



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

ANA BARBARA XAVIER DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDO POR  
ANTÍGENOS DAS CEPAS DE *Leishmania (V.) braziliensis*  
ISOLADAS DA SALIVA HUMANA DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Recife  
2023

ANA BARBARA XAVIER DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDO POR  
ANTÍGENOS DAS CEPAS DE *Leishmania (V.) braziliensis*  
ISOLADAS DA SALIVA HUMANA DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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.

**Orientador(a):** Maria Edileuza Felinto de Brito

**Coorientador(a):** Valéria Pereira  
Hernandes

Recife  
2023

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

Silva, Ana Barbara Xavier da.

Avaliação do perfil de citocinas produzido por antígenos das cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* isoladas da saliva humana de pacientes com leishmaniose tegumentar / Ana Barbara Xavier da Silva. - Recife, 2023.  
68 : il., tab.

Orientador(a): Maria Edileuza Felinto de Brito

Coorientador(a): Valéria Pereira Hernandes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Imunologia. 3. Citometria de fluxo. 4. Parasitologia. 5. Cultura de células. I. Brito, Maria Edileuza Felinto de. (Orientação). II. Hernandes, Valéria Pereira. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

ANA BARBARA XAVIER DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDO POR ANTÍGENOS DAS  
CEPAS DE *Leishmania (V.) braziliensis* ISOLADAS DA SALIVA HUMANA DE  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito  
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE/ Departamento de Imunologia

---

Prof. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz.  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE/ Departamento de Parasitologia

---

Me. Marton Kaique de Andrade Cavalcante  
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE/ Departamento de Imunologia

Dedico este trabalho aos meus pais e  
aos meus gatos, Na Yeon, Yoon A e  
Noah.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, em primeiro lugar, por me presentear todos os dias com mais um dia de vida, repleto de oportunidades para que eu possa conquistar meus objetivos, e pela força dada para que eu supere dia após dia.

À minha mãe, Mônica, por ter me dado a vida e por todo esforço para que eu pudesse (e possa) ter uma vida digna e me tornasse quem eu sou hoje, e por ter sempre estado comigo nos meus momentos de medos e inseguranças. Ao meu pai, Gilson, por todas as oportunidades que me foram dadas, fruto de muito esforço e trabalho dele, para que eu vivesse uma vida cheia de oportunidades. Ao meu pai de coração, Aurélio, pelo acolhimento e suporte desde bebê. Amo vocês e espero poder recompensá-los em breve.

À minha orientadora, Dra. Edileuza e minha coorientadora, Dra. Valéria, pela oportunidade e confiança que me foram dadas para desenvolver esse projeto. Agradeço também pelo tempo dedicado. À Dra. Edi agradeço por todos os ensinamentos, apoio e toda a sua dedicação e paixão pela ciência. À Dra. Valéria agradeço por todos os esforços e acolhimento em momentos difíceis. Serei eternamente grata e orgulhosa por ter sido orientada por duas mulheres referências na ciência e na leishmaniose.

À Allana, por ser a principal responsável por ensinar tudo o que aprendi na minha jornada científica, por todo acolhimento, compreensão, companheirismo e apoio, na rotina do laboratório e no desenvolvimento desse projeto. Boa viagem, vou sentir sua falta. À Marton, por todos aprendizados no laboratório e por se dedicar na parte experimental deste projeto e sacrificar seus dias de descanso. Você é uma pessoa incrível.

A todos os outros integrantes da equipe do LIBM, Ailton, Beatriz, Carolina, Elis, Larissa, Policarpo e Rafael, por todo o conhecimento compartilhado e pelo acolhimento, me sinto muito privilegiada. E também aos meus amigos ICs (e ex-ICs), Aline Andrade, Aline Albuquerque, Cleiton, Dani, Fábio, Micaela e minha dupla, Cibele, pela companhia e ajuda diária. Desejo muito sucesso para cada um de vocês, vocês merecem. À Ericka e Andrea, do Serviço de Referência em Leishmaniose, pela ajuda na parte experimental das culturas.

Aos meus amigos da faculdade, Clara, João, Lorennny, Mariana, Nathaly e Saulo, por compartilharem comigo todos os momentos bons e todos os difíceis também, desde o primeiro dia de aula, e por todo apoio. À minha amiga Stephane, pela ajuda nos meus momentos de mais desespero e pelas dicas e conhecimentos compartilhados. Às minhas amigas Lícia, Jady e Vitória, por me fazerem companhia em algumas fases dessa jornada acadêmica, às vezes um tanto solitária. Saudades de vocês.

Aos meus amigos da escola, João, Jobe, Júlio, Karoline, Lucas, Ricardo e Lívia, por todos esses anos de apoio e companheirismo, e por estarem sempre presentes. Às minhas amigas, Bianca e Bruna, por estarem comigo nos meus momentos mais difíceis, por compartilharem os mesmos gostos que eu, e por me apoiarem sempre. À minha amiga Isabela, por todos esses anos de amizade e companheirismo, por me fazer sentir acolhida e pertencente a esse mundo, e por me entender como ninguém. Obrigada por tudo, não sei o que seria de mim sem vocês.

Aos biomédicos, técnicos, estagiários e funcionários do HBL, por todos ensinamentos, pela luta compartilhada e pelo acolhimento na minha jornada de estágio.

Aos avaliadores, Carolina, Marton e Allana, por terem aceitado participar da banca e dedicarem seu tempo na avaliação e contribuição desse projeto. Muito obrigada.

A Fiocruz-PE (Instituto Aggeu Magalhães), PROEP e FACEPE, pela oportunidade de desenvolvimento desse projeto, pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas. A UFPE, pela oportunidade, mesmo com altos e baixos, de realizar meu sonho e me tornar Biomédica.

E, por fim, mas não menos importante, aos meus gatos, Na Yeon, Yoon A e Noah, por serem a principal razão para que eu me levante todos os dias e tenha forças para superar todos os obstáculos e dias ruins. Amo vocês.

“Todo mundo sofre a vida toda tentando conquistar algo e passa a vida inteira tentando provar a si mesmos para todos. Mas ninguém realmente sabe o que ganha fazendo isso.”

**Park Dong Hoon**  
My Mister, 2018



SILVA, Ana Barbara Xavier da. **Avaliação do perfil de citocinas produzido por antígenos das cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* isoladas da saliva humana de pacientes com leishmaniose tegumentar.** 2023. 68. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) apresenta cerca de 1 milhão de casos anualmente e pode ser causada por diversas espécies do protozoário *Leishmania*, que infectam mamíferos, sendo, no Brasil e em Pernambuco, a *L. (Viannia) braziliensis*, a espécie mais prevalente. A diversidade de espécies permite uma variedade de respostas imunológicas mediadas pela diferenciação das células T em Th1, Th2 e Th17, relacionadas com a susceptibilidade, resistência e controle do balanço inflamatório do hospedeiro à infecção. Consequentemente, diferentes manifestações clínicas podem ser desenvolvidas, variando desde lesões cutâneas até lesões viscerais. O diagnóstico da doença é feito pelos métodos parasitológico, imunológico e molecular, no entanto, esses testes necessitam de amostras invasivas, como a punção e os fragmentos de biópsia de borda da lesão, que causam desconforto e trazem risco aos pacientes. Por isso, novos métodos não invasivos, como o fluido salivar, vem sendo estudados como alternativa. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar quais citocinas são produzidas com a estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, utilizando-se que foram identificados pela primeira vez de cepas isoladas da saliva humana de pacientes com LT. As PBMC provenientes do sangue de indivíduos saudáveis, sem histórico de infecção por leishmaniose, foram estimuladas com dois antígenos, individualmente obtidos das culturas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de salivas humanas de pacientes com LT. Após 48h e 72h, os sobrenadantes das culturas foram utilizados para mensurar as citocinas IL-17A, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 através da metodologia Cytometric Bead Array (CBA). Foi possível demonstrar exacerbação na produção da IL-6 e um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , com diferenças significativas entre os dois tempos de estudo, e uma baixa produção de IL-10, sugerindo um possível direcionamento para o perfil Th1. A análise das citocinas permitiu demonstrar que os dois antígenos de isolados de saliva possuem um padrão de produção de citocinas semelhante ao da cepa padrão, não isolada de saliva. Assim, pode-se concluir que os três antígenos possuem a mesma capacidade de estimular uma resposta imune.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo. PBMC. Fluido salivar. Leishmaniose cutânea. Cultura de células.

SILVA, Ana Barbara Xavier da. **Evaluation of the cytokine profile produced by antigens of *Leishmania (V.) braziliensis* strains isolated from human saliva of patients with tegumentary leishmaniasis.** 2023. 68. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## ABSTRACT

The tegumentary leishmaniasis (TL) is responsible for about 1 million cases annually and can be caused by several species of the protozoan *Leishmania*, which infect mammals. In Brazil and in Pernambuco, *L. (Viannia) braziliensis* is the most prevalent species. The diversity of species allows a variety of immune responses mediated by the differentiation of T cells into Th1, Th2 and Th17, related to susceptibility, resistance and control of the host's inflammatory balance to infection. The diagnosis of the disease is made by parasitological, immunological and molecular methods, however, these tests require invasive samples, such as puncture and biopsy fragments from the edge of the lesion, which cause discomfort and bring risk to patients. For this reason, new non-invasive methods, such as salivary fluid, have been studied as an alternative. Therefore, the objective of this study was to verify which cytokines were produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy individuals induced by antigens from human saliva. PBMC from the blood of healthy individuals, with no history of leishmaniasis infection, were stimulated with two antigens, individually, obtained from cultures of *L. (V.) braziliensis* isolated from human saliva of patients with TL. After 48h and 72h, the culture supernatants were used to measure the cytokines IL-17A, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 through the Cytometric Bead Array (CBA) methodology. It was possible to demonstrate an exacerbation in the production of IL-6 and an increase in the production of IFN- $\gamma$ , with significant differences between the two study times, and a low production of IL-10, suggesting a possible direction for the Th1 profile. Cytokine analysis allowed demonstrating that the two antigens isolated from saliva have a pattern of cytokine production similar to that of the antigen of the standard strain, not isolated from saliva. Thus, it can be concluded that the three antigens have the same ability to stimulate an immune response.

**Key words:** Flow cytometry. PBMC. Salivary fluid. Cutaneous leishmaniasis. Cell culture.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição da endemia de leishmaniose no mundo.....	14
<b>Figura 2</b> – Distribuição de casos autóctones de leishmaniose tegumentar no território brasileiro.....	15
<b>Figura 3</b> – Formas evolutivas de <i>Leishmania sp.</i> .....	16
<b>Figura 4</b> – Fêmea de <i>Lutzomyia spp.</i> .....	16
<b>Figura 5</b> – Distribuição das espécies de <i>Lutzomyia spp.</i> no território brasileiro.....	17
<b>Figura 6</b> – Mamíferos infectados com leishmaniose tegumentar.....	18
<b>Figura 7</b> – Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i> .....	19
<b>Figura 8</b> – Evolução da lesão da leishmaniose tegumentar.....	20
<b>Figura 9</b> – Lesão ulcerativa da leishmaniose tegumentar.....	20
<b>Figura 10</b> – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.....	20
<b>Figura 11</b> – Perfil Th1, Th2 e Th17 envolvidos na resistência, susceptibilidade e controle da resposta imunológica do hospedeiro na leishmaniose tegumentar.....	22
<b>Figura 12</b> – Métodos de coleta para diagnóstico da leishmaniose tegumentar.....	25
<b>Figura 13</b> – Amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> visualizadas por microscopia óptica no exame direto.....	26
<b>Figura 14</b> – Gel de poliacrilamida dos antígenos brutos das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> isoladas de salivas humanas.....	36
<b>Figura 15</b> – Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno bruto (ng/mL) da cepa padrão IOCL 566 e da cepa isolada de saliva IOCL 3630 após 48h de estimulação <i>in vitro</i> de PBMC (µg/mL).....	37
<b>Figura 16</b> – Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno bruto (ng/mL) da cepa padrão IOCL 566 e da cepa isolada de saliva IOCL 3632 após 48h de estimulação <i>in vitro</i> de PBMC (µg/mL).....	37
<b>Figura 17</b> – Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido por cada antígeno bruto (ng/mL) após 72h de estimulação <i>in vitro</i> de PBMC (µg/mL).....	38
<b>Figura 18</b> – Comparação da expressão da IL-6 (pg/mL) induzida por cada um dos três antígenos brutos (ng/mL) após 48H e 72H de estimulação <i>in vitro</i> de PBMC (µg/mL).....	39
<b>Figura 19</b> – Comparação da expressão do IFN-γ (pg/mL) induzida por cada um dos	

três antígenos brutos (ng/mL) após 48H e 72H de estimulação *in vitro* de PBMC (µg/mL).....40

**Figura 20** – Comparação da expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) entre o basal e os antígenos brutos padrão IOCL 566 e os isolados de saliva IOCL 3630, IOCL 3632 (ng/mL) após 48H de estimulação *in vitro* de PBMC (µg/mL).....41

**Figura 21** – Comparação da expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) entre o basal e os antígenos brutos padrão IOCL 566 e os isolados de saliva IOCL 3630, IOCL 3632 (ng/mL) após 48H de estimulação *in vitro* de PBMC (µg/mL).....42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.....	21
<b>Tabela 2</b> – Caracterização do grupo de estudo.....	35
<b>Tabela 3</b> – Quantificação dos antígenos brutos.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA	Cytometric Bead Array
CF	Citometria de Fluxo
CLIOCL	Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz
ELISA	Imunoensaio Enzimático
EV	Endovenosa
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Força G
HUOC	Hospital da Universidade de Pernambuco
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IL-	Interleucina
IM	Intramuscular
(L.)	Leishmania
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
mL	Mililitro
MLST	Leishmania Multi-locus Sequence Typing
ng	Nanogramas
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PE	Pernambuco
pg	Picogramas
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotação Por Minuto

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator $\beta$ de Transformação de Crescimento
Th1	T Helper 1
Th2	T Helper 2
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tregs	Células T reguladoras
(V.)	Viannia
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	14
2.1.1	Agente Etiológico.....	15
2.1.2	Vetor.....	16
2.1.3	Hospedeiros e Reservatórios.....	17
2.1.4	Ciclo de Transmissão .....	18
2.2	ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	19
2.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	21
2.3.1	Citocinas inflamatórias.....	23
2.4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	24
2.4.1	Métodos de Coleta.....	24
2.4.2	Diagnóstico Parasitológico.....	26
2.4.3	Diagnóstico Molecular.....	27
2.4.4	Diagnóstico Imunológico.....	27
2.5	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	28
2.5.1	Fármacos.....	28
2.5.2	Vacinas.....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	32
4.1	SELEÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO.....	32
4.2	CULTIVO DAS CEPAS ISOLADAS DA SALIVA HUMANA.....	32
4.3	OBTENÇÃO DE ANTÍGENO .....	32
4.3.1	Quantificação do Antígeno .....	33
4.4	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC).....	33

4.5	CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC).....	34
4.6	IDENTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA).....	34
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO.....	36
5.2	OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO.....	36
5.3	PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDO PELOS ANTÍGENOS.....	37
5.4	EXPRESSÃO DA IL-6 EM DIFERENTES TEMPOS PÓS ESTIMULAÇÃO.....	39
5.5	EXPRESSÃO DO IFN- $\gamma$ EM DIFERENTES TEMPOS PÓS ESTIMULAÇÃO..	40
5.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INDUZIDA PELOS ANTÍGENOS .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>55</b>
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE.....	56
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido - Grupo de Controles.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças vetoriais, com uma grande diversidade de parasitos, reservatórios e vetores envolvidos na transmissão, e está distribuída mundialmente, sendo endêmica em cerca de 89 países (OMS, 2022; OPAS, 2023). São causadas por pelo menos 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que infectam humanos e animais (ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA *et al.*, 2018; MARCHI *et al.*, 2019). A variedade de espécies distintas causa diferentes respostas imunológicas induzidas pelos linfócitos T, a Th1, Th2 e Th17 (NEVES *et al.*, 2003).

A Th1 está associada com a resistência do hospedeiro e com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (NEVES *et al.*, 2003; BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; BURZA *et al.*, 2018). Th2 está relacionada com a susceptibilidade e com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10) (NEVES *et al.*, 2003; BARATTA-MASINI *et al.*, 2007; BURZA *et al.*, 2018). Th17 tem sido descrita como responsável pelo controle do balanço da produção das citocinas do perfil Th1 e Th2, caracterizada pela produção da IL-17 (GONÇALVES DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). No entanto, algumas citocinas ainda não apresentam uma distinção de perfil bem estabelecida (CASTELLANO *et al.*, 2009).

Conseqüentemente, essa variedade causa diversas manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas, com remissões espontâneas, e mucosas, caracterizando a leishmaniose tegumentar (LT), até lesões viscerais com risco de vida, caracterizando a leishmaniose visceral (LV) (BRASIL, 2017; BURZA *et al.*, 2018).

O diagnóstico da LT é feito pelo teste parasitológico, considerado padrão ouro, onde ocorre visualização do parasito através da microscopia óptica. Anticorpos e o DNA da *Leishmania* também podem ser pesquisados através dos testes imunológicos, como na citometria de fluxo (CF), e moleculares, como na reação em cadeia polimerase (PCR), respectivamente, mas não são comumente utilizados na rotina laboratorial (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014). Estes testes requerem amostras que são coletadas de forma invasiva, a exemplo os fragmentos de biópsia, que podem causar desconforto, sangramento e infecções, além disso, necessitam de uma boa infraestrutura e qualificação profissional (BOGGILD *et al.*, 2011). Por isso, novas alternativas vêm sendo estudadas e desenvolvidas para proporcionar maior segurança e conforto para os pacientes, como na coleta de fluido salivar, que é um

método simples, onde a saliva é dispensada em um coletor estéril, permitindo um maior conforto para o paciente, maior facilidade no transporte da amostra e diminuindo o risco de contaminação. Além disso, já foi demonstrado que esse tipo de material de coleta possibilita a identificação do DNA de *Leishmania* e o isolamento parasitário (CORVALAN *et al.*, 2011; BRITO *et. al.*, 2018).

As drogas de primeira escolha para tratamento da LT são os antimoniais pentavalentes, o estibogluconato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e, recentemente, a miltefosina tem sido utilizada como alternativa de uso oral. O sucesso da terapia e, conseqüentemente, a sobrevivência ou resistência parasitária dependem dos fatores imunológicos inerentes ao hospedeiro e ao parasito (ANVERSA *et. al.*, 2018; BRASIL, 2018).

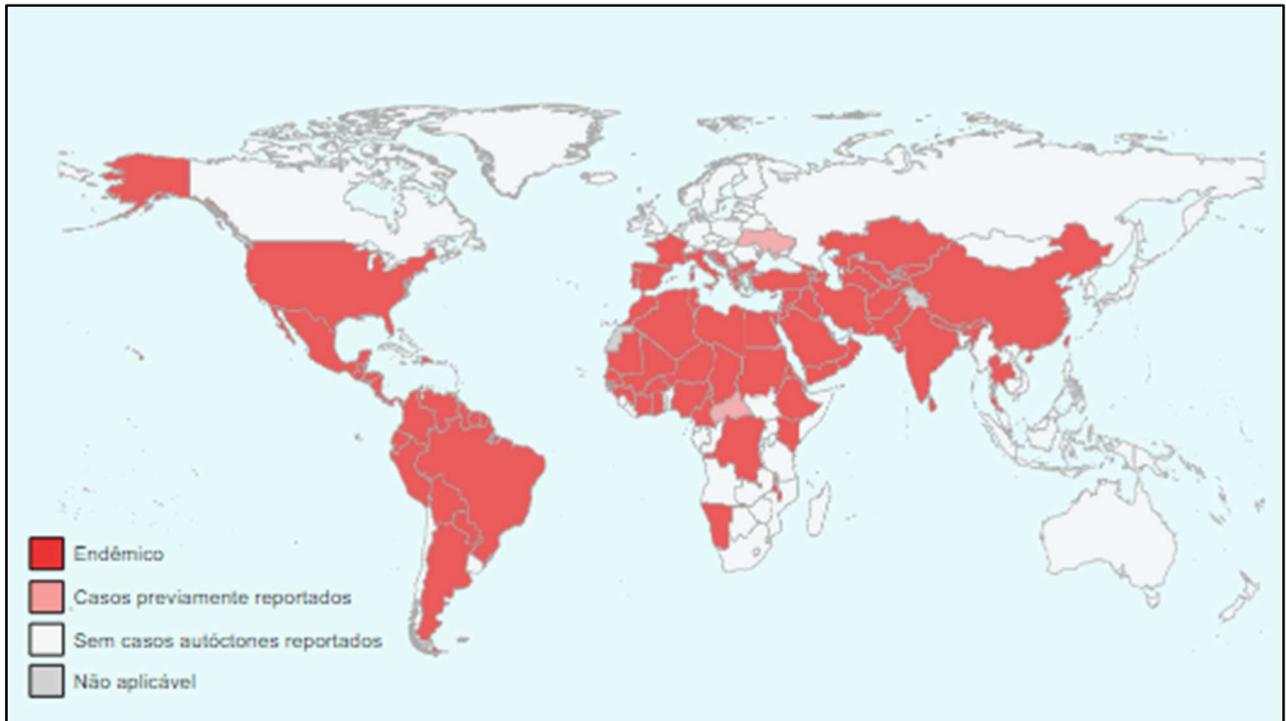
Neste contexto, entender o que ocorre durante a estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos com antígenos de cepas de *L. (V.) braziliensis*, isoladas, pela primeira vez, de salivas humanas, nessa relação parasito-hospedeiro estabelecida, associando aos dados epidemiológicos, é fundamental para uma melhor compreensão da imunopatogenia nas lesões e salivas dos pacientes com LT.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram 0,7-1 Milhão de casos de LT por ano, afetando, principalmente, países negligenciados da África, Ásia e América Latina. Dos 200 países e territórios que possuem casos registrados, 99 são endêmicos (Figura 1), entre eles o Brasil, que apresenta casos autóctones (Figura 2) em todos os estados desde 2003 (BRASIL, 2017; BURZA *et al.*, 2018; OMS, 2022).

**Figura 1** - Distribuição da endemia da leishmaniose tegumentar no mundo.

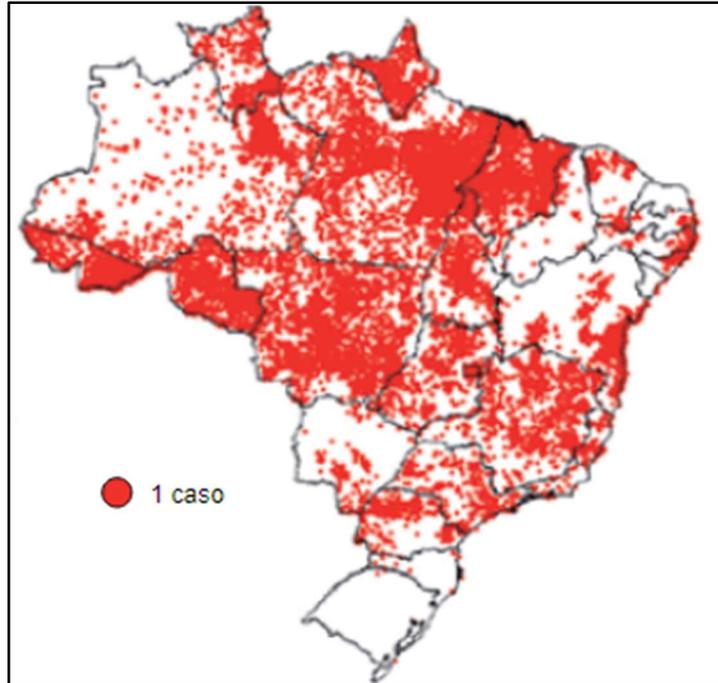


**Fonte:** Adaptado Organização Mundial de Saúde, 2022.

**Nota:** Distribuição da endemia de leishmaniose no mundo. Em vermelho, países endêmicos; em rosa, países com casos previamente reportados; em cinza claro, países sem casos autóctones reportados; em cinza escuro, países não aplicáveis.

Segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), o Brasil e a região da América andina apresentaram mais de 896 mil casos de LT, entre os anos de 2001 e 2021. Em Pernambuco, no mesmo período, cerca de 7 mil casos foram notificados (OPAS, 2022; Sinan/SVS/MS; 2022).

**Figura 2** - Distribuição de casos autóctones de leishmaniose tegumentar no território brasileiro.



**Fonte:** Adaptado Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2017.

**Legenda:** Distribuição de casos autóctones de leishmaniose tegumentar no território brasileiro. Cada ponto vermelho representa um caso.

### 2.1.1 Agente Etiológico

O agente etiológico da LT pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, podendo ainda ser subclassificado de acordo com o subgênero, *Leishmania* ou *Viannia*, diferenciados pelo local de desenvolvimento e fixação das formas promastigotas no intestino do flebotomíneo.

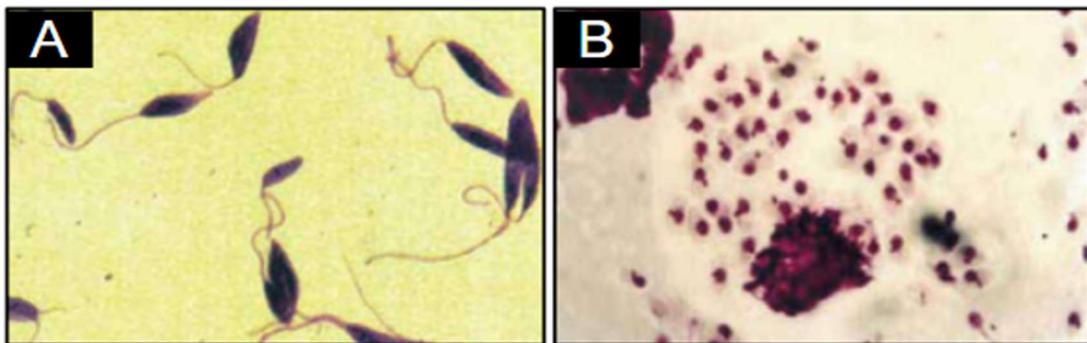
Além disso, o subgênero *Viannia* é caracterizado pela presença de espécies que causam lesões ulcerativas e mucosas, e o *Leishmania* pela presença de espécies que causam lesões nodulares (ANVERSA *et al.*, 2017; BURZA *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2020).

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários unicelulares e digenéticos, que se apresentam nas formas promastigota e amastigota (Figura 3). As promastigotas são alongadas com 5-15  $\mu\text{m}$  de comprimento, com flagelos livres, encontrados no tubo digestivo do vetor e em cultura *in vitro*; as amastigotas são

ovaladas com 2,5-5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sem flagelo livre e parasitam as células do hospedeiro vertebrado (NEVES, 2003; BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2017).

Atualmente, 12 espécies já foram identificadas como causadoras dessa doença em humanos. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, a *L. (V.) guyanensis*, a *L. (L.) amazonensis*, a *L. (V.) lainsoni*, a *L. (V.) naiffi*, a *L. (V.) lindenberg*, a *L. (V.) shawi* e a *L. (V.) braziliensis*, a mais prevalente e a principal responsável por causar uma ampla variedade de manifestações clínicas (BRASIL, 2017; BRITO *et al.*, 2018).

**Figura 3** - Formas evolutivas de *Leishmania sp.*



**Fonte:** Adaptado Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2017.

**Legenda:** Formas evolutivas de *Leishmania sp.* (A) Promastigotas. (B) Amastigotas.

### 2.1.2 Vetor

O inseto vetor responsável pela transmissão da LT é o flebotomíneo, que pertence à Ordem Díptera, à Família Psychodidae, à Subfamília Phlebotominae e ao Gênero *Lutzomyia* (Figura 4) (ANVERSA *et al.*, 2017; BRASIL; 2017).

**Figura 4** - Fêmea de *Lutzomyia spp.*

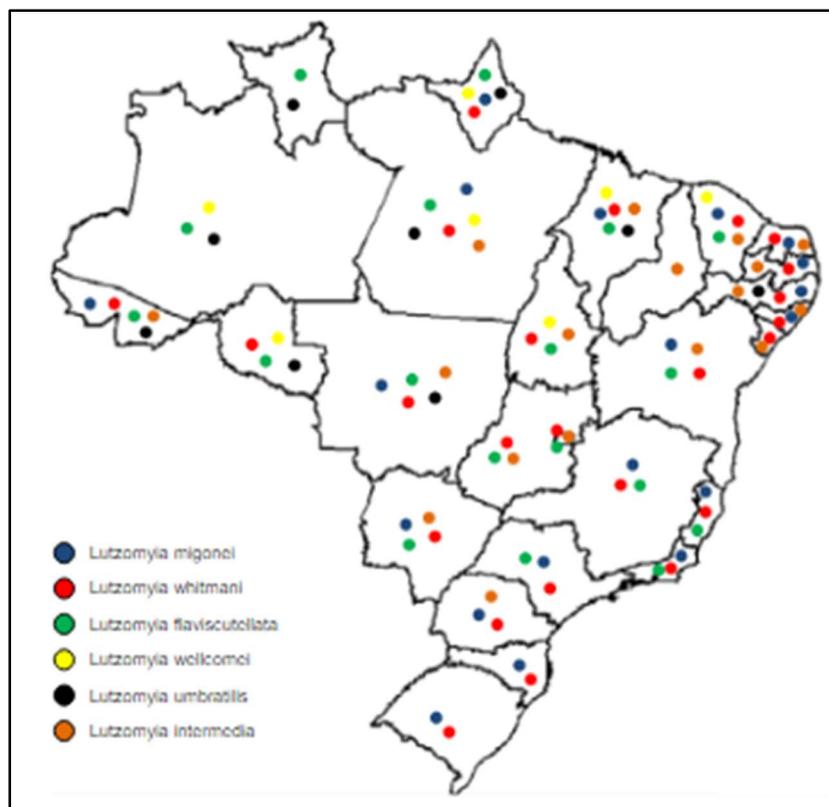


**Fonte:** Adaptado Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2017.

**Legenda:** Fêmea de *Lutzomyia* spp. durante a hematofagia.

Aproximadamente 700 espécies já foram identificadas como vetores da leishmaniose, e 40 outras são consideradas suspeitas (ANVERSA *et al.*, 2017; BRASIL; 2017). No Brasil, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. whitmani* são algumas das mais encontradas (Figura 5). Em Pernambuco, a *Lu. whitmani* é predominante no domicílio e a *Lu. complexa* está presente nas demais áreas (BRANDÃO *et al.*, 1999; DANTAS–TORRES *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2012; BRASIL; 2017; SILVA, C. J., 2022).

**Figura 5** - Distribuição das espécies de *Lutzomyia* spp. no território brasileiro.



**Fonte:** Adaptado Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2017.

**Legenda:** Distribuição das espécies de *Lutzomyia* spp. no território brasileiro. Em azul, *Lutzomyia migonei*; em vermelho, *Lu. whitmani*; em verde, *Lu. flaviscutellata*; em amarelo, *Lu. wellcomei*; em preto, *Lu. umbratilis*; em marrom, *Lu. intermedia*.

### 2.1.3 Hospedeiros e Reservatórios

A *Leishmania* apresenta uma ampla variedade de hospedeiros e reservatórios vertebrados, os mamíferos, que inclui humanos e animais, importantes na

manutenção do ciclo da doença. Entre os animais silvestres, os roedores, como o *Rattus rattus*, já foram incriminados como reservatórios sinantrópicos. E entre os domesticados, cães e gatos (Figura 6), devido à maior proximidade com os humanos, mesmo quando assintomáticos (BRANDÃO *et al.* 2003; ANVERSA *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022).

**Figura 6** - Mamíferos infectados com leishmaniose tegumentar.



**Fonte:** Adaptado RIVAS *et al.*, 2018; VELÉZ *et al.*, 2012.

**Legenda:** Mamíferos infectados com leishmaniose tegumentar. Lesões cutâneas da LT no nariz de animais domésticos. (A) Gata fêmea adulta com lesão ulcerativa. (B) Cão com nódulos múltiplos.

#### 2.1.4 Ciclo de Transmissão

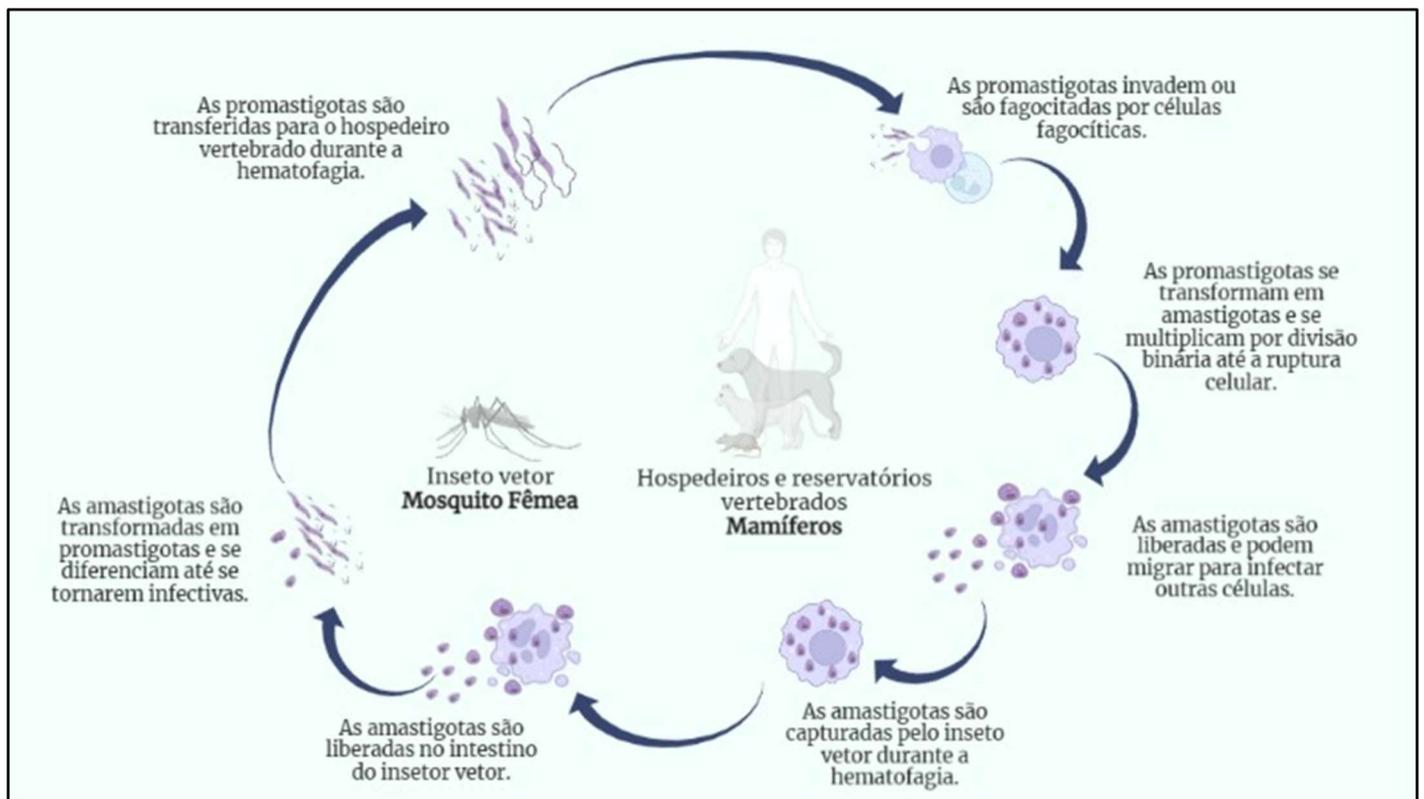
O ciclo de transmissão da LT está intimamente ligado aos fatores ambientais e socioeconômicos. A má distribuição socioeconômica, a proliferação descontrolada do inseto vetor, o desmatamento e avanço urbano são alguns desses fatores (MOKNI, 2019). No nordeste do Brasil, os casos predominam em locais com diferentes plantios agrícolas e em áreas remanescentes da Mata Atlântica (SILVA *et al.*, 2022).

As fêmeas dos flebotomíneos adquirem as formas amastigotas ao realizarem o repasto sanguíneo em um hospedeiro ou reservatório vertebrado. No trato intestinal do vetor, as amastigotas são depositadas e, durante a migração até a região faríngea, se diferenciam em promastigotas procíclicas, depois em promastigotas metacíclicas e, então, se tornam infectivas. Na válvula faríngea do inseto, são transferidas para um mamífero durante a hematofagia (ANVERSA *et al.*, 2017).

No hospedeiro, as promastigotas se aderem à membrana plasmática das

células fagocitárias e induzem o processo fagocítico. Depois disso, se transformam em amastigotas e se multiplicam, até o rompimento da célula hospedeira, por divisão binária. As amastigotas deixam as células para infectar outras células e serem capturadas pelo inseto vetor, dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (RODRIGUES *et al.*, 2013; ANVERSA *et al.*, 2017).

**Figura 7** - Ciclo biológico da *Leishmania sp.*



**Fonte:** A autora, 2023; Biorender ©.

**Legenda:** Ciclo biológico da *Leishmania sp.* envolvendo vetor, hospedeiros e reservatórios.

## 2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O período de incubação para o desenvolvimento das manifestações clínicas pode variar de duas semanas a dois meses. Inicialmente, no local da picada, surge uma mácula que permanece por até dois dias, que depois evolui para uma pápula e pode evoluir para uma úlcera, com um fundo avermelhado e as bordas bem delimitadas e elevadas (Figura 8) (BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2017; BURZA *et al.*, 2018).

**Figura 8** - Evolução da lesão da leishmaniose tegumentar.

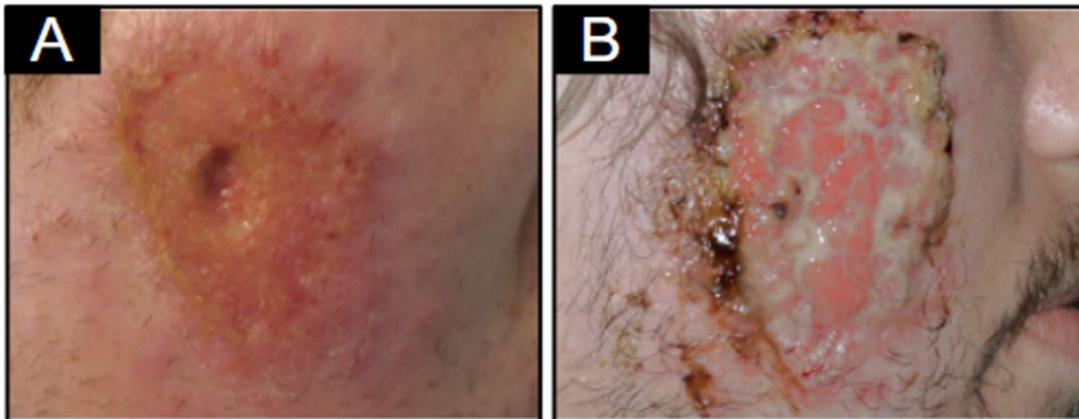


**Fonte:** Adaptado BRITO, 2012.

**Nota:** Evolução da lesão da leishmaniose tegumentar. (A) Pápula. (B-E) Lesão ulcerativa.

Normalmente a lesão é indolor, exceto quando associada a infecções bacterianas secundárias, que causam dor e secreção purulenta (Figura 9) (BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2017; BURZA *et al.*, 2018).

**Figura 9** - Lesão ulcerativa da leishmaniose tegumentar.

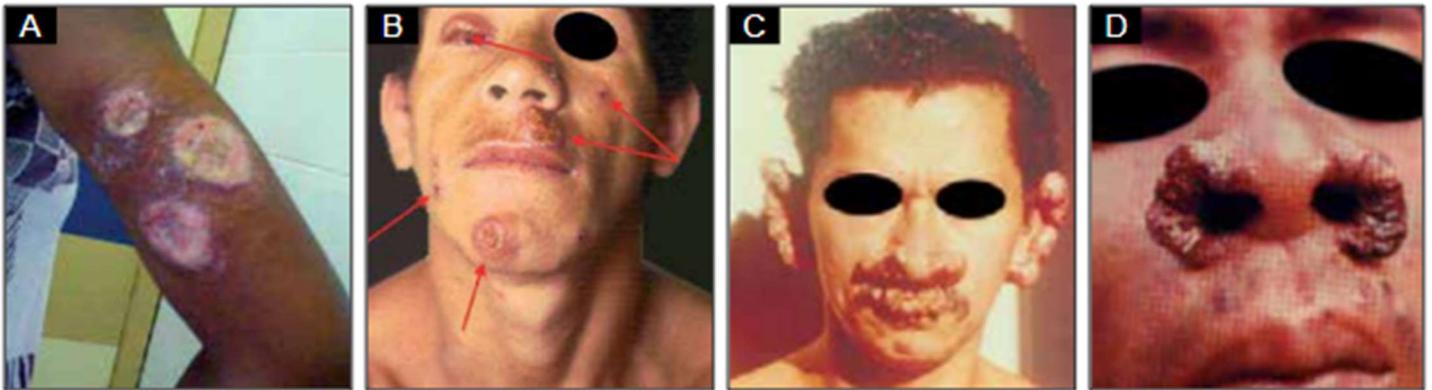


**Fonte:** Adaptado BURZA *et al.*, 2018.

**Nota:** Lesão ulcerativa da leishmaniose tegumentar. (A) Não purulenta. (B) Purulenta.

Dependendo da resposta imunológica do hospedeiro, do tipo de espécie, do local da lesão e da evolução clínica, a LT pode ser classificada em: leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Figura 10A), leishmaniose cutânea disseminada (LD) (Figura 10B), leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figura 10C) e leishmaniose mucocutânea (LM) (Figura 10D) (Tabela 1) (ANVERSA *et al.*, 2017; BRASIL; 2017).

**Figura 10** - Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.



**Fonte:** Adaptado Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2017.

**Legenda:** Formas clínicas da leishmaniose tegumentar. (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) L. cutânea disseminada. (C) L. difusa. (D) L. mucocutânea.

**Tabela 1 - Formas clínicas da leishmaniose tegumentar**

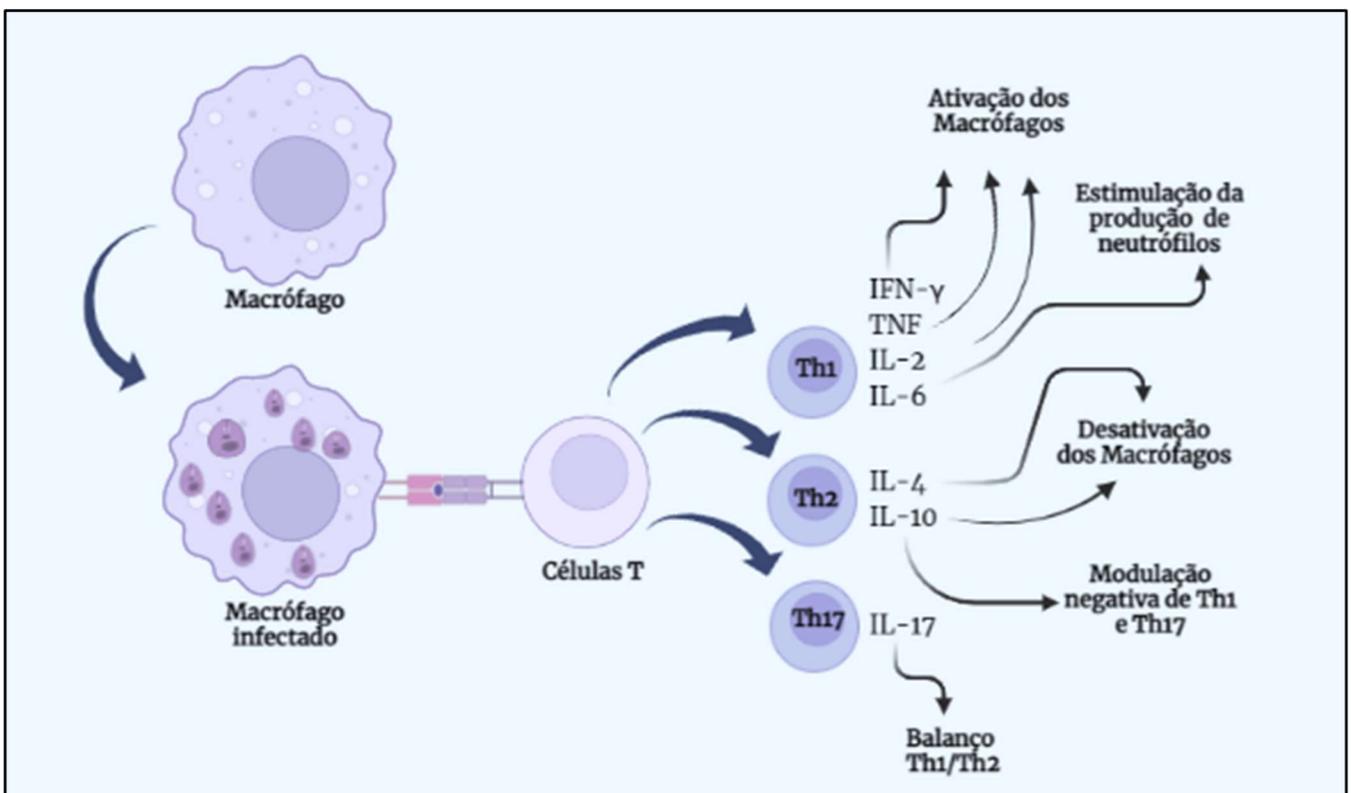
<b>Leishmaniose cutânea localizada</b>	Lesões ulcerativas únicas ou múltiplas em um mesmo segmento corporal. Precedidas ou não de disseminação linfática e envolvimento dos gânglios linfáticos.	Remissão espontânea das lesões entre 6-15 meses, nos casos de infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i> .
<b>Leishmaniose cutânea disseminada</b>	Lesões ulcerativas múltiplas, em vários segmentos corporais diferentes. Provavelmente, causadas pela disseminação do parasito pela via hemática ou via linfática.	O acometimento mucoso e a parestesia também podem ser encontrados.
<b>Leishmaniose difusa</b>	Lesão nodular única, sem ulceração, que evolui pelo corpo inteiro. Mais rara e grave, associada a pacientes com deficiência na resposta imunológica celular.	Pacientes apresentam uma resposta pobre ou ausente ao tratamento e não há remissão espontânea. No Brasil, é causada pela <i>L. (L.) amazonensis</i> .

**Fonte:** Adaptado REITHINGER *et al.*, 2007; BRASIL, 2017.

### 2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Os fatores intrínsecos da resposta imunológica do hospedeiro são importantes para determinar o desenvolvimento das manifestações clínicas características da LT (CASTRO *et al.*, 2023). Inicialmente, após a infecção transmitida pelo inseto vetor, as *Leishmanias* infectam os macrófagos do hospedeiro e conseguem criar um mecanismo para resistir à atividade microbicida dessas células, sobrevivendo e proliferando até a ruptura celular (Figura 11).

**Figura 11** – Perfil Th1, Th2 e Th17 envolvidos na resistência, susceptibilidade e controle da resposta imunológica do hospedeiro na leishmaniose tegumentar.



**Fonte:** A autora, 2023; Biorender ©.

**Legenda:** Os macrófagos fagocitam as amastigotas de *Leishmania* e, posteriormente, induzem as células T a desenvolverem as respostas imunológicas Th1, Th2 e Th17, e suas respectivas citocinas de resistência, susceptibilidade e controle da inflamação.

Com a ruptura, partículas antigênicas são liberadas e apresentadas, pelas células apresentadoras de antígenos, aos linfócitos T CD4+, que desenvolvem dois tipos de respostas: Th1, associada com a resistência do hospedeiro e com a produção de citocinas pró-inflamatórias, Th2, associada com a susceptibilidade e com a produção de citocina anti-inflamatórias e Th17, associada com controle do balanço do

perfil Th1 e Th2, caracterizada pela produção da IL-17 (Figura 11) (NEVES, 2003; ABBAS, 2015; BRASIL, 2017; GONÇALVES DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

No caso das formas clínicas causadas pela *L. braziliensis*, a resposta predominante normalmente é a Th1, com ativação dos macrófagos e consequente produção de óxido nítrico (NO), responsável pela atividade leishmanicida. Geralmente, essa resposta apresenta uma maior eficiência na eliminação do parasito, boa resposta ao tratamento e, em alguns casos, cura espontânea (DUARTE *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

Com o desenvolvimento da resposta imunológica, é necessário também que haja a produção de células T reguladoras (Tregs) para controle da resposta inflamatória, contudo, o papel das Tregs ainda não está muito bem esclarecido em modelo humano (CASTRO *et al.*, 2023).

### 2.3.1 Citocinas Inflamatórias

Uma das respostas imunológicas iniciais contra uma infecção, como na LT, é a produção de citocinas. Essas proteínas possuem diferentes estruturas e funções, e atuam regulando e coordenando as atividades das células na imunidade inata e adaptativa (SU *et al.*, 2012; ABBAS, 2015).

A interleucina 2 (IL-2) é uma citocina inflamatória que promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos linfócitos T, além de estimular a produção de outras citocinas, como interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e a interleucina 4 (IL-4) (ABBAS, 2015; MIRZAEI *et al.*, 2020).

O fator de necrose tumoral (TNF) é produzido por células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e as células dendríticas, e estimula a produção de quimiocinas que levam a um aumento na produção, migração, adesão e transmigração de leucócitos no endotélio vascular, além disso, TNF também atua na coestimulação de células B e T, induzindo a proteção do hospedeiro (CUMBERBATCH & KIMBER, 1992; ABBAS, 2015; MIRZAEI *et al.*, 2020).

O IFN- $\gamma$ , principal citocina ativadora de macrófagos, atua contra microrganismos intracelulares e inibe o desenvolvimento da resposta Th2. O IFN- $\gamma$  também leva à expressão de diversas proteínas responsáveis pela amplificação da resposta e pela apresentação de antígenos (FREITAS *et al.*, 2013; ABBAS, 2015).

A interleucina 6 (IL-6) é produzida por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e outras células e, assim como TNF- $\alpha$ , estimula a produção de neutrófilos na MO e promove a diferenciação de células T, além disso, promove a diferenciação das células B (ABBAS, 2015; SAHA *et al.*, 2011; MIRZAEI *et al.*, 2020).

A IL-4 é produzida pelos mastócitos e pelas células T, e é a principal citocina envolvida na estimulação da resposta Th2, atuando também na inibição da resposta Th1 (FREITAS *et al.*, 2013). Ademais, contribui para a ativação alternativa dos macrófagos, onde ocorre o aumento da produção da interleucina 10 (IL-10) e fator  $\beta$  de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ) (ABBAS, 2015).

A IL-10 é produzida por alguns tipos de células não linfóides, principalmente macrófagos ativados pela via alternativa e é conhecida como reguladora de retroalimentação negativa, por inibir a produção das células que a produzem (FREITAS *et al.*, 2013; ABBAS, 2015).

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina associada tanto com a resposta mediada por células T, quanto com a inflamação aguda. Atua modulando a IL-10, potencializa a produção de NO e induz a inflamação tecidual, além disso, aumenta a produção de neutrófilos, ao estimular a granulopoiese (FREITAS *et al.*, 2013; ABBAS, 2015; DUARTE *et al.*, 2016).

## 2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

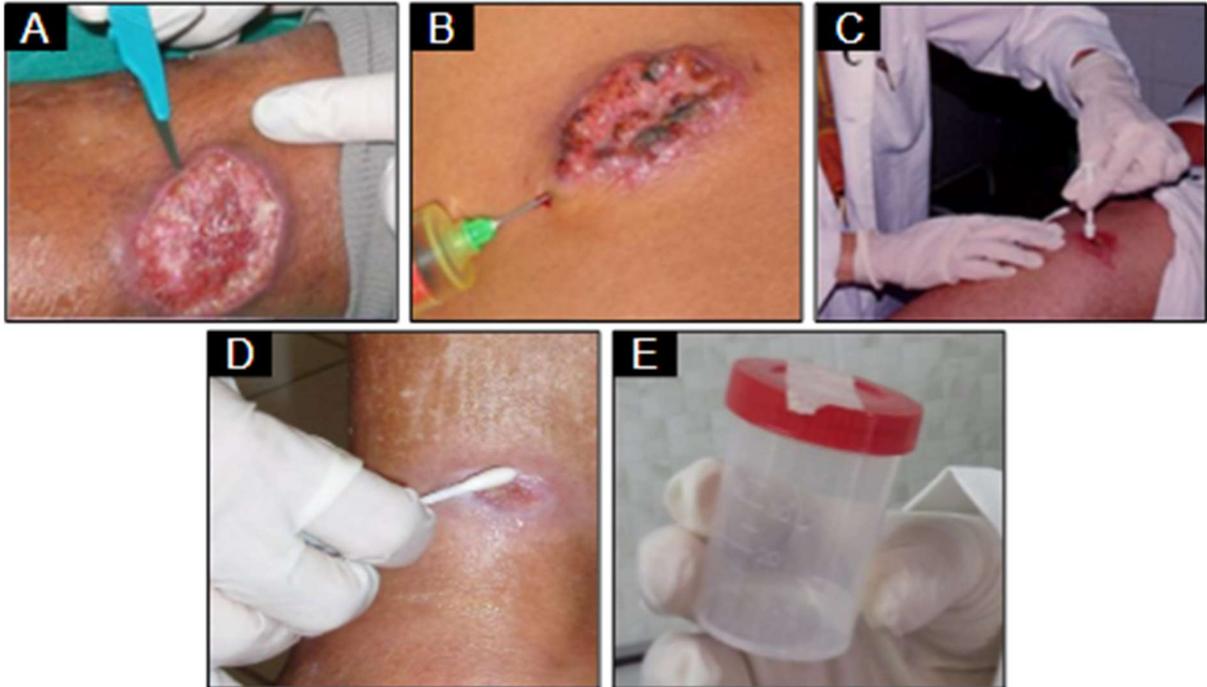
O diagnóstico preciso da LT envolve uma associação dos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da doença. Dentre os métodos laboratoriais estão as técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares (PEREIRA *et al.*, 2012; ANVERSA *et al.*, 2017). Essas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade variadas devido à diversidade de formas clínicas e de espécies de *Leishmania*, além do tempo de evolução das lesões (BRASIL, 2017).

### 2.4.1 Métodos de Coleta

Para o diagnóstico da LT ser realizado, é necessário que ocorra a coleta de material biológico (Figura 12) do paciente e entre os métodos de obtenção estão: a

escarificação da borda da lesão (Figura 12A), punção aspirativa (Figura 12B) e a biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina por aposição (Figura 12C).

**Figura 12** - Métodos de coleta para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.



**Fonte:** Adaptado BRITO, 2012; SILVA *et al.*, 2018.

**Legenda:** Métodos de coleta para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. (A) Escarificação da borda da lesão. (B) Punção aspirativa. (C) Biópsia. (D) *Swab* de lesão. (E) Fluido salivar.

Na técnica de escarificação, utiliza-se um bisturi ou estilete na borda interna da úlcera ou da superfície da lesão fechada. Já na punção, seringa e agulha são utilizadas na borda da lesão ou no linfonodo. Por fim, na biópsia com impressão, o fragmento de tecido é obtido por cirurgia e, posteriormente, é feita uma compressão sobre uma lâmina de vidro. A biópsia pode ainda ser feita com o auxílio de *punch* ou uma pinça saca-bocado, que além do esfregaço, pode ser utilizada para confecção de cortes histológicos e inoculação *in vivo*, em animais, e *in vitro*, em meio de cultura (BRASIL, 2017).

No entanto, esses métodos são considerados invasivos e, além do desconforto causado durante a coleta, apresentam risco de sangramento e infecção, e necessitam de infraestrutura e qualificação profissional, que não são facilmente encontrados em áreas remotas. Portanto, métodos menos invasivos, mais simples e que permitem um diagnóstico sensível vêm sendo estudados (BOGGILD *et al.*, 2010, BOGGILD *et al.*,

2011).

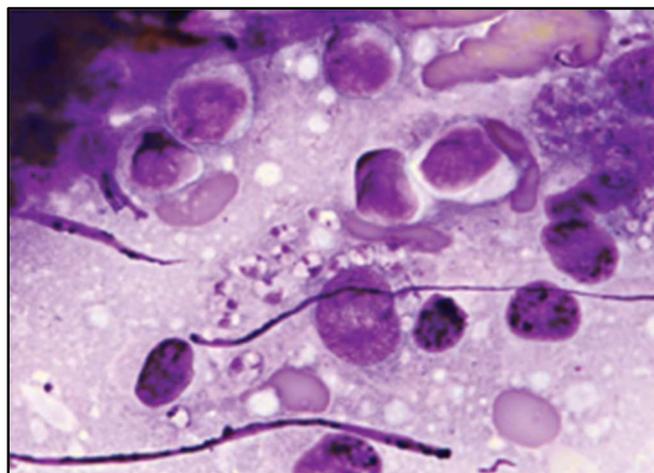
Entre os métodos menos invasivos estão o *swab* de secreção da lesão (Figura 12D) e os fluídos corporais (Figura 12E), como a saliva, urina e secreção nasal, que podem ser uma alternativa interessante, por não necessitar de profissionais altamente capacitados para a coleta, e por serem métodos mais fáceis e rápidos. (BRITO, 2013; SERENO *et al.*, 2020).

#### 2.4.2 Diagnóstico Parasitológico

Os métodos de diagnóstico parasitológicos se baseiam na visualização ou isolamento do parasito. A pesquisa direta, padrão ouro, estabelece o diagnóstico da LT, devido a sua alta especificidade, e permite a visualização das formas amastigotas de *Leishmania* por microscopia óptica (Figura 13) (ANVERSA *et al.*, 2017; BURZA *et al.*; 2018).

Esse método é utilizado como primeira escolha por ser classificado como padrão ouro, ser mais rápido, de baixo custo e de fácil execução (BRASIL, 2017). No entanto, não permite distinguir as espécies e possui baixa sensibilidade, especialmente em infecções por *L. (V.) braziliensis*, devido à baixa carga parasitária, na presença de infecções secundárias e com a evolução crônica da lesão (BRITO, 2013; BRASIL, 2017). Essa sensibilidade pode ser aumentada com a repetição do teste e a leitura de mais de uma lâmina. (BRASIL; 2017).

**Figura 13** - Amastigotas de *Leishmania sp.* visualizadas por microscopia óptica no exame direto.



**Fonte:** Adaptado CROFT & BUFFET, 2012.

**Legenda:** Amastigotas de *Leishmania sp.* visualizadas por microscopia óptica no exame direto em uma amostra de uma lesão de pele ulcerativa.

O isolamento parasitário *in vitro*, por meio cultura, além de confirmar a presença do parasito, permite a identificação posterior da espécie de *Leishmania*. O isolamento *in vivo*, por inoculação em animais, sendo o *Mesocricetus auratus* (hamster) comumente utilizado devido a sua alta sensibilidade, também pode ser feito.

No entanto, apesar de serem dois métodos muito sensíveis, o longo período de desenvolvimento, especialmente no isolamento *in vivo*, e o alto custo, torna-os inviáveis na rotina laboratorial (BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2017).

#### 2.4.3 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular vem sendo aprimorado extensivamente nas últimas décadas, e entre esses métodos está a reação em cadeia polimerase (PCR) (REITHINGER *et al.*, 2007).

Essa técnica se baseia na amplificação do DNA de *Leishmania* e apresenta uma alta sensibilidade, permitindo a detecção da infecção mesmo com uma baixa carga parasitária, e uma alta especificidade, podendo utilizar alvos específicos para identificação do gênero ou da espécie do parasito. Além do diagnóstico, a PCR permite também o monitoramento do tratamento (REITHINGER *et al.*, 2007; BRASIL, 2017).

Apresenta uma alta sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de DNA, mas, possui um custo alto e necessita de uma infraestrutura adequada, que ainda não é encontrada na rotina laboratorial (REITHINGER *et al.*, 2007; BRITO, 2013; BRASIL, 2017).

#### 2.4.4 Diagnóstico Imunológico

Os métodos de diagnóstico imunológicos, apresentam sensibilidades e especificidades variadas e permitem, geralmente, a detecção da LT e o monitoramento do tratamento. Contudo, assim como o diagnóstico molecular, algumas técnicas são de alto custo e necessitam de infraestrutura laboratorial, nem

sempre encontrada na rotina (BRASIL, 2017).

Entre algumas dessas técnicas estão: a intradermoreação de Montenegro (IDRM), que não é mais utilizada na rotina, e o imunoenensaio enzimático (ELISA) e a citometria de fluxo (CF), que ainda não são utilizados na rotina laboratorial.

A IDRM baseia-se na resposta de hipersensibilidade celular retardada. No entanto, pode apresentar um resultado negativo na fase inicial da doença, na leishmaniose visceral e em indivíduos fraco-reatores, como na leishmaniose difusa, e pode permanecer positivo mesmo após o tratamento e a cura clínica.

O ELISA se baseia na detecção de anticorpos *anti-Leishmania*, contudo, apresenta uma sensibilidade e especificidade que varia de acordo com a forma clínica da leishmaniose apresentada pelo paciente (ROMERO *et al.*, 2005).

A CF analisa, simultaneamente, várias características de uma partícula individual em fluxo fluído, através de uma fonte luminosa, e apresenta uma sensibilidade superior quando comparada a outros imunodiagnósticos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; BRASIL, 2017).

## 2.5 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O controle da LT é baseado em medidas profiláticas, para eliminar o vetor e os reservatórios, e no tratamento da infecção com fármacos (BEZERRA *et al.*, 2004). A maioria das lesões tendem a sofrer remissão espontânea entre 8 e 12 meses. A decisão de tratar é movida pela necessidade de atingir a cura mais rapidamente, reduzir as cicatrizes, evitar a disseminação e evolução para a forma mucocutânea, e contribuir para o controle da doença. Outro critério para o início da terapia é a quantidade e o diâmetro das lesões (BRASIL, 2017; BURZA *et al.*, 2018).

### 2.5.1 Fármacos

Entre os medicamentos disponíveis estão o antimonial pentavalente, a anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina (BRASIL, 2017; CONITEC, 2018). O antimonial pentavalente é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da LT, exceto em pacientes com mais de 50 anos, com doenças cardíacas, renais e hepáticas, com hipersensibilidade aos componentes da medicação, e pacientes em

uso de medicamentos que prolongam o intervalo QTc (BRASIL, 2017).

Pode ser administrado nas formas endovenosa (EV), intramuscular (IM) e intralesional (BRASIL, 2017; FARAJZADEH *et al.*, 2018). Possui um mecanismo de ação não muito esclarecido, mas estudos demonstram que é possível que esse medicamento seja um pró-fármaco, que sofre ativação nos macrófagos, e atua inibindo a produção de energia do parasito, por inibição da glicólise e da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (BEZERRA *et al.*, 2004; BRASIL, 2017).

A anfotericina B é um antibiótico que possui atividade antifúngica e antileishmanicida. Esse fármaco atua se ligando ao ergosterol, presente na membrana plasmática das *Leishmanias*, alterando a permeabilidade de membrana e o equilíbrio osmótico do parasito (BEZERRA *et al.*, 2004; BRASIL, 2017). É administrado por infusão intravenosa lenta, por quatro a seis horas (BRASIL, 2017).

A pentamidina é um fármaco que tem ação antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral, e é utilizado como alternativa para pacientes não responsivos ao antimonial pentavalente e por apresentar menos efeitos colaterais (BEZERRA *et al.*, 2004). Atua inibindo enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo a síntese de moléculas importantes para o parasito e pode ser administrada por via EV ou IM (BEZERRA *et al.*, 2004; BRASIL, 2017).

A miltefosina é uma droga alternativa que pode ser utilizada por via oral e atua interferindo na membrana celular, no metabolismo de fosfolipídios e na transmissão de sinal proliferativo, também induz a apoptose (CAMPOS *et al.*, 2018). O sucesso do tratamento depende de diversos fatores, tais como: fatores genéticos, resposta imunológica e a apresentação clínica do hospedeiro; a qualidade e a dosagem da droga; o tempo de duração e a finalização do tratamento; e os fatores intrínsecos e falta de resistência medicamentosa do parasito (ANVERSA *et al.*, 2017).

### 2.5.2 Vacinas

Algumas vacinas têm sido desenvolvidas para prevenção e tratamento da LT, mas apenas algumas avançaram para a fase clínica. Entre as estratégias vacinais estão as vacinas de subunidades, de DNA, de saliva do inseto vetor e de células dendríticas. O objetivo principal é a indução da resposta Th1 e a produção de anticorpos contra o parasito.

Contudo, alguns aspectos como a falta de informação suficiente para a indicação de uso em cada fase da doença e a carga parasitária que varia anualmente, dificultam esse desenvolvimento (UZONNA & OKWOR, 2009; MALVOLTI *et al.*, 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar quais citocinas são produzidas na cultura de células de indivíduos saudáveis estimuladas com antígenos de *L. (V.) braziliensis*, isolados de salivas humanas de pacientes com leishmaniose tegumentar.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar e caracterizar o grupo de estudo quanto aos aspectos epidemiológicos;
- b) Cultivar e obter antígenos a partir de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, isoladas de salivas humanas;
- c) Identificar as citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17) produzidas em sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos saudáveis;
- d) Comparar a produção de citocinas no sobrenadantes de PBMC de indivíduos saudáveis após estímulo com antígenos isolados de saliva humana e isolado do parasita.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 SELEÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

Dez indivíduos saudáveis, nomeados como grupo controle, sem lesões típicas, residentes de áreas não endêmicas e sem história epidemiológica compatível com leishmaniose foram selecionados, de forma voluntária. No entanto, não foram realizados testes laboratoriais para comprovação. Todos os indivíduos estavam cientes do objetivo do estudo e da necessidade de realização de coleta de punção venosa.

### 4.2 CULTIVO DAS CEPAS ISOLADAS DA SALIVA HUMANA

Dois isolados de *L. (V.) braziliensis*, caracterizados como IOCL 3630 e IOCL 3632 foram obtidos, de forma inédita por BRITO *et al.*, 2018, da saliva de dois pacientes com LT. Esses pacientes apresentavam lesões cutâneas localizadas e eram oriundos dos municípios de Moreno e Abreu e Lima, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco. As cepas foram depositadas e caracterizadas na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOCL/FIOCRUZ-RJ) com o padrão de “*Leishmania* Multi-locus sequence typing” (MLST) (Boité *et al.* 2016). Posteriormente, foram estocadas em nitrogênio líquido no laboratório de Imunopatologia, do Departamento de Imunologia, FIOCRUZ -PE.

As amostras foram descongeladas e mantidas em meio Schneider's (pH 7,2), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), a 25°C ± 1°C em uma estufa incubadora. O cultivo dessas cepas permitiu a realização da obtenção de antígeno bruto para os ensaios de estimulação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). A cepa IOCL 566 também foi utilizada, no entanto, é uma cepa padrão denominada MHOM/BR/1975/M2903, não isolada da saliva humana.

### 4.3 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO

Após o cultivo e crescimento das formas promastigotas de *Leishmania*,

provenientes das cepas IOCL 3630 e IOCL 3632, isoladas de salivas humanas, e IOCL 566, cepa padrão, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para um falcon de 50 mL e depois centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) estéril em uma centrifugação de 2200 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado novamente e 750 µL do tampão de lise e 250 µL do inibidor de protease foram adicionados. Depois da homogeneização, o conteúdo foi transferido para um criotubo de 2 mL. O criotubo foi congelado no nitrogênio líquido e, em sequência, descongelado no Banho-Maria, a 37°C, por 6 vezes. O antígeno bruto de cada cepa foi obtido separadamente.

#### 4.3.1 Quantificação do Antígeno

A quantificação do antígeno foi feita pela medida da absorbância no espectrofotômetro, utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Duas cubetas foram separadas, sendo uma para o branco e outra para o antígeno. Na cubeta do branco, foi adicionado 200 µL do reagente de Bradford e 800 µL de água destilada. Na cubeta do antígeno, foi adicionado 200 µL do reagente de Bradford, 799 µL de água destilada e 1 µL do antígeno bruto. As quantificações foram dadas em µg/µL.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Após a coleta, 20 mL do sangue venoso, de cada paciente, foi transferido para um tubo falcon contendo Ficoll Hypaque, na proporção 1:2 e, em seguida, esse tubo passou por uma centrifugação a 700 G por 30 minutos a 20°C, para formação do anel de PBMC. O anel, localizado entre o Ficoll Hypaque e o plasma, foi removido e depositado em um novo tubo contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Depois do depósito, uma nova centrifugação a 300 G por 10 minutos a 20°C foi feita e o sobrenadante foi descartado. Após isso, o “pellet” foi ressuspenso novamente em 10 mL de meio RPMI com 10% de SFB e centrifugado a 300 G, nas mesmas condições. Para quantificação das células, uma alíquota foi removida, diluída na proporção de 1:20 em azul de trypan e quantificada na câmara de Neubauer.

#### 4.5 CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

As PBMC provenientes do sangue de indivíduos saudáveis, foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço. Em seguida, as células foram estimuladas, com o antígeno bruto da cepa padrão IOCL 566 e das cepas isoladas da saliva de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, IOCL 3630 e IOCL 3632, individualmente, na concentração de 10 µg/mL (BRELAZ *et al.*, 2012). Como controle, foram utilizadas células mantidas apenas em meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> e, após 48h e 72h, as células foram centrifugadas a 300 G por 10 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17A.

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

As citocinas inflamatórias IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17A foram mensuradas nos sobrenadantes das culturas de PBMC, 48h e 72h após a estimulação com os antígenos das cepas de *L. (V.) braziliensis* padrão (IOCL 566) e as isoladas de salivas humanas (IOCL 3630 e IOCL 3632), individualmente. O kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante. Esse método permite a quantificação simultânea de múltiplos analitos, reduz a quantidade de amostra utilizada e minimiza o tempo necessário para análise dos resultados (MORGAN *et al.*, 2003).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 9. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificação de normalidade. Quando havia normalidade, para comparação de dois grupos, o teste T student foi utilizado, quando

não havia normalidade, o teste U de Mann-Whitney foi utilizado. Para comparação de mais de dois grupos, o teste ANOVA foi utilizado quando havia normalidade, e o teste de Kruskal-Wallis quando não havia normalidade. Todas as conclusões foram tomadas a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  = estatisticamente significativo).

#### 4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O procedimento de coleta de material biológico foi realizado após o consentimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos indivíduos do grupo de estudo (Anexo B). O grupo é composto por voluntários saudáveis, sem leishmaniose e residentes em áreas não endêmicas para a LT. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do IAM-FIOCRUZ-PE (Anexo A), com o CAAE de número 11083812.7.0000.5190.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

O grupo de estudo, denominado de grupo controle, foi composto por dez indivíduos, sendo cinco do sexo feminino e cinco do sexo masculino, com a faixa etária entre 22 e 33 anos (Tabela 2). Todos eram saudáveis, residentes de áreas não endêmicas e sem histórico epidemiológico compatível com leishmaniose.

**Tabela 2** - Caracterização do grupo de estudo.

Características	Grupo de estudo
Número total de indivíduos controles	10
Faixa etária	22-33
Relação sexo masculino/feminino	5/5

Fonte: A autora, 2023.

### 5.2 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO

Os antígenos das cepas de *L. (V.) braziliensis*, denominados IOCL 566 (cepa padrão, MHOM/BR/1975/M2903), IOCL 3630 e IOCL 3632 (cepas isoladas de salivas humanas) foram obtidos e, posteriormente, quantificados pelo método de Bradford através da leitura no espectrofotômetro (Tabela 3). A quantificação foi dada em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

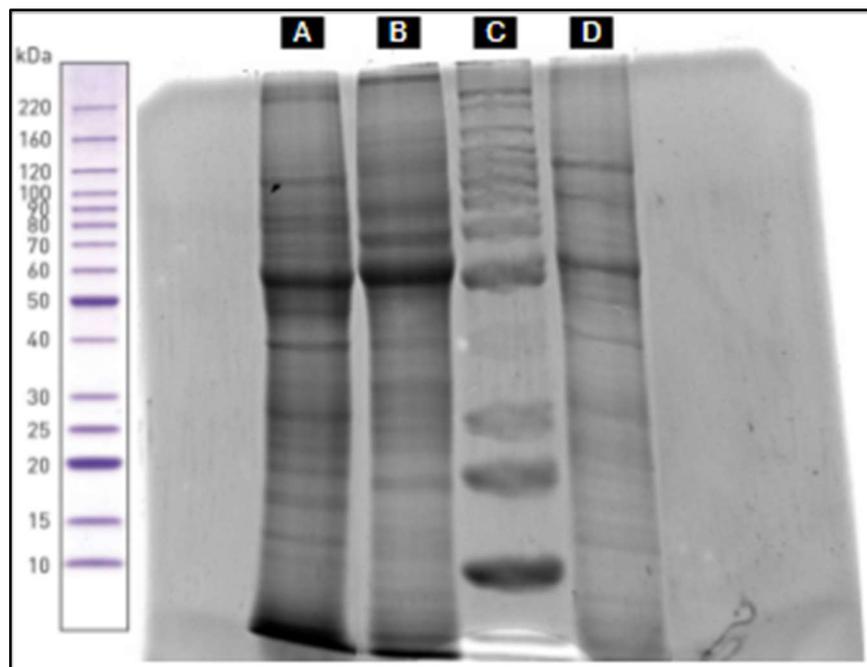
**Tabela 3** - Quantificação dos antígenos.

Antígeno	Quantificação
IOCL 566 MHOM/BR/1975/M2903	10,180 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
IOCL 3630	3,328 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
IOCL 3632	4,583 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Fonte: A autora, 2023.

Uma eletroforese com gel de poliacrilamida (Figura 14) foi realizada para verificação da integridade dos antígenos obtidos, para que pudessem, posteriormente, serem utilizados na estimulação das PBMC.

**Figura 14** - Gel de poliacrilamida dos antígenos das cepas de *L. (V.) braziliensis*, padrão e isoladas de salivas humanas.



**Fonte:** A autora, 2023; Sigma-Aldrich ©

**Legenda:** (A) IOCL 3630 (Isolada de saliva humana). (B) IOCL 566 (Padrão). (C) Marcador proteico. (D) IOCL 3632 (Isolada de saliva humana).

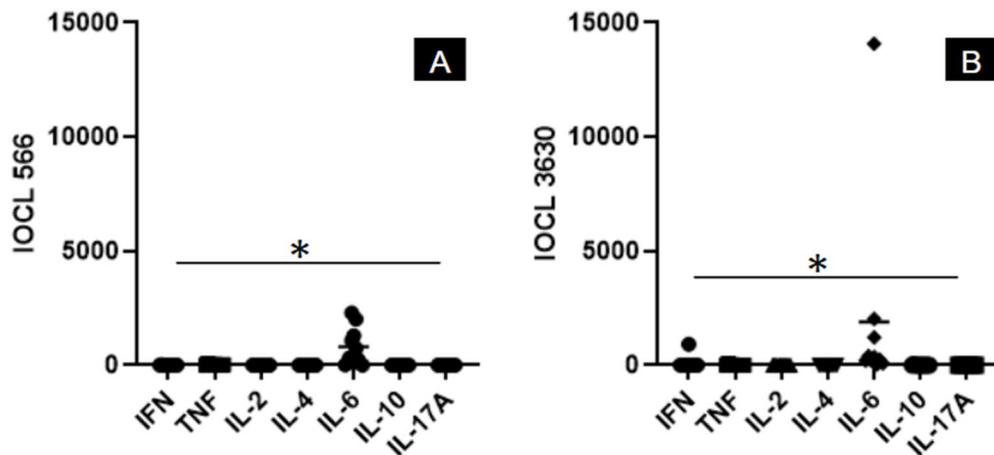
### 5.3 PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDO PELOS ANTÍGENOS

Após 48h e 72h de estimulação celular, analisamos o perfil de citocinas induzido por cada antígeno. Todos os três antígenos, obtidos da cepa padrão e das cepas isoladas de saliva, analisados após 48h apresentaram um aumento significativo da expressão da IL-6, quando comparada com as demais citocinas (Figura 15, 16).

O antígeno IOCL 566 (Figura 15A, 16A) e o IOCL 3632 (Figura 16B) quando comparados com o IOCL 3630 (Figura 15B) apresentam uma expressão bem mais significativa. Quando comparada a produção das citocinas entre as mesmas, todos os

três antígenos apresentaram individualmente a mesma significância estatística com  $p < 0.0001$ .

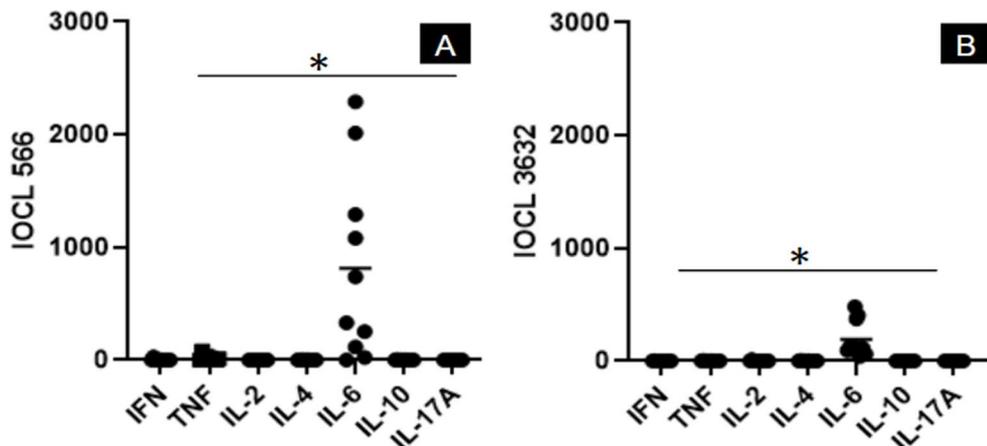
**Figura 15** - Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno (ng/mL) da cepa padrão IOCL 566 e da cepa isolada de saliva IOCL 3630 após 48h de estimulação *in vitro* de PBMC ( $\mu\text{g/mL}$ ).



Fonte: A autora, 2023.

**Legenda:** Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno da cepa padrão (A) IOCL 566 (10 ng/mL) e da cepa isolada de saliva (B) IOCL 3630 (10 ng/mL) após 48h da estimulação *in vitro* de PBMC (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Diferenças entre as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A foram consideradas significantes no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

**Figura 16** - Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno (ng/mL) da cepa padrão IOCL 566 e da cepa isolada de saliva IOCL 3632 após 48h de estimulação *in vitro* de PBMC ( $\mu\text{g/mL}$ ).

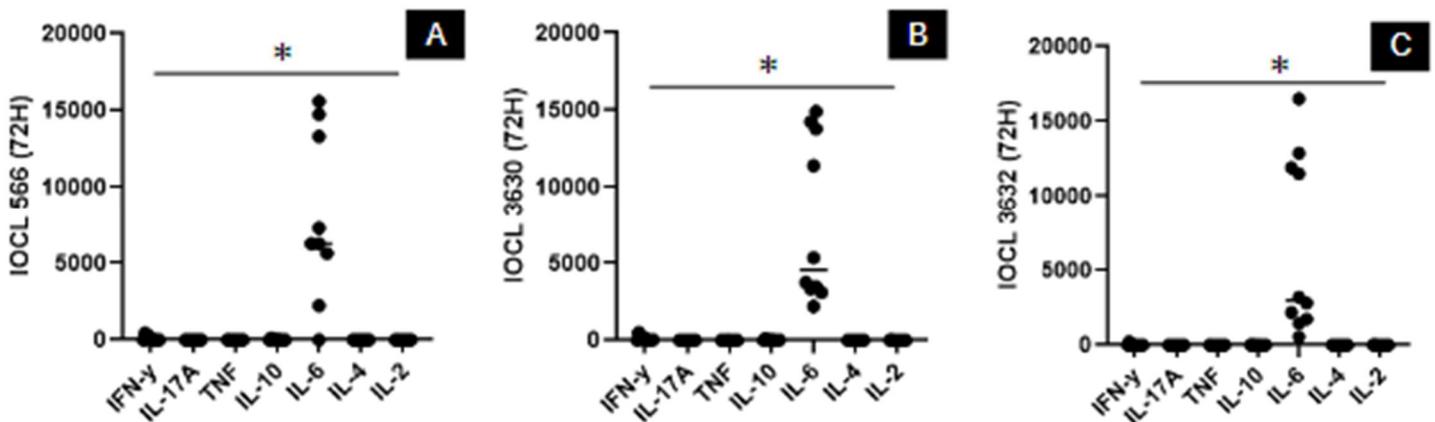


**Fonte:** A autora, 2023.

**Legenda:** Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno da cepa padrão (A) IOCL 566 (10 ng/mL) e da cepa isolada de saliva (B) IOCL 3632 (10 ng/mL) após 48h da estimulação *in vitro* de PBMC (10 µg/mL). Diferenças entre as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17A foram consideradas significantes no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

Após 72h, o perfil induzido por cada antígeno também foi semelhante, com a expressão significativa da IL-6 e sucinta do IFN-γ (Figura 17). Quando as citocinas induzidas por cada antígeno foram comparadas entre si, todos os três antígenos, IOCL 566 (Figura 17A), IOCL 3630 (Figura 17B) e IOCL 3632 (Figura 17C) apresentaram individualmente a mesma significância estatística com  $p < 0.0001$ .

**Figura 17** - Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido por cada antígeno (ng/mL) após 72h de estimulação *in vitro* de PBMC (µg/mL).



**Fonte:** A autora, 2023.

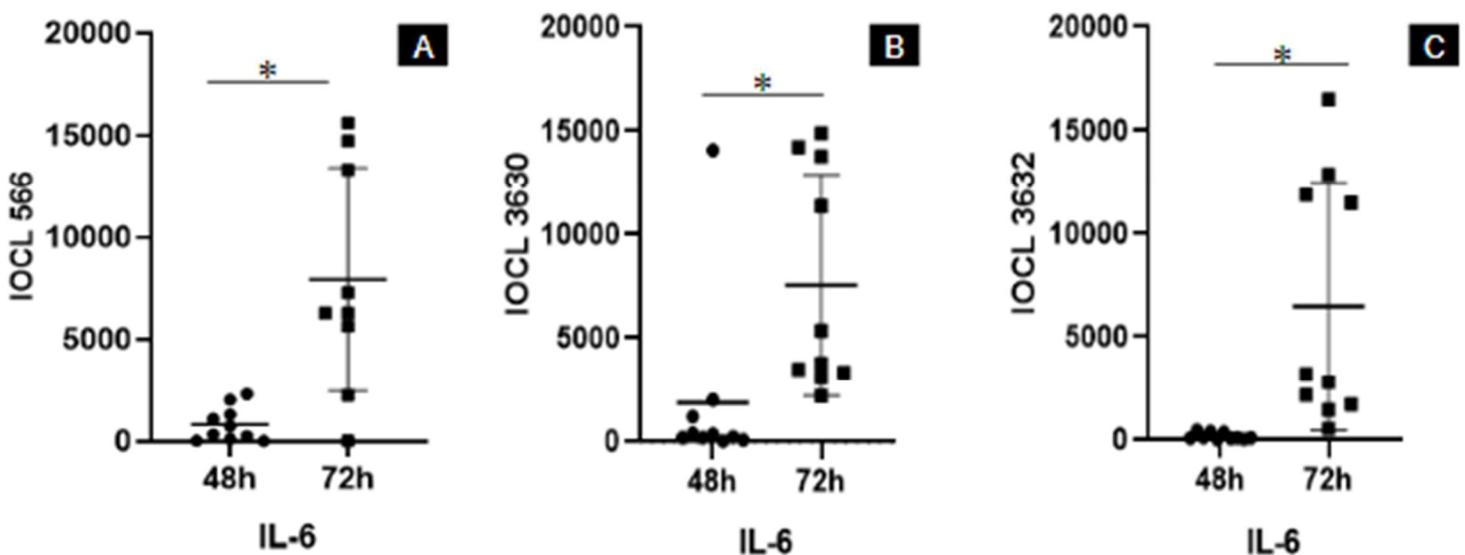
**Legenda:** Perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) induzido pelo antígeno padrão (A) IOCL 566 (10 ng/mL) e pelos antígenos isolados de salivas humanas (B) IOCL 3630 (10 ng/mL) (C) IOCL 3632 (10 ng/mL) após 72h da estimulação *in vitro* de PBMC (10 µg/mL). Diferenças entre as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17A foram consideradas significantes no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

#### 5.4 EXPRESSÃO DA IL-6 EM DIFERENTES TEMPOS PÓS ESTIMULAÇÃO

Após a expressão considerável da IL-6, analisamos o perfil induzido por cada antígeno (Figura 15 e 16), comparamos a expressão desta citocina, entre os tempos 48h e 72h após estimulação, induzida por cada antígeno individualmente (Figura 18).

Todos os três antígenos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois tempos, com o  $p=0.0008$  para o IOCL 566 (Figura 18A),  $p=0.0007$  para o IOCL 3630 (Figura 18B) e  $p<0.0001$  para o IOCL 3632 (Figura 18C).

**Figura 18** - Comparação da expressão da IL-6 (pg/mL) induzida por cada um dos três antígenos (ng/mL) após 48h e 72h de estimulação *in vitro* de PBMC ( $\mu\text{g/mL}$ ).



Fonte: A autora, 2023.

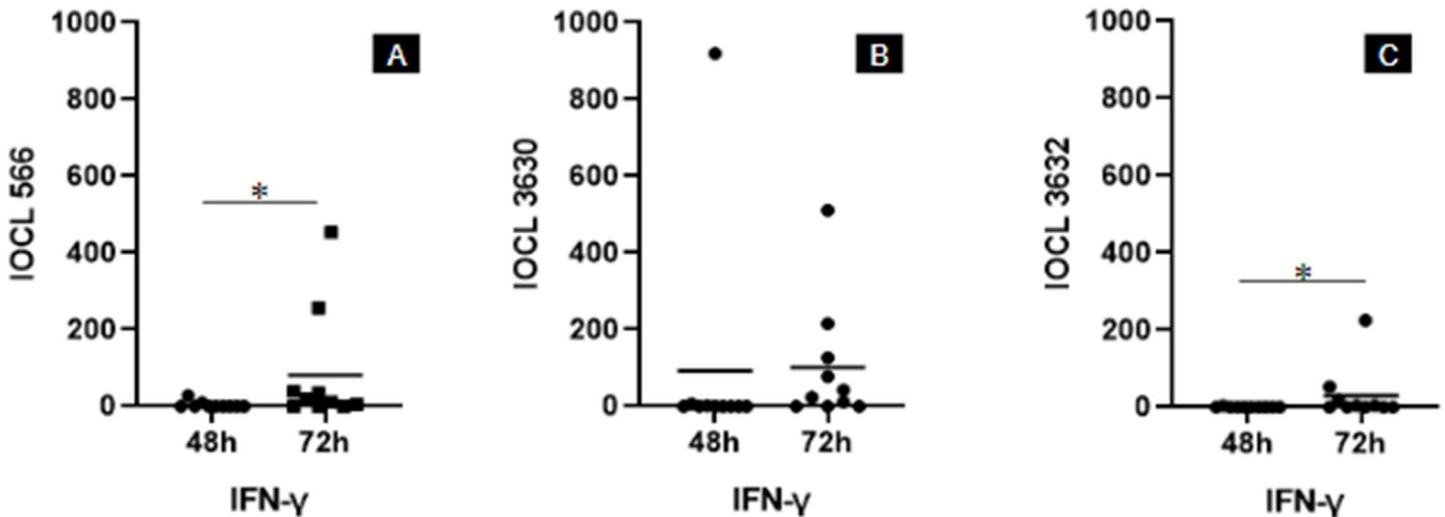
**Legenda:** Comparação da expressão da IL-6 (pg/mL) induzida pelo antígeno padrão (A) IOCL 566 (10 ng/mL) e pelos antígenos isolados de salivas humanas (B) IOCL 3630 (10 ng/mL) (C) IOCL 3632 (10 ng/mL) após 48h e 72h da estimulação *in vitro* de PBMC (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Diferenças entre os tempos foram consideradas significantes no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

## 5.5 EXPRESSÃO DO IFN- $\gamma$ EM DIFERENTES TEMPOS PÓS ESTIMULAÇÃO

Na análise do perfil de citocinas induzido por cada antígeno, o IFN- $\gamma$  também apresentou uma expressão aumentada, sendo bem menos expressiva que a da IL-6 (Figura 15 e 16). Considerando essa expressão, foi feita uma análise comparando os dois tempos após a estimulação, 48h e 72h (Figura 19).

Na análise de significância, o IOCL 566 (Figura 19A) e o IOCL 3632 (Figura 19C) apresentaram significância estatística, com  $p=0.0216$  e  $p=0.0325$ , respectivamente. Contudo, o IOCL 3630 (Figura 19B) não apresentou significância estatística.

**Figura 19** - Comparação da expressão de IFN- $\gamma$  (pg/mL) induzida por cada um dos três antígenos (ng/mL) após 48h e 72h de estimulação *in vitro* de PBMC ( $\mu$ g/mL).



Fonte: A autora, 2023.

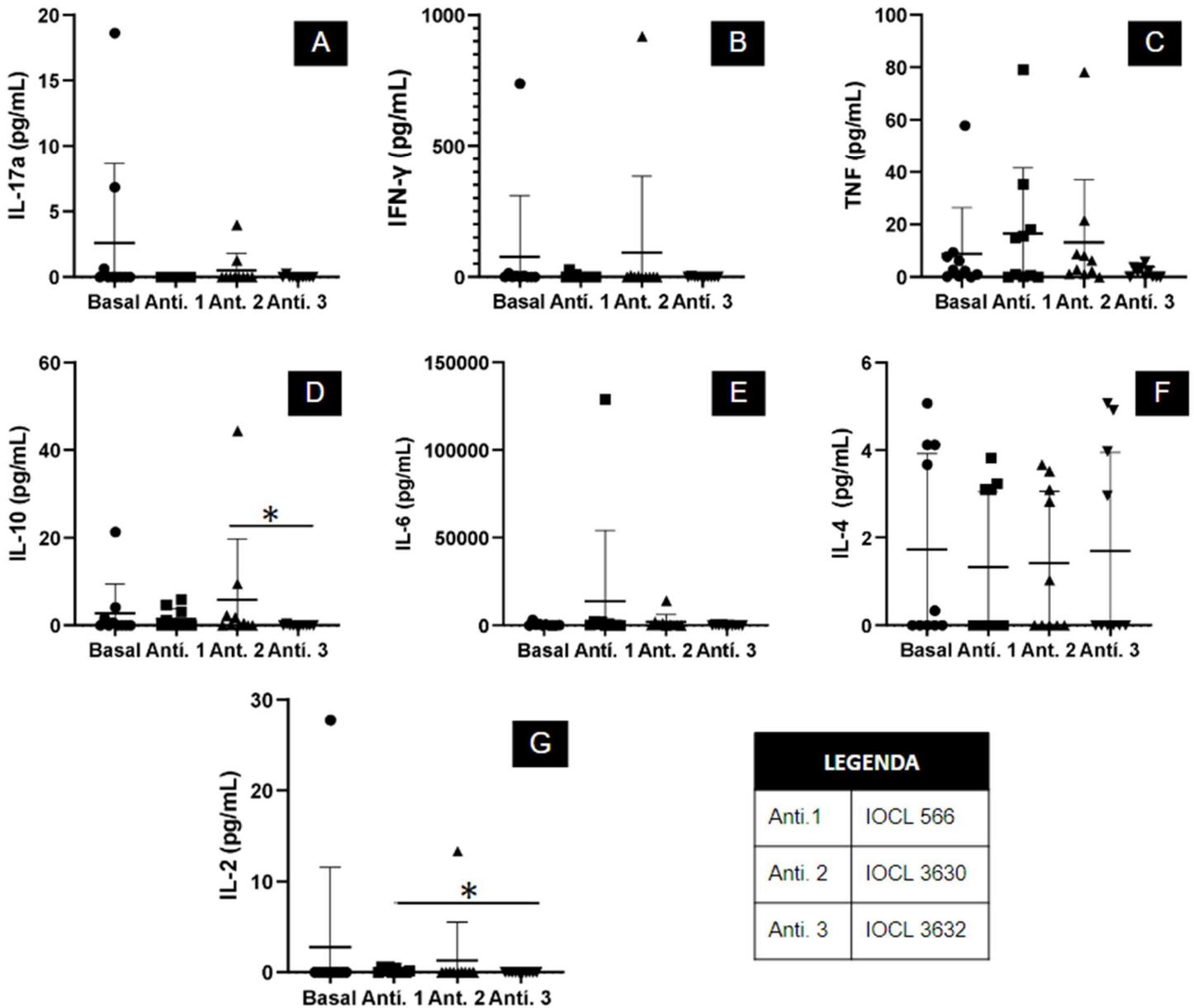
**Legenda:** Comparação da expressão do IFN- $\gamma$  (pg/mL) induzida pelo antígeno padrão (A) IOCL 566 (10 ng/mL) e pelos antígenos isolados de salivas humanas (B) IOCL 3630 (10 ng/mL) (C) IOCL 3632 (10 ng/mL) após 48h e 72h da estimulação *in vitro* de PBMC (10  $\mu$ g/mL). Diferenças entre os tempos foram consideradas significantes no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

## 5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INDUZIDA PELOS ANTÍGENOS BRUTOS

Analizamos cada citocina, separadamente, comparando a expressão induzida pelos antígenos entre si e com o basal, composto por células não estimuladas, em 48h e 72h após a estimulação (Figura 20 e 21). Após 48h (Figura 20), a IL-17A (Figura 20A), IFN- $\gamma$  (Figura 20B), TNF (Figura 20C), IL-6 (Figura 20E) e IL-4 (Figura 20F) não apresentaram significância estatística entre os antígenos padrão e os isolados de salivas humanas, nem em relação ao basal.

A IL-10 (Figura 20D) apresentou significância estatística com  $p=0.0186$ , quando houve a comparação entre os antígenos 2 e 3, IOCL 3630 e IOCL 3632, respectivamente. A IL-2 (Figura 20F) também apresentou significância estatística com  $p=0.0325$ , quando o antígeno padrão IOCL 566 e o antígeno isolado de saliva humana, IOCL 3632, foram comparados.

**Figura 20** - Comparação da expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) entre o basal e os antígenos padrão IOCL 566 e os isolados de saliva IOCL 3630, IOCL 3632 (ng/mL) após 48h de estimulação *in vitro* de PBMC ( $\mu\text{g/mL}$ ).

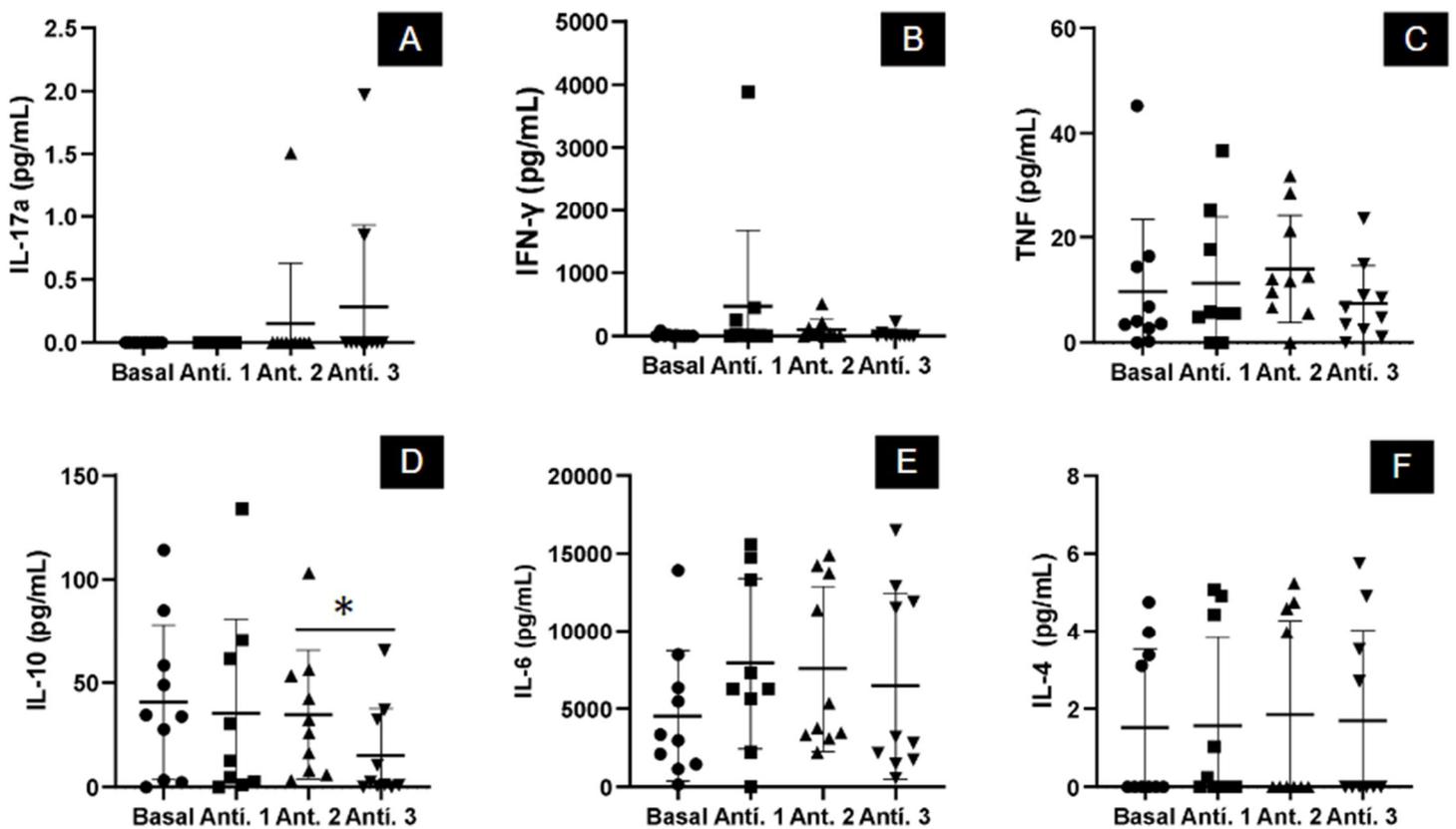


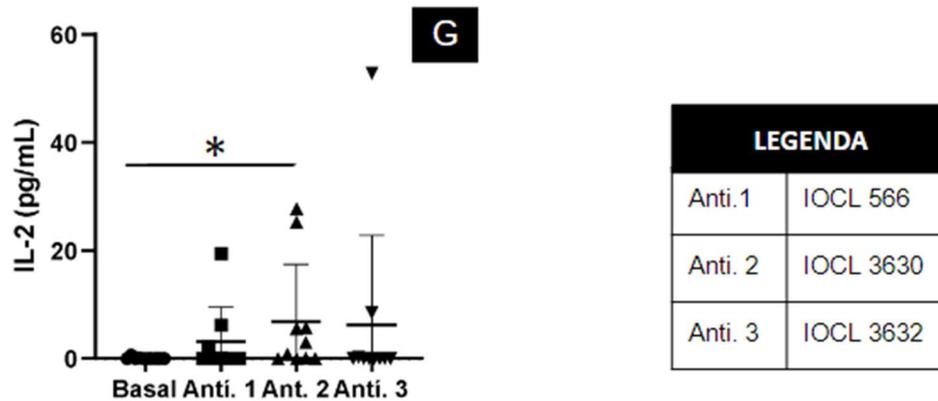
Fonte: A autora, 2023.

**Legenda:** Comparação da expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) entre o basal, composto de células não estimuladas, e os antígenos IOCL 566 (Ag.1) (10 ng/mL), padrão, IOCL 3630 (Ag.2) (10 ng/mL), IOCL 3632 (Ag.3) (10 ng/mL), isolados de salivas humanas, após 48h da estimulação *in vitro* de PBMC (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Diferenças entre os tempos foram consideradas significativas no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

Após 72h (Figura 21), as citocinas IL-17A (Figura 21A), IFN- $\gamma$  (Figura 21B), TNF (Figura 21C), IL-6 (Figura 21E) e IL-4 (Figura 21F) também não apresentaram significância estatística entre os antígenos, nem em relação ao basal. A IL-10 (Figura 21D) apresentou significância estatística com  $p=0.0325$ , quando houve a comparação entre os antígenos 2 e 3, IOCL 3630 e IOCL 3632, respectivamente. A IL-2 (Figura 21F) também apresentou significância estatística com  $p=0.0108$ , quando a comparação foi feita entre o basal e o antígeno 2, IOCL 3630.

**Figura 21** - Comparação da expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) entre o basal e os antígenos padrão IOCL 566 e os isolados de saliva IOCL 3630, IOCL 3632 (ng/mL) após 72h de estimulação *in vitro* de PBMC ( $\mu\text{g/mL}$ ).





**Fonte:** A autora, 2023.

**Legenda:** Comparação da expressão de citocinas Th1, Th2 e Th17 (pg/mL) entre o basal, composto de células não estimuladas, e os antígenos IOCL 566 (Ag.1) (10 ng/mL), padrão, IOCL 3630 (Ag.2) (10 ng/mL), IOCL 3632 (Ag.3) (10 ng/mL), isolados de salivas humanas, após 72h da estimulação *in vitro* de PBMC (10  $\mu$ g/mL). Diferenças entre os tempos foram consideradas significantes no valor de  $p < 0,05$  e estão representadas pelo (\*).

Algumas citocinas (Figura 20, 21) também foram produzidas pelo controle basal, composto apenas de células sem estimulação antigênica. Os indivíduos controles utilizados no nosso estudo não possuíam clínica e nem histórico epidemiológico compatível com leishmaniose, no entanto, eles não foram testados ou questionados quanto a outras doenças infecciosas. Portanto, essa produção pode ter sido causada por outros processos infecciosos e/ou inflamatórios.

## 6 DISCUSSÃO

A LT é uma doença que afeta, endemicamente, 99 países, e entre esses países está o Brasil, onde a *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie responsável pelos mais de 14 mil casos reportados só em 2021 (BRASIL, 2017; BURZA *et al.*, 2018; OMS, 2022). Afetando principalmente países negligenciados, onde nem sempre há infraestrutura laboratorial a serviço de toda a população, para um diagnóstico rápido e preciso da LT, tornou-se então necessário a busca por métodos mais simples, mais acessíveis e menos invasivos de coleta e diagnóstico. Entre esses possíveis métodos de coleta, a saliva, associada aos métodos de diagnóstico, como a PCR, vem sendo estudada (BOGGILD *et al.*, 2011; BRASIL, 2017; BRITO *et al.*, 2018).

CORVALAN *et al.*, 2012 demonstraram, através da PCR, a possibilidade de identificação do DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* em amostras de salivas humanas. Em 2018, de forma inédita, BRITO *et al.* isolaram sete cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* a partir da saliva de pacientes com LT sem lesões mucosas, apenas com lesões cutâneas localizadas.

Com a identificação e o isolamento parasitário, é possível que esse tipo de coleta, após o aprimoramento e associada aos métodos moleculares e/ou imunológicos, possa fazer parte do diagnóstico da LT. Além disso, esse isolamento também permite que novos conhecimentos sejam adquiridos para melhor entender a imunopatogenia da doença e buscar por novas estratégias de prevenção e monitoramento de cura.

A sobrevivência e a persistência da *Leishmania* em pacientes infectados com a leishmaniose dependem de estratégias de escape da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, que incluem a diferenciação de células T em uma resposta Th1 ou Th2 e, conseqüentemente, a produção de citocinas inflamatórias (NEVES *et al.*, 2003; BURZA *et al.*, 2018).

Dependendo da forma clínica e da espécie envolvida, esse perfil de citocinas imunológicas varia. Essa variação pode acontecer pela exacerbação de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, ou ainda, pela exacerbação de citocinas específicas, já que, diferente dos modelos animais, em humanos, a subdivisão dessas citocinas em resistência e susceptibilidade à infecção, ainda não é bem estabelecida

(NEVES *et al.*, 2003; CASTELLANO *et al.*, 2009).

Analisando o perfil de citocinas induzido pelos dois antígenos isolados de salivas humanas e o antígeno padrão, nos indivíduos saudáveis utilizados no estudo, foi possível perceber um padrão semelhante na expressão dessas moléculas, com a exacerbação expressiva da IL-6, inclusive nos dois tempos analisados.

Quando os antígenos foram comparados entre si e com o controle basal, quase todas as citocinas, com exceção da IL-2 e IL-10, demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Provavelmente, essa semelhança pode ser explicada pelo fato de as três cepas serem provenientes da mesma espécie, *L. (V.) braziliensis*. Esse achado permite concluir que as cepas isoladas de saliva apresentaram a mesma capacidade de estimulação que a cepa padrão, não isolada da saliva.

Apesar da produção significativa da IL-6, as demais citocinas apresentaram nenhuma ou uma baixa expressão. O grupo controle utilizado no nosso estudo é composto de indivíduos residentes de áreas não endêmicas e sem contato prévio com a *Leishmania*; portanto, a resposta imunológica induzida pode ter sido inespecífica, causando a expressão de níveis baixos dessas citocinas.

CASTELLANO *et al.*, 2009, analisaram a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, e IL-10 induzidas por um antígeno de *L. (V.) braziliensis* no sobrenadante das células de pacientes divididos em três grupos: i) grupo controle, com indivíduos saudáveis, nas mesmas condições do nosso estudo; ii) grupo de pacientes com lesões ativas e iii) grupo de pacientes pós tratamento. Essa análise permitiu demonstrar que as citocinas apresentaram uma expressão menos exacerbada no grupo de controles, quando comparado aos demais grupos, especialmente em relação ao grupo de pacientes com lesões ativas.

A IL-6 é uma citocina produzida por células T e células fagocíticas e é comumente associada à resposta pró-inflamatória, contudo, em murinos, é produzida pelas células Th2, responsáveis pela resposta anti-inflamatória. Além disso, atua estimulando a produção de neutrófilos e promovendo a diferenciação de células T (HATZIGEORGIOU *et al.*, 1993; MIRZAEI *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, verificamos uma produção considerável dessa citocina no

antígeno padrão e nos dois antígenos de isolados de saliva analisados. Ademais, foi possível também observar diferenças significativas entre os dois tempos pós estimulação, onde houve um aumento após 72h, com significância estatística.

GOMES *et al.*, 2014 analisaram a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  nas PBMC de indivíduos saudáveis, induzida pela infecção por amastigotas e promastigotas de diversas cepas de *L. (V.) braziliensis*. Foi possível demonstrar que quase todas as cepas tiveram produção significativa da IL-6, 24h e 48h após a estimulação.

O IFN- $\gamma$  é a principal citocina ativadora de macrófagos e, em altas concentrações é comumente associada com a cura espontânea na LT. Alguns estudos sugerem que o seu aumento, em conjunto com a diminuição da expressão de IL-10, pode estar associado com a indução inicial da inflamação e, conseqüentemente, resistência do hospedeiro à infecção (CASTELLANO *et al.*, 2009; BRELAZ *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A IL-10 é descrita como uma citocina que atua na regulação da resposta imunológica, inibindo a produção do IFN- $\gamma$  e a ativação dos macrófagos. A sua baixa expressão tem sido associada com a progressão da doença, quando produzida em altos níveis, e com produção de células T de memória, quando produzida em baixos níveis (CASTELLANO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, o IFN- $\gamma$  apresentou uma baixa produção nas três cepas analisadas, embora a análise estatística da comparação entre os dois tempos, sugere que essa citocina aumentou significativamente em um período de 24h, entre 48h e 72h, na cepa padrão (IOCL 566), e na cepa isolada de saliva (IOCL 3632). Em relação a IL-10, nosso estudo também demonstrou uma baixa expressão, sugerindo-se possível perfil pró-inflamatório.

POMPEU *et al.*, 2001, demonstraram que a baixa expressão de IFN- $\gamma$  tem sido associada também com a baixa expressão de IL-10, e que o aumento da IL-10 pode favorecer o aumento do IFN- $\gamma$ . Possivelmente, ocorre um contrabalanço entre as duas citocinas. OLIVEIRA *et al.*, 2014, também demonstraram que a alta expressão de IFN- $\gamma$  e TNF, associada com a baixa produção de IL-10, leva a produção de uma resposta inflamatória exacerbada, podendo causar o desenvolvimento de lesões cutâneas e mucosas.

Analisando a expressão das citocinas induzidas pela estimulação de antígenos obtidos das cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de salivas humanas, é possível perceber um perfil mais voltado para Th1, com a produção de IL-6 e IFN- $\gamma$ . Esse perfil geralmente está associado com a resposta imunológica pró-inflamatória. Além disso, não houve expressão significativa da IL-10, comumente associada à resposta Th2.

Esses achados corroboram com o fato de as cepas utilizadas na estimulação serem provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, uma forma clínica da LT caracterizada por uma resposta pró inflamatória, com consequentemente formação de ulcerações e lesões na pele (BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2018). Além disso, foi possível demonstrar que as cepas isoladas de salivas humanas induziram a produção de citocinas de forma bem semelhante a da cepa padrão, não isolada de saliva.

## 7 CONCLUSÃO

- As cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas da saliva de pacientes com LT permitiram a obtenção de antígenos brutos;
- Os antígenos obtidos permitiram a estimulação e análise das citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante da cultura de PBMC;
- Foi possível demonstrar exacerbação na produção da IL-6 e um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , com diferenças significativas entre os dois tempos de estudo, e uma baixa produção de IL-10, sugerindo um possível direcionamento para o perfil Th1;
- A análise das citocinas permitiu demonstrar que os dois antígenos de isolados de saliva possuem um padrão de produção de citocinas semelhante ao da cepa padrão, isolada do parasito. Assim, pode-se concluir que os três antígenos possuem a mesma capacidade de estimular uma resposta imune;
- Esse estudo pode assim corroborar no aprimoramento da saliva como método de coleta não invasivo, além de poder contribuir com o desenvolvimento de estratégias vacinais e de diagnóstico baseadas na capacidade antigênica dos antígenos estudados, questões importantes na prevenção e no controle da leishmaniose.

## REFERÊNCIAS

- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, Março 2018.
- BARATTA-MASINI *et al.* **Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance.** *Frontiers in Bioscience*, 12(1), 839–849, Janeiro 2007.
- BEZERRA, R. J. S. *et al.* Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr./jun., 2004
- BOGGILD, A. K. *et al.* Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, 50(1), e1-6, 2010.
- BOGGILD, A. K. *et al.* Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. **of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1097–1100, Março 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254, 1976.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 93, n.5, p.488-494. 1999.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** Londres, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Editores do Ministério da Saúde**, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos em Saúde. Miltefosina no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos em Saúde. **Editores do Ministério da Saúde**, 2018.
- BRELAZ, M. C. A., *et al.* Antigenic fractions of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease: Evaluation of patients' immune response to *Leishmania* V. *braziliensis*. **Parasite Immunology**, 34(4), 236–239, 2012.

BRITO, M. E. F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

BRITO, M. E. F. **Contribuição para o conhecimento de aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco: avaliação do uso associado de método de coleta não invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença.** 2013. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

BRITO, M. E. F. *et al.* Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, p. 170-250, Fevereiro 2018.

BURZA, S. *et al.* Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, Setembro, 2018.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Human immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, Junho 2009.

CASTRO, M.C. A. B. *et al.* Chemokine receptors on human regulatory T cells during cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, 2023;e12966, 2023.

CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida in vitro da miltefosine em formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) guyanensis, Leishmania (Viannia) braziliensis e estudo in vivo de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.** 2018. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2018.

CECÍLIO, P. *et al.* Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, 5, 480, Outubro 2014.

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC). Miltefosina no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar. **Relatório para a sociedade**, n.45, Dezembro 2016.

CORVALAN, F. H. *et al.* DNA identification of Leishmania (Viannia) braziliensis in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 98-102, 2011.

CROFT, S. L., & BUFFET, P. A. Leishmaniasis. **Em Goldman's Cecil Medicine**, Elsevier, p. 2025–2030, 2012.

CUMBERBATCH, M. & KIMBER, I. Dermal tumour necrosis factor- $\alpha$  induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. **Immunology**, 75:257-63, 1992.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 1-4, 2010.

DUARTE, M. C. et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49(4), 398–407, 2016.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014.

FARAJZADEH, S. et al. Evaluation of the efficacy of intralesional Glucantime plus niosomal zinc sulphate in comparison with intralesional Glucantime plus cryotherapy in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis, a randomized clinical trial. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, 42(4), 616–620, 2018.

FREITAS, J. C. C. et al. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação, **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.3, p.193-204, 2013.

GOMES, C. M. et al. Leishmania braziliensis amastigotes stimulate production of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$  by peripheral blood mononuclear cells from non endemic area healthy residents. **Parasite immunology**, 36(5):225-31, Maio 2014.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n.1, p. 66-70, 2012.

HATZIGEORGIOU, D. E. et al., IL-6 down-modulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human macrophages. **Journal of Immunology**, 151: 3682-3692, 1993.

LOMBARDO, G. et al. Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10–17, 2012.

MALVOLTI, S. et al. Human leishmaniasis vaccines: Use cases, target population and potential global demand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 15(9), e0009742, Setembro, 2021.

MARCHI, M. N. A. DE et al. Spatial analysis of leishmaniasis in Brazil: a systematized review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, p. e68, Dezembro 2019.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de dermatologie et de venerologie**, 146(3), 232–246, 2019.

MIRZAEI, A. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, 145(155297), 155297, 2021.

MORAIS, R. C. S. de *et al.* Duplex qPCR for *Leishmania* species identification using lesion imprint on filter paper. **Experimental Parasitology**, 219(108019), 108019, 2010.

MORGAN, E. *et al.* Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, 110(3), 252–266, 2004.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> edição. São Paulo. Atheneu, 2003.

OLIVEIRA, A. P. *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, 387(1–2), 245–253, 2013.

OKWOR, I., & UZONNA, J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. **Human Vaccines**, 5(5), 291–301, Maio 2009.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis: 2021, 2022.** Acesso em: <[https://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html)> Acessado em: 12 de Janeiro de 2023.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). **Informe epidemiológico das Américas**. 2022. Acesso em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>> Acessado em: 28 de Abril de 2023.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). **Leishmaniose cutânea e mucosa**. 2023. Acesso em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-cutanea-e-mucosa>> Acessado em: 28 de Abril de 2023.

PEREIRA, V. R. A. *et al.* Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 74(3), 292–298, 2012.

POMPEU M.M. *et al.* Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infection and Immunity**, 69: 7453–7460, 2001.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, 8(8), 458–459, Setembro 2007.

RIVAS, A. K. *et al.* Clinical and diagnostic aspects of feline cutaneous leishmaniosis in Venezuela. **Parasites & Vectors**, 11(1), 2018.

RODRIGUES, J. C. F. *et al.* Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Sub-Cellular Biochemistry**, 74, 1–42, 2014.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Tropica**, 93(1), 49–56, 2005.

SAHA P. *et al.* Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **Int. Immunopharmacol**, 11:1668-79, 2011.

SERENO, D. *et al.* Noninvasive biological samples to detect and diagnose infections due to Trypanosomatidae parasites: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(5), 1684, Fevereiro 2020.

SILVA, C. J. *et al.* Leishmania V. braziliensis infection in asymptomatic domestic animals within an endemic region in the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 55, e0600-2021, 2022.

SILVA, C. J. *et al.* Study on the zoonotic cycle of tegumentary leishmaniasis in an endemic area of a metropolitan region in the Northeastern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 64:e60, 2022.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SINAN/SVS/MS). **Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas: 1990 a 2021**, 2022. Acesso em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>> Acessado em: 28 de Abril de 2023.

SU D. L. *et al.* Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012:1-15, 2012.

VELÉZ, I. D. *et al.* An Epidemic Outbreak of Canine Cutaneous Leishmaniasis in Colombia Caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 86(5), p. 807–811, 2012.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

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

**Pesquisador:** Valéria Pereira Hernandes

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 11083812.7.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.839.158

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda elaborada para prorrogação e alteração da equipe de pesquisa.

##### Objetivo da Pesquisa:

Prorrogar de cronograma e alterar equipe.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

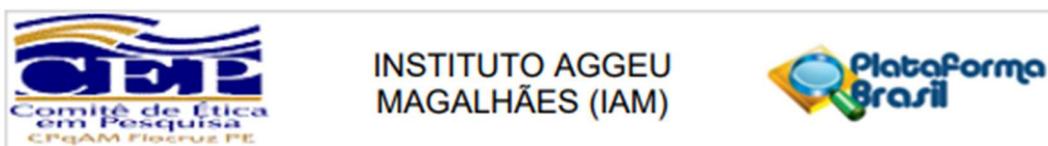
###### Riscos:

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 participante do projeto no hospital onde ela trabalha.

###### Benefícios:

Avaliar se o participante apresenta algum sinal de infecção ou se é imune 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.

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.839.158

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma emenda do projeto, cuja hipótese é a indisponibilidade de tratamentos profiláticos eficazes e a toxicidade da maioria dos medicamentos disponíveis para tratar infecções parasitárias, têm estimulado a busca de marcadores de suscetibilidade genética em diferentes populações, nos quais a administração de intervenções profiláticas ou terapêuticas poderia prevenir o estabelecimento da doença. Dessa maneira, além de fatores imunológicos, a constituição genética de indivíduos acometidos pela leishmaniose também exerce influência no desfecho da doença.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos estão apresentados sem pendências.

**Recomendações:**

Entrega de relatórios parciais e final via notificação, assim como informar qualquer alteração no protocolo no decorrer da pesquisa, como também mudança de equipe, via emenda. Todas as ações deve ser realizadas via Plataforma Brasil.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Respostas de pendências:

1. PAGINAÇÃO ERRADA E O PRONOME DE TRATAMENTO NÃO FOI ALTERADO. Apenas espaço para rubrica foi acrescentado. ATENDIDA.
2. O RESPONSÁVEL DEVE AUTORIZAR EM TCLE A PARTE. ATENDIDA.

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 3.839.158

execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1383048_E1.pdf	03/12/2019 12:48:03		Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	03/12/2019 12:44:32	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclepaisresponsaveis.pdf	03/12/2019 12:42:09	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclepacientesmaior.pdf	03/12/2019 12:41:54	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclecontrole.pdf	03/12/2019 12:41:31	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	talepacientesmenor.pdf	03/12/2019 12:38:16	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	relatorio_parcial.pdf	03/12/2019 12:36:24	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_VALERIA_PEREIRA_06_08_2019.pdf	06/08/2019 20:00:31	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_marton.pdf	19/06/2019 17:10:41	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	Resposta-pendencia-final-ValeriaPereira.doc	27/03/2013 10:09:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto-CPqAM-PereiraVRA-15-02-13.pdf	18/02/2013 14:25:41		Aceito
Outros	resposta-pendencia-projeto-leishmaniose-geral-15-02-13.pdf	18/02/2013 14:25:25		Aceito
Outros	cv_novembro-VRAP.doc	20/11/2012 13:09:14		Aceito
Outros	Participantes-CEP-2012.pdf	20/11/2012 13:04:06		Aceito
Outros	Carta-encaminhamento-CEP-2012.pdf	20/11/2012 13:02:18		Aceito

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

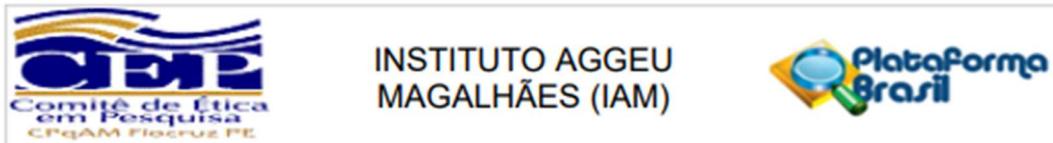
**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.839.158

Outros	Declaraca-compromisso-relatorios-CEP-2012.pdf	20/11/2012 13:02:02		Aceito
Outros	Angela_Medeiros_UPE_anuencia_2012_com-CPF.pdf	20/11/2012 12:35:01		Aceito
Outros	Anuencia-leishmania-Vitoria-CEP-2012.doc.pdf	20/11/2012 12:34:33		Aceito
Outros	Projeto-CPqAM-PereiraVRA-20-11-12.doc	20/11/2012 12:22:00		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto-Valeria.pdf	20/11/2012 12:16:19		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 14 de Fevereiro de 2020

Assinado por:

**Maria Almerice Lopes da Silva**  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

## ANEXO B

### Termo de consentimento livre e esclarecido - Grupo de Controles



#### 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)



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

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