophages in Vitro \*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 2, p. 300–304, 1 mar. 1983.

SALMANPOUR, R.; RAZMAVAR, M. R.; ABTAHI, N. Comparison of intralesional meglumine antimoniate, cryotherapy and their combination in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 9, p. 1115–1116, set. 2006.

SERRANO-COLL, H. et al. Innate immune response: ally or enemy in cutaneous leishmaniasis? **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, 26 maio 2021.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 6, p. 412–423, 1 jun. 2009.

SHIRZADI, M. R. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 10, p. 11–18, abr. 2019.

SILVA et al. Leishmania V. braziliensis infection in asymptomatic domestic animals within an endemic region in the Northeast of Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 55, 1 jan. 2022.

SILVA et al. Conhecimento da população sobre leishmaniose: revisão integrativa. **Peer Review**, v. 5, n. 19, p. 383–397, 23 ago. 2023.

SIVORI, S. et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 5, p. 1656–1666, maio 1999.

SIVORI, S. et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 16, n. 5, p. 430–441, 18 fev. 2019.

SOTO, J. A.; BERMAN, J. D. Miltefosine treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, 31 out. 2020.

VOGT, S.; MATTNER, J. NKT Cells Contribute to the Control of Microbial Infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 14 set. 2021.

VOSSHENRICH, C. A. J. et al. Roles for Common Cytokine Receptor  $\gamma$ -Chain-Dependent Cytokines in the Generation, Differentiation, and Maturation of NK Cell Precursors and Peripheral NK Cells in Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 3, p. 1213–1221, 20 jan. 2005.

VRANJKOVIC, A. et al. IL-7 decreases IL-7 receptor (CD127) expression and induces the shedding of CD127 by human CD8<sup>+</sup> T cells. **International Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1329–1339, 22 out. 2007.

WANROOIJ, E et al, CD127 is Required for Macrophage and Regulatory T Cell Function and Has a Protective Role in Atherosclerosis. *Circulation.*, 09 de junho de 2018; Volume 114

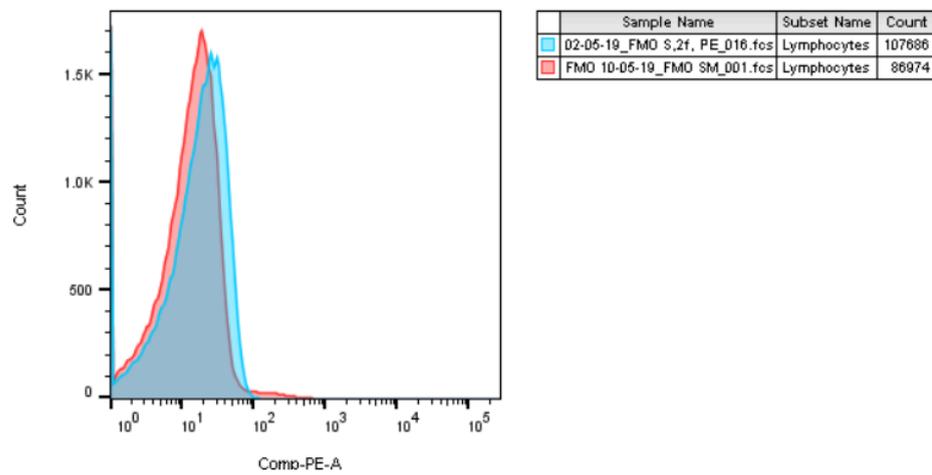
WENSVEEN, F. M.; JELENČIĆ, V.; POLIĆ, B. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 8 mar. 2018.

ZAMORA-CHIMAL, J.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, I. NKT cells in leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 222, n. 4, p. 641–646, 1 abr. 2017.

## **APÊNDICES**

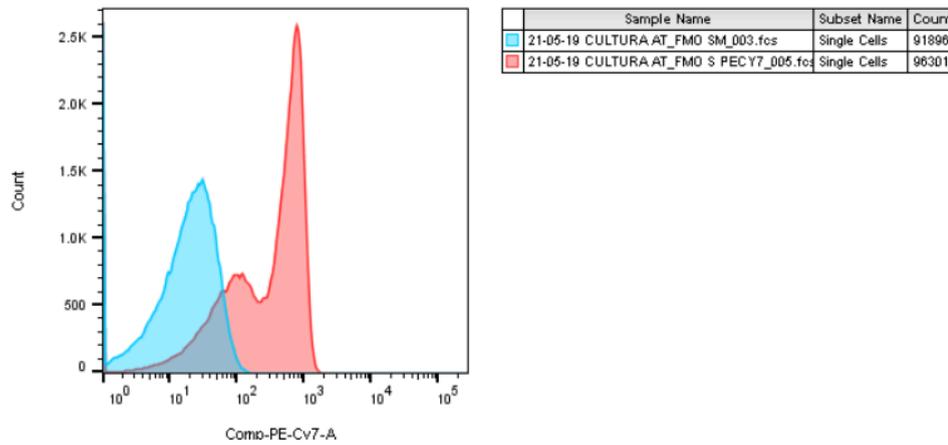
**APÊNDICE A**  
**FLUORESCENCE MINUS ONE DOS ANTICORPOS UTILIZADOS**  
**NO ESTUDO**

**Figura 15 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD56 (PE)**



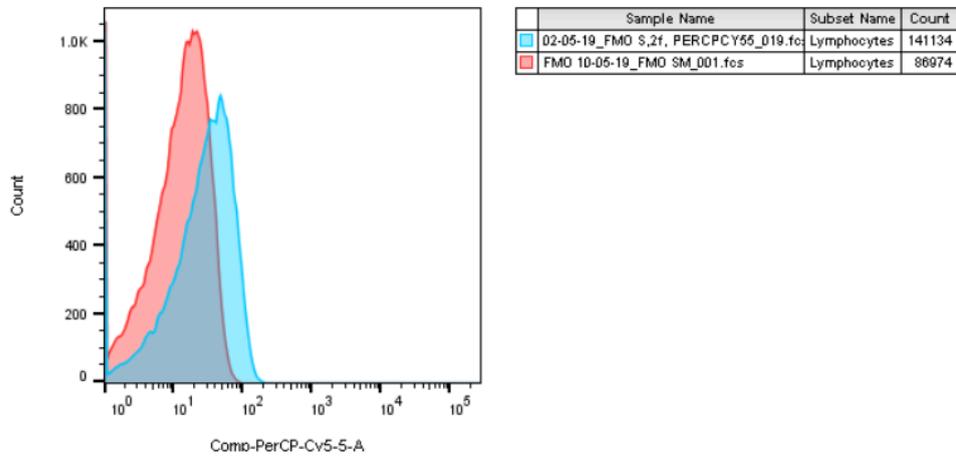
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**Figura 16 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD16 (PECY 7)**



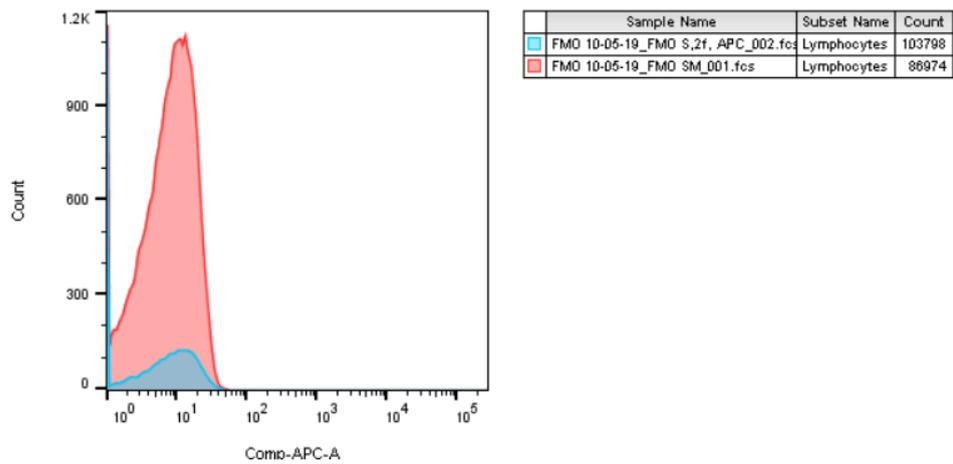
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**Figura 17 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD4 (PERCPCY 5.5)**



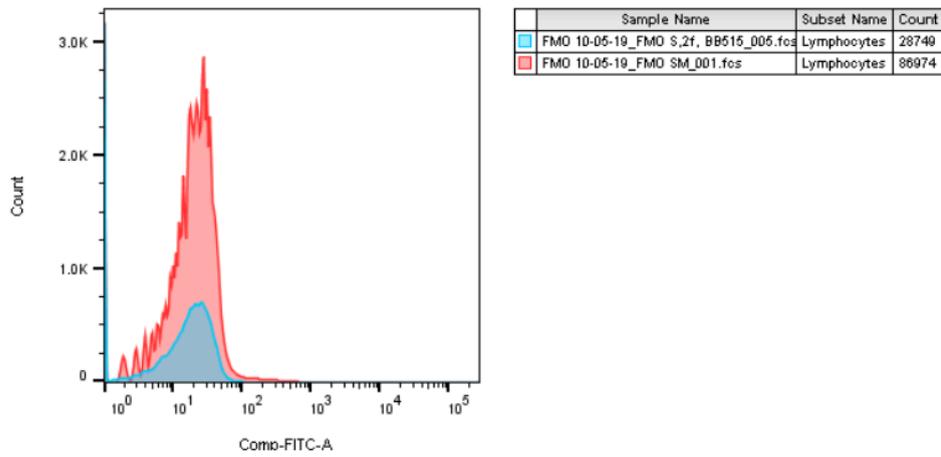
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**Figura 18 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD8 (APC)**



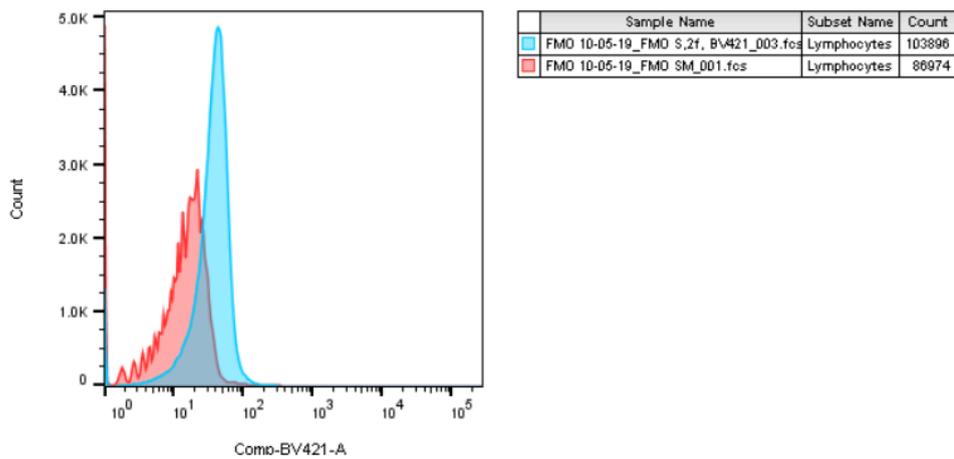
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**Figura 19 - Fluorescence Minus One** do anticorpo NKp46 (BB515)



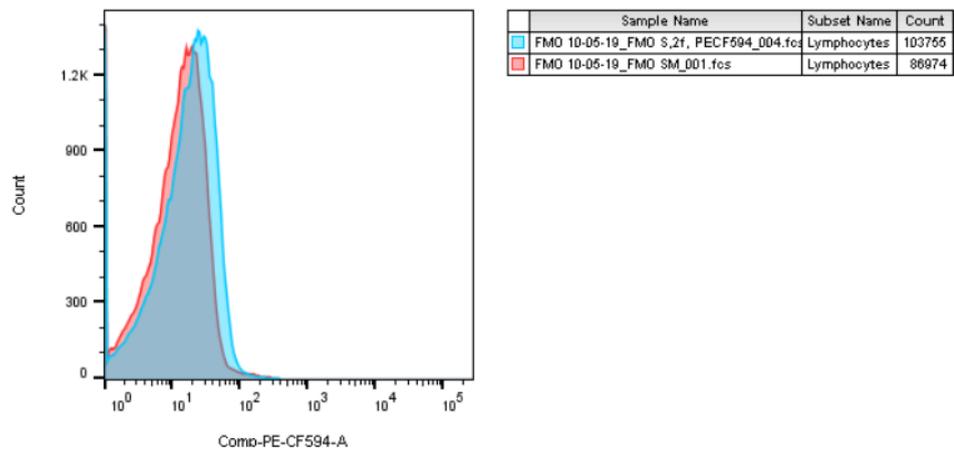
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**Figura 20 - Fluorescence Minus One** do anticorpo CD127 (BV421)



Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**Figura 21 - Fluorescence Minus One** do anticorpo NKG2D (PECF594)



Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

**ANEXOS**

# ANEXO A

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PAIS OU RESPONSÁVEIS



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PAIS OU RESPONSÁVEIS

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada pelo micróbio *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) seu(sua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo porque mora em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) seu(sua) filho(a) será acompanhado(a) por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa também serão consultadas.

Como o(a) seu(sua) filho(a) faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a). Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o(a) seu(sua) filho(a) tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que serão prescritas pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do(a) seu(sua) filho(a), o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que o(a) seu(sua) filho(a) realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o(a) seu(sua) filho(a) e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo do(a) seu(sua) filho(a).

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. (A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Instituto Aggeu Magalhães

**DECLARAÇÃO DO RESPONSÁVEL**

Recife, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 201 \_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que  
 compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_



Assinatura Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do entrevistador \_\_\_\_\_

**Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:**

Dra. Valéria Pereira Hernandes  
 Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães  
 Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE  
 CEP: 50670-420 Recife-PE  
 Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: [comiteetica@cpqam.fiocruz.br](mailto:comiteetica@cpqam.fiocruz.br). O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu inicio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site [www.saude.gov.br/sisnep](http://www.saude.gov.br/sisnep)

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

2/2

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)

**ANEXO B**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE**

**MAIOR DE 18 ANOS**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE GRUPO  
PACIENTE MAIOR DE 18 ANOS**

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada pelo micróbico *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo porque mora em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado(a) por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como o(a) senhor(a) faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a). Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o senhor tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que serão prescritas pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. (A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

1/2

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)



### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/201 \_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que  
 compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura da participante: \_\_\_\_\_



Assinatura Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do entrevistador: \_\_\_\_\_

#### Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandez  
 Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães  
 Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE  
 CEP: 50670-420 Recife-PE  
 Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site [www.saude.gov.br/sisnep](http://www.saude.gov.br/sisnep)

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)

## ANEXO C

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS



#### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS

Projeto: "Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica".

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada pelo micróbio *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque mora em uma região onde a leishmaniose é comum. Você será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois você se encontra no grupo de pacientes menores de 18 anos. Será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para você. Além disso, você também receberá os resultados desses exames, que serão emitidos pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e você tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que será prescrita pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no seu organismo, você deverá entrar em contato com seu pai ou responsável para se dirigir a um posto de saúde. Você não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são você e os outros membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. Você pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. Você poderá recusar ou retirar o consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o você concordar. Você poderá contactar o CEP/AM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que você tenha sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que você assinie este impresso.

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)



**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE**

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/20 \_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que  
compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura da menor: \_\_\_\_\_



Assinatura Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do entrevistador: \_\_\_\_\_

**Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:**

Dra. Valéria Pereira Hernandes  
Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães  
Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE  
CEP: 50670-420 Recife-PE  
Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: [comiteetica@cpqam.fiocruz.br](mailto:comiteetica@cpqam.fiocruz.br). O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

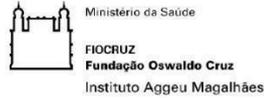
Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site [www.saude.gov.br/sisnep](http://www.saude.gov.br/sisnep)

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)

## ANEXO D

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE**

Projeto: "Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica".

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada pelo micróbio *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor está sendo convidado(a) a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença, e reside em região em que não é endêmica para a doença, e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Ao senhor(a) será solicitada uma única coleta de sangue de 20 ml o que equivale a duas colheres de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o(a) senhor(a) concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)

1/2

\_\_\_\_\_ (Pesquisador)



Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

#### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/201 \_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que  
 compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura da participante: \_\_\_\_\_



Assinatura Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do entrevistador: \_\_\_\_\_

#### Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandes  
 Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães  
 Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE  
 CEP: 50670-420 Recife-PE  
 Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site [www.saude.gov.br/sisnep](http://www.saude.gov.br/sisnep)

Rubricas \_\_\_\_\_ (Participante)  
 \_\_\_\_\_ (Pesquisador)

ANEXO E  
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

**PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL**

**Título:** CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

**Pesquisador responsável:** Valéria Pereira Hernandes

**Instituição de realização do Projeto:** CPqAM

**Instituições Envolvidas:** CPqAM/ FIOCRUZ

**Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM:** 04/04/2013

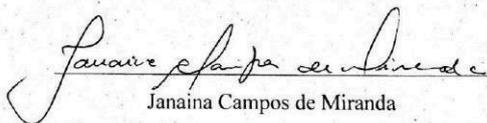
**Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM:** 30/03/2016

**Registro no CAAE:** 11083812.7.0000.5190

Prezada Dra., Valéria Pereira Hernandes

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 14 de Junho de 2016, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Res. 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 03 de julho de 2019

Recife, 26 de julho de 2016.

  
Janaina Campos de Miranda  
Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Av. Moraes Rego, s/n  
50.130-440 Fone: (81) 2101.2639  
811-345-1111 | 2101.2639  
60, Rio de Janeiro  
http://www.cpqam.fiocruz.br

1/2