UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LARISSA LAYNE SOARES BEZERRA SILVA

AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO CELULAR EM LINFÓCITOS T NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

RECIFE
2025

LARISSA LAYNE SOARES BEZERRA SILVA

AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO CELULAR EM LINFÓCITOS T NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (UFPE-PPGIT)

Orientador: Prof. Dr. Rafael de Freitas e Silva (UPE)

RECIFE

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Larissa Layne Soares Bezerra.
Avaliação de marcadores de exaustão celular em linfócitos T na leishmaniose cutânea / Larissa Layne Soares Bezerra Silva. - Recife, 2025.
155f.: il.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.
Orientação: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.
Coorientação: Rafael de Freitas e Silva.

1. Receptores co-inibitórios; 2. Linfócitos T; 3. Citometria de fluxo; 4. Resposta imune; 5. Leishmaniose cutânea. I. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de. II. Silva, Rafael de Freitas e. III. Título.

UFPE-Biblioteca do Centro de Biociências

LARISSA LAYNE SOARES BEZERRA SILVA

AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO CELULAR EM LINFÓCITOS T NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 17/03/2025

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes

Instituto Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior

Instituto Aggeu Magalhães

Profa. Dra. Jana Messias Sandes

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia dÉmery Alves Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha família, a Luna e a todos os pacientes que contribuíram para que fosse possível a realização desse estudo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui. Por me dar força, discernimento e sabedoria para trilhar esse caminho e superar os desafios que encontrei ao longo dele. Sem Ti, eu nada seria.

Aos meus pais, Evaldo e Josilene, e aos meus irmãos, Leon e Lizandra, que sempre foram meus maiores incentivadores e nunca duvidaram da minha capacidade e potencial. Vocês são minha inspiração diária para seguir em frente e vencer na vida. Essa conquista é para vocês!

À minha companheira de quatro patas, Luna, que deitou ao meu lado por incontáveis horas enquanto eu escrevia esta tese. Não sei o que seria de mim sem sua companhia nessa jornada.

Ao meu marido, Rodrigo, meu grande incentivador, que nunca me deixou desistir e sempre apoiou minhas decisões. Que enfrentou a dor da distância no início do nosso casamento para que eu pudesse concluir meus experimentos e finalizar essa etapa tão importante da minha vida. Eu te amo e sou imensamente grata a você.

À minha orientadora, Dra. Maria Carolina, por ter me acolhido, ensinado tanto e sido um verdadeiro anjo na minha trajetória. A senhora é uma pesquisadora excepcional e um ser humano ainda mais incrível! Obrigada por acreditar em mim e me dar essa oportunidade. Sem a senhora, esse sonho não teria sido possível.

Ao meu orientador, Dr. Rafael Freitas, por todos os ensinamentos e pelos puxões de orelha que me fizeram crescer ainda mais como pesquisadora.

À Dra. Valeria Pereira, que sempre foi gentil e acolhedora, contribuindo para o meu crescimento no laboratório.

À equipe do Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães - Pernambuco, especialmente à Dra. Edileuza Brito, que auxiliou na captação dos

pacientes e coletas, além de sempre torcer por minhas conquistas, dentro e fora da pesquisa.

Aos meus queridos amigos, Allana Maria e Marton Kaique, que estiveram comigo nos bons momentos e nos nem tão bons assim. As noites no laboratório fazendo experimentos com vocês foram essenciais para eu chegar até aqui. Obrigada por torcerem por mim sempre! Marton, serei eternamente grata por tudo que você fez por mim. Amo vocês!

Ao meu grupo de pesquisa, que me inspirou e me proporcionou momentos de aprendizado, crescimento e alegria.

A todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa e contribuir para a ciência.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro durante o doutorado, essencial para que eu pudesse trilhar esse caminho.

A todos que, de alguma forma, cruzaram meu caminho durante essa jornada, torceram por mim e me ajudaram, meu muito obrigada!

“Seja paciente com tudo o que permanece sem solução em seu coração. Tente amar as perguntas em si mesmas, como quartos trancados ou livros escritos em uma língua desconhecida. O ponto é viver tudo. Viva as perguntas agora. Talvez então, algum dia distante, sem perceber, você viverá sua resposta.”

-Rainer Maria Rilke, *Cartas a um jovem poeta* (1929)

LARISSA LAYNE SOARES BEZERRA SILVA

AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO CELULAR EM LINFÓCITOS T NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença negligenciada que afeta milhares de pessoas globalmente, com repercussões significativas no campo econômico e psicossocial. Uma imunidade protetora contra a *Leishmania* envolve ativação e expansão de clones de linfócitos T $CD4^+$ que reconhecem epítopos do parasita e produzem citocinas do perfil Th1. Em contrapartida, a ativação do sistema imunológico também induz a expressão de moléculas co-inibitórias em linfócitos e células apresentadoras de antígeno que podem caracterizar o fenótipo de exaustão, no qual as células T apresentam um estado disfuncional e redução da capacidade proliferativa e efetora. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar marcadores de exaustão celular em linfócitos T na leishmaniose cutânea. Foram incluídos 49 pacientes, divididos em grupos antes e após o tratamento, além de 33 indivíduos controles. A caracterização foi realizada por imunofenotipagem, dosagem de citocinas e análise transcriptômica. Pacientes com LC ativa apresentaram elevada expressão de receptores de exaustão em células T CD4conv, como PD-1 e TIGIT, sugerindo comprometimento da resposta efetora. Em contraste, no grupo pós-tratamento, células T CD8+ mostraram aumento de 2B4 e CD160, indicativo de recuperação imunológica e restabelecimento da homeostase. As células T reguladoras exibiram um perfil desbalanceado, com aumento de TIGIT e redução de TIM-3 antes do tratamento, enquanto as células T duplo-negativas apresentaram alterações em CD160 e CD28, sugerindo papel na regulação da resposta após o tratamento. Nos ensaios de citocinas, observou-se uma resposta inflamatória acentuada em pacientes com doença ativa, marcada por elevação de TNF, IL-6, IL-10 e IL-1β, ao passo que, após o tratamento, o perfil sugeriu modulação inflamatória e tentativa de restauração da homeostase. A análise de RNAseq confirmou a superexpressão de genes relacionados à exaustão, incluindo PDCD1, TIGIT e TOX, reforçando os achados fenotípicos. A integração dos dados clínicos,

imunofenotípicos e transcriptômicos evidência que a LC ativa induz um estado imunológico exausto, favorecendo a persistência do parasita. Esses resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na cronicidade da LC e podem apoiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas à reversão da exaustão de células T, com potencial impacto na redução do dano tecidual no controle da doença.
Palavras-chave: Receptores co-inibitórios; Linfócitos T; Citometria de fluxo; Resposta imune; Leishmaniose cutânea.

LARISSA LAYNE SOARES BEZERRA SILVA

EVALUATION OF T-CELL EXHAUSTION MARKERS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected disease that affects thousands of people worldwide, with significant economic and psychosocial repercussions. Protective immunity against *Leishmania* involves the activation and expansion of $CD4^+$ T-cell clones that recognize parasite epitopes and produce Th1-type cytokines. Conversely, immune system activation also induces the expression of co-inhibitory molecules on lymphocytes and antigen-presenting cells, which can define an exhaustion phenotype characterized by dysfunctional T cells with reduced proliferative and effector capacity. In this context, the aim of this study was to evaluate markers of T-cell exhaustion in cutaneous leishmaniasis. A total of 49 patients were enrolled, divided into groups before and after treatment, along with 33 healthy controls. Characterization was performed through immunophenotyping, cytokine quantification, and transcriptomic analysis. Patients with active CL displayed high expression of exhaustion receptors on CD4conv T cells, such as PD-1 and TIGIT, suggesting impaired effector responses. In contrast, in the post-treatment group, $CD8^+$ T cells exhibited increased expression of 2B4 and CD160, indicative of immune recovery and reestablishment of homeostasis. Regulatory T cells showed an unbalanced profile, with increased TIGIT and decreased TIM-3 before treatment, while double-negative T cells displayed alterations in CD160 and CD28, suggesting a role in regulating the response after treatment. Cytokine assays revealed a pronounced inflammatory response in patients with active disease, marked by elevated TNF, IL-6, IL-10, and IL-1β, whereas post-treatment profiles suggested inflammatory modulation and an attempt to restore homeostasis. RNAseq analysis confirmed the overexpression of exhaustion-related genes, including PDCD1, TIGIT, and TOX, reinforcing the phenotypic findings. The integration of clinical, immunophenotypic, and

transcriptomic data provides evidence that active CL induces an exhausted immune state that favors parasite persistence. These results contribute to the understanding of the immunological mechanisms underlying CL chronicity and may support the development of novel therapeutic strategies aimed at reversing T-cell exhaustion, with potential impact on reducing tissue damage and improving disease control.

Keywords: Co-inhibitory receptors; T lymphocytes; Flow cytometry; Immune response; Cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Incidência da leishmaniose cutânea no mundo em 2021 24
Figura 2 – Número de casos de leishmaniose cutânea reportados em 2021 nas Américas 25
Figura 3 – Casos de leishmaniose cutânea por Estado em 2021 26
Figura 4 – Formas evolutivas da *Leishmania* spp. 27
Figura 5 – Ciclo de vida da *Leishmania* spp. 28
Figura 6 – Formas clínicas da leishmaniose cutânea 30
Figura 7 – Resposta imune inata na leishmaniose cutânea 36
Figura 8 – Impacto da *Leishmania* nas linhagens de macrófagos 37
Figura 9 – Diferenciação das células T ao reconhecerem o antígeno de *Leishmania* 42
Figura 10 - Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária de interesse 57
Figura 11– Estratégia de análise das células T CD4conv 58
Figura 12 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células T CD4conv.58
Figura 13 – Estratégia de análise das células Treg 59
Figura 14 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células Treg 60
Figura 15 – Estratégia de análise das células T CD8+ 60
Figura 16 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células T CD8+ 61
Figura 17 – Estratégia de análise das células T DN 62
Figura 18 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células T DN 63
Figura 19 - Expressão percentual dos receptores PD-1, PD1+TIM3+, PD1+TIM3-, PD1+TIM3+TIGIT+, PD1+TIM3+TIGIT-, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, GRANZ+2B4+, GRANZ+2B4+PD1+, CD28, CD160 em células T CD4 convencionais 72

Figura 20 - Expressão percentual dos receptores PD-1, PD1+TIM3+, PD1+TIM3-, PD1+TIM3+TIGIT+, PD1+TIM3+TIGIT-, TIGIT, TIM-3 e TOX em células T reguladoras 77

Figura 21 - Expressão percentual dos receptores PD-1, PD1+TIM3+, PD1+TIM3-, PD1+TIM3+TIGIT+, PD1+TIM3+TIGIT-, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, 2B4+CD160+, Granzima B, GRANZ+2B4+, GRANZ+2B4+PD1+, CD28, CD160 em células T CD8+.....81

Figura 22 - Expressão dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, GRANZ+2B4+, GRANZ+2B4+PD1+, CD28, CD160 em células T Duplo-Negativas 88

Figura 23 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 em células T CD4+ 92

Figura 24 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3 e TOX em células T reguladoras 95

Figura 25 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 em células T CD8+ 97

Figura 26 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 em células T Duplo-Negativas 100

Figura 27 - Redução dimensional por t-SNE das distribuições das subpopulações de células T e os receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, CD28, Granzima B, CD160 e 2B.....103

Figura 28 - Expressão gênica de receptores de células T em lesões de leishmaniose cutânea 106

Figura 29 – Concentração das citocinas IL-12, TNF, IL-10, IL-6, IL-1B e IL-8 em sobrenadantes após cultura de PBMC com antígeno total de *L. braziliensis* de pacientes AT, PT e indivíduos CT (A-F). 109

Figura 30 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD3 (APC-CY7) 144

Figura 31 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD4 (BV510) 144

Figura 32 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD8 (PerCP) 145

Figura 33 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo TIGIT (FITC) 145

Figura 34 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo TOX (PE) 146

Figura 35 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo TIM-3 (PE/DAZZLE) 146

Figura 36 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo FOXP3 (APC) 147

Figura 37 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo PD-1 (BV421) 147

Figura 38 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD28 – (PE-CY7) 148

Figura 39 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD160 – (APC) 148

Figura 40 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo GRAZIMA B – (FITC) 149

Figura 41 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo 2B4 – (PE/DAZZLE) 149

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Receptores e citocinas que podem estar envolvidos na exaustão de células T. 46
Quadro 2 – Limiar de detecção das citocinas 54
Quadro 3- Painel A de anticorpos utilizados no estudo 55
Quadro 4- Painel B de anticorpos utilizados no estudo 56
Quadro 5 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes antes do tratamento incluídos no ensaio de citometria de fluxo (imunofenotipagem). 66
Quadro 6 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes pós-tratamento incluídos no ensaio de citometria de fluxo. 67
Quadro 7 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes antes do tratamento incluídos no ensaio de CBA. 68
Quadro 8 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes pós-tratamento incluídos no ensaio de CBA. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Fluorocromo aloficocianina
AT	Antes do tratamento
BV421	*Brilliant violet* (violeta brilhante) 421nm
BV510	*Brilliant violet* (violeta brilhante) 510nm
CD4conv	CD4 convencionais
CT	Controle
DC	Célula dendrítica
DN	Duplo-Negativas
FMO	*Fluorescence Minus One* (Fluorescência Menos Um)
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IDRM	Introdermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
L.	*Leishmania*
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
MFI	*Mean Fluorescence Intensity* (Intensidade média de fluorescência)
MHC	*Major Histocompatibility Complex* (Complexos principal de histocompatibilidade)
NETs	*Neutrophil extracellular traps* (Armadilhas extracelulares de neutrófilos)
NK	*Natural Killer* (Células Natural Killer)
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	*Pathogen-associated molecular patterns*
PD-1	Proteína de morte celular -1
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Fluorocromo ficoeritina
PE Cy-7	Fluorocromo ficoeritina conjugado com cianina
PERCP	Fluorocromo Peridinin Chlorophyll Protein Complex conjugado
PRRs	*Pattern recognition receptors*
PT	Pós-tratamento
ROS	*Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigênio)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro bovino fetal
SRL	Serviço de Referência em Leishmanioses
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th	T helper (Linfócito T auxiliar)
TIGIT	T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM)
TIM-3	Imunoglobulina de células T e domínio de mucina contendo-3
TNF	Fator de necrose tumoral
TOX	Thymocyte selection-associated high mobility group box protein (Proteína de caixa de grupo de alta mobilidade associada à seleção de timócitos).
t-SNE	*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*
V.	*Viannia*
WHO	*World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO DA LITERATURA 21

2. 1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA 27

2. 2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA: FORMAS EVOLUTIVAS, TRANSMISSÃO, CICLO DE VIDA, FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO 34

2. 3 RESPOSTA IMUNE CONTRA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA 34

2. 3. 1 RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA 34

2. 3. 2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA 38

2. 4 EXAUSTÃO CELULAR NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA 42

3 OBJETIVOS 48

3.1 OBJETIVO GERAL 44

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 48

4 JUSTIFICATIVA 49

5 MATERIAIS E MÉTODO 51

5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 51

5.2 CULTURA DE *L. (V.) braziliensis* E OBTENÇÃO DO ANTÍGENO 52

5.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS PACIENTES SELECIONADOS 52

5.4 CULTURA DAS PBMC COM ANTÍGENO TOTAL DE *L. braziliensis* 53

5.5 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS 53

5.6 CITOMETRIA DE FLUXO 54

5.7 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE 56

5.8 ANÁLISE DE DADOS PÚBLICOS DE RNA-seq PARA OS MARCADORES DE INTERESSE 63

5.8.1 Seleção de dados e pré-processamento 63

5.8.2 Visualização de genes de interesse 64

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 64

6 RESULTADOS 65

6.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E SOCIODEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA 65

6.2 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS T CD4conv E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 70

6.3 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS T REGULORAS (Treg) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 76

6.4 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS T CD8+ E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 80

6.5 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS DUPLO-NEGATIVAS (CD8-CD4-) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 86

6.6 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T CD4conv E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 91

6.7 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS (Treg) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 94

6.8 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T CD8+ E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 96

6.9 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T DUPLO-NEGATIVAS (CD8-CD4-) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC 99

6.10 ANÁLISE DE t-SNE DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T CD4conv, CD8+ e Treg 102

6.11 EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE EXAUSTÃO E SUPRESSÃO DE CÉLULAS T EM DADOS PÚBLICOS DE RNAseq 104

6.12 AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS APÓS ESTIMULAÇÃO E CULTURA COM ANTÍGENO DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* 106

7 **DISCUSSÃO** 112

8 CONCLUSÕES 125

REFERÊNCIAS 127

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MAIOR DE 18 ANOS 136

APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS 138

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PAIS OU RESPONSÁVEIS 140

APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE 142

APÊNDICE E – ***FLUORESCENCE MINUS ONE*** **DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO** 144

APÊNDICE F – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: CHEMOKINE RECEPTORS ON HUMAN REGULATORY T CELLS DURING CUTANEOUS LEISHMANIASIS 150

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA 151

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um importante grupo de doenças negligenciadas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados. Em número de casos, a leishmaniose cutânea (LC) é a mais importante e estimativas apontam para 600 mil a 1 milhão de novos casos por ano, sendo 95% deles nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia central (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023). O Brasil é um dos países que mais registra ocorrências de LC, totalizando um total de 17.438 novos casos notificados entre o ano de 2023 e 2024 (BRASIL, Ministério da Saúde, s.d.; 2025).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie responsável pela LC no Brasil, podendo causar desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas até graves lesões mucocutâneas mutilantes e incapacitantes (COUTINHO et al., 2022). A complexidade da resposta imunológica do hospedeiro contra a *Leishmania* tem sido um importante fator limitante ao desenvolvimento de novas medidas de controle da LC. Dentre essas medidas figuram o desenvolvimento de novas drogas ou combinações com efeito imunomodulador e mais eficazes na eliminação dos parasitas, assim como uma vacina que seja segura e eficaz para ser aplicada em seres humanos. Grande parte dessa complexidade também se deve ao escasso conhecimento dos mecanismos imunológicos que atuam na pele (NNAMDI et al., 2020).

A resposta imunológica ao parasita inicia-se logo após a inoculação das promastigotas flageladas pelo vetor. Os parasitas são rapidamente fagocitados por neutrófilos e monócitos infiltrantes, mas são nos fagolisossomos dos macrófagos residentes que a *Leishmania* se transforma em amastigota e se multiplica. Nesse processo, as células dendríticas (DCs) produzem IL-12 que é essencial para diferenciação de linfócitos Th1 produtores de IFN-γ (SERRANO-COLL et al., 2021). Esta etapa é crucial para ativação de macrófagos infectados e indução de óxido nítrico e ânion superóxido que são capazes de eliminar os parasitas. Outras fontes celulares também contribuem para produção de IFN-γ, como linfócitos T CD8+ e células natural killer (NK) (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Além disso, estudo recente também demonstrou que as células T duplo-negativas (DN), que não expressam nem CD4 nem CD8, desempenham papeis importantes tanto na modulação efetora quanto regulatória da resposta imune em infecções parasitárias. Essas células exercem funções capazes de reduzir a inflamação, mas ao mesmo tempo favorecer a sobrevivência do parasita, participando da manutenção do equilíbrio imunológico (VELIKKAKAM; GOLLOB; DUTRA, 2022) .

Grande parte dos trabalhos se dedicam a entender como se dá a ativação do sistema imune durante a resposta ao parasita e os mecanismos efetores utilizados para conter a infecção. Contudo, poucos trabalhos procuraram compreender os mecanismos de sinalização negativa que agem para conter a resposta imune (GANNAVARAM et al., 2016). Neste contexto, diferentes moléculas co-inibitórias foram identificadas na superfície de linfócitos T e B ativados (MURPHY; MURPHY, 2010). O principal papel dessas moléculas é enviar sinais inibitórios durante a resposta imune inata ou adaptativa. Algumas importantes moléculas inibitórias foram identificadas, como a proteína de morte celular -1 (PD1, CD279, *Programmed cell death protein* 1) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 que são membros da família B7 (CHARLES et al., 2010). O papel dessas moléculas e interações tem sido investigado em modelos de infecção viral crônica e foi observado que o bloqueio da via PD-1-PD-L1 reverte o fenótipo de exaustão dos linfócitos (DUHALDE VEGA et al., 2022).

Além disso, a interação PD-1-PD-L1 tem um papel importante na manutenção da homeostase imune induzindo tolerância periférica e protegendo os tecidos de ataque pelo sistema imunológico (MURPHY; MURPHY, 2010). Nas infecções por protozoários, o papel das moléculas co-inibitórias expressas por linfócitos ainda não está claro. Um modelo experimental de infecção com *L. major,* sugeriu que há uma maior frequência de macrófagos residentes e monócitos infiltrantes expressando PD-L1 na lesão infectada e no linfonodo que drena a lesão. Em paralelo, observou-se uma maior expressão de PD-1 em linfócitos T $CD4^+$ que infiltram a lesão dos animais (FREITAS E SILVA et al., 2020). Apesar dos modelos murinos serem ideais para investigação dos mecanismos imunológicos, faz-se cada vez mais necessário a investigação dos mecanismos em seres humanos.

Além do PD-1, demais marcadores inibitórios estão sendo estudados e podem estar relacionados à exaustão de células T e progressão ou cura da LC. A mucina e imunoglobulina de linfócitos T – 3 (TIM-3) está envolvido na inibição da resposta Th1 e expressão de citocinas como IFNγ e TNF (DAS; ZHU; KUCHROO, 2017). O 2B4 (CD244) é um receptor co-inibitório expresso por células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ que podem mediar a resposta imune (CHEN et al., 2017). Já o TOX é um fator de transcrição de linfócitos que recentemente tem demonstrado estar associado à exaustão de células T $CD8^+$ em doenças crônicas (SEKINE et al., 2020). A imunoglobulina de linfócitos T e domínio ITIM (TIGIT) são responsáveis por interagir com o CD155 que é expresso por células apresentadoras de antígenos e vão agir reduzindo a regulação das funções das células T e células natural killer (HARJUNPÄÄ; GUILLEREY, 2020).

No nosso estudo demonstramos, através da análise de dados de citometria de fluxo, análise de citocinas inflamatórias e da análise de RNAseq, que a infecção por leishmaniose cutânea induz um estado de exaustão nos linfócitos T, evidenciado pelo aumento de receptores de exaustão e inibitórios, favorecendo a persistência do parasita e cronicidade da doença. Deste modo, espera-se que os achados deste estudo não apenas aprofundem a compreensão dos mecanismos de exaustão celular na LC, como também possa abrir perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que auxiliam na eliminação do parasita e possam reduzir os impactos clínicos e socioeconômicos da doença.

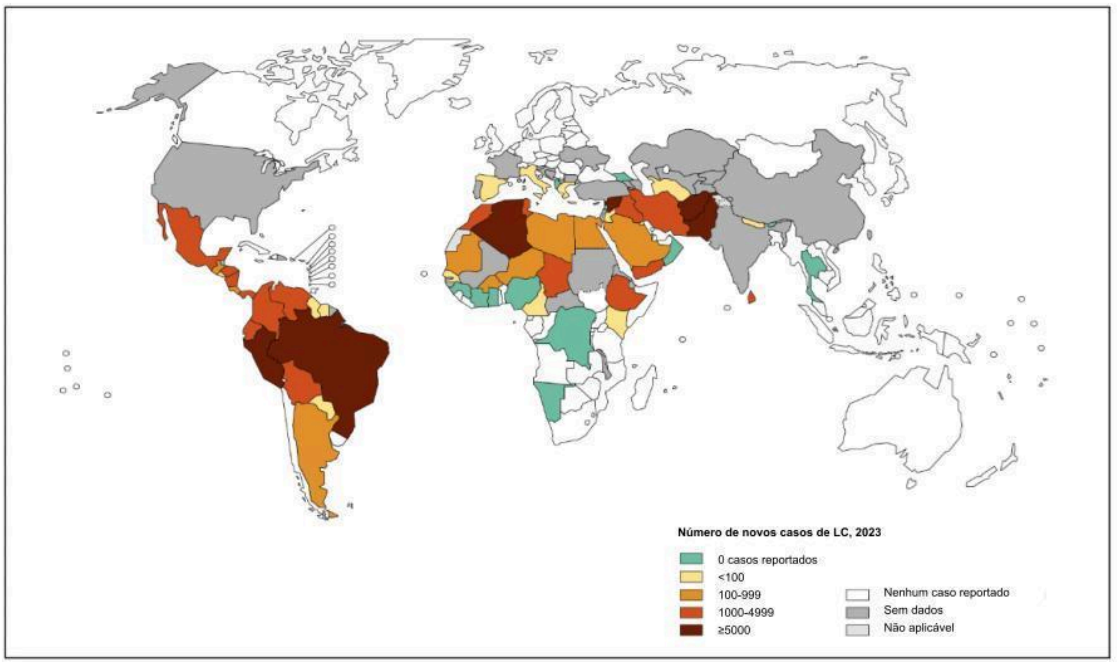
2 REVISÃO DA LITERATURA

2. 1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

As leishmanioses são um grupo de doenças transmitidas pela picada do flebotomíneo fêmea infectado com o protozoário do gênero *Leishmania*. É considerada uma doença tropical negligenciada e está associada principalmente às más condições de vida, atingindo as populações mais pobres. Existem dois principais tipos de leishmanioses: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose cutânea (LC). Em 2021, dos 99 países e territórios que são endêmicos para as leishmanioses, 71 são endêmicos para as formas visceral e cutânea e 19 são endêmicos apenas para a forma cutânea. Apenas em 2021 foram reportados por 9 países, entre eles o Brasil, mais de 5000 novos casos de leishmaniose cutânea, que juntos contabilizam 88% da incidência global total da LC (Figura 1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023).

É estimado que cerca de 600 000 a 1 milhão de novos casos de LC acontecem todos os anos ao redor do mundo, entretanto, apenas 200 000 são notificados para a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023).

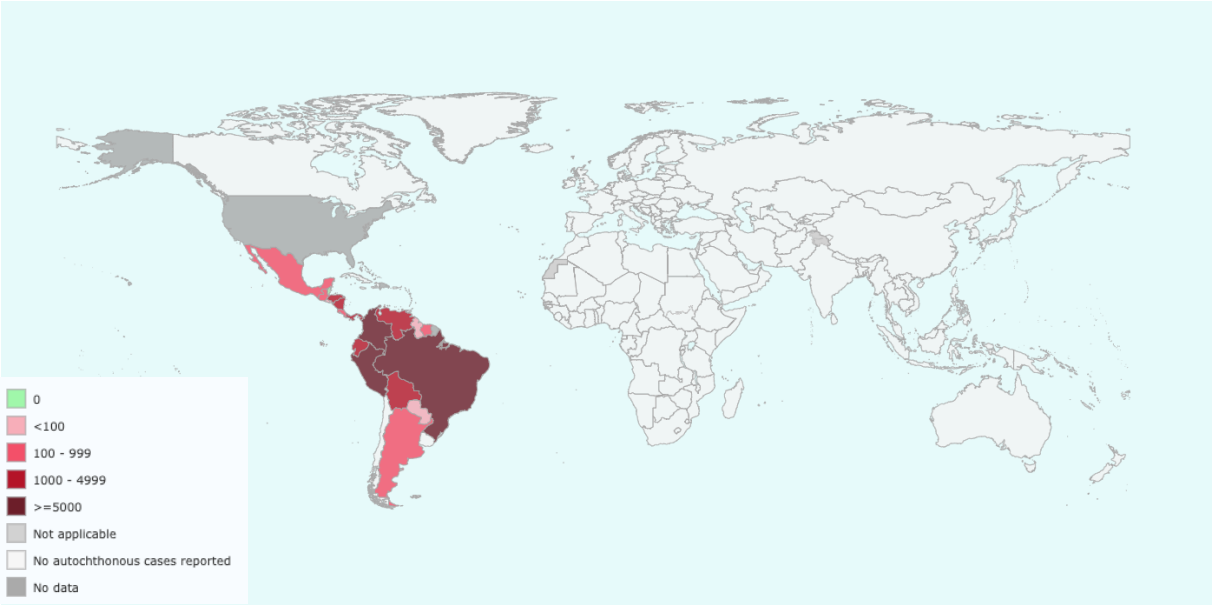
Figura 1 – Incidência da leishmaniose cutânea no mundo em 2023



Fonte: adaptado de WHO, 2025.

Dos países que registram a incidência de mais de 85% de casos de LC, 3 estão localizados nas Américas, sendo eles: Brasil, Colômbia e Peru. No panorama das Américas, entre os anos de 2001 e 2021 foram registrados um total de 1.105.545 casos de LC pela Organização Pan-Americana de Saúde (Figura 2) (OPAS, 2023). Apesar de se observar uma queda no número de casos de LC notificados dos últimos 10 anos, o Brasil foi o país que mais registrou casos da doença nas Américas no ano de 2021, contabilizando 14.800 casos de leishmaniose cutânea (WHO, 2023).

Figura 2 – Número de casos de leishmaniose cutânea reportados em 2023 nas Américas



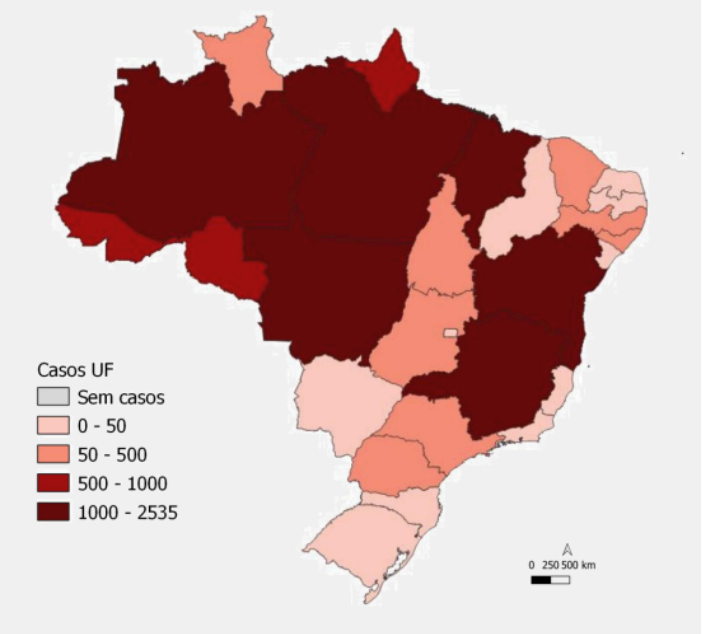
Fonte: WHO, 2025.

No Brasil, a LC é um grave problema de saúde pública, uma vez que é disseminada em todas as regiões do país. Nos últimos 5 anos foram registrados, em média, cerca de 21.000 casos por ano de leishmaniose tegumentar (LT), que envolve a leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, e as regiões que apresentam uma maior incidência são a região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 3) (BRASIL, 2023). Existem sete espécies de *leishmania* que causam a LT no Brasil, no entanto, as mais importantes são *Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*,

sendo essa última de maior importância por estar amplamente distribuída em todo o país (BRASIL, 2023).

Na região Nordeste foram registrados 3.260 casos de LT no ano de 2021 e as espécies de *Leishmania* encontradas nesta região são a *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*. Dentre os Estados do Nordeste, os que mais registraram casos de LT no ano de 2021 foram Bahia, Maranhão, Ceará e Pernambuco. Pernambuco, nesse contexto, registrou 208 casos (BRASIL, 2023).

Figura 3 – Casos de leishmaniose cutânea por Estado em 2021



Fonte: MS, 2025.

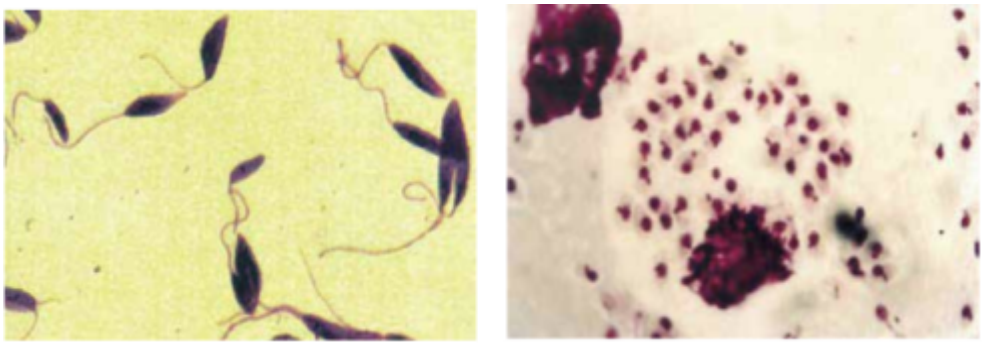
Vale ressaltar que os fatores de risco para adquirir e desenvolver a infecção por *Leishmania* está intimamente relacionado com fatores domiciliares, peridomiciliares e situação socioeconômica da população, como por exemplo local de residência do indivíduo, condições sanitárias do local de habitação, profissão exercida, escolaridade, sexo e até mesmo renda familiar. Quanto mais frágil a situação socioeconômica da população, mais frequente os casos de leishmanioses (MATTOS; TUMELERO, 2023).

2. 2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA: FORMAS EVOLUTIVAS, TRANSMISSÃO, CICLO DE VIDA, FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A leishmaniose cutânea é causada por um protozoário intracelular obrigatório da família *Trypanosomatidae,* do gênero *Leishmania* e é transmitida pela picada do flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomya*, presente no novo mundo, conhecido popularmente como mosquito-palha (BRASIL, Ministério da Saúde, 2017). A *Leishmania* tem um ciclo de vida denominado de heteroxênico, uma vez que necessita de um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado para ter seu ciclo de vida completo (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). O hospedeiro invertebrado é responsável pela transmissão do parasita aos hospedeiros vertebrados. A *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas: uma forma flagelada, que é encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, o flebotomíneo, denominada de promastigota, e uma forma aflagelada, que é encontrada nos hospedeiros vertebrados, denominada de amastigota (Figura 4) (BRASIL, Ministério da Saúde, 2017). A forma promastigota é alongada e possui um flagelo longo para locomoção. Já as amastigotas têm forma arredondada e não possuem flagelo, e necessitam estar dentro de células do sistema monocítico fagocitário para que se multipliquem (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 4 – Formas evolutivas da *Leishmania* spp.

A **B**

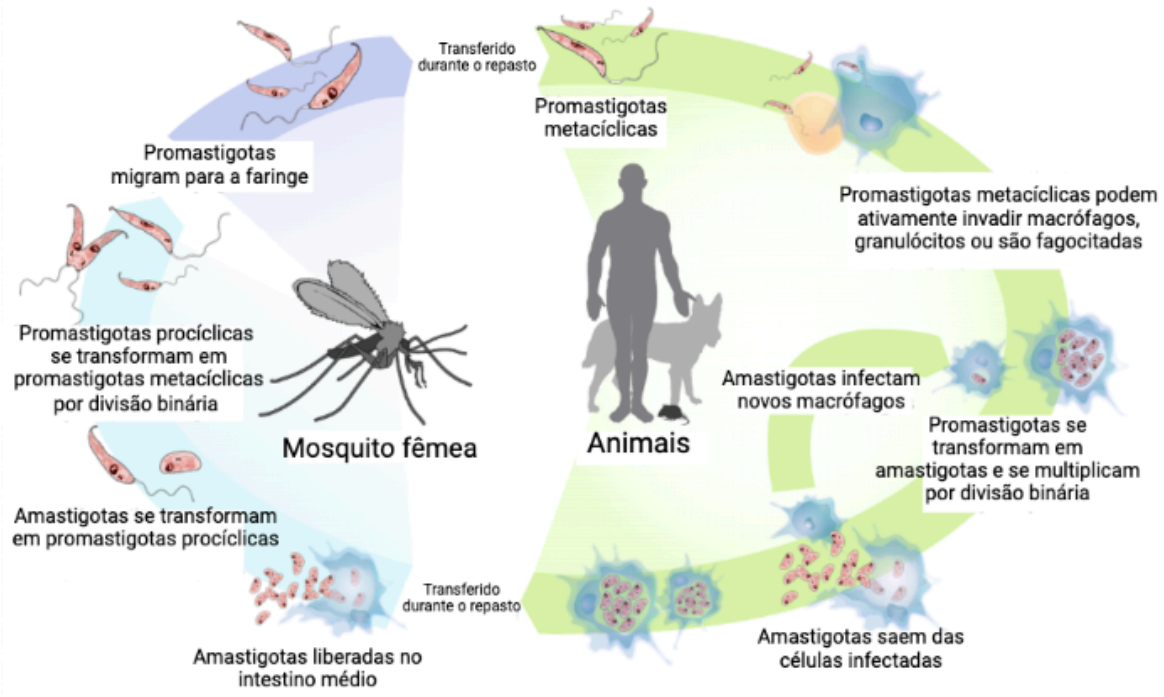


Legenda: A: *Leishmania* na forma flagelada, denominada de promastigota. B: *Leishmania* na forma aflagelada, denominada de amastigota.

Fonte: Brasil, 2017.

A doença é definida pela presença de lesões na pele que se originam através da picada do vetor transmissor, o flebotomíneo, no qual inoculam a forma promastigota do parasita. Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, os parasitas são fagocitados pelos macrófagos e se multiplicam, assumindo a forma amastigota. Em certo momento, após inúmeras multiplicações das amastigotas, os macrófagos se rompem e liberam os parasitas que novamente serão fagocitados por novos macrófagos. No flebotomíneo, as amastigotas que são ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam em promastigotas e habitam o trato digestivo do mosquito e se tornam infectantes, metacíclicas, para posteriormente serem inoculadas em um novo hospedeiro, dando início a um novo ciclo (Figura 5) (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 5 – Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Legenda: Promastigotas são inoculadas no hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo do inseto fêmea infectado. As promastigotas infectantes invadem e são fagocitadas pelas células do sistema monocítico fagocitário (macrófagos e granulócitos). Dentro da célula, as promastigotas se transformam em amastigotas e se multiplicam até que a célula se rompa e as amastigotas possam infectar novos macrófagos. Um inseto não infectado, ao realizar o repasto sanguíneo no vertebrado infectado, irá ingerir as amastigotas. As amastigotas irão se transformar

em promastigotas e se multiplicarão por divisão binária. As promastigotas se tornam infectantes (metacíclicas) e migram para o sistema digestório do inseto e uma nova infecção acontecerá quando o inseto for realizar o repasto sanguíneo.

Fonte: Adaptado de (Wikimedia Foundation, 2011).

A lesão inicial da LC geralmente é única e após o período de incubação, que é em média de dois a três meses, podendo variar de 10 dias a dois anos, surge uma pápula eritematosa que lentamente progride para a formação de um nódulo. Nesse período ocorre o aumento do volume dos gânglios linfáticos decorrente da proliferação de células do sistema imune para a região afetada, denominada de adenopatia (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

A manifestação clínica da leishmaniose é multifatorial e vai depender não apenas da espécie do parasita, mas também do material genético do hospedeiro, do estado nutricional, dos mecanismos do sistema imune do hospedeiro, como também fatores sociais e ambientais em que o indivíduo está inserido (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). A variedade de espécies de *Leishmania* juntamente com o mecanismo da resposta imune do hospedeiro facilita a existência de diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas. Diante disso, a LC pode ser classificada em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LM). (ANVERSA et al., 2018; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

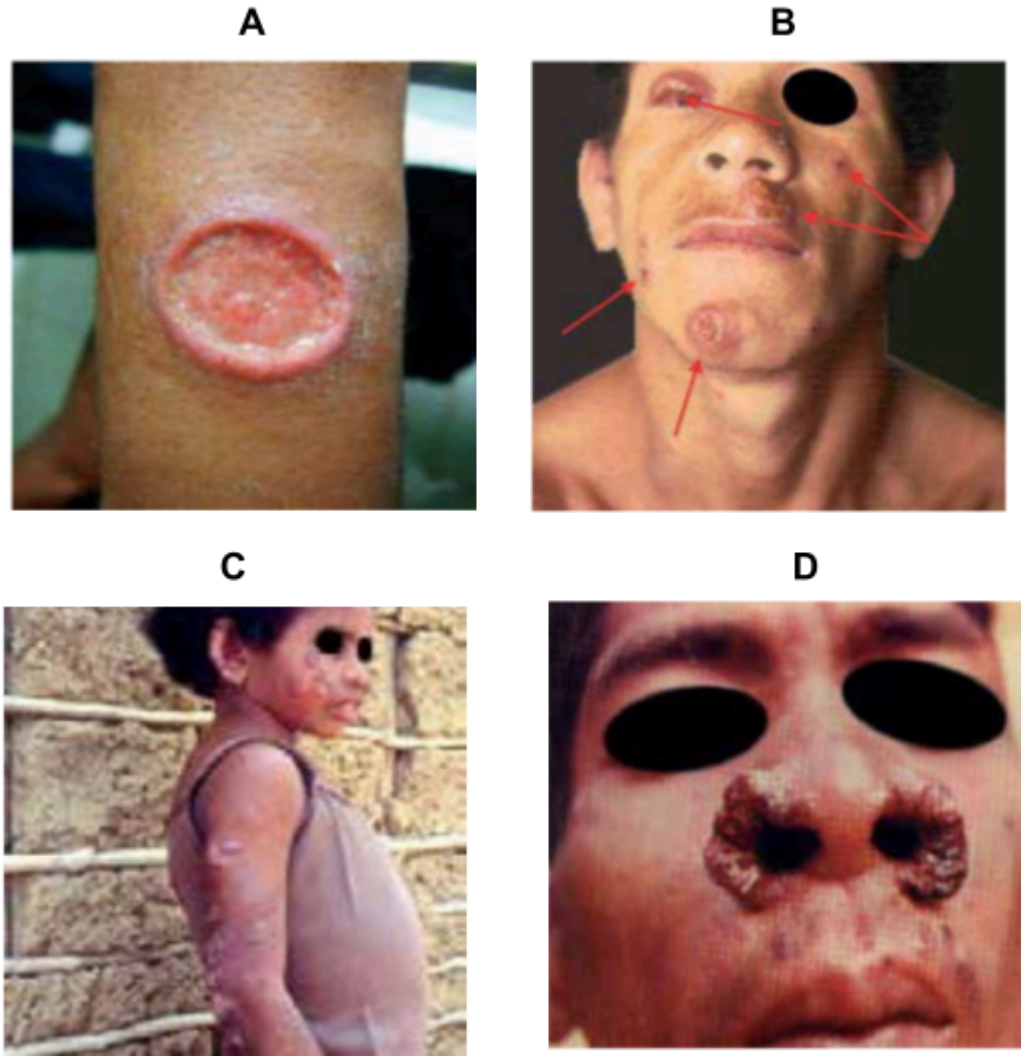
A LCL é caracterizada por uma lesão única no local onde houve a picada do mosquito e geralmente são localizadas em áreas do corpo mais expostas como pernas, mãos e rosto. Essa forma clínica também é a mais frequente das leishmanioses. Na fase inicial a lesão apresenta vermelhidão e inchaço e progride em tamanho. Após o tempo de incubação é formada a úlcera avermelhada, típica da leishmaniose, em formato arredondado e com bordas elevadas e bem definidas, geralmente indolor (Figura 6) (ANVERSA et al., 2018; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

A LD é uma forma um pouco mais rara da doença e as lesões aparecem em grande quantidade por todo o corpo e isso acontece, provavelmente, devido a disseminação do parasita pela corrente sanguínea e o sistema linfático. As lesões costumam ser pequenas e ulceradas. A LCD é a forma clínica rara e grave que se

inicia com uma única lesão e progride para lesões crônicas, não ulceradas, com formação de múltiplos nódulos em grandes extensões (Figura 6) (ANVERSA et al., 2018; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

Na LM as lesões são localizadas nas mucosas do indivíduo, envolvendo na maioria das vezes a mucosa nasal. Inicialmente as manifestações clínicas envolvem obstrução nasal, hiperemia e epistaxe. Com a progressão da doença são atingidas a cartilagem do septo nasal, paredes laterais, vestíbulo, seguido do palato, lábios, língua, faringe e laringe (Figura 6) (ANVERSA et al., 2018; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

Figura 6 – Formas clínicas da leishmaniose cutânea



Legenda: A: leishmaniose cutânea localizada; B: leishmaniose cutânea disseminada; C: leishmaniose difusa; D: leishmaniose mucocutânea.

Fonte: Brasil, 2017.

Para que haja o correto diagnóstico da leishmaniose, deve-se fazer uma associação entre o quadro clínico, epidemiológico e laboratorial. Apenas com a associação desses parâmetros é possível confirmar a doença. Existem diferentes métodos diagnósticos com diferentes aplicações e sensibilidade. A escolha do método vai depender da forma clínica, do tempo da lesão e da espécie de *Leishmania* envolvida. Vale ressaltar que um diagnóstico diferencial é de extrema importância, uma vez que outras doenças cutâneas podem se assemelhar a leishmaniose, como por exemplo tuberculose, esporotricose, micobacteriosis atípicas, histoplasmose, criptococose, hanseníase, lúpus eritematoso, sífilis, psoríase, neoplasias cutâneas e entre outros (ANVERSA et al., 2018; BRASIL, Ministério da Saúde. 2017). O diagnóstico clínico-epidemiológico consiste na avaliação da característica da lesão, juntamente com a anamnese e aliado aos dados epidemiológicos. Esses dados, por si só, são considerados um diagnóstico presuntivo. Só é possível confirmar o diagnóstico de leishmaniose confirmando a suspeita com a realização de testes laboratoriais (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os testes diagnósticos mais efetivos para leishmaniose possuem coletas invasivas e demandam de profissionais especializados, bem como de recursos adequados para a coleta do material biológico (CAETANO et al., 2019). O exame parasitológico e técnica considerada como padrão ouro, com maior especificidade, para o diagnóstico da leishmaniose é a técnica que é possível visualizar o parasita no microscópio. A busca pelo parasita na LC pode ser feita por meio da escarificação da lesão, biópsia e aspiração da borda da lesão. Esses testes não demandam muito recurso financeiro e são rápidos de serem realizados. No entanto, são considerados testes de sensibilidade limitada, principalmente em lesões crônicas, visto que quanto maior o tempo de duração da lesão, menor será a carga parasitária encontrada (ANVERSA et al., 2018; CAETANO et al., 2019; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Um outro método diagnóstico laboratorial é a reação de polimerase em cadeia (do inglês, *polymerase chain reaction* – PCR), no qual é um teste que se pode utilizar diferentes tipos de amostras clínicas, incluindo sangue periférico, e que consiste na amplificação do sequenciamento do DNA do parasita, sendo possível identificar, inclusive, a espécie de *Leishmania* envolvida. Trata-se de um teste de

alta sensibilidade e especificidade, muitas vezes utilizado para pesquisa clínica uma vez que é um teste de alto custo (ANVERSA et al., 2018; CAETANO et al., 2019).

Existe também o teste imunológico que avalia a resposta celular anti-*Leishmania* para fins diagnóstico, sendo o principal deles a intradermorreação de Montenegro – IDRM, que consiste em um teste intradérmico que avalia a resposta de hipersensibilidade celular retardada. O teste é realizado inoculando antígeno de *Leishmania* no antebraço do paciente e realizando a leitura após o período de 48 ou 72 horas, no qual em caso positivo irá apresentar enduração igual ou superior a 5mm. Vale ressaltar, no entanto, que após cura clínica a IDRM continua positiva pelo período de vários anos e por esse motivo é considerado como um teste presuntivo, pois não é possível afirmar se a leishmaniose se trata de doença atual ou pregressa. Por se tratar de um teste que avalia apenas a reação imunitária celular, o IDRM não tem sido mais utilizado por não ser muito eficaz (CARVALHO; BACELLAR; CARVALHO, 2022; ESTUMANO; SÁ; MACÊDO, 2020; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

Também são utilizados testes sorológicos para diagnósticos como o imunofluorescência indireta – IFAT e ensaio imunoenzimático – ELISA. Esses testes, assim como o IDRM, detectam anticorpos anti-*Leishmania*, mas geralmente estão associados a uma resposta humoral exacerbada. Em contrapartida, esses testes diagnósticos para LC podem apresentar taxas variáveis de especificidade e sensibilidade (ANVERSA et al., 2018).

O sucesso do tratamento para os indivíduos diagnosticados com leishmaniose vai depender de inúmeros fatores, como os fatores genéticos do hospedeiro, resposta imune e a forma clínica da doença, como já citado anteriormente. Além disso, para um tratamento eficaz também deve-se levar em consideração a qualidade e dosagem da droga, tempo de tratamento e características específicas do parasita como sensibilidade ao tratamento e resistência à medicação (ANVERSA et al., 2018). A droga de primeira escolha para todas as formas clínicas da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) encontrados em duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), ambos interagem na bioenergética do parasita na forma amastigota agindo na redução da produção de ATP e biossíntese

molecular, uma vez que vai inibir a atividade glicolítica e oxidativa dos ácidos graxos (ANVERSA et al., 2018; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

Para que o esquema terapêutico seja padronizado, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose administrada do antimonial seja calculada em miligramas da droga por quilograma de peso corporal por dia (mg Sb^{+5}/kg/dia). A administração pode ser realizada por via intramuscular, sendo esta um pouco mais inconveniente por apresentar dor local, ou por via endovenosa, que é considerada mais adequada pois permite a administração de grandes volumes e sem o inconveniente da dor local (BRASIL, 2018).

Uma outra droga que é disponibilizada desde 2018 pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento da LC é a miltefosina, no qual a dose preconizada para adultos é de 2,5 mg/kg/dia, com dose máxima de 150 mg/dia por via oral, durante o período de 28 dias (BRASIL, 2018).

Mesmo os antimoniais pentavalentes tendo uma eficácia de aproximadamente 90%, essas drogas possuem uma alta toxicidade e muitos efeitos adversos que, na maioria das vezes, são leves ou moderados e não necessita haver a suspensão do tratamento, como náusea, vômito, cefaleia, tontura, mialgia, febre, artralgia, dor abdominal e entre outros. Nos casos em que não é possível utilizar o antimonial pentavalente, ou que não houve resposta terapêutica satisfatória, a droga de segunda escolha é a anfotericina B (CROFT; YARDLEY, 2002; BRASIL, Ministério da Saúde, 2017).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico com ação leishmanicida. Essa droga vai agir por meio da fixação com ésteres presentes na membrana plasmática e provocando uma maior produção de óxido nítrico pelos macrófagos para eliminação do parasita. A administração da anfotericina deve ser realizada por infusão lenta em via endovenosa, durando de 4 a 6 horas de administração. Por esse motivo essa droga só pode ser administrada em ambiente hospitalar. Os efeitos adversos que podem surgir são náuseas, vômitos, febre, cefaleia, flebite, hipotensão, cianose, tremores e entre outros (BRASIL, Ministério da Saúde, 2017; TRAJKOVIC et al., 2001).

Além das drogas convencionais, se tem estudado outros tratamentos alternativos com o objetivo de combater a LC, pois acredita-se que a endemia por

LC ainda acontece, não apenas por causa de fatores socioeconômicos como já citado anteriormente, mas porque ainda há limitações nos tratamentos atuais, como o número de drogas limitadas e por serem de administração parental provocando desconforto e baixa adesão do paciente, e maior custo terapêutico. Diante do exposto, são estudados tratamentos tópicos, como gel de buparvaquona, gel de miltefosina, creme de morfina e entre outros, por se tratar de um método mais conveniente para a LC. Vários medicamentos em diferentes dosagens estão são estudados e são associados a um bom resultado terapêutico, principalmente quando combinados com o tratamento convencional parenteral, como é o caso do creme de cetoconazol e fluconazol em combinação com o glucantime que estão na fase de testes pré-clínicos. Dessa forma é possível que no futuro haja um aumento no número de opções terapêuticas para o tratamento da LC (AZIM et al., 2021).

2. 3 RESPOSTA IMUNE CONTRA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Ao invadir o hospedeiro, a *Leishmania* vai interagir com inúmeras células do sistema imune inato, modulando seus fenótipos e funções, como também com a resposta imune adaptativa. Além disso, também contribuindo para o estabelecimento da infecção, a saliva do flebotomíneo possui componentes que são vasodilatadores, anticoagulante e de efeito imunoregulador (FILHO et al., 2021).

A resposta imune se inicia quando a promastigota é inoculada na pele do hospedeiro e interage com componentes do soro, ativando o sistema complemento, bem como a via clássica e alternativa (FILHO et al., 2021). A resposta imune contra o parasita costuma ser rápida e eficiente, eliminando cerca de 90% das promastigotas logo após a inoculação (VON STEBUT, 2007). No entanto, o parasita desenvolveu um mecanismo de resistência para contornar o processo de lise que normalmente ocorreria. Esse mecanismo envolve a expressão de proteínas quinases que inibem a ativação do sistema complemento pelas *Leishmanias*, além de possuir moléculas em sua superfície que previnem a lise e morte do parasita, facilitando o processo de internalização da *Leishmania (FILHO et al., 2021)*.

Uma variedade de células sentinelas que estão presentes no local da inoculação como os macrófagos, mastócitos, queratinócitos e outras células expressam uma variedade de receptores de reconhecimento de padrão (do inglês*, pattern recognition receptors* - PRRs) que reconhecem padrões moleculares

associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) e estimulam a fagocitose de microrganismos. A cascata de ativação da resposta imune inata e adaptativa se inicia então com a expressão de receptores de citocinas e produção de quimiocinas por essas células presentes no tecido. As células ativadas sofrem modificações morfológicas e funcionais que levam a fagocitose do parasita e estresse oxidativo (COSTA-DA-SILVA et al., 2022).

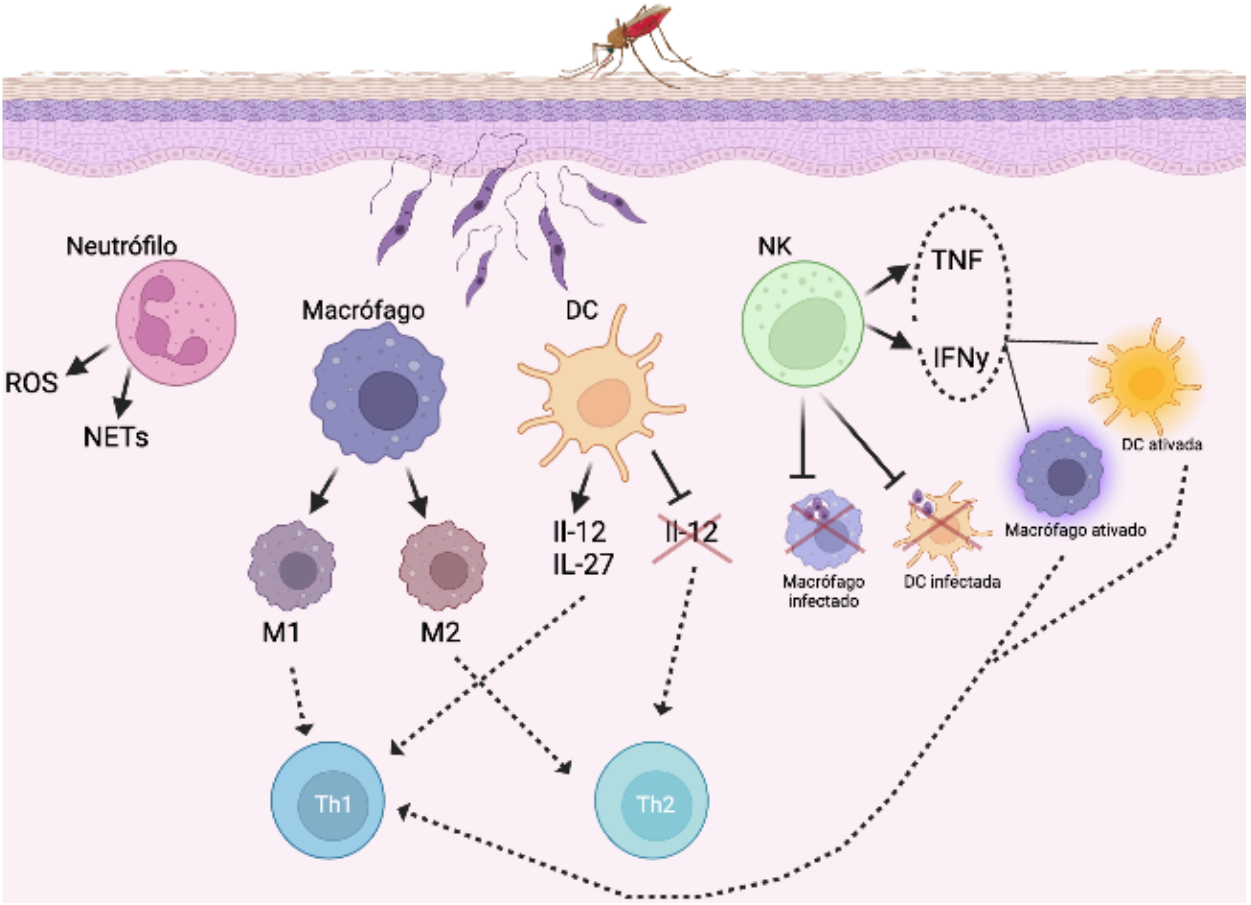
O controle ou a progressão da infecção por *Leishmania* tem sido associada com a resposta imune pro-inflamatória e anti-inflamatória. Enquanto uma resposta Th1 é caracterizada por uma resposta por-inflamatória com produção de citocinas como IL-12, IL-2, IFNγ e TNF e ativação de macrófagos, a resposta Th2 é caracterizada por uma resposta anti-inflamatória, com a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e inibição de macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasita, progressão e cronicidade da doença (GABRIEL et al., 2019).

2. 3. 1 RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

As células que fazem parte do sistema imune inato são os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK). A primeira célula do sistema imune inato a chegar ao sítio da infecção são os neutrófilos. Em geral, o neutrófilo age eliminando o parasita por meio da fagocitose da *Leishmania* e produção de fatores microbicidas intracelulares e extracelulares, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). No entanto, a *Leishmania* possui mecanismos que auxiliam a sua sobrevivência dentro dos neutrófilos, como a inibição da biogênese do fagolisossoma, a prevenção do estresse oxidativo e retardo da apoptose do neutrófilo (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). Além disso, os neutrófilos infectados produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas que tem a função de atrair demais neutrófilos e células do sistema monocítico fagocitário que participam da fagocitose dos mesmos. No entanto, essa produção de citocinas também resulta na limitação da ativação dessas células, reduzindo a apresentação do antígeno de *Leishmania* e a expressão de marcadores de ativação de superfície. Isso favorece a sobrevivência e a patologia da *Leishmania* (DUBIE; MOHAMMED, 2020; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016).

Uma vez que os neutrófilos infectados são fagocitados pelos macrófagos recrutados, há a secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β pelos macrófagos e, consequentemente, redução de citocinas pró-inflamatórias como IFNγ e TNF auxiliando que o parasito sobreviva nos macrófagos. O real papel dos neutrófilos contra a infecção da *Leishmania* ainda não é bem elucidado e sua função vai depender da espécie de *Leishmania* envolvida e fatores do hospedeiro (FIGURA 7) (DUBIE; MOHAMMED, 2020; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016).

Figura 7 – Resposta imune inata na leishmaniose cutânea



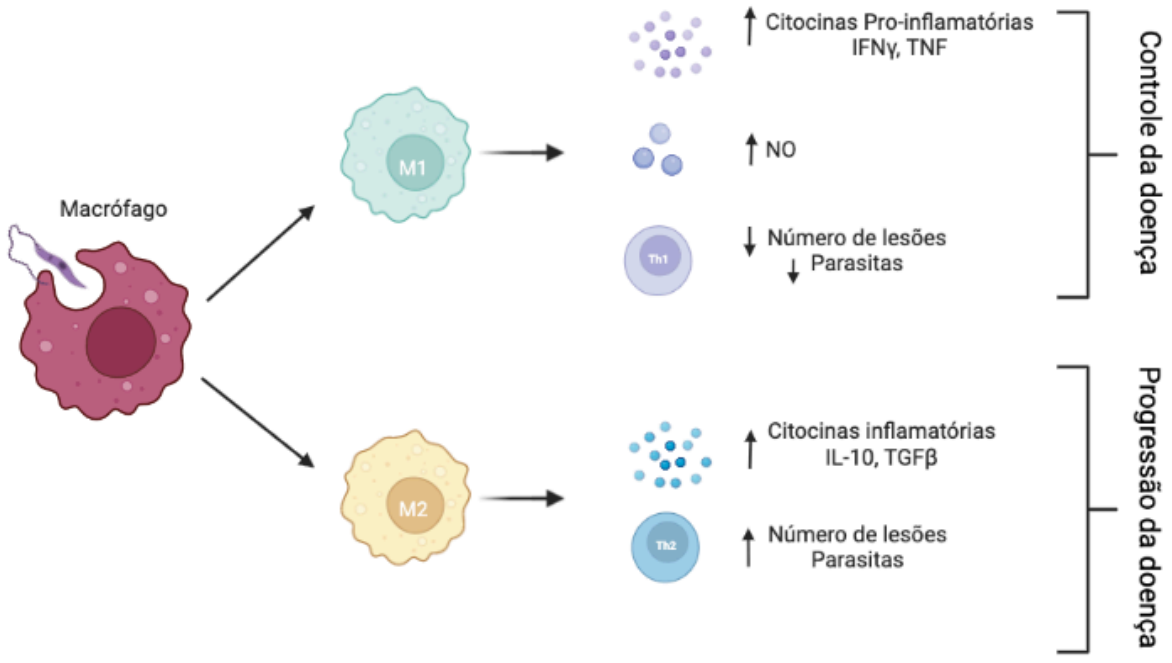
Legenda: Após a infecção por *Leishmania*, os neutrófilos secretam ROS e NETs com o intuito de eliminar o parasita. Os macrófagos se diferenciam em macrófagos M1, que induzem uma resposta Th1 protetora, e em macrófagos M2, que induzem uma resposta Th2 favorecendo a progressão da doença. As células dendríticas são a ponte entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa e produzem citocinas pro-inflamatórias que irão induzir uma resposta Th1, ou pode bloquear a

citocina IL-12 induzindo uma resposta Th2. Células NK vão agir destruindo células fagocitárias infectadas e produzem citocinas que ativam novas células de sistema monocítico fagocitário para eliminação do parasita e controle da infecção.

Fonte: Elaborado pela autora no BioRender®, 2025.

Outra célula que é essencial na patogênese da infecção por *Leishmania* são os macrófagos. Os macrófagos podem se diferenciar em duas linhagens celulares diferentes: M1 ou M2. Os macrófagos M1, também conhecidos como classicamente ativados, possuem propriedades microbicidas e são capazes de matar e eliminar o parasita através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFNγ e TNF, e expressão óxido nítrico (NO), estimulando uma resposta Th1 responsável pelo controle da infecção reduzindo o número de lesões e parasitas. Além de serem responsáveis pela eliminação do parasita, os macrófagos quando diferenciados na linhagem M2, também conhecidos como alternamente ativados, estão associados ao reparo tecidual e são células cruciais para a sobrevivência, replicação e diferenciação da *Leishmania*, uma vez que aumentam a produção de citocinas inflamatórias como IL-10 e TGF-β, impulsionando uma resposta Th2 e consequentemente a progressão da doença (FIGURA 8) (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; GABRIEL et al., 2019).

Figura 8 – Impacto da *Leishmania* nas linhagens de macrófagos



Legenda: Após o macrófago fagocitar a *Leishmania*, a célula pode se diferenciar em duas linhagens: M1 e M2. Macrófagos M1 produzem citocinas pro-inflamatórias e NO que vai favorecer a resposta Th1, controle da doença e reparo tecidual. Macrófagos M2 produzem citocinas inflamatórias e desencadeiam uma resposta Th2 favorecendo a progressão da doença e progressão da lesão.

Fonte: elaborado pela autora no BioRender®, 2025.

Uma célula que é essencial na iniciação e regulação de uma resposta imune efetiva contra a *Leishmania*, e que também compõe o sistema imune inato, são as células dendríticas (DCs). As DCs são responsáveis por absorver e processar antígenos, amadurecer e regular moléculas co-estimulatórias, migrar para os linfonodos e ativar as células T para se diferenciarem em células Th1 efetoras, mediando a ponte entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. É por meio das DCs que o antígeno de *Leishmania* é transportado do sítio da infecção para os linfonodos para que seja induzida uma resposta T específica. As DCs podem induzir uma resposta Th1 secretando IL-12 e IL-27 ou ainda pode induzir uma resposta Th2 bloqueando a secreção de IL-12 (FIGURA 7) (COLLIN; BIGLEY, 2018; HURDAYAL et al., 2020).

Além das células fagocitárias, as células NK também fazem parte do sistema imune inato. As células NK são responsáveis por uma resposta protetora na infecção por *Leishmania*, uma vez que tem atividade citotóxica, capazes de lisar macrófagos e DCs infectados e produzem citocinas iniciais antes mesmo da ativação da resposta imune adaptativa como IFNγ e TNF, que contribuem para a ativação de macrófagos e DCs para eliminação dos parasitas intracelulares, que auxiliará no desenvolvimento da resposta Th1 e consequentemente controle da infecção (FIGURA 7) (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; MESSLINGER et al., 2018).

2. 3. 2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Os componentes chaves para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa são as células B e as células T e essas células são essenciais para o desfecho da infecção por *Leishmania*. Existem dois subtipos de células B: células

B-1 e células B-2. As células B-1 são células apresentadoras de antígeno (APC) e responsáveis pela resposta humoral, responsáveis por produzir anticorpos contra antígenos e fazendo parte da ativação de células T. A ativação da célula B ocorre quando o sistema imune do indivíduo é exposto a um antígeno estranho e uma vez que esse antígeno é internalizado há a replicação e diferenciação de células B efetoras. Já as células B-2 são responsáveis pela produção de anticorpos específicos e a geração da memória imunológica (ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; GABRIEL et al., 2019).

As células T, por sua vez, possuem receptores de superfície (TCR) que reconhecem proteínas derivadas de patógenos vinculadas aos complexos principais de histocompatibilidade (MHC) nas células apresentadoras de antígenos (APCs). As células T virgens são ativadas quando há o reconhecimento do antígeno codificado pelo MHC, envolvendo a ligação entre os receptores da célula T e a superfície da APC (Figura 9).

Citocinas secretadas favorecem, então, o desenvolvimento da resposta das células T específicas para o antígeno reconhecido e a subpopulação de memória, que são os linfócitos auxiliares T $CD4^+$, irão se diferenciar em duas subpopulações celulares, tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2). As células Th1 são geralmente responsáveis contra microrganismos intracelulares, como é o caso da *Leishmania*. As principais células que fazem parte da resposta Th1 são os macrófagos, células T $CD8^+$, células B e células T $CD4^+$ (JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019).

Na leishmaniose, as células T $CD4^+$ estão envolvidas tanto na progressão da doença como também impedindo a progressão. Enquanto a resposta Th1 induz que os macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1β, IFNγ e TNF aumentando a fagocitose e promovendo uma resposta protetora contra a *Leishmania*, as células Th2 induzem uma resposta anti-inflamatória secretando citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF-β promovendo o crescimento e suscetibilidade do parasita (ELINA PANAHI et al., 2022; JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019). Além disso, a resposta Th2 também vai modular a resposta Th1 uma vez que as citocinas IL-4, IL-10 e TGF-β diminuem a ativação dos macrófagos e consequentemente agravam a doença (YASMIN et al., 2022). Em síntese, a infecção por *Leishmania* vai envolver tanto uma resposta Th1, que

promove resistência ao parasita, como também uma resposta Th2, que promove suscetibilidade.

Outra célula que também tem um papel fundamental na infecção por *Leishmania* são as células T reguladoras (Treg). As Treg são subpopulações celulares especializadas de células T $CD4^+$ que compreendem vários marcadores e fatores de transcrição, como por exemplo $CD25^+$, $CD127^-$ e $Foxp3^+$. Na infecção por *Leishmania*, as células Treg têm mostrado estar envolvidas na patologia da doença e persistência do parasita. Elas têm sido consideradas as principais supressoras da atividade antiparasitária das respostas das células T $CD4^+$ ao sintetizar citocinas como IL-10 e TGF-β, aumentando a suscetibilidade a infecção, impedindo a eliminação do parasita e levando a exacerbação da doença. As células Treg são responsáveis por produzir IL-10 e essa citocina tem função de supressão antimicrobiana e de inibir a ativação de células T efetoras (ALLOS et al., 2019; ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021; YASMIN et al., 2022).

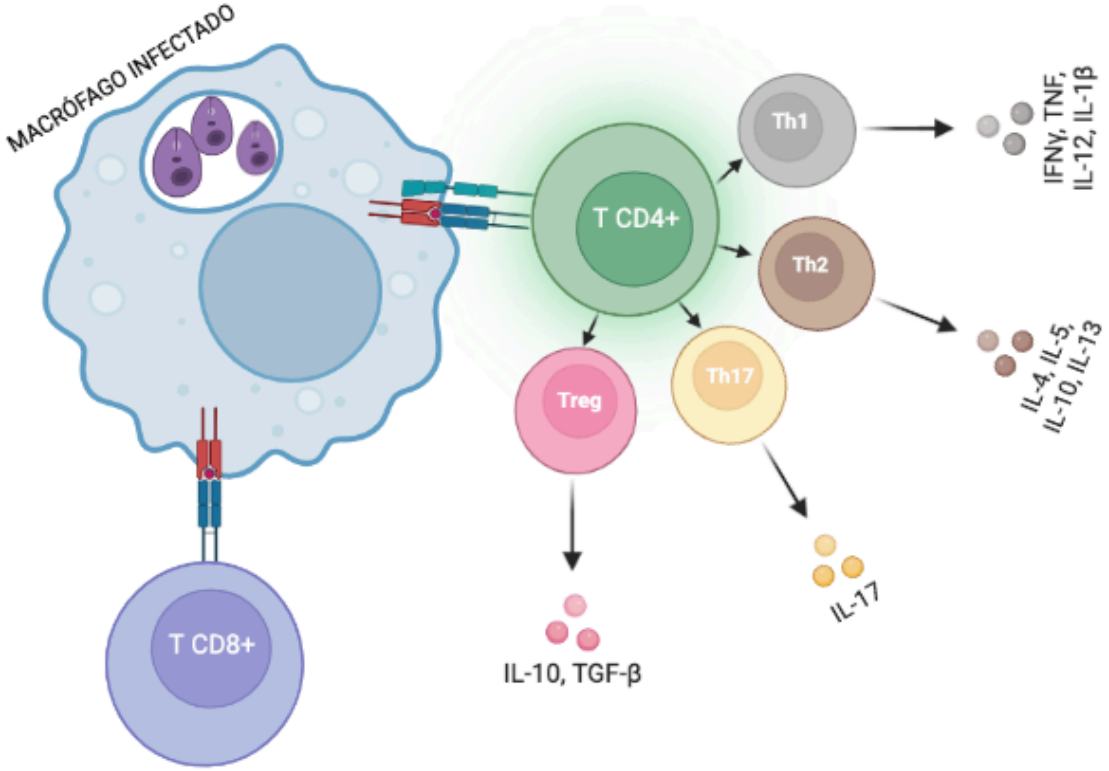
Além da resposta Th1 e Th2, também fazem parte da resposta imune as células Th17 que está associada a uma resposta pro-inflamatória. O perfil Th17 é ativado quando há altos níveis de IL-17, citocina produzida pelas células T $CD4^+$. A IL-17 atua como um modulador essencial da imunidade adaptativa contra a *Leishmania* uma vez que se trata de uma citocina pro-inflamatória e induz outras células a liberarem mediadores inflamatórios, promovendo o recrutamento dos neutrófilos para o sítio de infecção e sustentando um ambiente inflamatório que pode estar associado à persistência da lesão (BUNN et al., 2018; GABRIEL et al., 2019; YASMIN et al., 2022). O real papel das células Treg como das células Th17 ainda não está bem elucidado na infecção contra a *Leishmania* e se faz necessário que haja maiores investigações para compreender melhor o uso desses marcadores para a gravidade da doença.

As células T $CD8^+$ são responsáveis pela proteção contra patógenos intracelulares como vírus, bactérias e protozoários. No entanto, na leishmaniose o papel dessa subpopulação celular pode estar associado tanto a resposta imunológica protetiva quanto também mediar a imunopatogênese da doença (NOVAIS; SCOTT, 2015). Essas células possuem atividade citotóxica e podem desempenhar uma proteção imunológica através da produção de citocinas

pro-inflamatórias como IFNγ e TNF. Além disso, a produção de citocinas pelas células T $CD8^+$ contribuem para desencadear uma resposta Th1 protetora, por meio da polarização das células T $CD4^+$, e essa produção de citocinas através de mecanismos citotóxicos que incluem perforina e granzimas desencadeiam uma participação das células T $CD8^+$ contra a infecção por *Leishmania* (RODRIGUES et al., 2021).

No entanto, também foi observado que em alguns casos as células T $CD8^+$ apresentam uma reduzida capacidade citotóxica e de produção de citocinas. Isso pode estar associado ao estado crônico de exaustão celular e consequentemente promover a progressão da doença (DUBIE; MOHAMMED, 2020). As células T $CD8^+$ possuem a capacidade de lisar macrófagos autólogos infectados e foi observado que nas células que expressaram marcadores citolíticos, como CD107 e Granzima B^+, encontrados nas células T $CD8^+$ de pacientes com LC, a frequência de Granzima B foi associada ao tamanho da lesão. Além de disso, também foi observado que uma alta porcentagem de Granzima B^+ encontrado nas biópsias de pacientes com LC está relacionado com o processo de necrose mais intenso, levando a conclusão de que as células T $CD8^+$ estão envolvidas tanto no processo de cura da doença como também mediando o dano tecidual (FIGURA 9) (SANTOS et al., 2013).

Figura 9 – Diferenciação das células T ao reconhecerem o antígeno de *Leishmania*



Legenda: Célula T virgem ao reconhecerem o antígeno de *Leishmania* pelo MHC são ativadas e tornam-se células T específicas: T $CD4^+$ e T $CD8^+$. As células T $CD4^+$ originam células Th1, Th2, Th17 e Treg. Células Th1 secretam citocinas pro-inflamatórias como IL-12, IL-1β, IFNγ e TNF. Células Th2 secretam citocinas inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Células Th17 secreta a citocina IL-17. Células Treg secretam citocinas como IL-10 e TGF-β.

Fonte: elaborado pela autora no BioRender®, 2025.

2. 4 EXAUSTÃO CELULAR NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Muito se discute sobre o que pode levar à cura ou cronificação da leishmaniose cutânea (LC) e a compreensão limitada da complexidade da resposta imunológica do hospedeiro, bem como a complexidade do parasita, é o que dificulta a encontrar estratégias para evitar a cronificação da doença. Na busca pelo melhor

entendimento desse fenômeno tem-se investigado a associação entre a exaustão celular e a cronificação da LC.

A exaustão de células T é caracterizada pela perda progressiva das funções efetoras e é mediada pelo aumento da expressão de receptores inibitórios, como por exemplo o receptor de morte celular programada 1 (PD-1, do inglês *Programmed cell death 1*), o qual reduz a capacidade proliferativa e produção de citocinas inflamatórias ao interagir com seus ligantes PD-L1/PD-L2 (BARROSO et al., 2018; DA FONSECA-MARTINS et al., 2021; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020). O PD-1 também pode ser encontrado em células natural killer (NK), células B e monócitos ativados. Já o seu ligante PD-L1 pode ser encontrado em outros tipos celulares, como neutrófilos, células B, células dendríticas, monócitos e em diversas células não-hematopoiéticas (BARROSO et al., 2018; DA FONSECA-MARTINS et al., 2021).

A expressão de PD-1 é induzida uma vez que há a ativação do receptor de células T (TCR) pelas células T virgens. Quando não há mais essa sinalização no TCR, a expressão de PD-1 tende a diminuir. Todavia, com a persistência do antígeno, como pode acontecer no caso da LC, a estimulação do TCR é mantida pelo epítopo na ativação crônica (SIMON; LABARRIERE, 2018).

Dessa forma, a via PD-1/PD-L1 tem uma dupla função. Por um lado, pode inibir a proliferação de células T, uma vez que a ligação do receptor com o seu ligante atua atenuando a sinalização do TCR (SAEIDI et al., 2018) e consequentemente auxiliando o patógeno a invadir o sistema imune (DA FONSECA-MARTINS et al., 2021). Como, por outro lado, também pode aumentar a proliferação de células T, como foi observado em um estudo onde utilizou-se B7-H1, que é uma molécula transmembrana idêntica ao PD-L1 humano, para estimular células T provenientes de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) humanas, e foi possível constatar que o B7-H1 foi capaz de promover e co-estimular a proliferação de células T, dessa maneira auxiliando o sistema imune no combate ao patógeno (DA FONSECA-MARTINS et al., 2021).

A expressão isolada do PD-1 por si só não caracteriza o estado de exaustão, mas sim o conjunto da expressão de múltiplos receptores co-inibitórios (SAEIDI et al., 2018). Dessa forma, outros receptores inibitórios que também podem atuar juntamente com o PD-1 para a exaustão de células T são as imunoglobulinas-3 de

célula T (TIM-3, do inglês *T cell immunoglobulin-3*); proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA-4, do inglês *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*); gene-3 de ativação de linfócito (LAG-3, do inglês *Lymphocyte activation gene-3*); 2B4 (CD244), CD160 e imunoglobulina de célula T e domínio ITIM (TIGIT) (GARCIA DE MOURA et al., 2021; SAEIDI et al., 2018).

O papel desses receptores tem sido estudado na LC, uma vez que esse fenótipo de exaustão de células T têm sido encontrado nos pacientes que apresentam a cronificação da doença (GARCIA DE MOURA et al., 2021; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020). Acredita-se que este fenômeno acontece em resposta a exposição prolongada ao antígeno e às citocinas pró-inflamatórias locais, fazendo com que haja a ativação constante das células T e consequente indução ou estímulo ao fenótipo de exaustão (GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020).

Alguns estudos demonstraram que as células T quando expostas a exposição prolongada ao antígeno de *Leishmania* e inflamação crônica aumentam a interação e expressão do complexo PD-1/PD-L1, o que ocorre não apenas durante o curso da LC, mas também pode persistir após o tratamento (FREITAS E SILVA et al., 2020; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020).

Além do aumento da expressão do complexo PD-1/PD-L1, essa exposição persistente ao antígeno também irá ativar as células do sistema imune inato com a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias contribuindo para a inflamação crônica e consequentemente a um fenótipo de exaustão (GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020). Dentre essas citocinas, destaca-se o fator de necrose tumoral (TNF).

O TNF é uma das citocinas pró-inflamatórias que têm sido estudada como grande mediadora da exaustão celular, e é de grande importância nas infecções crônicas, uma vez que pode mediar o processo inflamatório e combater a infecção na fase inicial. Todavia, uma resposta inflamatória exacerbada na LC pode induzir a disfunção de células T na fase crônica, pois a exposição persistente ao antígeno contribui para a inflamação crônica e consequentemente com o fenótipo de exaustão auxiliando para a progressão da lesão e exacerbação da doença (CUNHA et al., 2020; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020).

O TNF pode ser produzido pelos macrófagos e células dendríticas de indivíduos infectados por *Leishmania* e em níveis elevados, como acontece na fase crônica da LC, induz a elevação de PD-1 pelas células T $CD4^+$ e expressão de seu

ligante PD-L1, e tem papel fundamental na exaustão de células T (DA FONSECA-MARTINS et al., 2021; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020).

Em relação a essa exaustão de células T, um importante achado é que as T $CD4^+$ adquirem um perfil de exaustão primeiro do que as células T $CD8^+$. Sugere-se que, uma vez que estes ainda apresentam marcadores de atividade citotóxica como o CD107a, que é um marcador de degranulação celular, em infecções crônicas por *Leishmania*. Dessa forma, entende-se que células T CD8+ precisam de um maior nível de expressão de PD-1 para sua completa inativação, do que células T CD4 (CUNHA et al., 2020; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020).

Um estudo realizado com pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, infectados por *Leishmania braziliensis*, observou uma expansão do marcador CD107a em células T citotóxicas, principalmente na fase em que os pacientes estavam em tratamento com o antimonial, inferindo assim seu papel na cura da doença (CUNHA et al., 2020).

Além das citocinas que contribuem para a exaustão celular, também tem sido identificado fatores de transcrição que induzem um programa de transcrição para esse perfil (SCOTT; NOVAIS, 2016). Sabe-se que o fator de transcrição do fator nuclear de células T ativadas (NFAT, do inglês *nuclear factor of activated T cells*) é responsável pela ativação de células T, todavia, também tem sido observado como um redutor dessa ativação quando há a exposição da ativação do TCR das células T na ausência de sinais estimulatórios positivos ou na presença de sinais negativos (MARTINEZ et al., 2015).

Um dos maiores fatores de transcrição associado à exaustão de células T identificado foi o TOX (do inglês, *Thymocyte selection-associated high mobility group box protein*). Observou-se que há alta expressão do TOX, que é regulado pelo NFAT, presente em células T disfuncionais, e que este é aumentado progressivamente pela estimulação do TCR, correlacionando-se com a alta expressão de receptores inibitórios (NÜSSING; TRAPANI; PARISH, 2020; PHILIP; SCHIETINGER, 2022; SCOTT; NOVAIS, 2016).

O TOX é responsável pelo desenvolvimento da linhagem de células T CD4, NK e células linfoides. Porém, o que se tem observado é que esse fator de transcrição também participa de maneira importante na diferenciação de células T CD8 durante a infecção, desenvolvimento de tumores e autoimunidade (PHILIP; SCHIETINGER, 2022).

Em um estudo foi possível identificar que a expressão de TOX reduziu a produção de citocinas enquanto aumenta PD-1, como também foi possível observar que a expressão de TOX induziu genes de exaustão como receptores inibitórios e fatores de transcrição e reprimiu genes associados a memória imunológica (KHAN et al., 2019).

Diante do exposto, é possível inferir que receptores inibitórios e fatores de transcrição têm sido marcadores chave que contribuem para o fenótipo de exaustão das células T e cronificação da leishmaniose cutânea. Estudos nessas áreas podem auxiliar na elucidação do mecanismo da resposta imunológica de pacientes com essa doença, bem como no desenvolvimento de soluções terapêuticas mais eficazes para resolução e cura da LC.

Nesse estudo, avaliamos alguns dos principais receptores que podem estar envolvidos na exaustão de células T, juntamente com algumas citocinas que podem ser relevantes para a persistência ou resolução da doença:

Quadro 1: Receptores e citocinas que podem estar envolvidos na exaustão de células T.

RECEPTOR OU CITOCINA	**FUNÇÃO**
PD-1	Marcador de exaustão de células T; inibe a proliferação e função efetora.
TIM-3	Receptor inibitório associado à disfunção de células T.
TIGIT	Inibidor da ativação de células T; regulação negativa.
CD160	Modula a atividade citotóxica das células T.
TOX	Fator de transcrição que mantém o estado de exaustão celular.
CD28	Receptor co-estimulatório essencial para ativação e proliferação de células T.
2B4	Modula a função das células T; pode atuar tanto na ativação

	quanto na inibição das mesmas.
Granzima B	Enzima citotóxica que elimina células infectadas.
IL-10	Citocina antiinflamatória que regula a resposta imune.
TNF	Citocina pró-inflamatória que promove a ativação de macrófagos e recrutamento celular.
IL-6	Citocina pró-inflamatória envolvida no recrutamento de neutrófilos.
IL-1β	Citocina pró-inflamatória que contribui para a ativação de células T.
IL-8	Citocina que promove o recrutamento de neutrófilos.
IL-12	Citocina pró-inflamatória essencial para a diferenciação de células T $CD4^+$ em Th1 e produção de IFN-y.

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar marcadores de exaustão celular em linfócitos T na leishmaniose cutânea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os pacientes deste estudo quanto aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais; Identificar em células mononucleadas do sangue periférico dos pacientes com LC os perfis de linfócitos T CD4conv, T $CD8^+$, T reguladoras e T duplo-negativas;
- Determinar nos sub-perfis de células T a expressão e co-expressão dos receptores PD-1, TIM-3, TOX, TIGIT, 2B4, CD160, CD28 e Granzima B;
- Mensurar a produção das citocinas TNF, IL-6, IL-10, IL-12, IL-1β e IL-8 em células mononucleares estimuladas *in vitro* com antígeno total de *Leishmania*;
- Avaliar a expressão gênica *in silico* de marcadores de exaustão em células T.

4 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença negligenciada que afeta milhares de pessoas globalmente, com repercussões significativas no campo econômico e psicossocial (GRIFFERTY et al., 2021). No Brasil, o número de casos continua elevado, tornando essencial o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e tratamento (BUZANOVSKY et al., 2020). Um dos principais desafios para o avanço de novas terapias e vacinas contra a LC é o conhecimento ainda complexo sobre a complexidade da resposta imunológica do hospedeiro, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de ativação, regulação e exaustão das células T durante a infecção.

A imunidade protetora contra a *Leishmania* depende da ativação e expansão de clones de linfócitos T $CD4^+$ que reconhecem epítopos do parasita e produzem citocinas do perfil Th1, sendo o IFN-γ o principal mediador da ativação de macrófagos para a eliminação do patógeno (ELINA PANAHI et al., 2022; JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019). No entanto, diferentes infecções crônicas, incluindo a leishmaniose, são capazes de induzir a expressão de receptores inibitórios em células T e células apresentadoras de antígeno (APCs), como PD-1, TIM-3 e TIGIT, limitando a resposta imune e favorecendo a persistência do parasita (MURPHY; MURPHY, 2010). Além disso, há evidências de que o estado de exaustão celular pode levar à perda progressiva da diversidade do repertório de receptores de células T (TCR), reduzindo a capacidade do sistema imune de reconhecer e eliminar o patógeno de forma eficaz (DA FONSECA-MARTINS et al., 2021).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram, em modelo experimental de LC, uma alta frequência de linfócitos T efetores expressando PD-1 na lesão ativa, assim como a presença de PD-L1 em diferentes subtipos de APCs. No entanto, ainda há lacunas na compreensão da resposta imune em pacientes com LC, principalmente no que diz respeito à distribuição e funcionalidade dessas células em diferentes compartimentos orgânicos e ao impacto da coexpressão de múltiplos receptores inibitórios na regulação da resposta inflamatória (FREITAS E SILVA et al., 2020). Dessa forma, a realização de ensaios de citometria de fluxo se torna essencial para caracterizar os fenótipos celulares associados à exaustão e ativação das células T, permitindo a identificação de padrões específicos da infecção e sua evolução após o tratamento.

Além disso, a quantificação de citocinas inflamatórias e reguladoras complementa a investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença, permitindo avaliar a produção de mediadores que desempenham papéis centrais na modulação da resposta imune contra *Leishmania*. A análise desses mediadores é fundamental para entender o equilíbrio entre resposta protetora e dano tecidual, assim como o impacto da inflamação na persistência da infecção (ELINA PANAHI et al., 2022; JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019).

Por fim, a investigação do perfil gênico por RNAseq permite identificar assinaturas moleculares associadas à exaustão celular, ativação imunológica e regulação da resposta inflamatória em lesões de LC, possibilitando uma visão mais abrangente da dinâmica imunológica envolvida na infecção (AMORIM et al., 2019). A integração desses dados é crucial para esclarecer o papel dos receptores inibitórios, a funcionalidade das células T e a regulação da resposta inflamatória ao longo da progressão da doença e após o tratamento.

Portanto, a caracterização detalhada da resposta imune na LC, combinando análises fenotípicas, funcionais e transcriptômicas, é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos que determinam a persistência ou resolução da infecção. Esses achados poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas imunomoduladoras e para a melhoria das estratégias de controle da doença.

5 MATERIAIS E MÉTODO

5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS (deixar claro quais testes positivos)

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de área endêmica para LC em Pernambuco, captados pelo Sistema de Referência em Leishmanioses. Foram selecionados 49 pacientes, dos quais 27 eram portadores de lesões ativas antes do tratamento, de ambos os sexos, com idades variadas, e 22 pacientes pós-tratamento. Além disso, também participaram do estudo 33 controles saudáveis compostos por estudantes da Universidade Federal de Pernambuco e funcionários do Instituto Aggeu Magalhães. O total de 9 pacientes com a doença ativa participaram do ensaio de citometria de fluxo, enquanto 18 pacientes com a doença ativa participaram do ensaio de avaliação das citocinas. Dos pacientes do grupo pós-tratamento, 15 pacientes participaram do ensaio de citometria de fluxo, enquanto 7 participaram do ensaio da avaliação das citocinas.

Os pacientes receberam atendimento ambulatorial, onde ficaram cientes do objetivo do estudo. Foram acompanhados para realização de procedimentos para coleta de 30 ml de sangue antes do tratamento e após tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina). Prosseguimos com os procedimentos para coleta de sangue somente após o paciente concordar em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICES A, B e C). O grupo controle foi composto por 16 indivíduos que participaram do ensaio de citometria de fluxo e 17 indivíduos que participaram do ensaio de avaliação das citocinas, constituído por indivíduos saudáveis, residentes em área não endêmica, e somente após concordar em assinar o TCLE (APÊNDICE D). Foi coletado 30 ml de sangue de todos os grupos.

O material sanguíneo coletado foi processado e marcado no departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) e as amostras foram fixadas e analisadas em citômetro de fluxo. Os protocolos experimentais dessa pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/FIOCRUZ (11083812.7.0000.5190) (ANEXO A) e o projeto foi pautado conforme o Código de Ética, Resolução CNS 466/12 e complementares. Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos

laboratoriais para confirmação da doença com o apoio do Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) do IAM. Os exames incluíram: pesquisa direta; punção aspirativa de borda de lesão; biópsia; reação em cadeia de polimerase (PCR) e/ou imunofluorescência indireta (IFI).

5.2 CULTURA DE *L. (V.) braziliensis* E OBTENÇÃO DO ANTÍGENO

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903), cultivadas *in vitro*, foram expandidas em meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) até a fase de crescimento exponencial. A massa parasitária foi então submetida a duas lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 2200x rpm, por 10 minutos, a 4ºC. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 750µl de tampão de lise branda e 250µl de inibidor de protease. A suspensão foi colocada em tubos *eppendorf*, congeladas e descongeladas em nitrogênio líquido e banho-maria até as células estarem completamente lisadas. Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 4ºC, 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante, correspondente a fração solúvel das proteínas, foi coletado e guardado para que fosse submetido a uma dosagem proteica segundo o método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981). Após a quantificação, as frações antigênicas foram armazenadas a -80ºC para que posteriormente fossem utilizadas para realização de estímulo em cultura de células mononucleares do sangue periférico.

5.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS PACIENTES SELECIONADOS

Foi coletado trinta mililitros (30ml) de sangue periférico de pacientes e controles. O sangue foi diluído em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) na proporção de 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia). Os tubos foram submetidos a centrifugação de 400 x g por 35 minutos para obtenção da camada de PBMC. Após coleta das PBMCs, as células foram lavadas duas vezes com 10 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e submetidas a centrifugação de 300 x g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10 %

de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µl de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Foi então retirada 10µl de uma alíquota da suspensão celular, diluída em 90µl de azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO) para quantificação em câmara de Neubauer.

Após separação e contagem, parte das PBMCs foram submetidas a cultura com antígeno de *L. braziliensis* e outra parte submetida à marcação celular.

5.4 CULTURA DAS PBMC COM ANTÍGENO TOTAL DE *L. braziliensis*

Após a separação das PBMC, $1x10^6$ células em 1 ml foram colocadas em cultura. A cultura foi realizada utilizando meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µl de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) por 72h em estufa 37ºC com 5% de CO2. Para cada paciente e controle foram mantidas duas culturas: uma com estímulo de antígeno total de *L. braziliensis* na concentração de 10µl/ml e outra sem estímulo. Após o período de cultura, as células foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80ºC para posteriormente ser realizada a avaliação de citocinas.

5.5 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas foram mensuradas em sobrenadante de cultura de pacientes e controles utilizado o kit CBA humano inflamatório (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #551811, BD Bioscience, San Jose, CA). As citocinas avaliadas foram TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-1β e IL-8 e foram seguidas as recomendações do fabricante para o ensaio. O limiar de detecção para cada citocina analisada está disposto no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 – Limiar de detecção das citocinas

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL-1β	7.2
IL-6	2.5
IL-8	3.6
IL-10	3.3
IL-12p70	1.9
TNF	3.7

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

5.6 CITOMETRIA DE FLUXO (*ex vivo*)

Realizamos análises por citometria de fluxo para identificar e quantificar as populações e subpopulações de linfócitos T. As PBMCs ($1x10^6$) foram transferidas para tubos de poliestireno e foram suspensas em 2 ml de PBS. Em seguida foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e, em seguida, adicionado 50µl do mix de anticorpos de superfície conforme tabelas 1 e 2, respectivo a cada painel (Painel A= anti- CD3, CD4, CD8, PD-1, TIM-3, TIGIT; Painel B= anti- CD3, CD4, CD8, PD-1, CD160, 2B4, CD28). As células foram então incubadas durante 20 minutos ao abrigo da luz a 8ºC. Após o tempo de incubação, foi adicionado 2 ml de PBS aos tubos e centrifugados por 10 minutos a 400 x g e em seguida descartado o sobrenadante. Essa etapa foi realizada 2 vezes. Em seguida, foi adicionado 200µl de Fix/Buffer (Invitrogen/ThermoFisher) e as células foram incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, foi adicionado 2 ml de Perm/Buffer (Invitrogen/ThermoFisher) aos tubos e centrifugados por 10 minutos a 400 x g e em seguida descartado o sobrenadante. Essa etapa foi realizada 2 vezes. Na etapa seguinte, foi adicionado

50µl do mix de anticorpos intracelulares, conforme quadros 3 e 4, respectivo a cada painel (Painel A= anti- FOXP3 e TOX; Painel B= anti- GRAZIMA B). As células foram então incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz a 8ºC. Após o tempo de incubação, foi adicionado 2 ml de Perm/Buffer aos tubos e centrifugados por 10 minutos a 400 x g e em seguida descartado o sobrenadante. Essa etapa foi realizada 2 vezes. Por fim, as células foram ressuspensas em 200µl de PBS para serem adquiridas (300.000 eventos/tubo) no citômetro de fluxo (BD FACS ARIA III) e analisadas através do *software* FlowJo versão 10.9.0 (Tree Star Inc®). Os paineis e anticorpos utilizados estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Quadro 3- Painel A de anticorpos utilizados no estudo

Painel A			
Anticorpo	**Fluorocromo**	**Clone**	**Fabricante**
CD3	APC-Cy7	SK7	BD
CD4	BV510	SK3	BD
CD8	PerCP	SK1	BD
PD-1	BV421	EH12.1	BD
FOXP3	APC467	259D	BioLegend
TIM-3	PE/DAZZLE594	F38-2E2	BioLegend
TIGIT	FITC/AF488	MBSA43	BioLegend
TOX	PE	TXRX10	ThermoFisher

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Quadro 4- Painel B de anticorpos utilizados no estudo

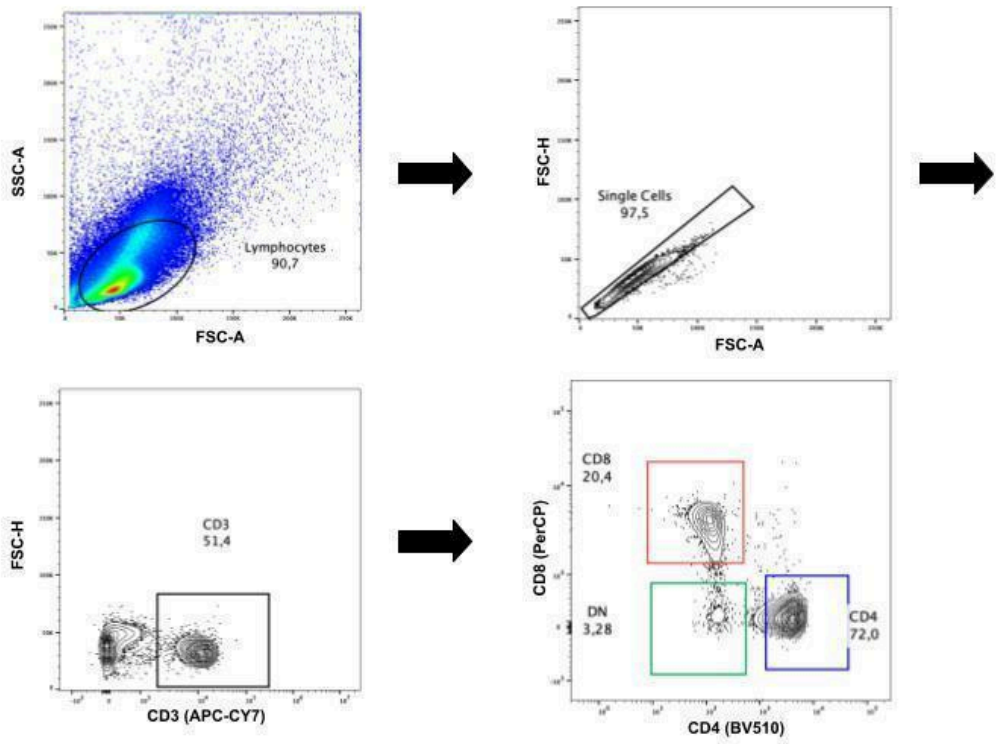
Painel B			
Anticorpo	**Fluorocromo**	**Clone**	**Fabricante**
CD3	APC-Cy7	SK7	BD
CD4	BV510	SK3	BD
CD8	PerCP	SK1	BD
PD-1	BV421	EH12.1	BD
2B4	PE/DAZZLE594	C1.7	BioLegend
CD28	PE-Cy7	CD28.2	BD
CD160	APC	BY55	BioLegend
GRANZIMA B	FITC	QA16A02	BioLegend

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

5.7 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE

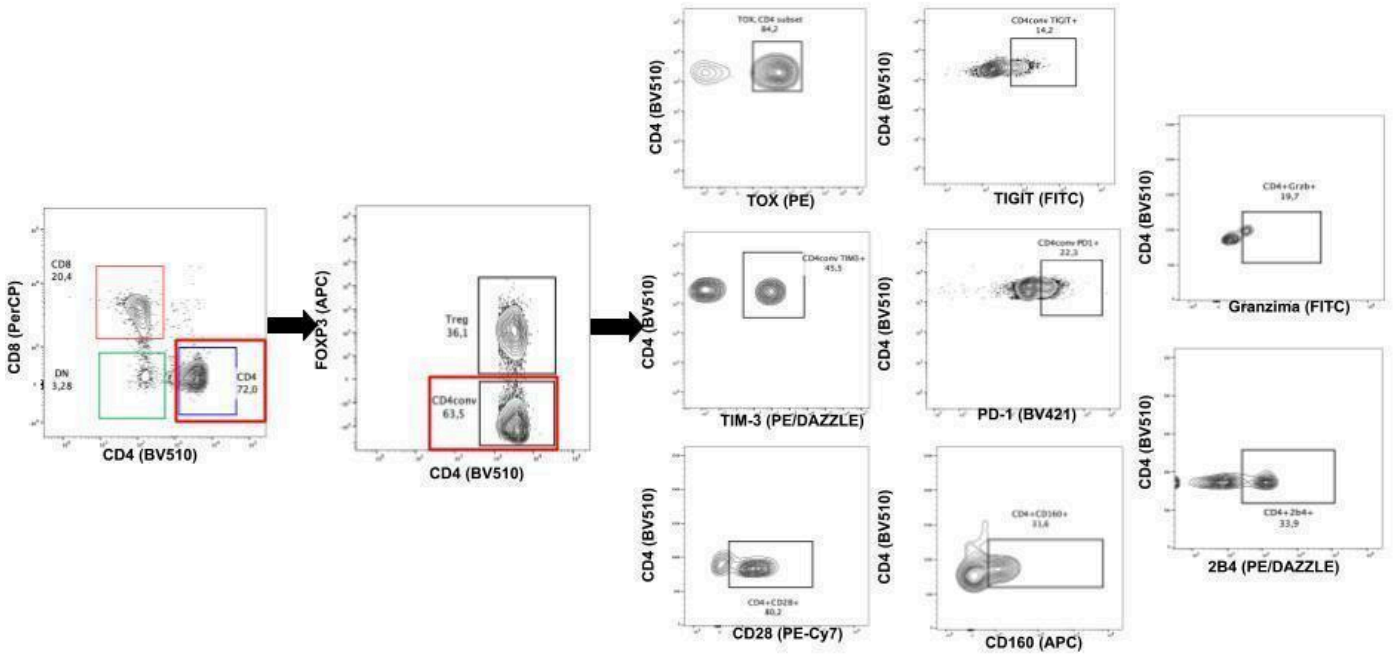
Para realização das análises de citometria, inicialmente delimitou-se a região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC-A) versus Dispersão Lateral (SSC-A), seguido de FSC-H versus FSC-A, e foi feita a exclusão dos *doublets*. A partir dessa região foi possível construir gráficos de fluorescência e seus respectivos histogramas para delimitação dos quadrantes e regiões de análise. Para a delimitação dos quadrantes utilizou-se como parâmetro a população negativa, titulação dos anticorpos e utilização da florescência menos um em controles (do inglês, *Fluorescence Minus One* – FMO) (Figuras 30-41), sendo esta última essencial para delimitar populações mais raras, como as células supressoras investigadas neste estudo. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e ou/histograma/*dotplot*. As estratégias de análise para cada uma das populações estão descritas nas Figuras 10 a 18.

Figura 10 - Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária de interesse



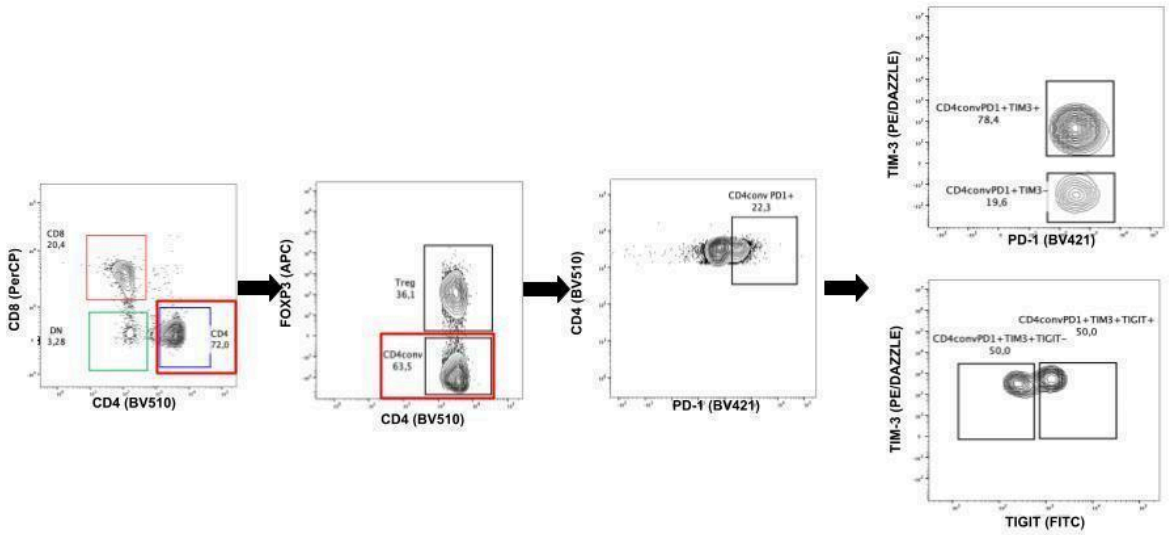
Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

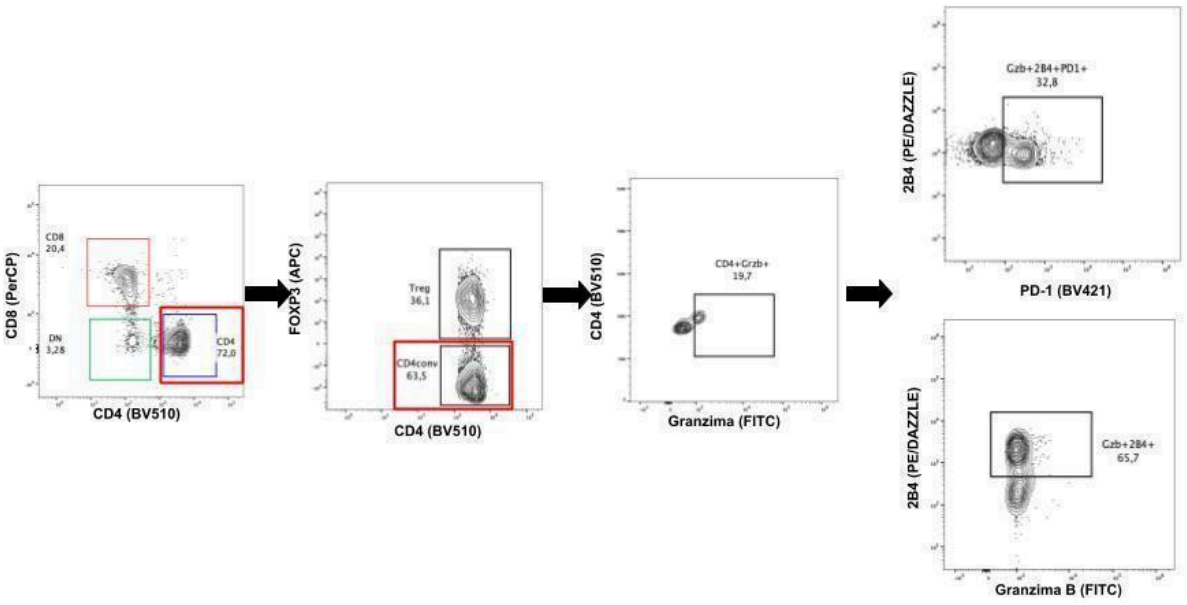
Figura 11– Estratégia de análise das células T CD4conv



Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

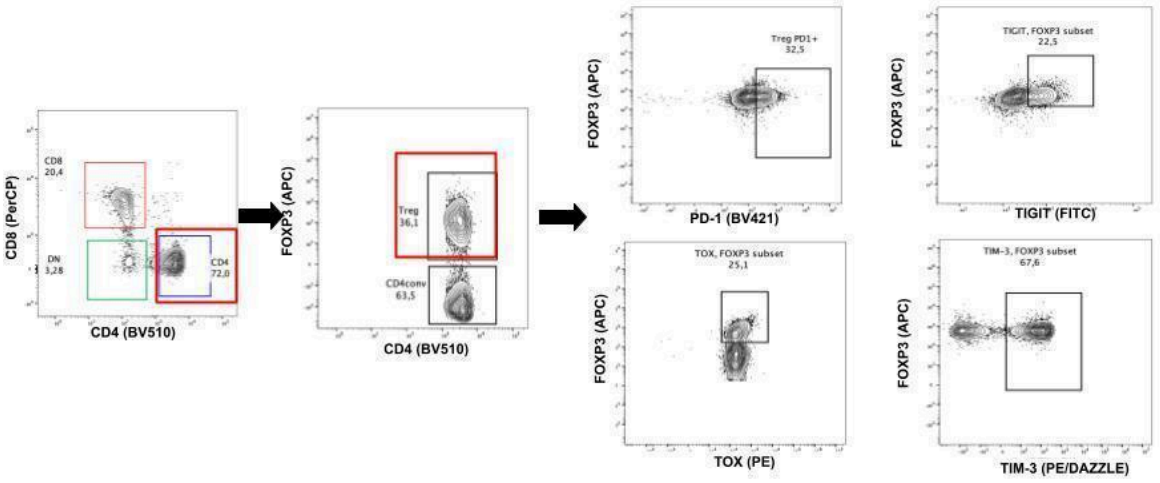
Figura 12 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células T CD4conv





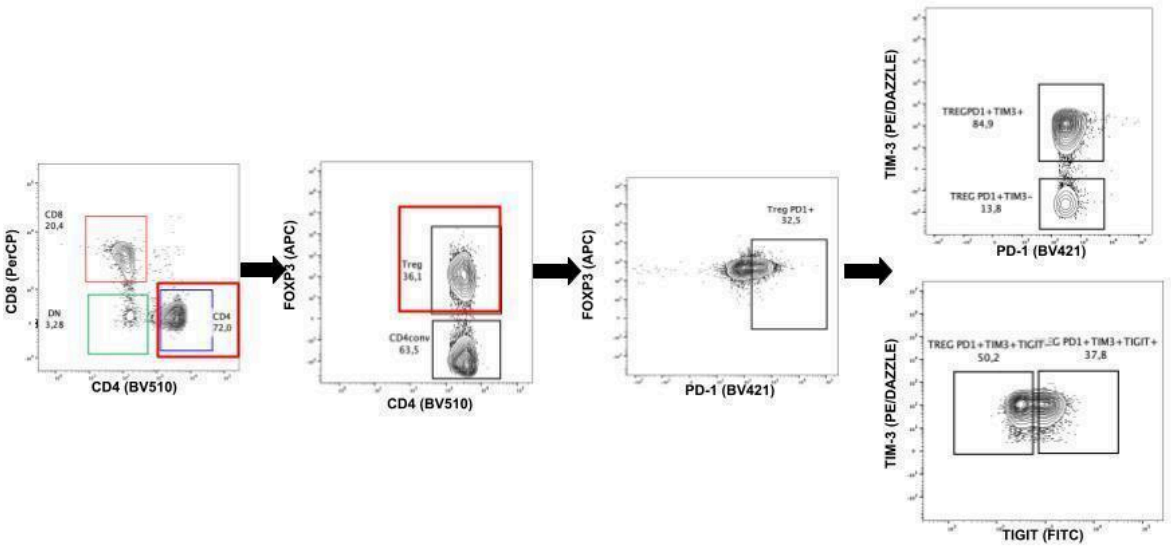
Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

Figura 13 – Estratégia de análise das células Treg



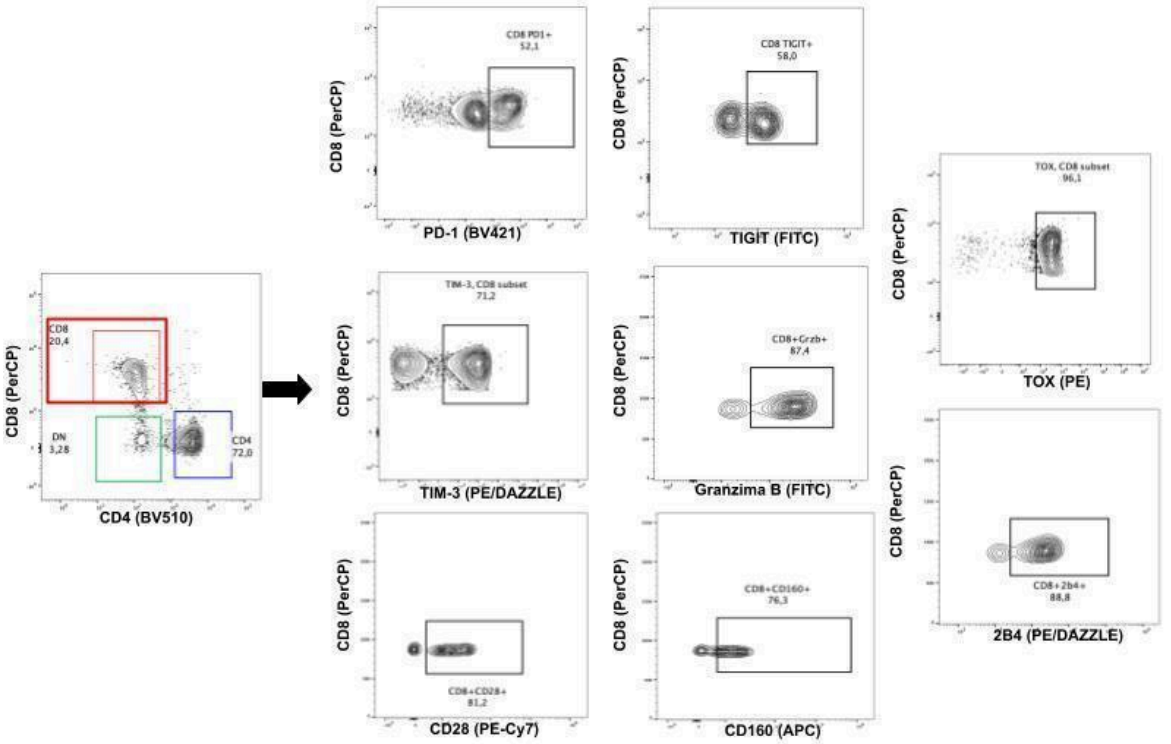
Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

Figura 14 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células Treg



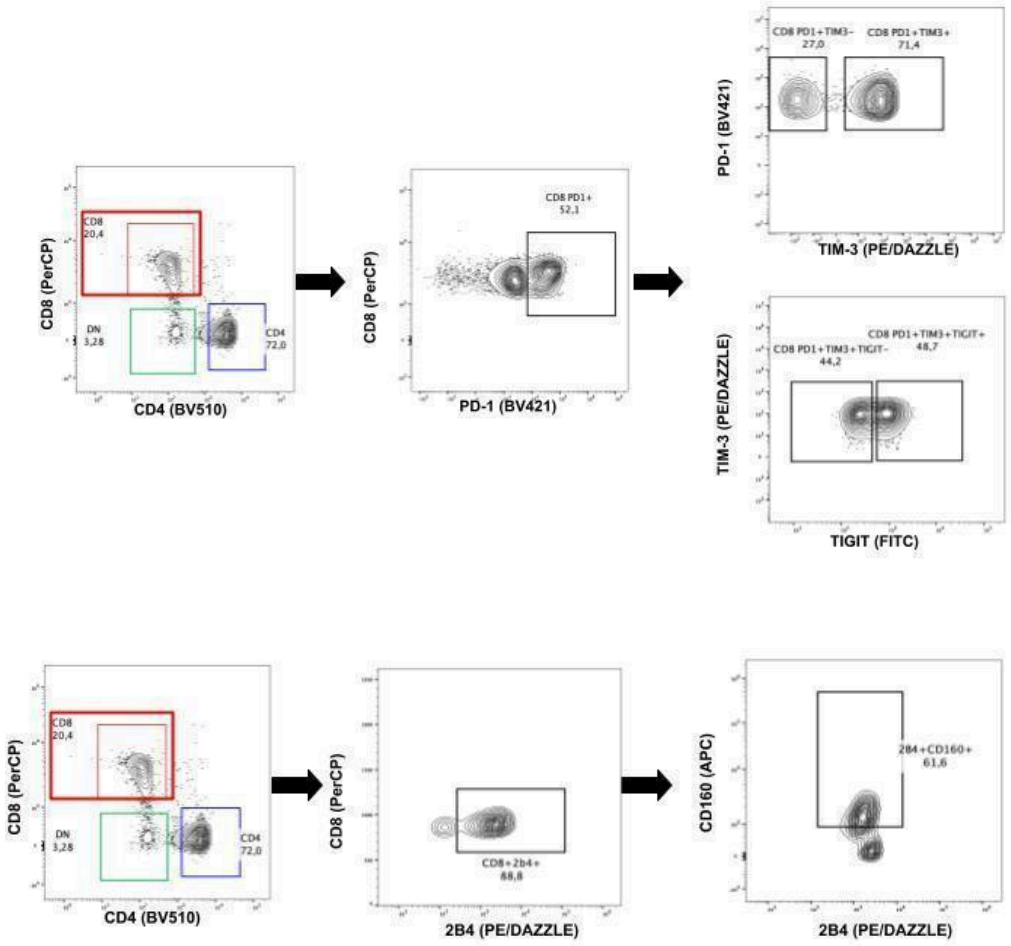
Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

Figura 15 – Estratégia de análise das células T CD8+



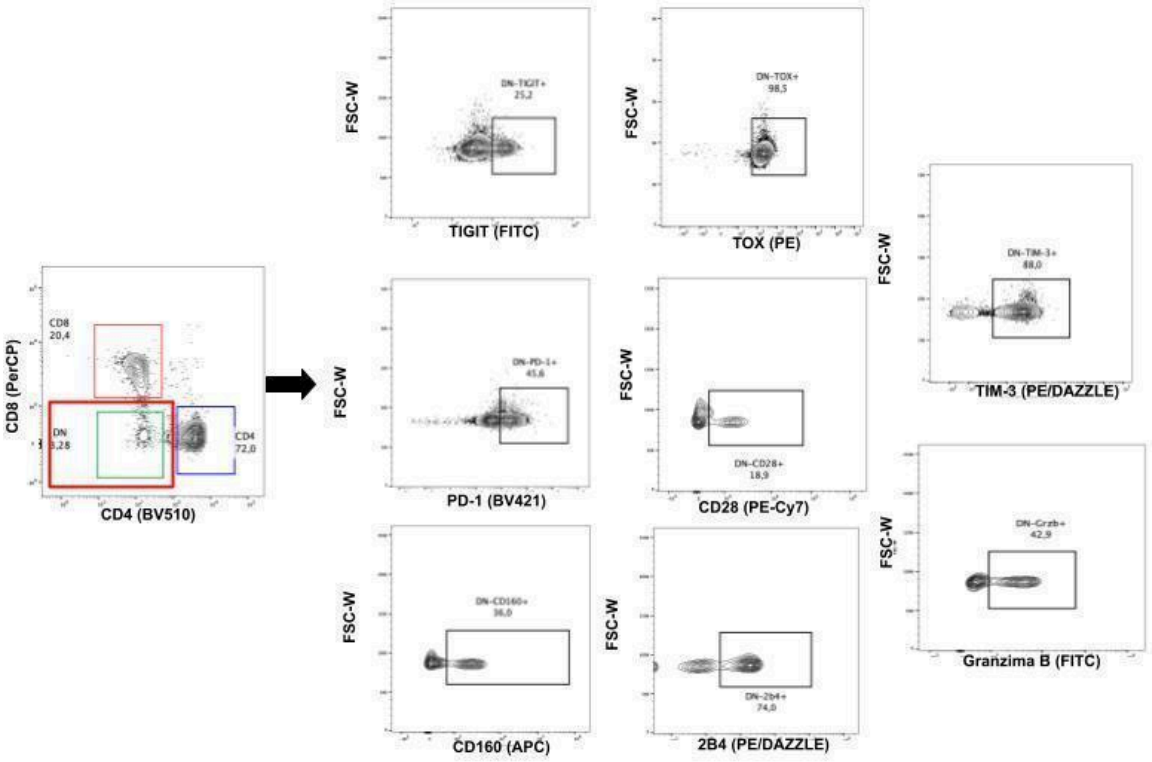
Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

Figura 16 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células T CD8+



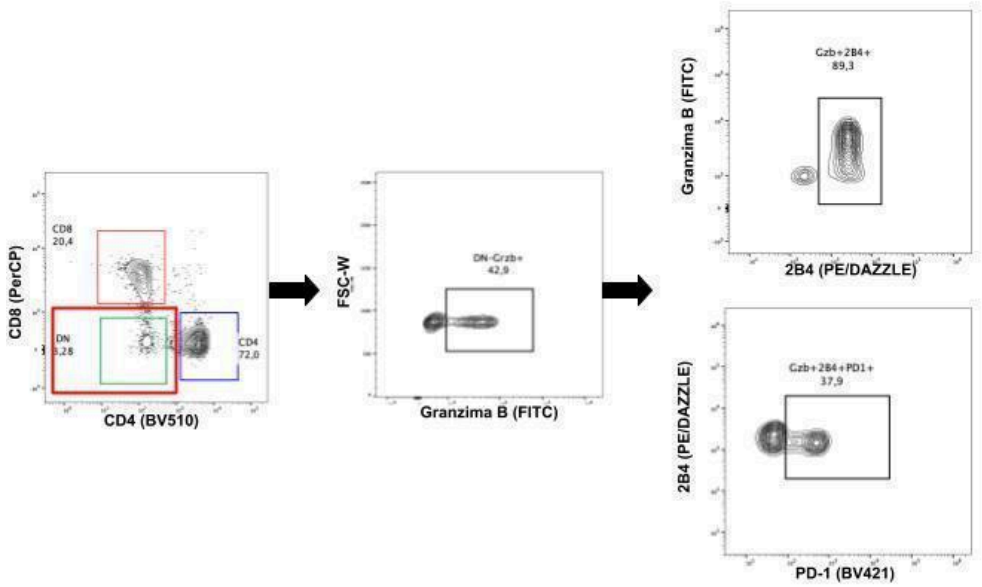
Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

Figura 17 – Estratégia de análise das células T DN



Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

Figura 18 – Estratégia de análise de múltiplas expressões das células T DN



Fonte: Dados obtidos no *software* Flowjo versão 10.9.0.

5.8 ANÁLISE DE DADOS PÚBLICOS DE RNA-seq PARA OS MARCADORES DE INTERESSE

5.8.1 Seleção de dados e pré-processamento

Após busca no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO) (CLOUGH; BARRETT, 2016) pelo termo "*Leishmania braziliensis*" e com a aplicação de filtros que buscassem apenas por amostras humanas que contivessem dados de expressão gênica com contagens brutas provenientes de sequenciamento completo de RNA, o estudo de Amorim e colaboradores com código GSE127831 foi selecionado (AMORIM et al., 2019). O conjunto de dados contendo a matriz de contagens brutas e os metadados foram então importados para o Rstudio com uso da biblioteca GEOquery (DAVIS; MELTZER, 2007), os quais foram padronizados a fim de garantir que as informações da matriz de contagem correspondessem exatamente aos metadados. Posteriormente as contagens foram normalizadas com

uso da biblioteca DESeq2 e do método de estimação dos fatores de tamanho a fim de evitar as diferenças técnicas como as diferenças de profundidade de sequenciamento entre as amostras.

5.8.2 Visualização de genes de interesse

Primeiramente, para avaliar se os dados eram biologicamente representativos e apresentavam um comportamento esperado, foi realizada pelo DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) a análise de genes diferencialmente expressos com os valores sendo filtrados para um p ajustado < 0,05. Posteriormente, com uso da biblioteca ComplexHeatmap (GU, 2022) para visualizar a expressão dos marcadores de exaustão celular em linfócitos T CD8 (*CD274, TOX, TIGIT, HAVCR2, GZMB, CD28, CD160, LAMP1, CD244 e CD8A*) os quais tiveram seus valores escalonados com uso do método Z-score a fim de melhor destacar as diferenças entre os grupos do estudo.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela versão 9.3.1 do programa GraphPad Prism (Dotmatics). Para verificação de normalidade realizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Foi realizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney para comparar tendências centrais de amostras independentes e determinar a significância estatística quando as amostras não foram normais e o teste t-student para as amostras que apresentaram normalidade. Todas as conclusões foram tomadas no nível de significância de 5% ($p<0,05$ = estatisticamente significativo).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E SOCIODEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Quarenta e nove pacientes participaram do nosso estudo. Para os ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizamos nove pacientes que apresentaram lesão ativa e não haviam iniciado o esquema terapêutico, fazendo parte do grupo antes do tratamento (AT) do ensaio e quinze pacientes que já haviam finalizado o esquema terapêutico e obtiveram cura clínica, fazendo parte do grupo pós-tratamento (PT). Para os ensaios de cultura celular e dosagem de citocinas por CBA foram utilizados dezoito pacientes AT e sete pacientes PT.

A idade dos pacientes com a doença ativa que fizeram parte do ensaio de citometria de fluxo variou entre 10 e 65 anos, com predominância do sexo masculino (7/9), que apresentaram de 1 à 4 lesões, estando a maioria delas presentes em membros inferiores, com duração entre 20 dias e 3 meses do início da formação da lesão (Quadro 5). Enquanto a idade dos pacientes com a doença ativa que fizeram parte do ensaio de CBA variou entre 4 e 88 anos, com predominância do sexo masculino (12/18), que apresentaram de 1 à múltiplas lesões, estando a maioria delas presentes nos membros inferiores, com duração entre 8 dias e 1 ano (Quadro 7).

Todos os pacientes foram diagnosticados pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE por meio de pesquisa direta, punção aspirativa de borda de lesão, biópsia, reação em cadeia de polimerase (PCR) e/ou imunofluorescência indireta (IFI)pesquisa direta e PCR de amostras de swab da lesão, sangue e saliva, levando em consideração também as características clínicas e epidemiológicas.

A idade dos pacientes pós-tratamento que participaram do ensaio de citometria de fluxo variou entre 15 e 65 anos, com predominância do sexo masculino (13/15), com o tempo de coleta após o tratamento variando entre 2 meses a 3 anos e 5 meses (Quadro 6). A idade dos pacientes pós-tratamento que participaram do ensaio de CBA variou entre 19 e 37 anos, predominantemente do sexo masculino (4/7) (Quadro 8).

Os controles foram compostos por dezesseis indivíduos saudáveis para o ensaio de citometria de fluxo e dezessete indivíduos saudáveis para o ensaio de CBA. Os indivíduos não possuíam histórico prévio de LC e eram residentes de áreas não endêmicas, com idade entre 18 e 51 anos.

Quadro 5 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes antes do tratamento incluídos no ensaio de citometria de fluxo (imunofenotipagem).

Paciente	Sexo	Idade	Município de residência	Profissão	Local da lesão	Tempo da lesão	Nº de lesões
1	M	54 anos	Jaboatão dos Guararapes	Aposentado	MID	2 meses	01
2	M	31 anos	São Lourenço	Mecânico industrial	MID	2 meses	01
3	M	58 anos	Recife	Empresário	Face direita	+/- 3 meses	01
4	M	17 anos	Moreno	Estudante	Inguinal	+ 1 mês	01
5	F	55 anos	Belo Jardim	Do lar - Agricultora	Olho, MSD (2x), MSE	+/- 3 meses	04
6	M	65 anos	Aldeia	Engenheiro	MID	2 meses	01
7	F	63 anos	Aldeia	Economista	MSE	20 dias	01
8	M	45 anos	Moreno	-	-	-	-
9	M	10 anos	Moreno	-	-	-	-

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Legenda: F: feminino; M: masculino; MSD: membro superior direito; MSE: membro superior esquerdo; MID: membro inferior direito; MIE: membro inferior esquerdo.

Quadro 6 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes pós-tratamento incluídos no ensaio de citometria de fluxo.

Paciente	Sexo	Idade	Município de residência	Profissão	Tempo de coleta após tratamento	Localização da cicatriz
10	M	25 anos	Moreno	Motoboy	11 meses	MIE
11	M	15 anos	Moreno	Estudante	1 ano e 8 meses	Nariz
12	M	16 anos	Moreno	Estudante	1 ano e 3 meses	MID
13	M	65 anos	Moreno	Agricultor	9 meses	MSD, MID, cabeça, tronco
14	M	46 anos	Moreno	Militar	1 ano e 7 meses	Abdômen
15	M	33 anos	Moreno	Operador	2 meses	MSD
16	M	-	-	-	1 ano	-
17	M	56 anos	Moreno	-	1 ano e 3 meses	-
18	M	-	-	-	3 anos e 5 meses	-
19	M	-	-	-	1 ano e 1 mês	-

20	M	-	-	-	9 meses	-
21	M	-	-	-	6 meses	-
22	M	-	-	-	6 meses	-
23	F	-	-	-	5 meses	-
24	F	-	-	-	9 meses	-

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Legenda: F: feminino; M: masculino; MSD: membro superior direito; MID: membro inferior direito; MIE: membro inferior esquerdo.

Quadro 7 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes antes do tratamento incluídos no ensaio de CBA.

Paciente	**Sexo**	**Idade**	**Município de residência**	**Profissão**	**Local da lesão**	**Tempo da lesão**	**Nº de lesões**
25	M	15 anos	Moreno	Estudante	-	-	2
26	M	39 anos	Moreno	Agricultor		2 meses	2
27	F	72 anos	Bonança	Aposentada	MID	1 mês	1
28	M	28 anos	Moreno	Auxiliar de manutenção	MSE	-	2
29	M	36 anos	Moreno	-	MSD, Face	-	2
30	M	18 anos	Moreno	Desempregado	-	-	-

31	F	44 anos	Moreno	Doceira	MSD	8 dias	1
32	M	29 anos	Igarassu	Operador de máquina	Omoplata	1 mês	1
33	F	30 anos	Igarassu	Do lar	MID	15 dias	3
34	F	31 anos	Igarassu	Do lar	MIE, MSD, Tronco	15 dias	Múltiplas
35	M	40 anos	Igarassu	Frentista	MSD	25 dias	1
36	M	48 anos	Igarassu	Encarregado de produção	MSD	45 dias	1
37	F	4 anos	Igarassu	Estudante	MSD	2 meses	1
38	M	12 anos	Igarassu	Estudante	MID	1 mês	1
39	F	33 anos	Moreno	Agricultora	MIE	1 mês	1
40	M	37 anos	Igarassu	Servente	MSD	1 ano	1
41	M	88 anos	Aldeia	Aposentado	MIE	1 mês	2
42	M	17 anos	Moreno	Estudante	MID	15 dias	1

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Legenda: F: feminino; M: masculino; MSD: membro superior direito; MSE: membro superior esquerdo; MID: membro inferior direito; MIE: membro inferior esquerdo.

Quadro 8 - Aspectos clínicos e sociodemográficos dos pacientes pós-tratamento incluídos no ensaio de CBA.

Paciente	Sexo	Idade	Município de residência	Profissão
43	M	28 anos	Igarassu	-
44	F	22 anos	Igarassu	Do lar
45	F	47 anos	Igarassu	Agricultora
46	M	37 anos	Igarassu	Aviarista
47	M	23 anos	-	-
48	M	19 anos	-	-
49	F	42 anos	-	-

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Legenda: F: feminino; M: masculino.

6.2 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS T CD4conv E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

Avaliamos, *ex vivo,* o percentual de células T CD4+, bem como os percentuais dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 nessas células CD4conv, em três grupos distintos de indivíduos: controles saudáveis, pacientes com LC antes do tratamento e pacientes com LC pós-tratamento.

Ao analisar a frequência percentual do receptor PD-1 expresso pelas células T CD4conv, verificamos valores significativamente maiores no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0081) como também pelo grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0054) (Figura 19B). Além disso, também avaliamos as células T CD4conv que co-expressam PD-1^{+}TIM-3^{+} e PD-1^{-}TIM-3^{-}. As células T CD4conv que co-expressam PD-1^{+}TIM-3^{+}

não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 19C), diferente das células T CD4conv que co-expressam PD-1^{+}TIM-3^{-}, no qual observamos um aumento percentual significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0001), como também no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0071) (Figura 19D). Além disso, quando incorporamos o receptor inibitório TIGIT na análise das células T CD4conv que co-expressam PD-1^{+}TIM-3^{+}TIGIT^{+}, observou-se um aumento significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0015) como também quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0016). As demais análises não foram significativas (Figura 19E).

Em relação ao receptor TIGIT pelas células T CD4conv, observamos um aumento da frequência percentual estatisticamente significativo tanto no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0011), como também quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0018) (Figura 19G).

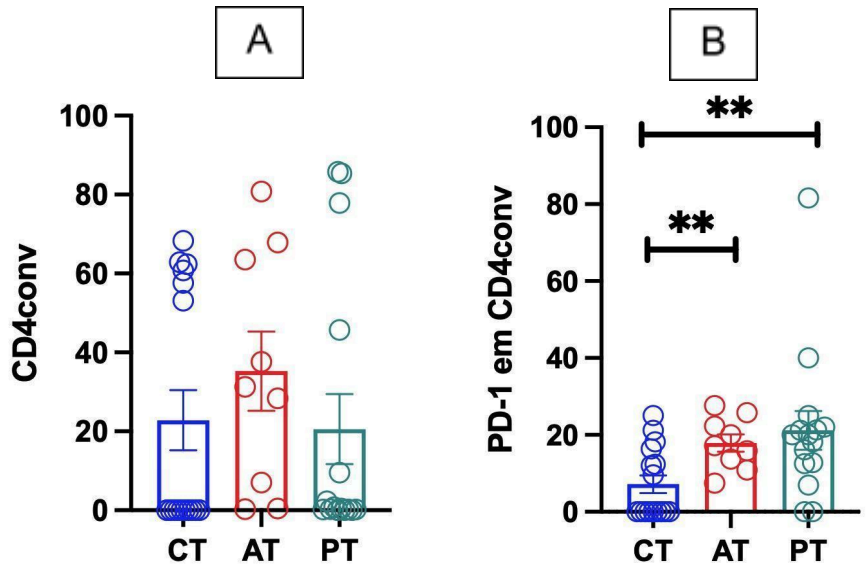
Na avaliação da frequência percentual do fator de transcrição TOX nas células T CD4conv, observamos que o grupo antes do tratamento apresentou um aumento percentual significativamente maior quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0004) (Figura 19I).

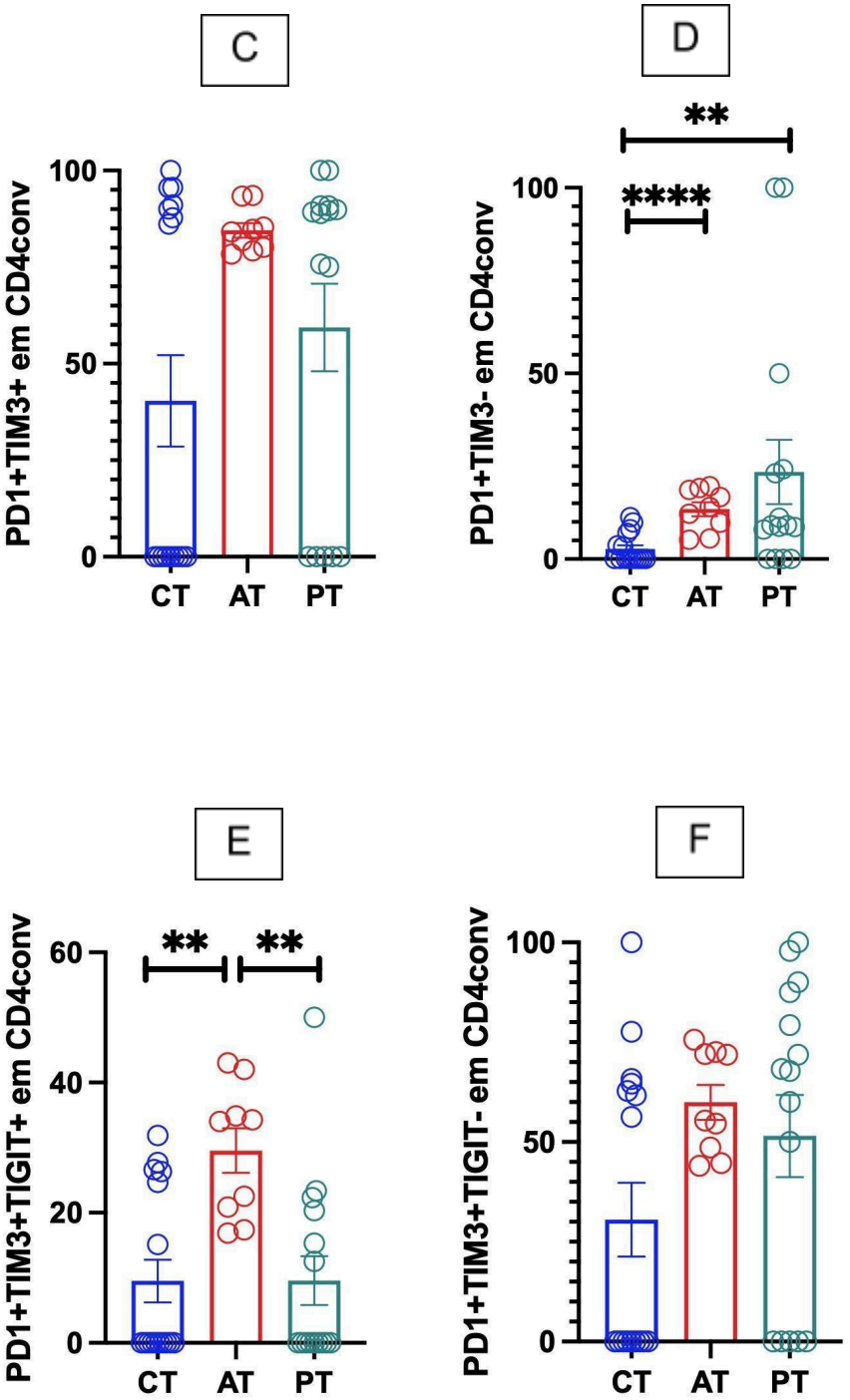
Considerando que algumas populações de células CD4 também podem apresentar um caráter citotóxico (COVRE et al., 2024). dessa forma, decidimos investigar a correlação entre receptores inibitórios e a expressão de Granzima B. Na análise da frequência percentual de Granzima B pelas células T CD4conv, notamos um aumento estatisticamente significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0044), e uma diminuição significativa do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0494) (Figura 19K). Além disso, também avaliamos as células T CD4conv que co-expressam os marcadores Granz^{+}2B4^{+} (Figura 19L), no entanto não foi observada nenhuma significância estatística relevante. Já ao avaliarmos a frequência percentual de Granz^{+}2B4^{+}PD-1^{+} pelas células T CD4conv, observamos uma diminuição significativamente relevante no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0356) (Figura 19M).

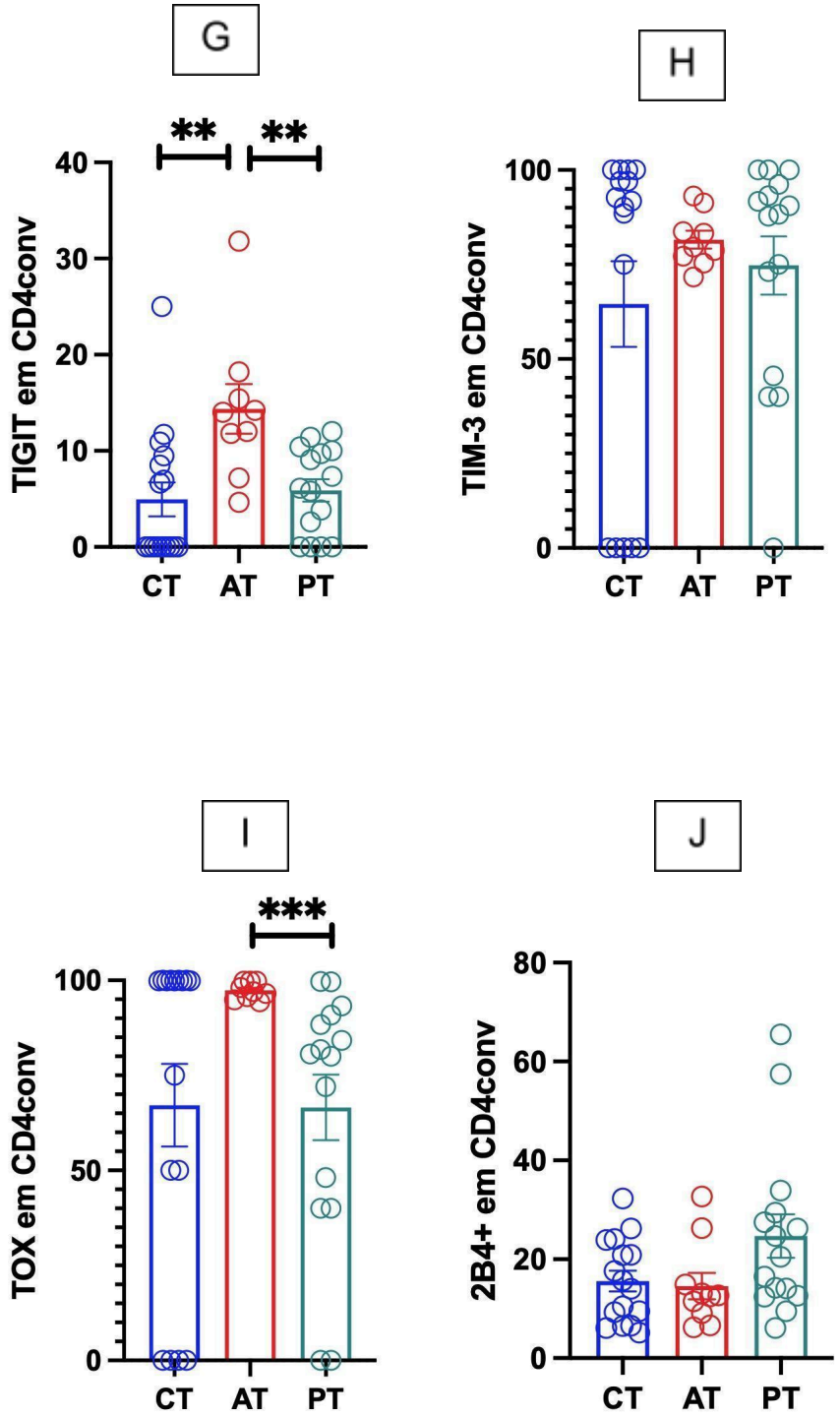
Por fim, o receptor CD160, cuja expressão nas células T CD4conv foi avaliada devido ao seu potencial envolvimento em mecanismos de regulação imune, mostrou uma diminuição percentual estatisticamente significativa no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0140), um aumento significativamente relevante no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0131) e no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0011) (Figura 19O).

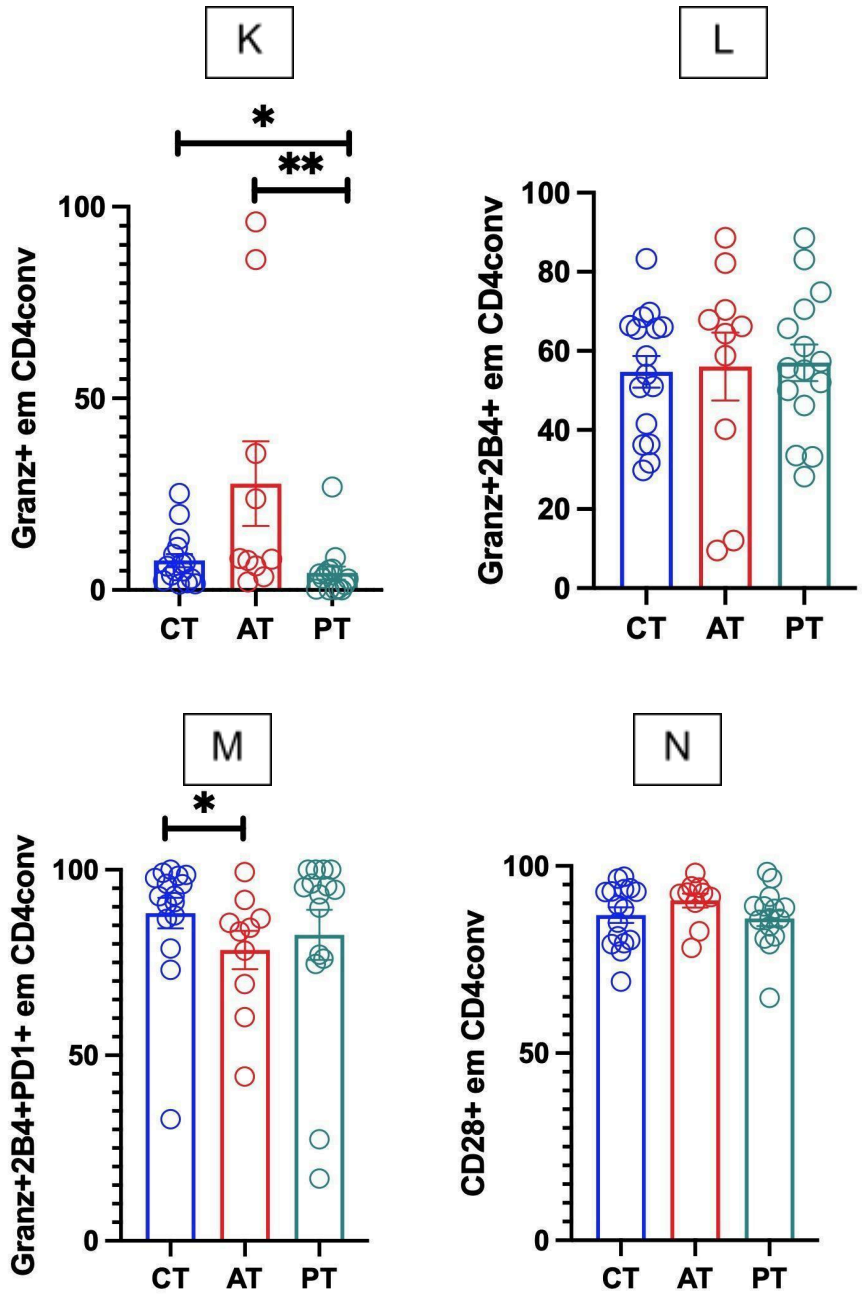
A frequência percentual das células T CD4conv gerais (Figura 19A), juntamente com os demais receptores (2B4 e CD28 (Figuras 19J e 19N)), não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados os grupos controles, antes do tratamento e pós-tratamento.

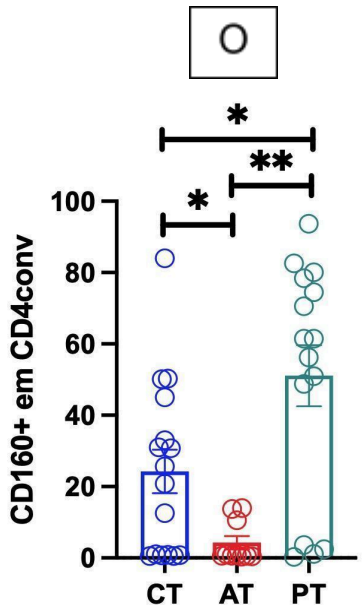
Figura 19 - Expressão percentual dos receptores PD-1, PD1+TIM3+, PD1+TIM3-, PD1+TIM3+TIGIT+, PD1+TIM3+TIGIT-, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, GRANZ+2B4+, GRANZ+2B4+PD1+, CD28, CD160 em células T CD4 convencionais




C
PD1+TIM3+ em CD4conv
100
50
0
CT
AT
PT
D
PD1+TIM3- em CD4conv
**
****
100
50
0
CT
AT
PT
E
PD1+TIM3+TIGIT+ em CD4conv
**
**
60
40
20
0
CT
AT
PT
F
PD1+TIM3+TIGIT- em CD4conv
100
50
0
CT
AT
PT


G
**
**
TIGIT em CD4conv
40
30
20
10
0
CT
AT
PT
H
TIM-3 em CD4conv
100
50
0
CT
AT
PT
I
***
TOX em CD4conv
100
50
0
CT
AT
PT
J
2B4+ em CD4conv
80
60
40
20
0
CT
AT
PT


K
*
**
100
50
0
Granz+ em CD4conv
CT
AT
PT
L
100
80
60
40
20
0
Granz+2B4+ em CD4conv
CT
AT
PT
M
*
100
50
0
Granz+2B4+PD1+ em CD4conv
CT
AT
PT
N
100
50
0
CD28+ em CD4conv
CT
AT
PT



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,005, *** p ≤ 0,0005, **** p ≤ 0,0001.

6.3 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS T REGULORAS (Treg) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

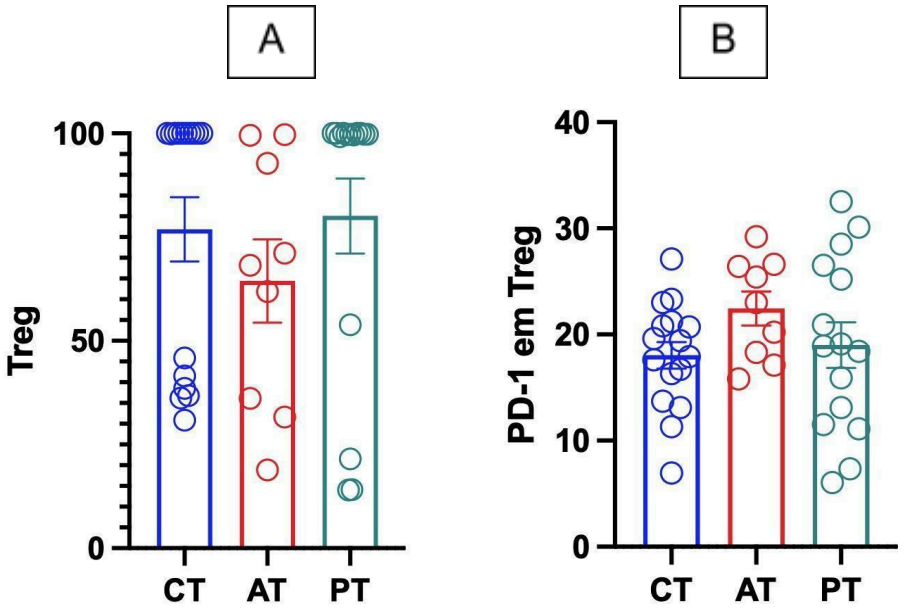
Avaliamos, *ex vivo,* o percentual de células T regulatórias (Treg), bem como os percentuais da expressão dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3 e o fator de transcrição TOX. Ao avaliarmos a expressão percentual do receptor de superfície PD-1 pelas células Treg não observamos nenhum aumento significativamente relevante. No entanto, ao avaliarmos a co-expressão de PD-1^{+}TIM-3^{+} pelas células Treg com o intuito de verificar se há exaustão funcional, condição observada em infecções crônicas, observamos uma diminuição percentual significativa dessa co-expressão no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0264) (Figura 20C), enquanto na expressão de PD-1^{+}TIM-3^{-} observamos um aumento percentual significante no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0139) (Figura 20D). Entretanto, pode-se observar um cenário diferente ao avaliar a co-expressão dos receptores PD-1^{+}TIM-3^{+}TIGIT^{+} pelas células

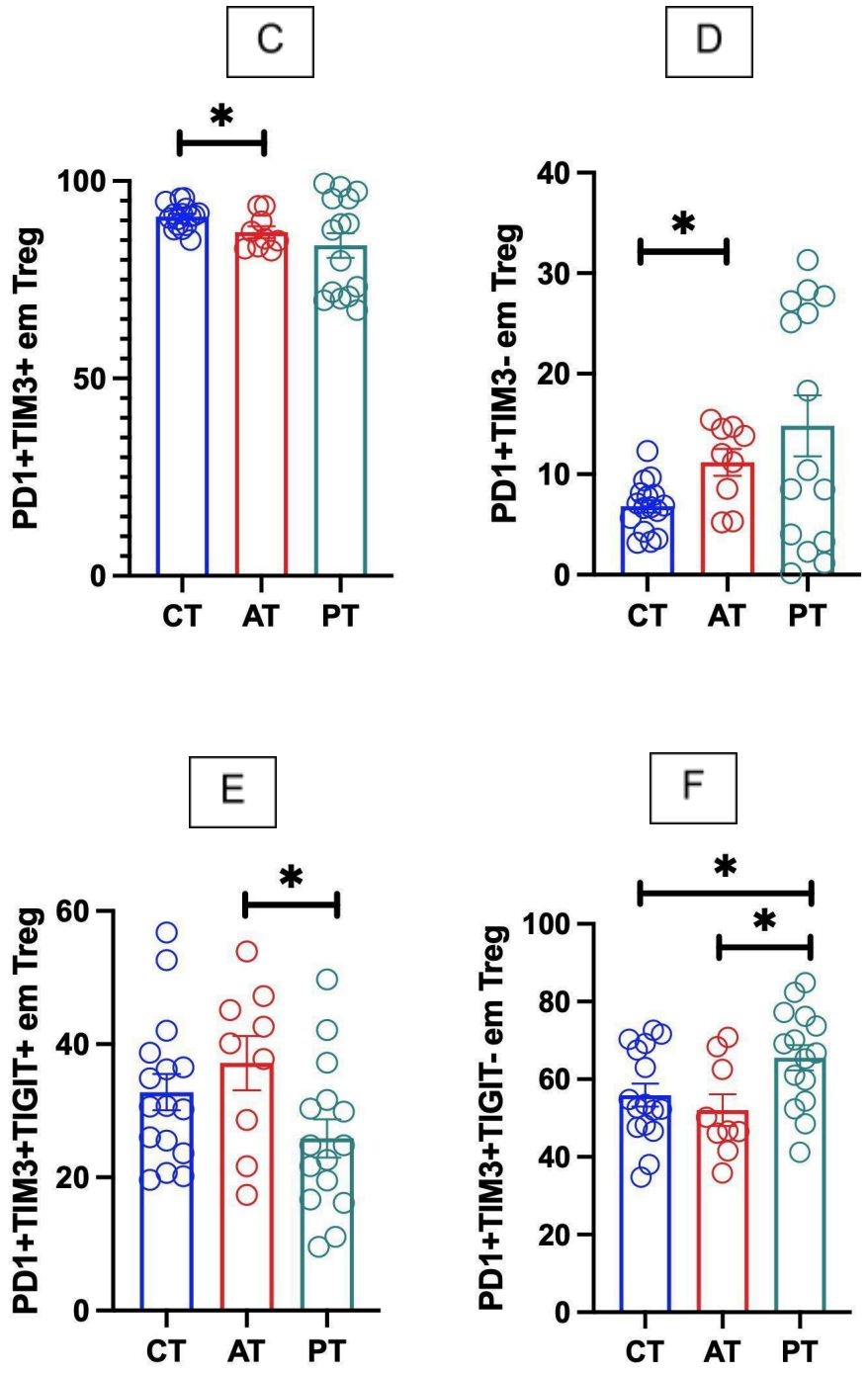
Treg, no qual observamos um aumento percentual significativo desses receptores no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0424) (Figura 20E). Na avaliação de PD-1^{+}TIM-3^{+}TIGIT^{-} pelas células Treg, observamos um aumento percentual significativo pelo grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0251) e quando comparado ao grupo controle (p=0,0494) (Figura 20F).

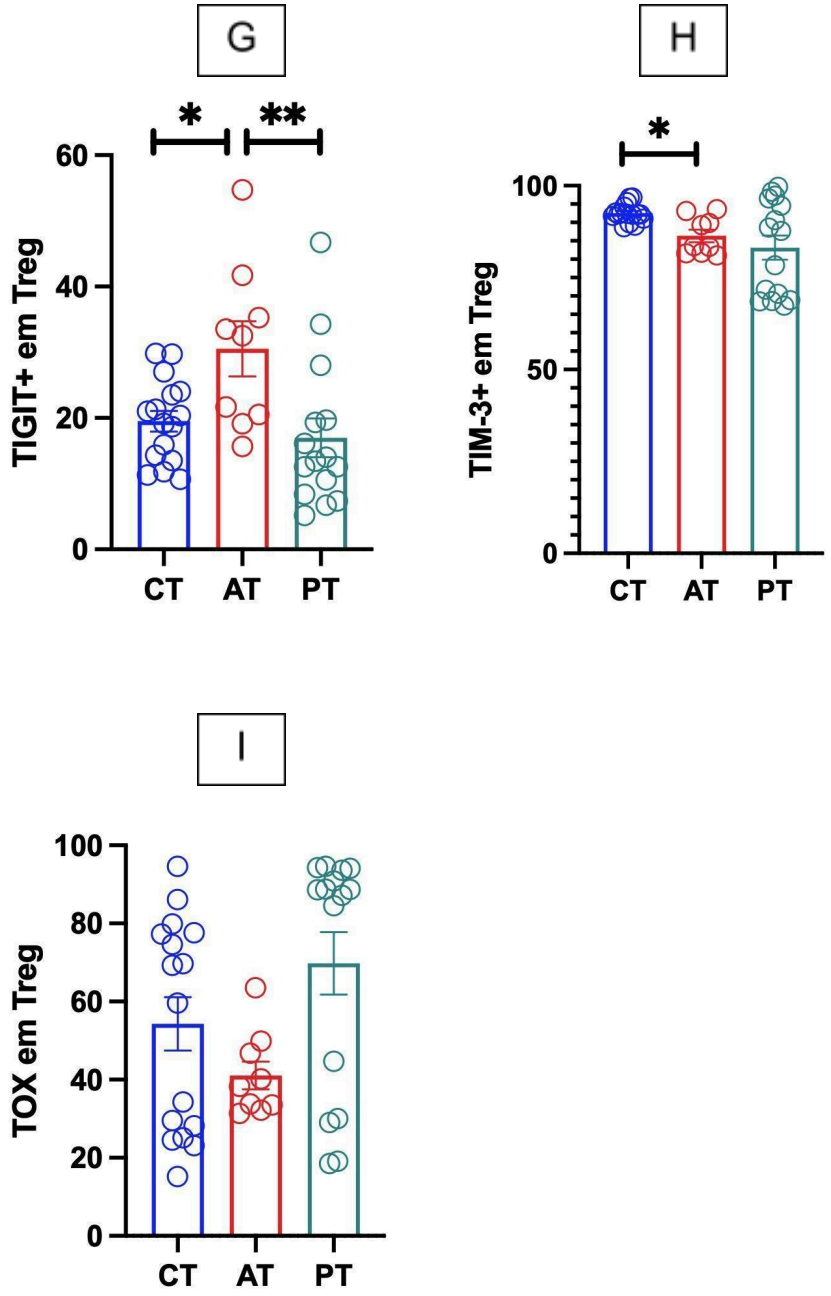
Observamos que o percentual de células Treg expressando o receptor TIGIT foi significantemente maior no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0231) e quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0064) (Figura 20G). Na avaliação da expressão percentual de TIM-3, pelas células Treg, verificamos uma diminuição estatisticamente significativa no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0138) (Figura 20H).

A expressão percentual das células T Treg gerais (Figura 20A), juntamente com a expressão percentual de TOX (Figura 20I), não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados os grupos controles, antes do tratamento e pós-tratamento.

Figura 20 - Expressão percentual dos receptores PD-1, PD1+TIM3+, PD1+TIM3-, PD1+TIM3+TIGIT+, PD1+TIM3+TIGIT-, TIGIT, TIM-3 e TOX em células T reguladoras




C
D
E
F
PD1+TIM3+ em Treg
PD1+TIM3- em Treg
PD1+TIM3+TIGIT+ em Treg
PD1+TIM3+TIGIT- em Treg
CT
AT
PT
*



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,005, *** p ≤ 0,0005, **** p ≤ 0,0001.

6.4 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS T CD8+ E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

Avaliamos, *ex vivo,* o percentual de células T $CD8^+$, bem como os percentuais da frequência dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160. Não foi observado aumento estatisticamente significativo no percentual de células T $CD8^+$ quando comparados os grupos controles, antes do tratamento e pós-tratamento (Figura 21A). Também não observamos diferença estatisticamente relevante quando avaliamos o receptor de superfície $PD\text{-}1^+$, co-expressão de $PD\text{-}1^+TIM\text{-}3^+$, $PD\text{-}1^+TIM\text{-}3^-$ e nem na co-expressão de $PD\text{-}1^+TIM\text{-}3^+TIGIT^+$ e $PD\text{-}1^+TIM\text{-}3^+TIGIT^-$ pelas células T $CD8^+$ (Figuras 21E-F).

Na avaliação da frequência percentual de TIGIT pelas células T $CD8^+$, observamos um aumento estatisticamente significativo no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0457$) (Figura 21G). Ao avaliar a frequência percentual do fator de transcrição TOX, observamos uma diminuição estatisticamente significativa no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0303$), como também no grupo pós-tratamento ($p=0,0009$) (Figura 21I). Ainda na avaliação das células T $CD8^+$, observamos um aumento estatisticamente significativo na frequência percentual do receptor 2B4 no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0020$) (Figura 21J). Além disso, também avaliamos a co- expressão de $2B4^+CD160^+$ por essas células, devido ao papel dessas moléculas na regulação da função citotóxica das células T $CD8^+$, e observamos um aumento significativamente relevante no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento ($p=0,0044$) (Figura 21K). Em adição, avaliou-se a co-expressão de $2B4^+CD160^+$ em células expressando o receptor Granzima B ($2B4^+CD160^+Granz^+$) e observamos um aumento significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento ($p=0,0023$) e uma diminuição significativa do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0366$) (Figura 21L).

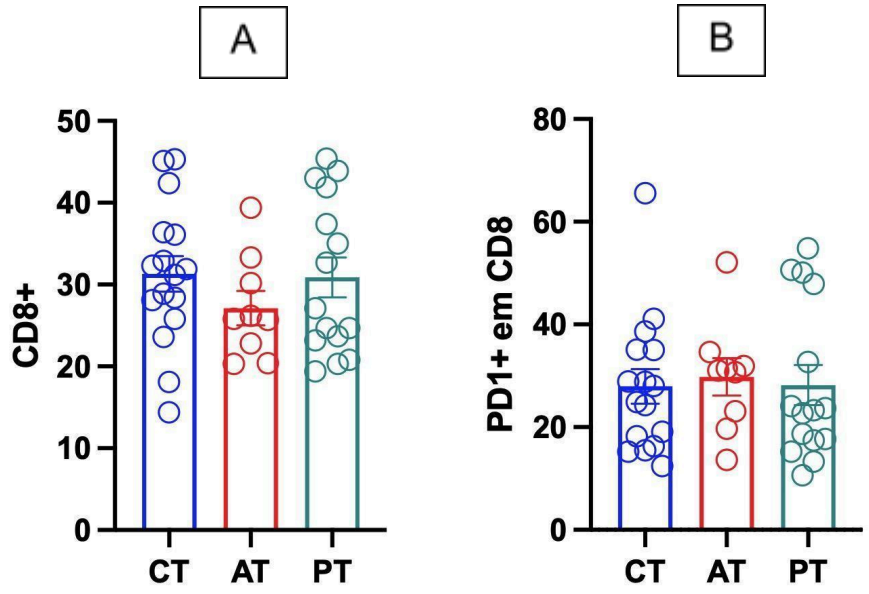
Ao avaliarmos a frequência percentual de Granzima B pelas células T $CD8^+$, observamos um aumento significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento ($p=0,0264$) (Figura 21M). Além disso, também avaliamos a co-expressão de $Granz^+2B4^+$ e co-expressão de $Granz^+2B4^+PD\text{-}1^+$, com o objetivo de investigar possíveis alterações na citotoxicidade e na regulação da

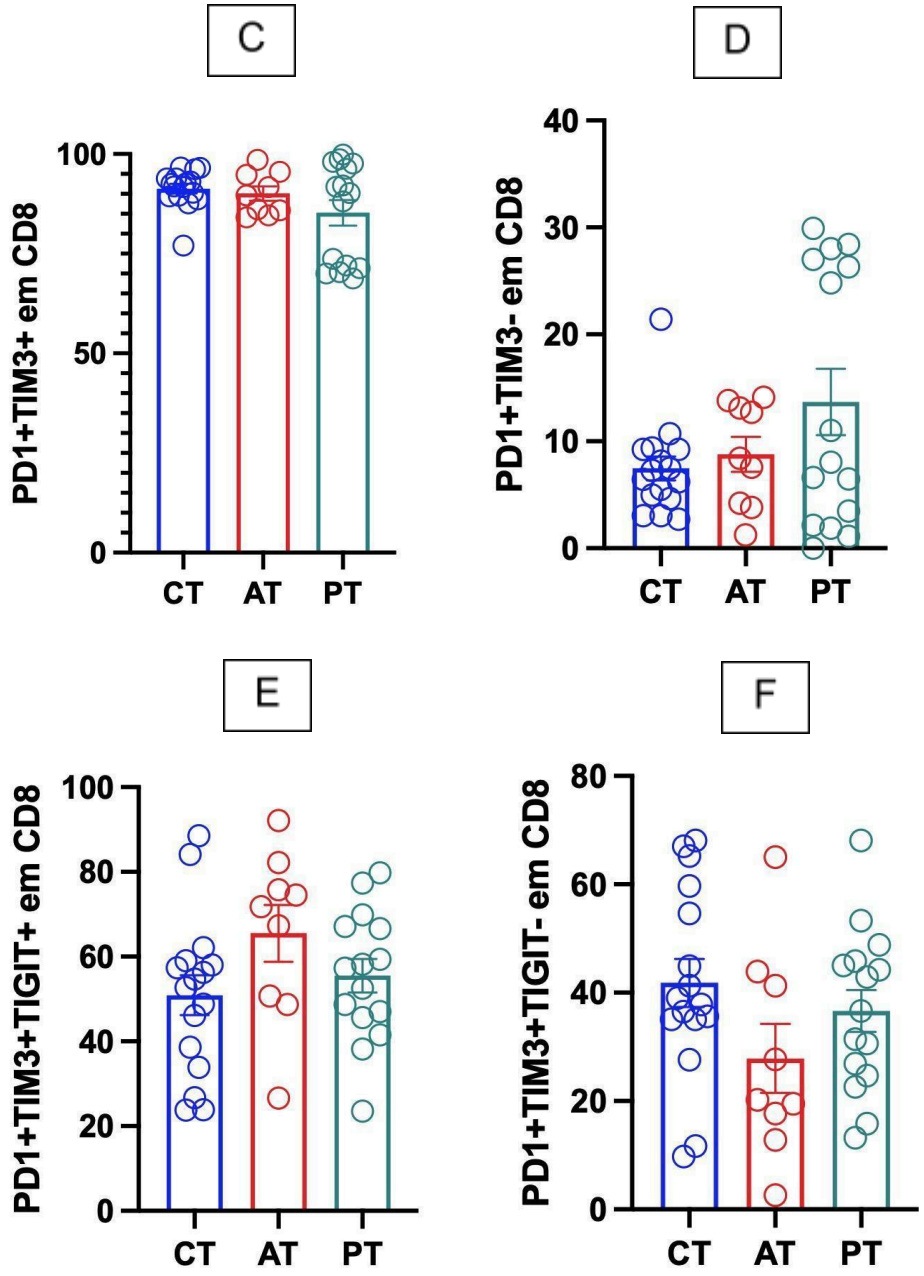
resposta imune, pelas células T CD8$^+$ no intuito de investigar alterações citotóxicas e na regulação da resposta imune, no entanto não apresentaram nenhuma significância estatisticamente relevante (Figura 21N-O).

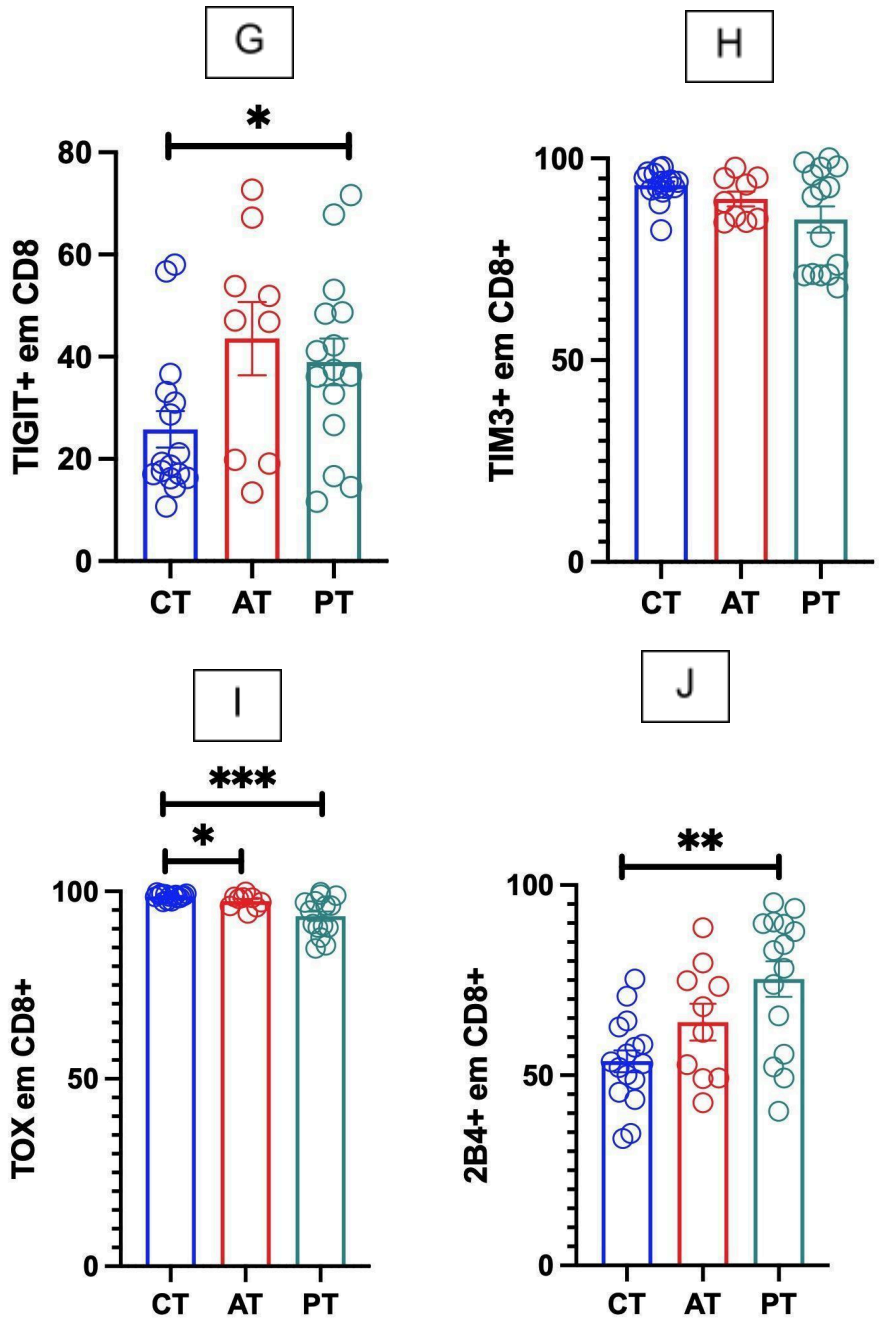
Na avaliação do receptor CD28 pelas células T CD8$^+$, observamos uma diminuição da frequência significativamente relevante no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0015) (Figura 21P).

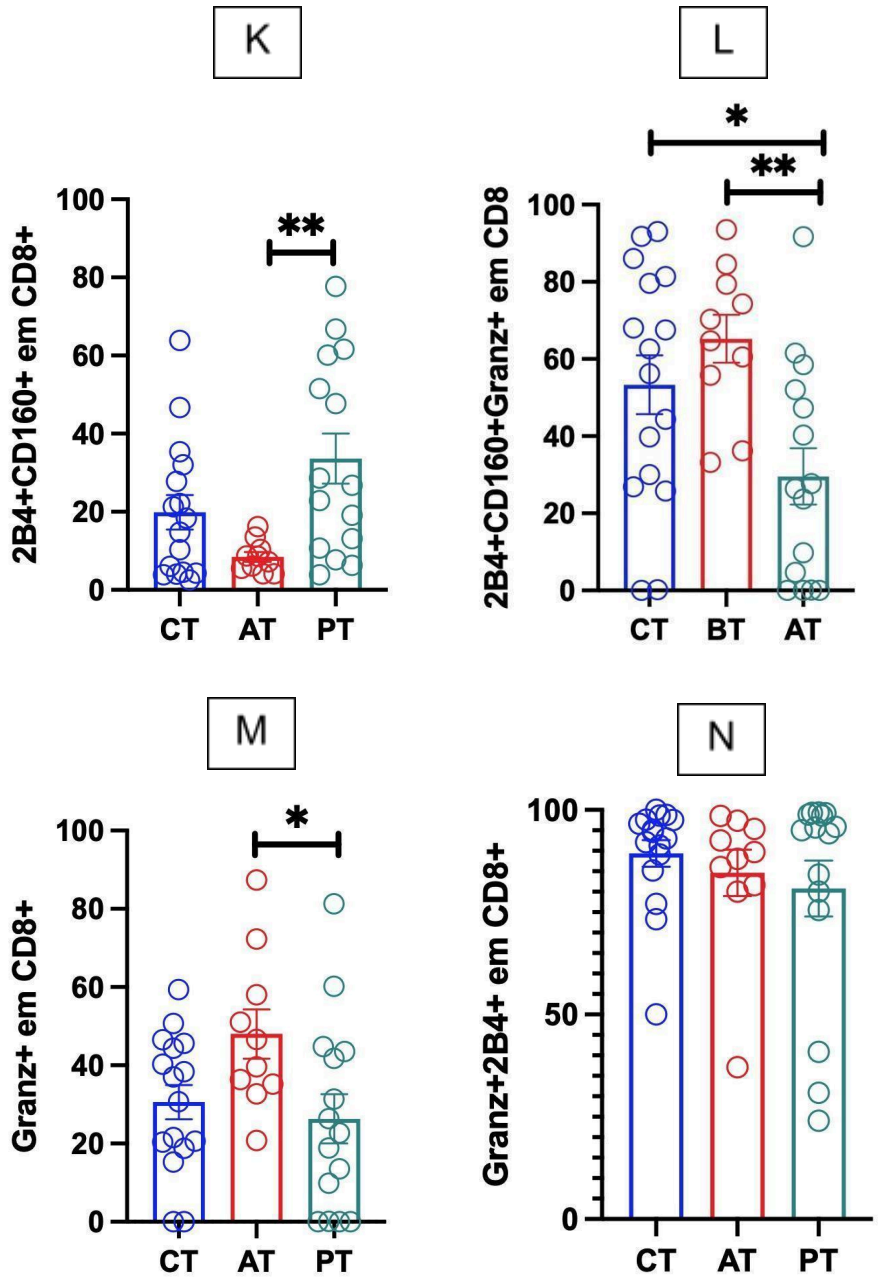
Finalizamos avaliando a expressão de CD160 pelas células T CD8$^+$, onde observamos um aumento estatisticamente significativo no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0448), como também quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0029) (Figura 21Q).

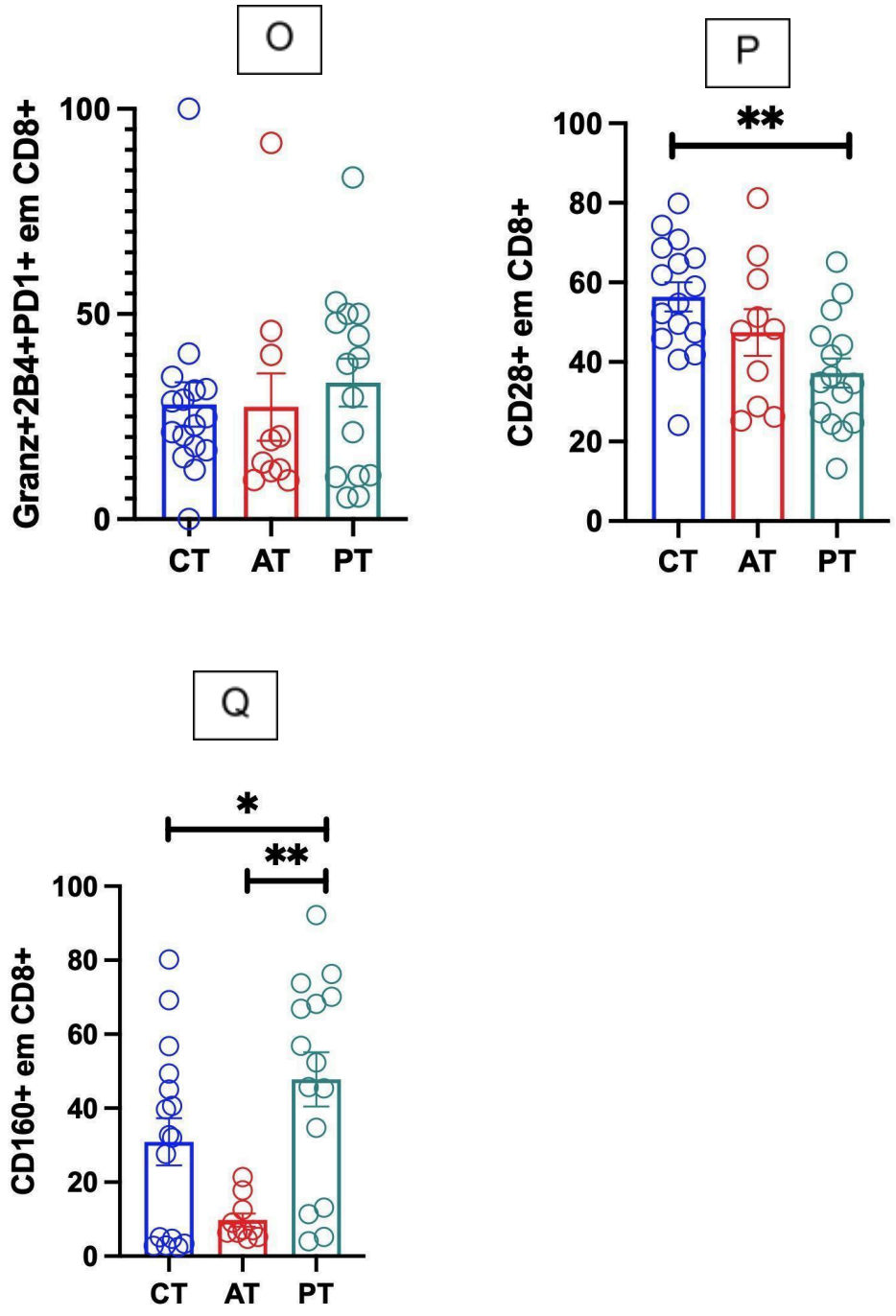
Figura 21 - Expressão percentual dos receptores PD-1, PD1+TIM3+, PD1+TIM3-, PD1+TIM3+TIGIT+, PD1+TIM3+TIGIT-, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, 2B4+CD160+, Granzima B, GRANZ+2B4+, GRANZ+2B4+PD1+, CD28, CD160 em células T CD8+




C
PD1+TIM3+ em CD8
100
50
0
CT
AT
PT
D
PD1+TIM3- em CD8
40
30
20
10
0
CT
AT
PT
E
PD1+TIM3+TIGIT+ em CD8
100
80
60
40
20
0
CT
AT
PT
F
PD1+TIM3+TIGIT- em CD8
80
60
40
20
0
CT
AT
PT


G
*
80
60
40
20
0
TIGIT+ em CD8
CT
AT
PT
H
100
50
0
TIM3+ em CD8+
CT
AT
PT
I
***
*
100
50
0
TOX em CD8+
CT
AT
PT
J
**
100
50
0
2B4+ em CD8+
CT
AT
PT


K
2B4+CD160+ em CD8+
100
80
60
40
20
0
**
CT
AT
PT
L
2B4+CD160+Granz+ em CD8
*
**
CT
BT
AT
M
Granz+ em CD8+
*
CT
AT
PT
N
Granz+2B4+ em CD8+
50
CT
AT
PT



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$.

6.5 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS DUPLO-NEGATIVAS (CD8-CD4-) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

Avaliamos, *ex vivo,* o percentual de células duplo-negativas (DN) bem como os percentuais da frequência dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160. Observamos que houve uma diminuição significativa no percentual de células DN no grupo antes do tratamento (p=0,0116), bem como no grupo pós-tratamento (p=0,0330) quando comparado ao grupo controle (Figura 22A).

Na avaliação da frequência percentual de TIGIT pelas células DN, observamos que houve o aumento estatisticamente significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0014) e do grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0409) (Figura 22C).

Ao avaliar o receptor 2B4 sendo expresso pelas células DN, observamos um aumento percentual estatisticamente significativo no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0375) e quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0019) (Figura 22F).

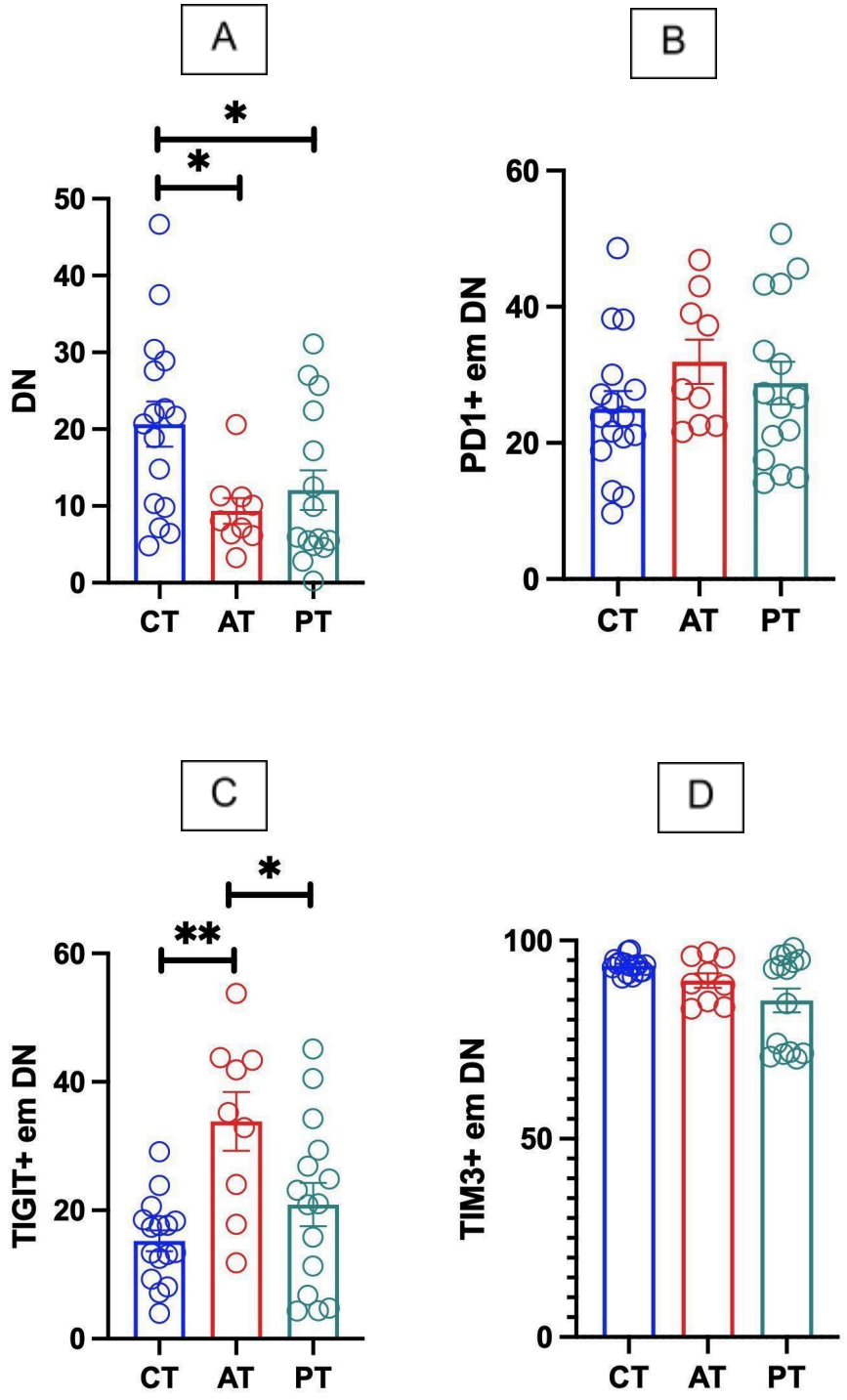
Ao avaliar a molécula Granzima B, não observamos significância quando comparamos o grupo controle, grupo antes do tratamento e o grupo pós-tratamento (Figura 22G). O mesmo aconteceu quando avaliamos a co-expressão de $Granz^{+}2B4^{+}$ e a co-expressão de $Granz^{+}2B4^{+}PD\text{-}1^{+}$ pelas células DN, no qual não observamos nenhuma significância estatisticamente relevante quando comparados os grupos entre si (Figuras 22H-I).

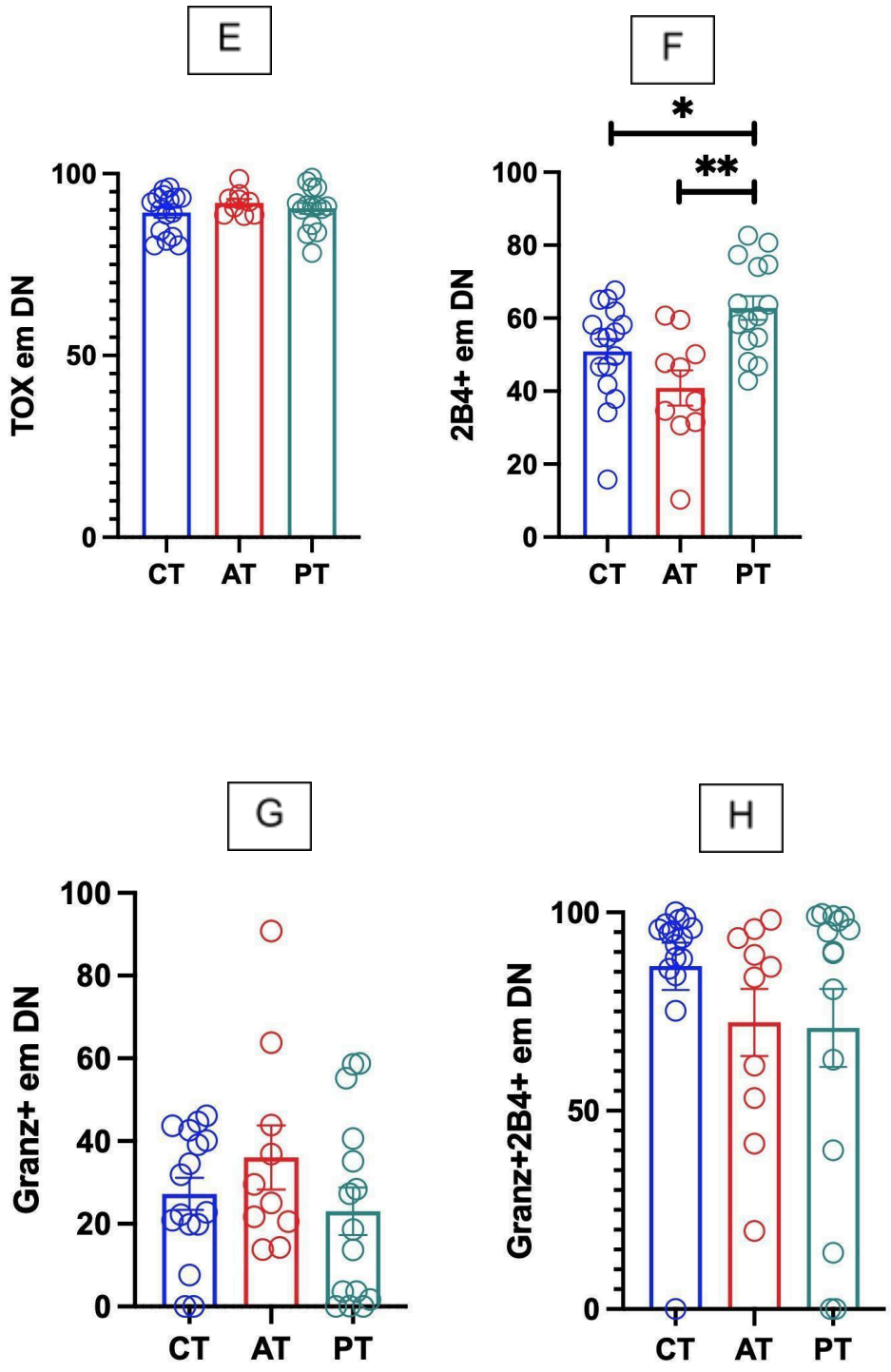
Avaliamos a frequência percentual de CD28 pelas células DN e observamos uma diminuição significativa do grupo antes do tratamento (p=0,0061), como também do grupo pós-tratamento (p=0,0070) quando comparado ao grupo controle (Figura 22J).

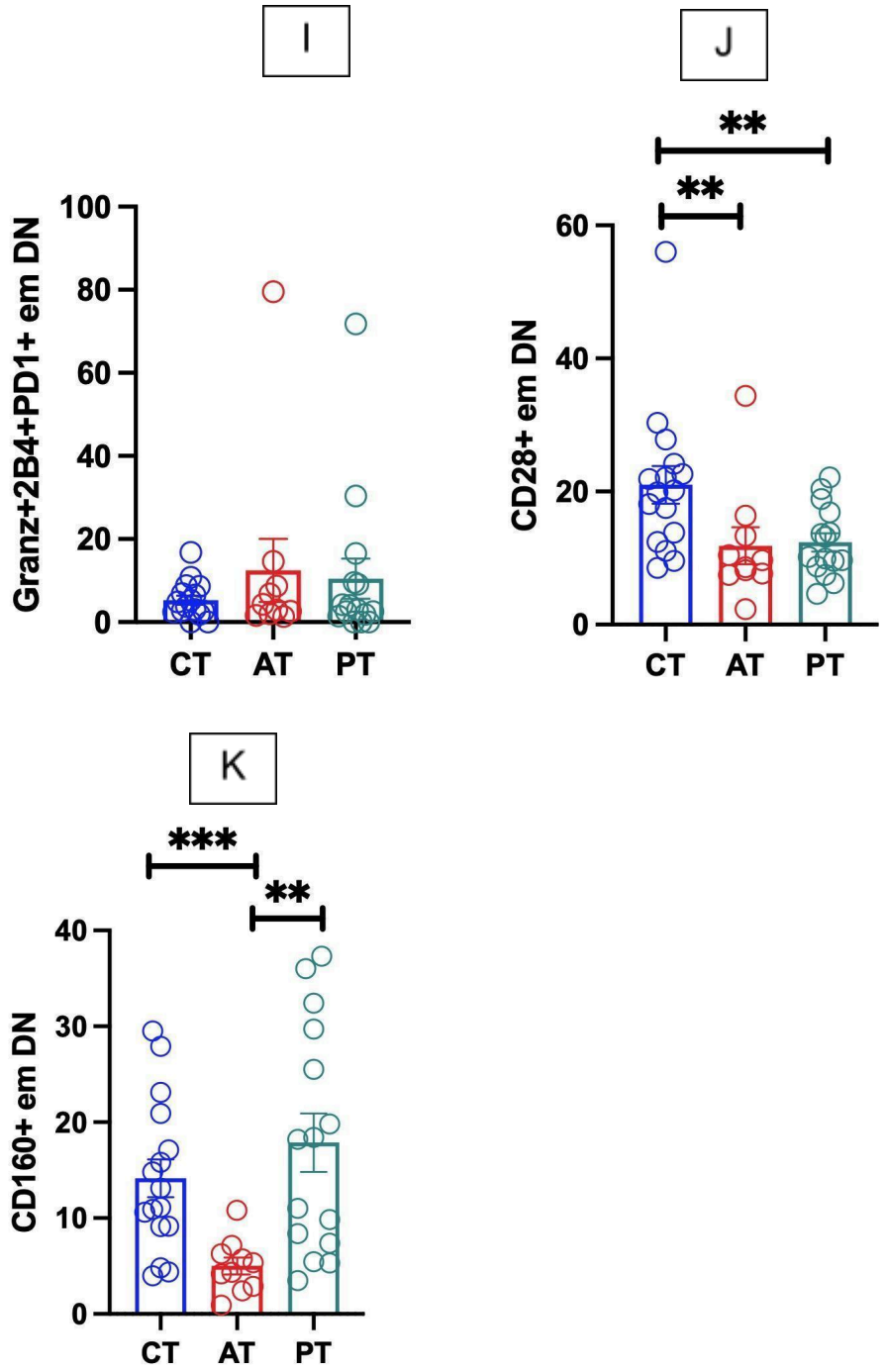
Por fim, ao avaliar a frequência percentual do receptor CD160 pelas células DN, observamos uma diminuição estatisticamente significativa no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0009), e um aumento estatisticamente significativo no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0012) (Figura 22K).

Os demais receptores PD-1, TIM-3 e TOX não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos controles, antes do tratamento e pós-tratamento (Figuras 22B,D,E).

Figura 22 - Expressão dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, GRANZ+2B4+, GRANZ+2B4+PD1+, CD28, CD160 em células T Duplo-Negativas




E
TOX em DN
100
50
0
CT
AT
PT
F
*
**
2B4+ em DN
100
80
60
40
20
0
CT
AT
PT
G
Granz+ em DN
100
80
60
40
20
0
CT
AT
PT
H
Granz+2B4+ em DN
100
50
0
CT
AT
PT



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$.

6.6 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T CD4conv E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

Além da avaliação do percentual das células T CD4conv, também realizamos a análise do MFI (do inglês, *Mean Fluorescence Intensity*) com o intuito de avaliar o estado funcional e a ativação dessas células, para os receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 nessas células CD4conv, em três grupos distintos de indivíduos: controles saudáveis, pacientes com LC antes do tratamento e pacientes com LC pós-tratamento.

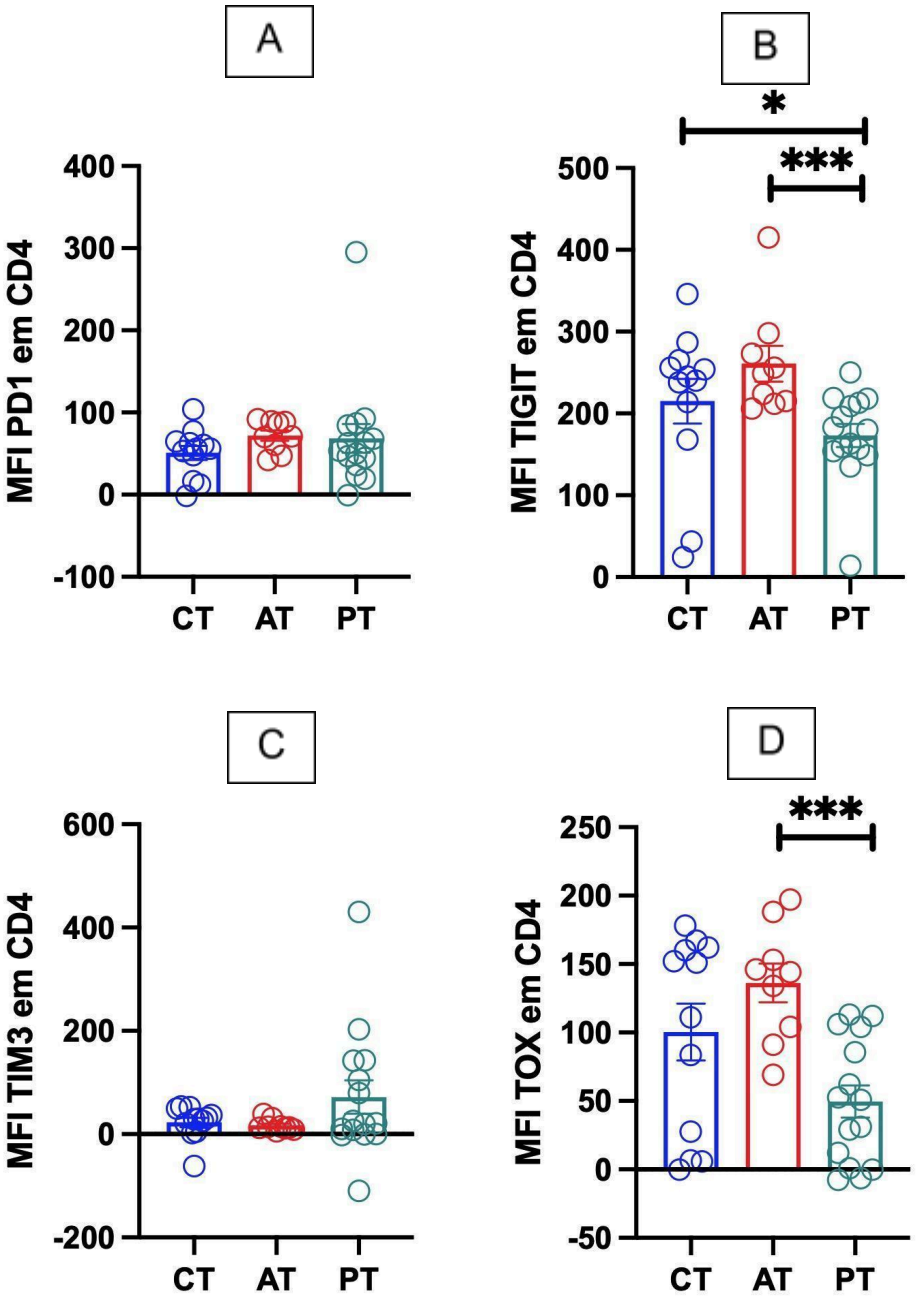
A análise do MFI revelou um aumento significativo na intensidade de fluorescência do receptor TIGIT nas células T $CD4^+$ do grupo antes do tratamento em comparação ao grupo pós-tratamento (p=0,0007), e uma diminuição significativa do grupo pós-tratamento em comparação ao grupo controle (p=0,0186) (Figura 23B).

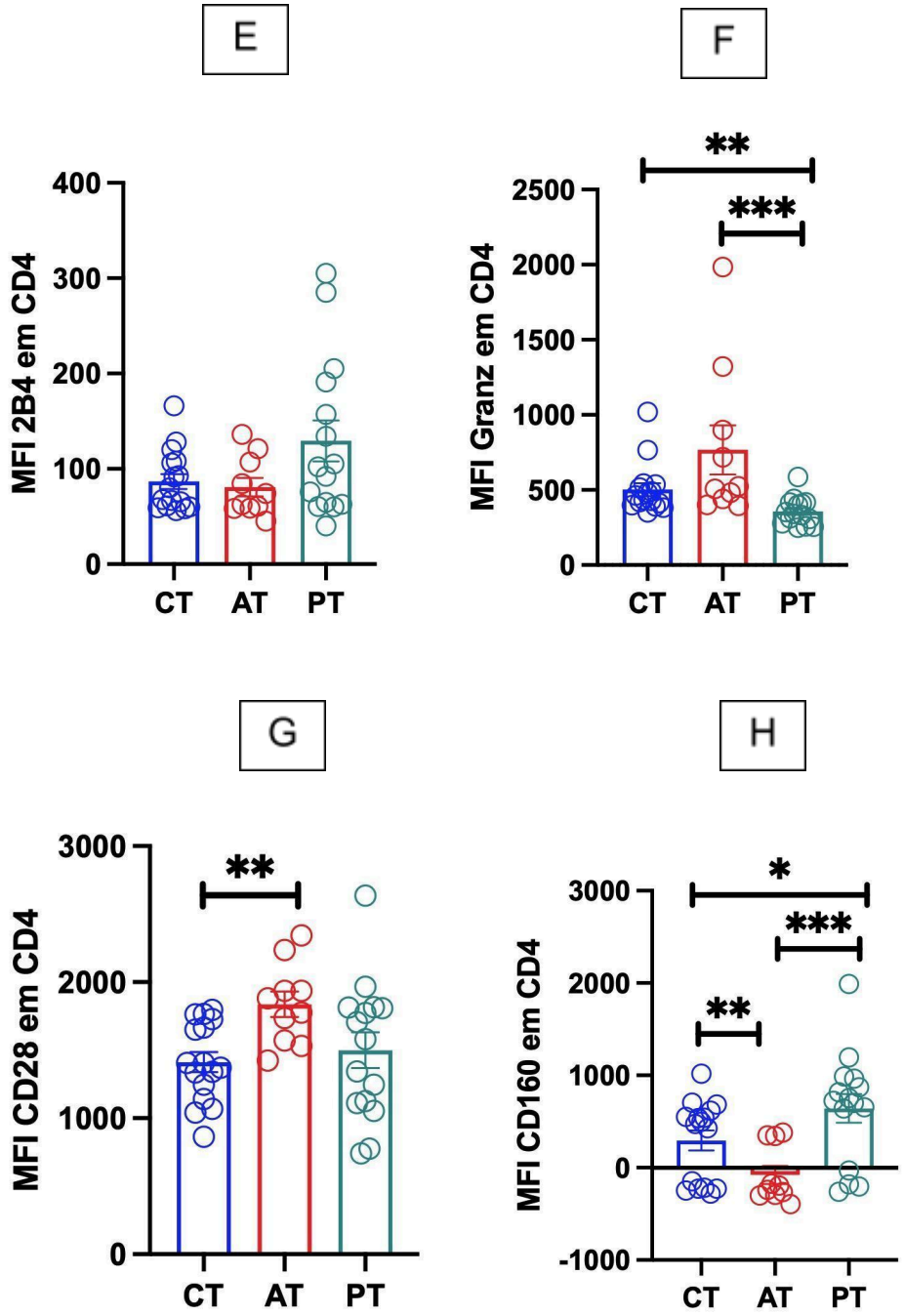
Além disso, observamos um aumento significativamente relevante na intensidade de fluorescência do fator de transcrição TOX pelas células T $CD4^+$ no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0004) (Figura 23D).

Ao avaliar a intensidade de fluorescência da molécula Granzima B, observamos um aumento significativo no grupo antes do tratamento em comparação ao grupo pós-tratamento (p=0,0007), e uma diminuição significativa do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0012) (Figura 23F). No entanto, quando avaliamos a intensidade de fluorescência do receptor CD28 observamos que houve um aumento significativo no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0014) (Figura 23G).

Por fim, na avaliação da intensidade de fluorescência do receptor CD160 observamos uma diminuição significativa pelo grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0084), e um aumento significativo do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0009) e do grupo controle (p=0,0188) (Figura 23H). Não houve significância estatística na intensidade de fluorescência nos demais receptores avaliados: PD-1, TIM-3 e 2B4 (Figuras 23A, C, E).

Figura 23 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 em células T CD4+





Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,005, *** p ≤ 0,0005, **** p ≤ 0,0001.

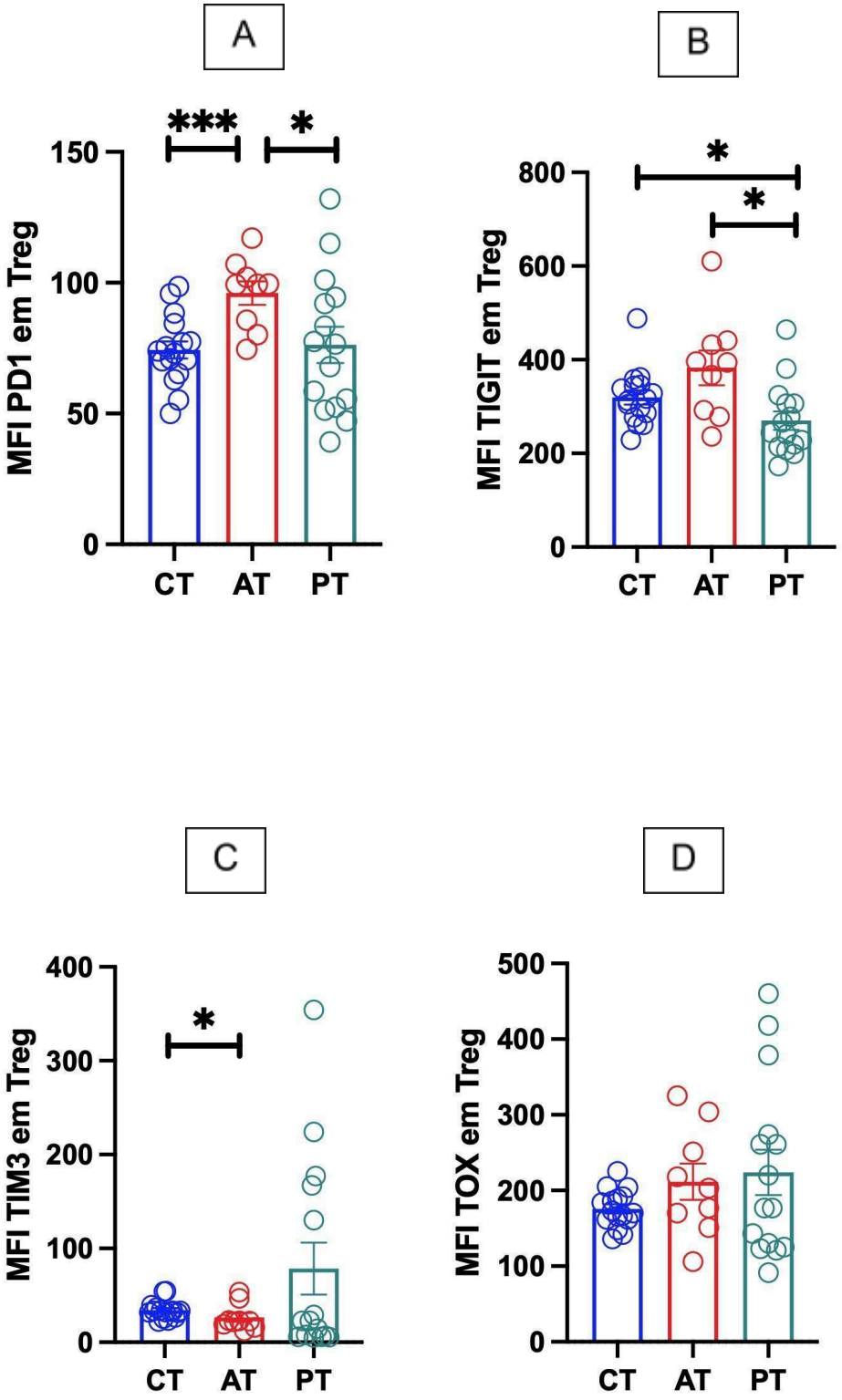
6.7 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS (Treg) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

Realizamos a análise do MFI para os receptores PD-1, TIGIT, TIM-3 e TOX nas células Treg, em três grupos distintos de indivíduos: controles saudáveis, pacientes com LC antes do tratamento e pacientes com LC pós-tratamento. A análise do MFI revelou um aumento significativo na intensidade de fluorescência do receptor de superfície PD-1 nas células Treg no grupo antes do tratamento quando comparado tanto ao grupo controle ($p=0,0005$) quanto ao grupo pós-tratamento ($p=0,0409$) (Figura 24ª).

Na análise do MFI do receptor TIGIT, observamos um aumento significativo na intensidade de fluorescência no grupo antes do tratamento em comparação ao grupo pós-tratamento ($p=0,0106$), e uma diminuição significativa do grupo pós-tratamento em comparação ao grupo controle ($p=0,0208$) (Figura 24B).

Por fim, observamos uma diminuição significativa na intensidade de fluorescência do receptor TIM-3 pelo grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0223$) (Figura 24C).

Figura 24 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3 e TOX em células T reguladoras



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,005, *** p ≤ 0,0005, **** p ≤ 0,0001.

6.8 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T CD8+ E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

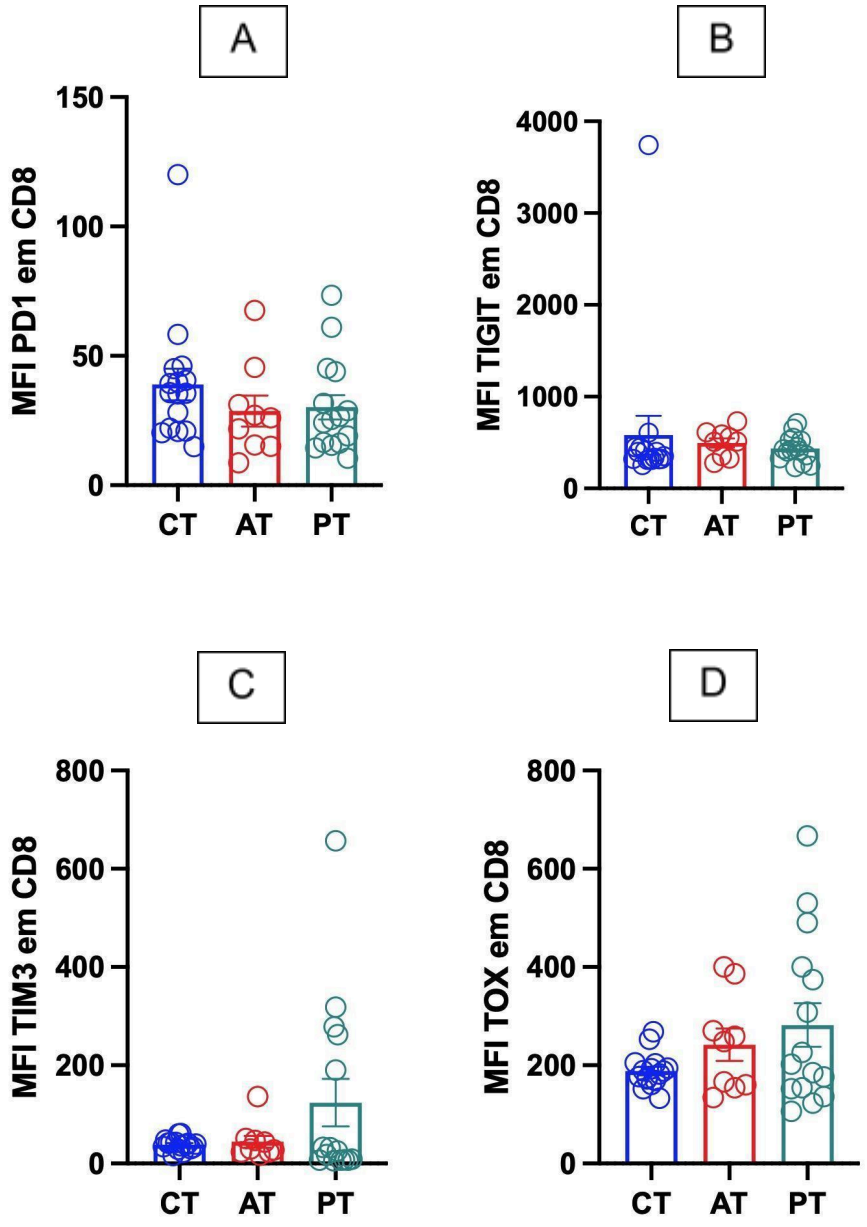
Analisamos o MFI para os receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 nas células T CD8+, em três grupos distintos de indivíduos: controles saudáveis, pacientes com LC antes do tratamento e pacientes com LC pós-tratamento. A análise do MFI revelou um aumento significativo na intensidade de fluorescência do receptor 2B4 no grupo pós-tratamento em comparação com o grupo controle (p=0,0055) (Figura 25E).

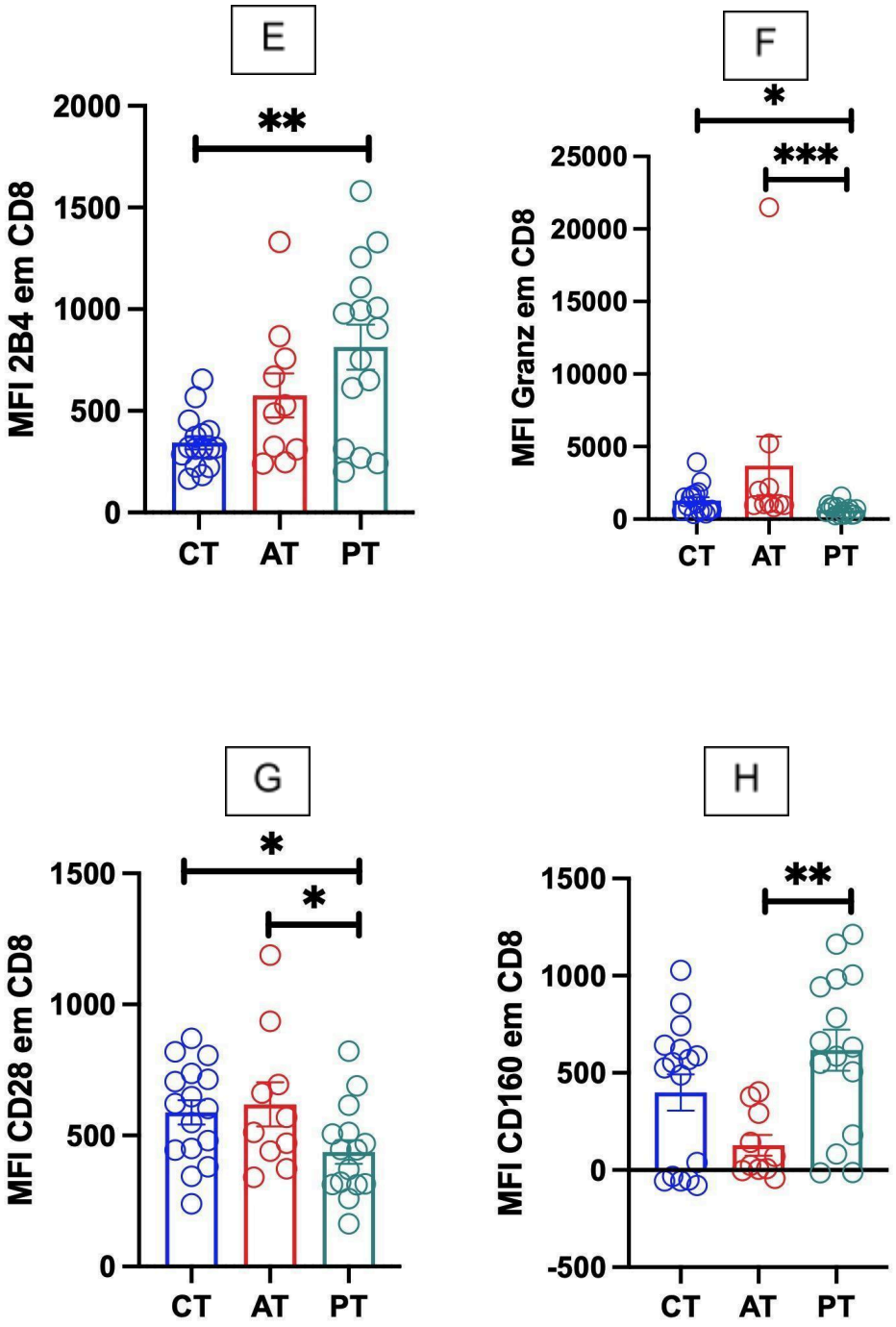
Na análise do MFI do receptor Granzima B, observamos um aumento significativo na intensidade de fluorescência no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0001), e uma diminuição significativa do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle (p=0,0171) (Figura 25F).

O mesmo padrão foi observado ao analisar o MFI do receptor CD28, em que houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo pós-tratamento (p=0,0491), e uma diminuição significativa no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupocontrole (p=0,0298) (Figura 25G).

Ao analisar o MFI do receptor CD160, observamos o aumento significativo na intensidade de fluorescência no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0044) (Figra 25H). Não foi observado significância estatística nos demais receptores avaliados: PD-1, TIGIT, TIM-3 e TOX (Figuras 25A, B, C, D).

Figura 25 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 em células T CD8+





Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$.

6.9 ANÁLISE DO MFI DAS CÉLULAS T DUPLO-NEGATIVAS (CD8-CD4-) E RECEPTORES ASSOCIADOS EM PACIENTES COM LC

Analisamos o MFI para os receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 nas células T duplo-negativas, em três grupos distintos de indivíduos: controles saudáveis, pacientes com LC antes do tratamento e pacientes com LC pós-tratamento. A análise do MFI revelou um aumento significativo na intensidade de fluorescência do receptor TIGIT no grupo antes do tratamento em comparação ao grupo controle ($p=0,0001$) e ao grupo pós-tratamento ($p=0,0013$) (Figura 26B).

Na análise do MFI do fator de transcrição TOX, observamos um aumento significativo na intensidade de fluorescência no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0298$) (Figura 26D).

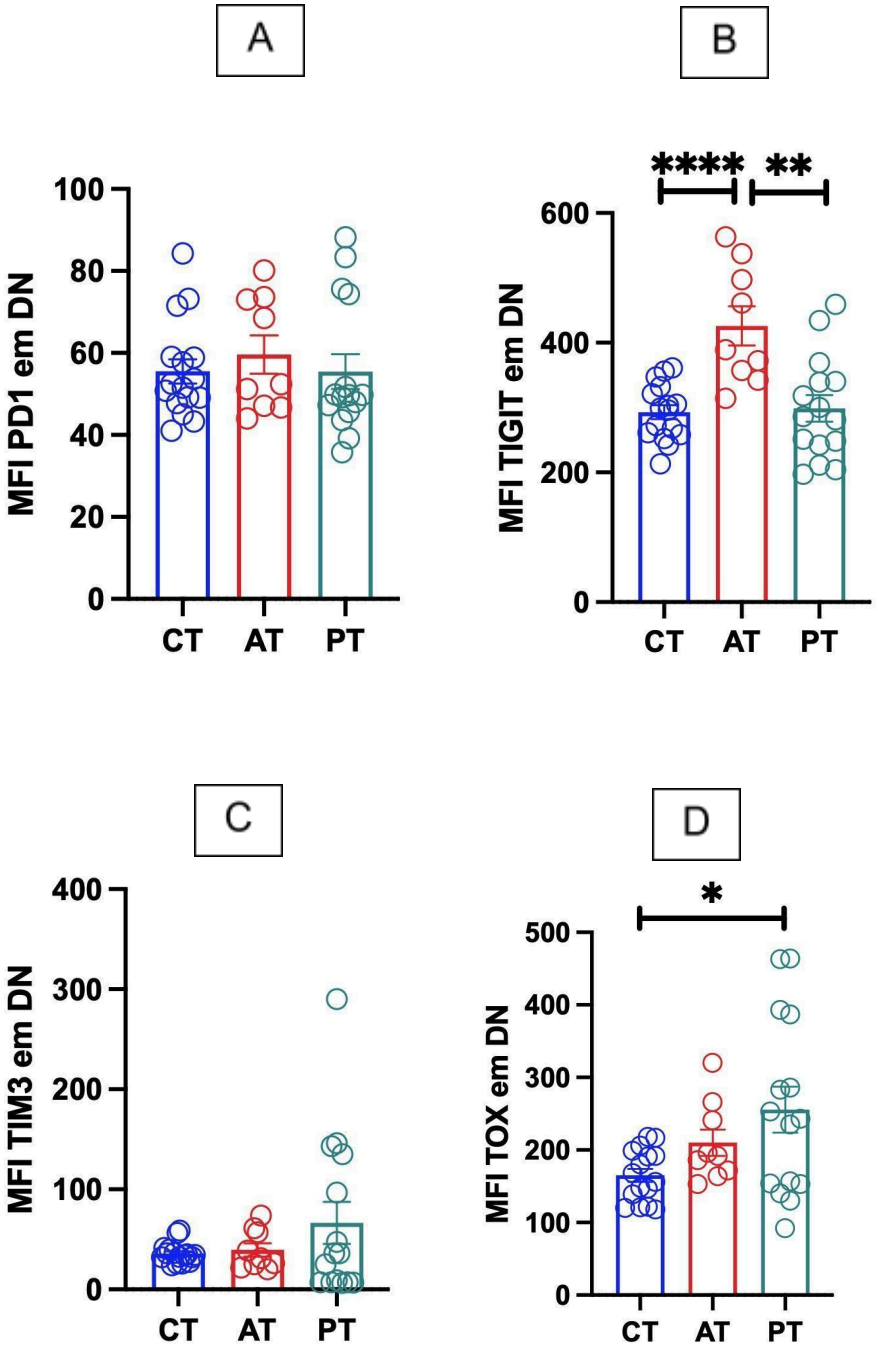
Ao analisar a intensidade de fluorescência do receptor 2B4, observamos um significativo no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0016$) e ao grupo antes do tratamento ($p=0,0003$) (Figura 26E).

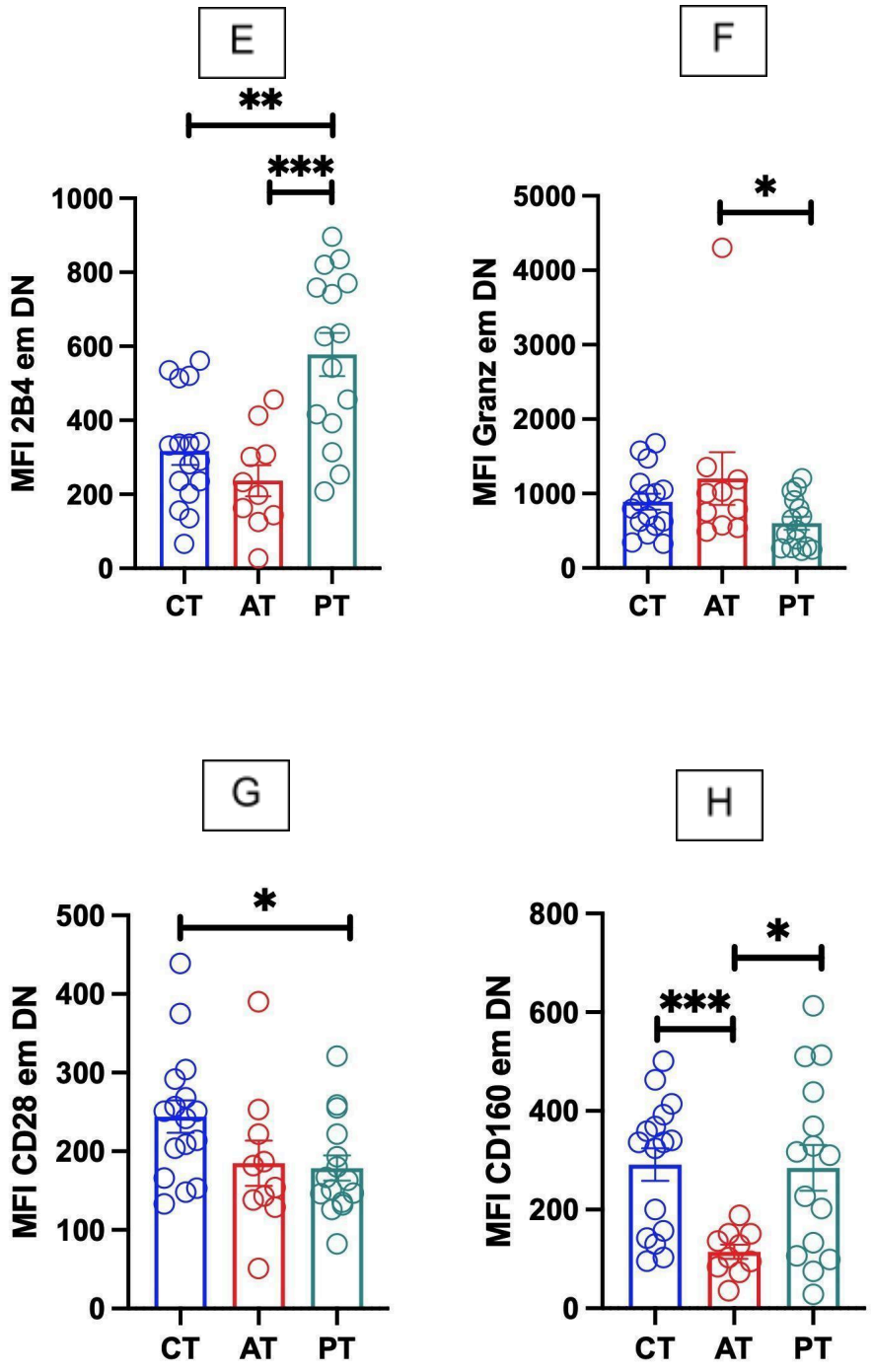
Na avaliação do MFI do receptor Granzima B, observamos o aumento significativo na intensidade de fluorescência no grupo antes do tratamento em comparação com o grupo pós-tratamento ($p=0,0475$) (Figura 26F).

Ao avaliarmos a intensidade de fluorescência do marcador CD28, observamos que houve uma diminuição significativa no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0209$) (Figura 26G).

Por fim, ao analisarmos o MFI do receptor CD160, observamos que houve uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência no grupo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,0007$), e um aumento significativo do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento ($p=0,0184$) (Figura 26H). Não foi observado significância estatística nos demais marcadores avaliados: PD-1 e TIM-3 (Figuras 26A, C).

Figura 26 - Expressão do MFI dos receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, 2B4, Granzima B, CD28 e CD160 em células T Duplo-Negativas





Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,005, *** p ≤ 0,0005, **** p ≤ 0,0001.

6.10 ANÁLISE DE t-SNE DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T CD4conv, CD8+ e Treg

Utilizamos a análise de redução dimensional por t-SNE para visualizarmos a distribuição das subpopulações de células T $CD4^+$, $CD8^+$ e Treg, bem como a expressão dos receptores dos TIGIT, TOX, TIM-3, PD-1, FOXP3, CD160, Granzima B, CD28 e 2B4 em três grupos distintos de indivíduos: controles saudáveis (Figura 27A), pacientes com LC antes do tratamento (Figura 27B) e pacientes de LC pós-tratamento (Figura 76C).

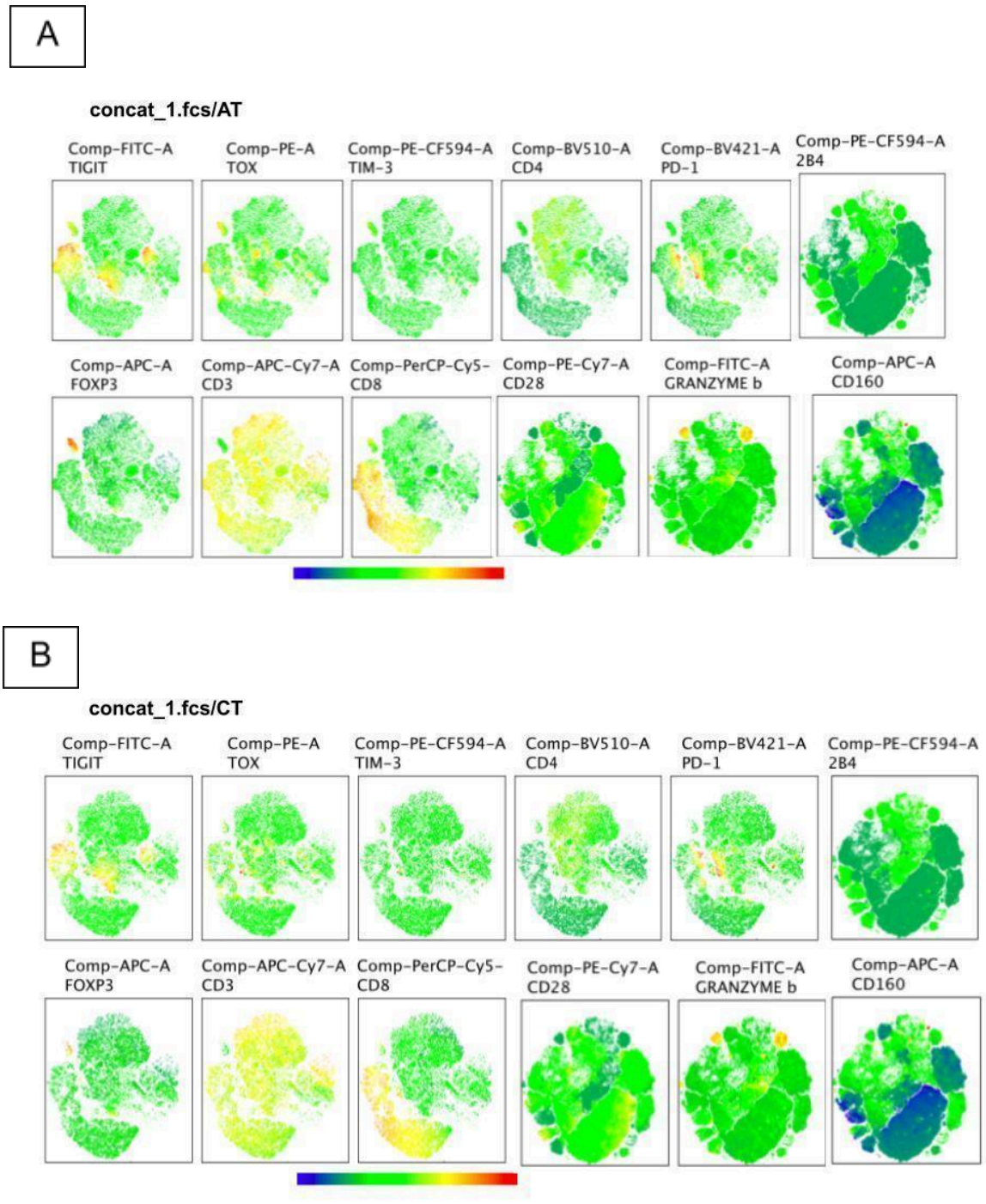
O marcador TIGIT apresentou maior expressão tanto em células $CD8^+$ quanto em $CD4^+$ em todos os grupos. Já PD-1 também estava expresso em células $CD4^+$ e $CD8^+$, independentemente do grupo analisado, indicando sua participação contínua na modulação da ativação celular.

A análise de TOX revelou um aumento da sua expressão nas células $CD4^+$ e $CD8^+$ no grupo PT, em comparação com os grupos CT e AT. Em contrapartida, CD160 apresentou baixa expressão tanto em células $CD8^+$ quanto em $CD4^+$ em todos os grupos.

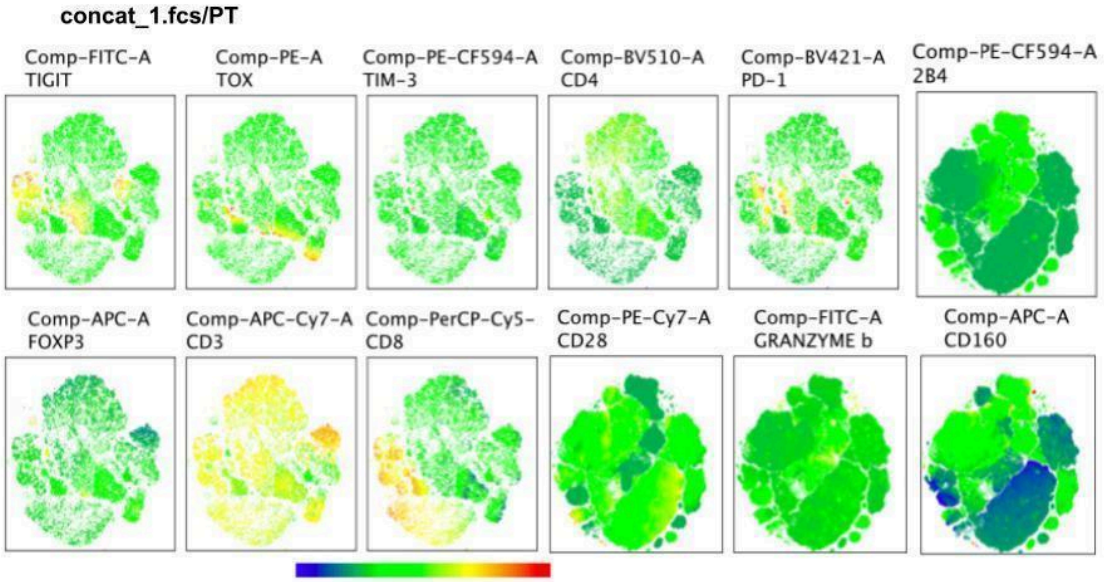
A avaliação da expressão de Granzima B indicou uma menor presença desta molécula citotóxica no grupo PT, e uma maior expressão nos grupos CT e AT.

Em relação às células T reguladoras (Treg), observou-se uma expressão mais intensa no grupo AT, e uma redução expressiva no grupo PT, sugerindo que a infecção pode induzir um aumento dessas células, mas que após o tratamento as mesmas diminuem.

Figura 27 - Redução dimensional por t-SNE das distribuições das subpopulações de células T e os receptores PD-1, TIGIT, TIM-3, TOX, CD28, Granzima B, CD160 e 2B4.



C



Legenda: Gráfico t-SNE com a distribuição de diferentes subpopulações de células T em três grupos: CT= controles saudáveis, AT= antes do tratamento, PT= pós-tratamento. A escala de cores indica os níveis de expressão, com tons vermelhos indicando alta expressão e tons azuis indicando baixa expressão.

6.11 EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE EXAUSTÃO E SUPRESSÃO DE CÉLULAS T EM DADOS PÚBLICOS DE RNAseq

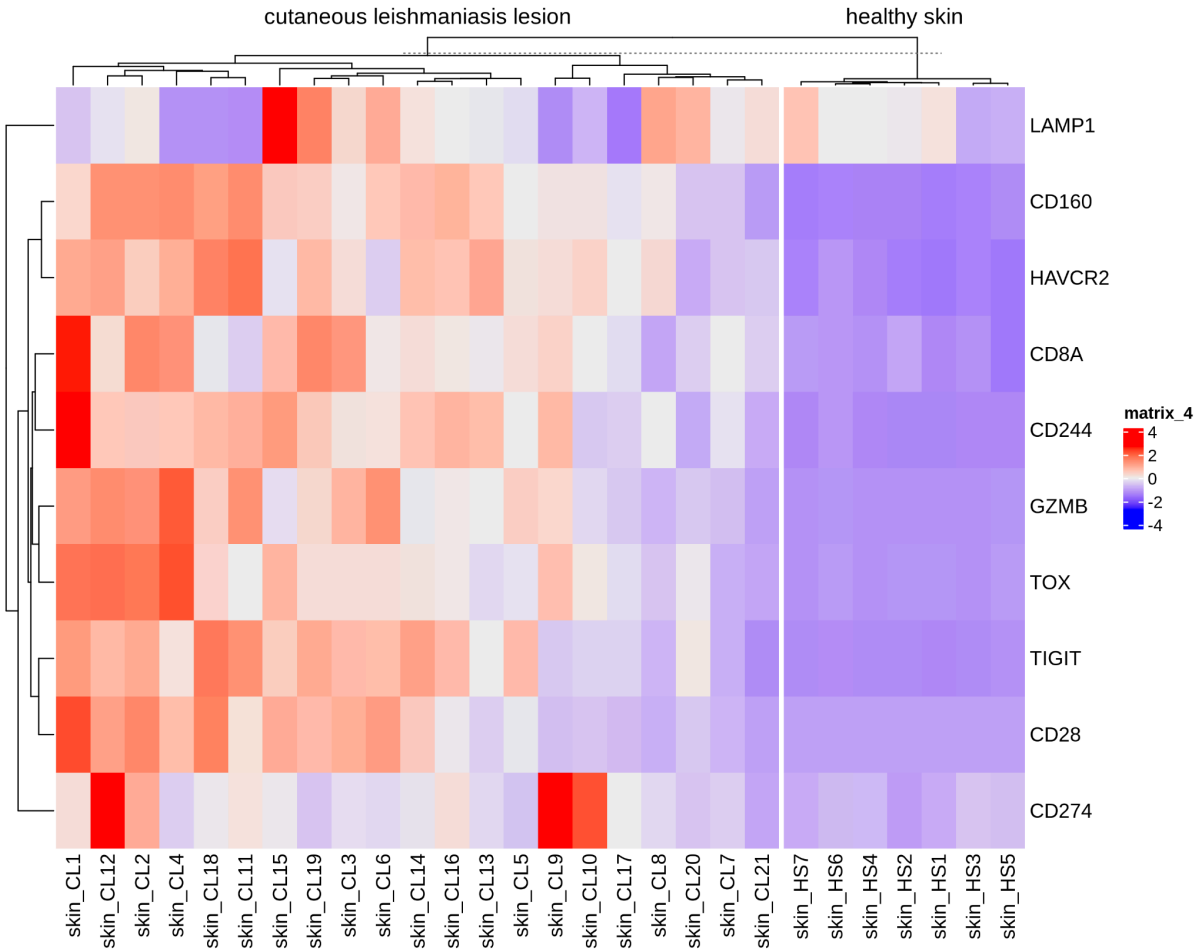
Para complementar os achados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo, realizamos uma análise exploratória em dados públicos de RNAseq, investigando a expressão de genes associados à exaustão e supressão de células T em lesões de leishmaniose cutânea e pele saudável. O *heatmap* apresentado na Figura 27 exibe a expressão diferencial destes genes entre as duas condições avaliadas.

Os genes analisados incluem PD-1 (PDCD1), TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), CD160, CD28, CD107a (LAMP1), TOX, Granzima B (GZMB) e 2B4 (CD244). Para manter a padronização, os nomes utilizados na figura correspondem à nomenclatura oficial dos genes, como indicado entre parênteses. As colunas representam amostras individuais, sendo um grupo de pacientes com leishmaniose cutânea e um grupo representando indivíduos saudáveis. A escala de cores reflete os níveis de expressão relativa dos genes, onde tons avermelhados indicam maior expressão e tons azulados indicam menor expressão.

Os resultados indicam um padrão diferencial de expressão gênica entre os grupos, com níveis aumentados de vários marcadores de exaustão e ativação em lesões de leishmaniose cutânea em comparação com pele saudável. Destacaram-se a expressão elevada de GZMB, CD160, CD244 e HAVCR2 em lesões, sugerindo um microambiente enriquecido em células T disfuncionais. Em contraste, amostras de pele saudável exibiram menor expressão desses genes.

Essa análise transcriptômica reforça os nossos achados obtidos por citometria de fluxo, evidenciando um perfil imunológico característico de exaustão celular em pacientes com leishmaniose cutânea.

Figura 28 - Expressão gênica de receptores de células T em lesões de leishmaniose cutânea



Legenda: *Heatmap* representando a expressão dos genes associados à exaustão e regulação imunológica: PDCD1 (PD-1), TIGIT, HAVCR2 (TIM-3), TOX, CD160, 2B4 (CD244), Granzima B (GZMB) e CD107a (LAMP1). Amostras de lesões de leishmaniose cutânea comparadas à pele saudável. Cada coluna representa uma amostra individual e a escala de cores indica os níveis de expressão, com tons vermelhos indicando alta expressão e tons azuis indicando baixa expressão.

6.12 AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS APÓS ESTIMULAÇÃO E CULTURA COM ANTÍGENO DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

Foram dosadas as citocinas IL-12, TNF, IL-10, IL-6, IL1B e IL-8 do sobrenadante da cultura estimulado ou não com antígeno total de *L. braziliensis* de pacientes antes do tratamento (n=18), pacientes pós-tratamento (n=7) e de

controles (n=17). Observamos que não houve aumento estatisticamente significativo em nenhum dos grupos da expressão da citocina IL-12 (FIGURA 27A).

Ao avaliarmos a expressão de TNF, observamos um aumento significativo dessa citocina nas amostras estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* no grupo antes do tratamento em comparação às amostras basais desse mesmo grupo (p=0,0010). Além disso, identificamos que a concentração de TNF foi significativamente maior nas amostras basais do grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento (p=0,0006), sugerindo uma regulação diferencial dessa resposta inflamatória após a eliminação do parasita. Ainda, verificamos que o grupo pós-tratamento apresentou uma maior expressão de TNF nas amostras basais quando comparado ao grupo controle (p=0,0272), o que pode indicar um estado inflamatório residual após a recuperação clínica. Em relação ao grupo controle, também identificamos um aumento significativo da concentração de TNF nas amostras estimuladas com antígeno quando comparadas às amostras basais (p=0,0062). Adicionalmente, houve uma maior concentração de TNF nas amostras basais do grupo controle em comparação ao grupo antes do tratamento (p=0,0159).

Na avaliação da IL-10, identificamos que as amostras estimuladas com antígeno no grupo antes do tratamento apresentaram uma expressão significativamente maior dessa citocina em comparação às amostras basais (p=0,0001), sugerindo uma tentativa do sistema imune de modular a resposta inflamatória desencadeada pelo parasita. Além disso, observamos que as amostras basais do grupo pós-tratamento exibiram uma maior expressão de IL-10 em comparação às amostras basais do grupo antes do tratamento (p=0,061), o que pode indicar um papel dessa citocina na resolução da inflamação após a eliminação do parasita. No grupo controle, observamos que a IL-10 foi significativamente mais expressa nas amostras estimuladas quando comparadas às basais (p=0,0306). Também identificamos que as amostras basais do grupo controle apresentaram maior expressão de IL-10 em relação ao grupo antes do tratamento (p=0,0487).

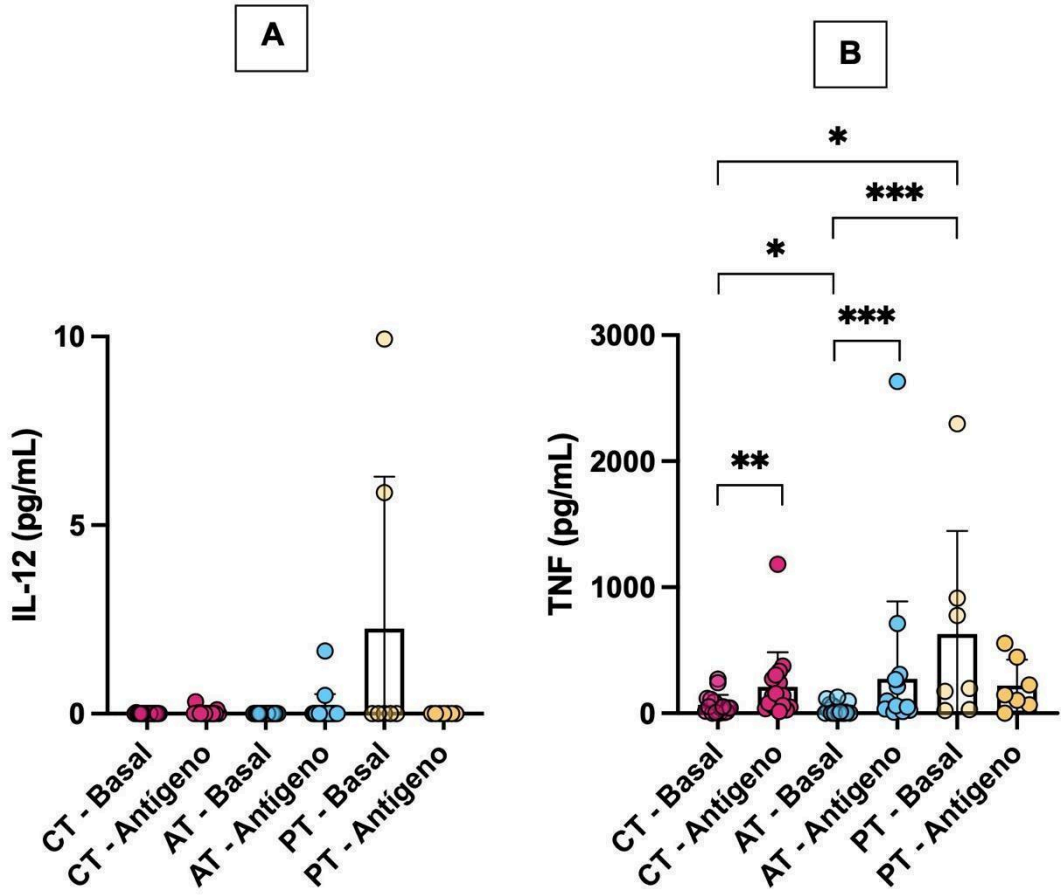
Em relação à IL-6, observamos um aumento significativo da expressão dessa citocina nas amostras estimuladas com antígeno do grupo antes do tratamento quando comparadas às amostras basais (p=0,0006). Além disso, identificamos um

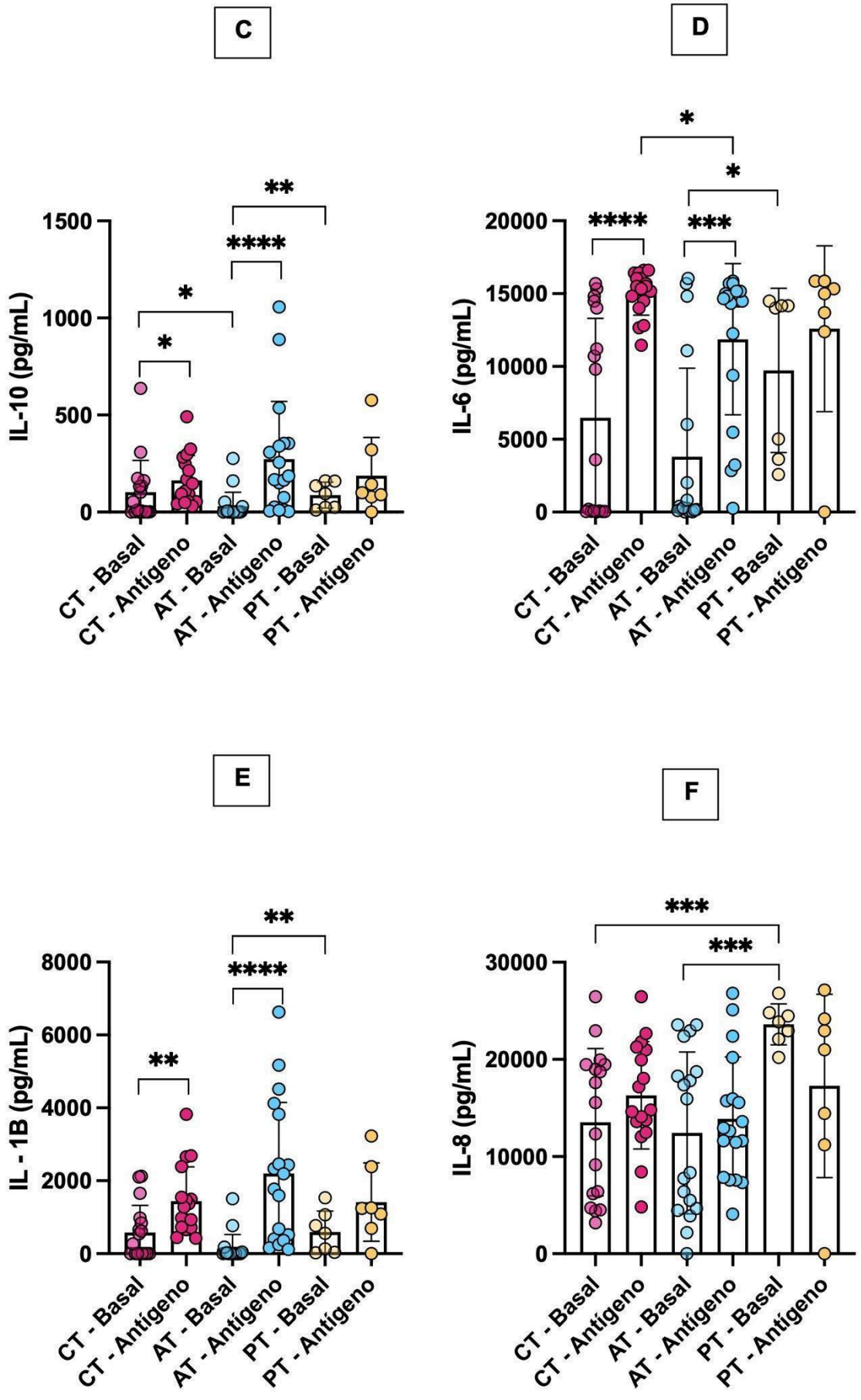
aumento significativo da IL-6 nas amostras basais do grupo pós-tratamento quando comparadas às do grupo antes do tratamento (p=0,0283). No grupo controle, verificamos que as amostras estimuladas apresentaram uma maior expressão de IL-6 em relação às basais (p=0,0001). Adicionalmente, houve um aumento significativo da expressão dessa citocina nas amostras estimuladas do grupo controle em comparação às amostras estimuladas do grupo antes do tratamento (p=0,0164).

A avaliação da IL-1β revelou que, no grupo antes do tratamento, as amostras estimuladas com antígeno apresentaram uma expressão significativamente maior dessa citocina em relação às basais (p=0,0001), reforçando o papel da IL-1β na ativação inflamatória contra *L. braziliensis*. Além disso, as amostras basais do grupo pós-tratamento exibiram uma maior expressão de IL-1β em comparação às amostras basais do grupo antes do tratamento (p=0,0023), sugerindo que essa citocina pode permanecer elevada mesmo após a resolução clínica da doença. No grupo controle, identificamos que as amostras estimuladas apresentaram maior expressão de IL-1β em relação às basais (p=0,0022).

Por fim, ao analisarmos a IL-8, verificamos que houve um aumento significativo dessa citocina nas amostras basais do grupo pós-tratamento em comparação às amostras basais do grupo antes do tratamento (p=0,0006). Também identificamos que a expressão de IL-8 foi significativamente maior nas amostras basais do grupo pós-tratamento em relação ao grupo controle (p=0,0004).

Figura 29 – Concentração das citocinas IL-12, TNF, IL-10, IL-6, IL-1B e IL-8 em sobrenadantes após cultura de PBMC com antígeno total de *L. braziliensis* de pacientes AT, PT e indivíduos CT (A-F).




C
IL-10 (pg/mL)
1500
1000
500
0
*
*
****
**
CT - Basal
CT - Antígeno
AT - Basal
AT - Antígeno
PT - Basal
PT - Antígeno
D
IL-6 (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
****
***
*
*
E
IL - 1B (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
**
****
**
F
IL-8 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
***
***

Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: CT= grupo controle; AT= grupo antes do tratamento; PT= grupo pós-tratamento.

Nota: Diferenças significativas foram consideradas quando * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$.

7 DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea (LC) faz parte do conjunto de doenças tropicais negligenciadas, impactando principalmente populações socioeconomicamente vulneráveis. A persistência da doença está diretamente associada a fatores ambientais e socioeconômicos, como desmatamento, a urbanização desordenada e a expansão de áreas agrícolas, que modificam o habitat do inseto vetor e ampliam o risco de infecção humana (BUZANOVSKY et al., 2020). Além disso, a LC continua sendo um problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, com sua distribuição influenciada por fatores climáticos e ecológicos que favorecem a adaptação do parasita a diferentes condições ambientais, variando de florestas tropicais a áreas áridas (GUREL; TEKIN; UZUN, 2020).

No presente estudo, todos os pacientes incluídos eram residentes de áreas endêmicas e preencheram os critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico, com confirmação por pesquisa direta e PCR de amostra de swab da lesão, sangue e/ou saliva. A predominância do sexo masculino entre os pacientes com LC ativa corrobora achados anteriores que indicam que homens são mais acometidos pela doença, possivelmente devido à maior exposição ao vetor durante atividades laborais e rurais (BUZANOVSKY et al., 2020).

Em nosso estudo, a faixa etária variou, desde crianças até idosos, embora a maioria dos pacientes tenha apresentado idades compatíveis com a população economicamente ativa, o que impacta na produtividade e na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Estudos epidemiológicos indicam que a LC não apenas representa um problema de saúde pública, mas também impõe uma perda significativa na economia para países endêmicos, devido aos custos diretos do tratamento e às perdas relacionadas à incapacidade temporária dos pacientes para o trabalho (GRIFFERTY et al., 2021).

Os controles incluídos no estudo eram indivíduos saudáveis, sem histórico de infecção e residentes de áreas não endêmicas, garantindo um grupo de comparação adequado para a avaliação das alterações imunológicas específicas da LC. A inclusão de diferentes faixas etárias e a análise de indivíduos em diferentes estágios da doença foram fundamentais para compreender melhor os aspectos imunológicos e epidemiológicos da infecção.

A exaustão de células T é um estado disfuncional caracterizado pela perda gradual da capacidade de proliferação das células T e, consequentemente, redução em realizar suas funções efetoras (BARROSO et al., 2018; DA FONSECA-MARTINS et al., 2021; GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020). Esse estado disfuncional já é bastante conhecido e estudado em doenças como o câncer. Todavia, além do câncer, também já é de conhecimento que a exaustão celular está presente em demais doenças crônicas, incluindo mais recentemente a leishmaniose cutânea (DA FONSECA-MARTINS et al., 2021). Na LC, a exaustão de células T pode estar associada a marcadores de exaustão que, em elevada concentração, irão ativar as células T de forma persistente e crônica impactando na resolução e cura da doença (MIGGELBRINK et al., 2021).

Uma vez que a resposta imunológica contra a LC é mediada pelo envolvimento das células T $CD4^+$ e de células T $CD8^+$, e que receptores de exaustão podem estar atrelados na modulação da resposta imune da doença (GARCIA DE MOURA et al., 2021; SEKINE et al., 2020), nosso estudo avaliou alguns receptores associados nas células T $CD4^+$, $CD8^+$ e DN. Vamos focar nossa discussão nos receptores encontrados e o que significam.

Nosso estudo revelou que a expressão percentual do receptor inibitório PD-1 está significativamente elevada nas células T CD4conv de pacientes com leishmaniose cutânea ativa, quando comparadas ao grupo controle. Esse achado pode sugerir um possível estado de exaustão celular, o que pode comprometer a função efetora das células, dificultando a eliminação do parasita e contribuindo para a persistência da infecção. Resultados semelhantes foram observados em modelos experimentais, nos quais células T $CD4^+$ de camundongos infectados por *Leishmania major* apresentaram aumento na expressão de PD-1 em comparação a animais não infectados (FREITAS E SILVA et al., 2020).

Em nosso estudo também observamos o aumento da expressão da proteína PD-1 nos indivíduos pós-tratamento pelas células CD4conv, provavelmente indicando uma continuação de uma disfunção do sistema imune, mesmo após a resolução da doença. Corroborando com os nossos achados, no estudo de Freitas-e-Silva (2020), indivíduos pós-tratamento de LC apresentaram uma alta expressão de PD-1 por células $CD4^+$, inferindo que esse dado é devido a uma alta

exposição do antígeno ou até mesmo um estado de exaustão celular que persiste após a eliminação do antígeno (FREITAS E SILVA et al., 2020).

Embora o percentual da coexpressão de PD-1^{+}TIM-3^{+} pelas células T CD4conv não tenha mostrado diferenças estatisticamente significativas, observamos um aumento expressivo na frequência percentual de células PD-1^{+}TIM-3^{-} nos pacientes antes e após o tratamento em relação aos controles. Esse resultado pode indicar que, apesar da maior expressão de PD-1, cuja expressão elevada está associada a disfunção ou exaustão de células T, a ausência de TIM-3, que está associado à outro receptor inibitório, sugere um estado intermediário de disfunção celular, o que pode refletir um equilíbrio entre ativação e inibição da resposta imune (RALLÓN et al., 2018). Além disso, ao avaliarmos a coexpressão de PD-1^{+}TIM-3^{+}TIGIT^{+}, identificamos um aumento significativo dessa população antes do tratamento, em relação ao grupo controle e ao grupo pós-tratamento. Esse achado reforça a ideia de que múltiplos receptores inibitórios podem atuar de maneira combinada para modular a resposta imune durante a leishmaniose cutânea, conforme descrito em estudos anteriores com humanos e camundongos que demonstraram a expressão de PD-1, TIM-3 e TIGIT em células T exaustas durante infecções crônicas (DA FONSECA-MARTINS et al., 2021; GARCIA DE MOURA et al., 2021; RALLÓN et al., 2018).

No caso das células Treg, embora a expressão percentual isolada de PD-1 não tenha diferido entre os grupos, observamos uma redução significativa na coexpressão de PD-1^{+}TIM-3^{+} nos pacientes antes do tratamento, o que pode indicar um perfil menos supressor dessas células durante a fase ativa da doença. Por outro lado, a população PD-1^{+}TIM-3^{-} mostrou um aumento significativo no grupo antes do tratamento, o que pode estar relacionado a uma alteração funcional das células Treg na regulação da resposta inflamatória, visto que a ausência de TIM-3 nessas células pode indicar que elas não atingiram um estado de exaustão completo (GAUTRON et al., 2014). Adicionalmente, a expressão de PD-1^{+}TIM-3^{+}TIGIT^{+} esteve aumentada antes do tratamento, podendo estar associada a um estado de exaustão ou disfunção celular ao expressar os três marcadores simultaneamente e reduzindo a capacidade efetora das células Treg (MEYIAH et al., 2023), enquanto a população PD-1^{+}TIM-3^{+}TIGIT^{-} aumentou no grupo pós-tratamento, o que pode indicar uma

recuperação parcial da funcionalidade das Treg, refletindo em um estado menos exausto (MOLLAVELIOGLU et al., 2022). Essas diferenças podem indicar um processo dinâmico na modulação da atividade reguladora das células Treg ao longo da infecção e após a eliminação do parasita, influenciando no curso e resolução da doença.

Por fim, não observamos diferenças significativas na frequência de células T $CD8^{+}PD1^{+}$ ou na coexpressão dos receptores inibitórios analisados nesse subconjunto celular. Esse achado sugere que a disfunção imunológica mediada por PD-1, TIM-3 e/ou TIGIT na leishmaniose cutânea pode estar mais associada às células T CD4conv e às células Treg do que às células T $CD8^{+}$.

Em conjunto com esses dados, ao realizar a análise da intensidade média de fluorescência (MFI) revelou um aumento significativo na expressão do receptor PD-1 em células Tregs no grupo antes do tratamento, quando comparado tanto ao grupo controle e quanto ao grupo pós-tratamento. Essa expressão elevada de PD-1 em Tregs pode indicar uma tentativa do sistema imunológico de controlar a resposta inflamatória exacerbada, característica da leishmaniose cutânea (GABRIEL et al., 2019). Estudos demonstram que a interação PD-1/PD-L1 desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune, promovendo a diferenciação de células T em Tregs e desviando a resposta para um perfil Th2, o que pode favorecer a persistência do parasita (JAFARZADEH et al., 2022).

Após o tratamento, a redução na média de expressão de PD-1 nas Tregs sugere uma restauração da homeostase imunológica, possivelmente refletindo a diminuição da carga parasitária e da necessidade de uma regulação imunossupressora intensa. Esse padrão é consistente com observações em outras infecções, onde a expressão de PD-1 em Tregs diminui após a resolução da infecção, indicando uma recuperação da função imunológica normal (ASANO et al., 2017).

Outro receptor de *checkpoint* imunológico associado à regulação negativa da resposta imune é o TIGIT, o qual desempenha um papel essencial na modulação da atividade das células T (HARJUNPÄÄ; GUILLEREY, 2020). No nosso estudo, observamos um aumento significativo na frequência percentual de células T

CD4conv e Treg expressando TIGIT antes do tratamento em relação ao controle e pós-tratamento, sugerindo um possível mecanismo de regulação para conter a resposta inflamatória exacerbada associada à leishmaniose cutânea ativa. Esse fenômeno pode refletir um esforço do sistema imune para evitar danos teciduais excessivos, mas, paradoxalmente, pode contribuir para um ambiente de supressão imunológica que favorece a persistência do parasita. Isto é sugerido em estudos com câncer, em que células Treg que expressam TIGIT exibem um fenótipo de supressão celular, principalmente porque irão produzir IL-10 de forma elevada e dessa forma mediar um fenótipo disfuncional das células T efetoras (EJRNAES et al., 2006; JOHNSTON et al., 2014; KURTULUS et al., 2015). No contexto da leishmaniose cutânea nossos achados podem indicar ineficiência na eliminação do parasita

Além disso, a análise da intensidade média de fluorescência (MFI) revelou um aumento significativo da expressão de TIGIT pelas células T $CD4^+$ antes do tratamento, o que pode indicar não apenas um maior número de células expressando esse receptor, mas também um aumento na densidade de moléculas TIGIT por célula. Essa alteração sugere um reforço na sinalização inibitória, corroborando a hipótese de exaustão funcional das células T, nas infecções crônicas e doenças inflamatórias persistentes (ŠUNINA et al., 2021; ZHONG et al., 2024).

Também observamos que houve uma redução do percentual e do MFI da expressão de TIGIT nas células T CD4conv e Treg no grupo pós-tratamento o que pode indicar uma recuperação funcional do sistema imune após a eliminação do parasita, restaurando a capacidade de resposta imune efetora. O aumento da expressão de TIGIT pelas células T $CD8^+$ nesse mesmo grupo pode estar relacionado a um mecanismo compensatório para evitar uma resposta inflamatória desregulada durante o processo de resolução da infecção (JOSEFSSON et al., 2018; ŠUNINA et al., 2021).

No estudo de Garcia de Moura e colaboradores 2021, observou-se, por meio da análise de RNA-seq de biópsias de indivíduos infectados com *Leishmania braziliensis*, a presença do aumento da expressão de receptores inibitórios como PD-1, TIM-3, CTLA-4, PD-L1 e PD-L2. Ao avaliar as células T circulantes por meio da coleta de sangue de indivíduos com LC, tanto as células $CD4^+$ como as células

CD8+ também expressaram elevadas frequências de PD-1, TIM-3 e CTLA-4, padrão também observado em nosso estudo pelas células T CD4+ nos receptores PD-1, TIM-3 e coexpressão de ambos. No entanto, ao bloquearam o receptor PD-1 eles identificaram que a capacidade proliferativa das células T foi restaurada, assim como a secreção das citocinas IFN-y, que é uma citocina associada ao papel de proteção contra a LC, tanto pelas células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ (GARCIA DE MOURA et al., 2021).

Em relação ao receptor TIM-3, em nossos resultados observamos a diminuição da frequência e na intensidade de fluorescência (MFI) do mesmo nas células Treg do grupo antes do tratamento, em comparação ao grupo controle. O TIM-3 é um receptor de *checkpoint* imunológico que inibe a resposta Th1, regulando a produção de citocinas como IFN-y e TNF, o que, em condições fisiológicas, contribui para o controle da resposta imune (DAS; ZHU; KUCHROO, 2017). Em estudos com tumores, a expressão de TIM-3 em Tregs induz um fenótipo mais efetor, aumentando sua atividade supressora, promovendo a exaustão das células T efetoras e elevando a produção de IL-10 (BANERJEE et al., 2021). Dessa forma, a menor expressão de TIM-3 em Tregs dos pacientes com LC pode refletir uma capacidade reguladora comprometida, contribuindo para uma resposta inflamatória descontrolada e para a patogênese da doença.

Na exaustão de células T um outro elemento que tem sido bastante estudado é o fator de transcrição TOX, que desempenha um papel na modulação da resposta imune e na atividade de células T (KHAN et al., 2019). No nosso estudo observamos uma expressão aumentada tanto do percentual quanto do MFI nas células T CD4conv antes do tratamento, o que pode indicar um papel ativo desse fator de transcrição na exaustão celular e na capacidade dessas células de influenciar efetivamente na infecção. No entanto, diferindo dos nossos achados, em vírus crônicos como no caso do HIV, TOX é um fator de transcrição que mantém a exaustão de células T $CD8^+$ de memória (SEKINE et al., 2020). Essas diferenças indicam a necessidade de investigar mais a fundo se a modulação de TOX em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ ocorre de maneira distinta dependendo do patógeno envolvido, uma vez que não observamos o aumento de TOX pelas células $CD8^+$ no grupo antes do tratamento, mas sim uma diminuição quando comparado ao grupo controle, o que pode sugerir uma tentativa das células T $CD8^+$ de manter sua

capacidade citotóxica contra o parasita e evitar a progressão para um estado de exaustão completa.

A Granzima B é uma enzima liberada por células citotóxicas como os linfócitos T $CD8^+$ e células NK, desempenhando um papel crucial na indução de apoptose em células infectadas por patógenos (NOVAIS; NGUYEN; SCOTT, 2021). No nosso estudo observamos um aumento significativo na expressão percentual de Granzima B pelas células T CD4conv e T $CD8^+$ no grupo antes do tratamento, o que pode estar contribuindo para a formação das lesões. Um estudo encontrou achados semelhantes com o nosso, no qual os pesquisadores avaliaram a expressão de Granzima B pelas células $CD8^+$ em pacientes com LC residentes de áreas endêmicas para *Leishmania braziliensis*. Neste estudo identificaram que os pacientes do estudo produziram mais granzima B pelas células $CD8^+$ e apresentaram uma citotoxicidade aumentada, sugerindo que as células T $CD8^+$ estão envolvidas na formação das lesões de LC (CARDOSO et al., 2015).

Outro achado relevante foi o aumento da intensidade de fluorescência (MFI) de granzima B nas células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ nos grupos antes do tratamento, com uma diminuição significativa nos grupos pós-tratamento. Esse resultado pode sugerir que, com a resolução da infecção, há uma redução na atividade citotóxica dessas células, o que pode estar relacionado ao controle da resposta inflamatória e à restauração do equilíbrio imunológico. Embora a atividade citotóxica seja essencial para o controle da infecção, uma resposta exacerbada pode resultar em danos teciduais significativos (NOVAIS; NGUYEN; SCOTT, 2021).

Além disso, também observamos uma diminuição da frequência de células T CD4conv coexpressando $GRANZ^+2B4^+PD1^+$ no grupo antes do tratamento em comparação ao grupo controle, o que pode ter acontecido devido à migração dessas células para os locais de lesão e diminuindo sua frequência detectada no sangue periférico, além de indicar que essas células podem estar passando por um processo de exaustão, resultando na diminuição da funcionalidade celular (BANERJEE et al., 2021; NOVAIS; NGUYEN; SCOTT, 2021).

Observamos que, em células T $CD8^+$, o aumento da frequência do receptor 2B4 no grupo pós-tratamento, assim como o aumento da coexpressão de $2B4^+CD160^+$ quando comparado ao grupo antes do tratamento, e juntamente

observamos o mesmo padrão na intensidade de fluorescência média (MFI) do receptor em células $CD8^+$ e DN, o que sugere que há uma modulação pós-terapêutica visando regular a atividade citotóxica. Essa regulação por 2B4, um receptor co-inibitório, tem como função limitar a atividade efetora das células T, prevenindo danos teciduais excessivos, mas, ao mesmo tempo, pode comprometer a eliminação do parasita se expressa em níveis elevados ou em contexto de exaustão funcional (CHEN et al., 2017). Dessa forma, a modulação dos níveis de 2B4, e sua coexpressão com CD160 e granzima B, indicam uma regulação da atividade citotóxica após o tratamento, o que pode refletir um mecanismo de proteção contra danos teciduais após a cura.

Diferindo dos nossos achados, no estudo de Egui e colaboradores (2018), ao avaliar a expressão 2B4 e CD160 por células $CD8^+$ de indivíduos com LC, observou-se que houve maior expressão desses marcadores por células CD8+ pelos indivíduos com a doença ativa quando comparado ao grupo após a cura, o que sugere exaustão de células T $CD8^+$ durante a infecção por *Leishmania* (EGUI et al., 2018).

Os nossos achados demonstram que, nas células T CD4conv e DN, a expressão de CD160 é significativamente reduzida no grupo antes do tratamento em comparação ao controle, enquanto no grupo pós-tratamento observa-se um aumento acentuado, sugerindo uma recuperação ou reequilíbrio da via regulatória. Em contraste, nas células T $CD8^+$, o aumento de CD160 no pós-tratamento, tanto em frequência quanto em intensidade (MFI), indica uma possível retomada do controle da atividade citotóxica, prevenindo danos teciduais excessivos. Essa dinâmica pode ser explicada pelo papel dual do CD160, podendo atuar tanto na ativação quanto na inibição das respostas celulares, dependendo do contexto imunológico (NOVAIS; NGUYEN; SCOTT, 2021).

No estudo realizado com humanos, de Zhang e colaboradores 2020, mostra que a modulação de CD160 em diferentes subpopulações de células T está diretamente ligada ao equilíbrio entre respostas efetoras e mecanismos inibitórios, influenciando o curso das infecções crônicas (ZHANG et al., 2020). Dessa forma, a variação na expressão de CD160 observada em nossos grupos pode refletir a

tentativa do sistema imunológico de reequilibrar os mecanismos de ativação e regulação após a intervenção terapêutica na leishmaniose cutânea.

Nosso estudo observou ainda que, nas células T $CD8^+$ e nas DN, há uma redução na frequência e na intensidade de expressão do receptor CD28 no grupo pós-tratamento em comparação ao grupo controle, enquanto nas células T CD4conv observamos um aumento na intensidade de fluorescência de CD28 no grupo antes do tratamento. O CD28 é uma molécula de superfície que tem como principal função atuar como receptor de co-estimulação de células T. A interação do CD28 aos seus ligantes CD80/CD86 vai ser responsável pela ativação das células T, proliferação das células T ativadas e promoção de uma resposta imune eficiente (FIRMINO RODRIGUES NETO, 2022).

Nossos achados sugerem que, durante a fase ativa da leishmaniose cutânea, a ativação exacerbada das células T CD4conv é mediada pelo sinal co-estimulador do CD28, promovendo uma resposta imune intensa, enquanto a diminuição de CD28 em células T CD8+ e DN no grupo pós-tratamento pode refletir uma tentativa de retorno da homeostase do sistema imune, diminuindo o sinal coestimulador para evitar uma ativação excessiva das células T. No entanto, em estudos com humanos com doenças crônicas demonstraram que a perda ou redução de CD28 também pode está associada à disfunção e exaustão das células T, influenciando negativamente na resposta imune (HUANG et al., 2023; ZELLE-RIESER et al., 2016).

Os resultados da análise de t-SNE corroboram com os dados percentuais por citometria de fluxo. Observamos que tanto as células T CD4+ quanto as células T CD8+ exibiram elevada expressão de PD-1 e elevada expressão de TIGIT pelas células T CD4+, contribuindo para o estado de exaustão celular. Além disso, observamos redução da expressão de Granzima B, assim como observado nos dados percentuais, pelo grupo pós-tratamento sugerindo o retorno da homeostase após resolução da doença.

Juntos, nossos dados sugerem que as células T CD4conv apresentam um padrão de exaustão no grupo antes do tratamento, evidenciado pelo aumento de receptores como PD-1 e TIGIT, sugerindo uma tentativa de modular a resposta Th1, mas comprometendo a eficácia na eliminação do parasita e, consequentemente,

cronicidade da doença. Enquanto no grupo pós-tratamento os dados indicam uma tendência à recuperação da funcionalidade imunológica com a redução de TIGIT e TOX, o que sugere uma diminuição do estado de exaustão e reequilíbrio da resposta efetora.

Em contraste, as células T $CD8^+$ exibiram um perfil mais predominantemente citotóxico, com a expressão de 2B4 e CD160 no grupo pós-tratamento, sugerindo uma recuperação do sistema imune e retorno da homeostase. As células T reguladoras (Treg) apontaram para uma capacidade supressora alterada que pode prejudicar o equilíbrio regulatório com a elevação de TIGIT e diminuição de TIM-3 nos pacientes com a doença ativa. Já nas células DN observou-se alteração com maior expressão em marcadores como CD28 e CD160 no grupo pós-tratamento, que podem refletir um estado de ativação e regulação para restabelecer a homeostase.

Além dos resultados de citometria de fluxo, a análise transcriptômica de RNAseq do nosso estudo demonstrou que os genes associados à exaustão e supressão de células T, como GZMB (Granzima B), CD160, CD244 (2B4) e HAVCR2 (TIM-3), estão significativamente elevados em lesões de leishmaniose cutânea quando comparados à pele saudável, o que reforça nossa hipótese de que há uma disfunção das células T. Esses dados reforçam os achados obtidos por citometria de fluxo, que também indicam a presença de um perfil de exaustão celular nos pacientes com LC. Em estudo recente de Singh e colaboradores 2025, foram analisadas amostras de lesões e pele saudável, e foi observado uma expressão elevada de marcadores de exaustão como PDCD1, TIGIT, HAVCR2 e GZMB, que estão associados à incapacidade de efetiva da resposta imune e à persistência do parasita (AVILA et al., 2025).

A análise da expressão de citocinas inflamatórias do nosso estudo demonstrou uma variação interessante na regulação da resposta imune na leishmaniose cutânea. A IL-12, essencial para diferenciação de células T CD4+ em células Th1 que serão responsáveis por produzir IFN-y para eliminação do parasita (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; JOHANSSON et al., 2011), não apresentou variações significativas entre amostras basais e estimuladas com antígeno de

Leishmania braziliensis, sugerindo que nesse contexto outros mediadores podem ser mais determinantes para a resposta imune.

Em contrapartida, o fator de necrose tumoral (TNF), mostrou aumento significativo em amostras estimuladas tanto em pacientes com LC ativa quanto em indivíduos saudáveis, o que pode refletir a ativação de uma resposta pró-inflamatória indispensável para a eliminação do parasita, mas que, se expresso de forma excessiva e prolongada, pode ocasionar danos teciduais (TARAGHIAN et al., 2021). Em estudo de coorte, realizado em humanos com LC, relacionaram níveis elevados de TNF com maiores lesões, sugerindo que a modulação desse fator pode ser crucial para o manejo das úlceras causadas pela LC (BARRAL et al., 2011).

De forma similar, a expressão das citocinas IL-1β e IL-6 aumentou significativamente após estímulo antigênico, evidenciando uma resposta inflamatória robusta que, em exposição prolongada, pode promover sinalização crônica das células T, resultando na perda funcional progressiva dessas células e contribuindo para a exaustão celular (CARVALHO; BACELLAR; CARVALHO, 2022).

Em adição, as células basais do grupo pós-tratamento apresentaram níveis significativamente maiores de TNF, IL-6 e IL-1β quando comparadas ao grupo antes do tratamento, sugerindo que, após a intervenção terapêutica, o sistema imunológico passa por um reequilíbrio inflamatório, possivelmente refletindo uma tentativa de reparar os danos causados durante a fase ativa da doença. Uma situação similar pode estar acontecendo quando observamos que houve uma maior e significativa expressão de TNF pelas células que não receberam o estímulo antigênico do grupo controle quando comparado a expressão pelas células basais do grupo antes do tratamento, o que nos leva a supor que indivíduos saudáveis estão exibindo um perfil de inflamação normal a fatores não relacionados a LC, enquanto os indivíduos com LC ativa apresentam uma menor e não suficiente expressão de TNF para eliminação do parasita, podendo ser uma característica da exaustão celular já estabelecida (GONZÁLEZ-TAFOYA et al., 2020; TARAGHIAN et al., 2021).

Uma outra citocina pró-inflamatória é a IL-8, que é responsável por recrutar células imunológicas para o sítio da inflamação. No nosso estudo, a IL-8 teve uma expressão significativamente maior nas amostras que não receberam estímulo

antigênico do grupo pós-tratamento quando comparado às amostras que também não receberam o estímulo do grupo de indivíduos antes do tratamento e controle. Esse aumento de IL-8 no grupo pós-tratamento pode estar relacionado ao processo de regeneração tecidual após o tratamento contra LC para recuperação do tecido lesionado.

Uma vez que o sistema imune está expressando citocinas pró-inflamatórias na tentativa de eliminar o patógeno, mas que essa expressão pode estar excessiva e causar danos ao tecido (AZIM et al., 2021), uma outra citocina é extremamente importante para regular a resposta inflamatória excessiva. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que tem a capacidade de inibir citocinas pró-inflamatórias e suprimir a ativação de células T com o objetivo de controlar uma resposta imune excessivamente agressiva (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008).

Nesse estudo identificamos que houve uma expressão significativamente aumentada de IL-10 nas amostras estimuladas com antígeno nos grupos controle e antes do tratamento, podendo inferir que essa expressão pode estar envolvida na modulação da resposta imune, tentando prevenir uma resposta inflamatória excessiva, uma vez que identificamos um aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias, como visto anteriormente. Similar aos nossos achados, um outro estudo também avaliou a expressão de IL-10 em pacientes com LC. Nesse estudo eles identificaram que houve uma maior expressão de IL-10 pelas células Treg de pacientes com a doença ativa quando comparado a indivíduos não infectados (COSTA et al., 2013). Em um outro estudo, ao avaliar a produção de IL-10 por indivíduos antes do tratamento, pós-tratamento e após cura clínica, observou-se que houve uma produção significativamente maior de IL-10 pelos indivíduos antes do tratamento quando comparado aos outros dois grupos (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012). No entanto, esse mecanismo de *feedback* negativo da IL-10 pode também estar contribuindo para o estado de exaustão celular uma vez que essa citocina vai limitar a capacidade efetiva das células T.

Além disso, também identificamos que houve uma expressão aumentada e significativa de IL-10 pelas amostras que não receberam estimulação antigênica no grupo pós-tratamento quando comparado ao grupo antes do tratamento, o que pode indicar que após o tratamento o sistema imune está promovendo a resolução da

inflamação crônica e respondendo de maneira mais controlada e regulada para retorno da homeostase do indivíduo.

Já uma maior e significativa expressão de IL-10 nas amostras que não receberam o estímulo antigênico do grupo controle quando comparado às amostras que não receberam o estímulo do grupo antes do tratamento pode estar relacionado com os níveis basais de regulação imunológica presente em indivíduos saudáveis, enquanto os indivíduos com a doença ativa apresentam uma resposta imunológica desequilibrada, refletindo em uma resposta pró-inflamatória exacerbada (KANE; MOSSER, 2001).

Este estudo teve como limitações a captação de pacientes que foi impactada pela pandemia de COVID-19, que restringiu o acesso aos serviços de saúde e, consequentemente, dificultou a inclusão de participantes. Além disso, ocorreram desafios de natureza técnica, como dificuldades em alguns momentos no uso dos equipamentos, bem como contaminação de reagentes, fatores esses que levaram à perda de algumas das amostras, e por consequência, à redução do número final de participantes incluídos no estudo.

Em conjunto, nossos dados integrados, da citometria de fluxo, análise de RNAseq e avaliação de citocinas, revelam um cenário complexo na leishmaniose cutânea, onde os marcadores de exaustão e inibição (PD-1, TIM-3, TIGIT, CD160 e TOX) se articulam com os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1β, IL-6, IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10) para moldar a resposta imune. Durante a fase ativa, a ativação inflamatória intensa e a subsequente exaustão das células T parecem favorecer a persistência do parasita, enquanto, após o tratamento, há indícios de um reequilíbrio imunológico que busca restaurar a homeostase.

8 CONCLUSÕES

- A LC afeta principalmente indivíduos adultos do sexo masculino devido a uma maior exposição ambiental ao vetor, especialmente em atividades laborais ao ar livre, o que também justifica a predominância das lesões estarem localizadas nos membros inferiores;
- A citometria de fluxo possibilitou a identificação das subpopulações de linfócitos T CD4conv, $CD8^+$, Treg e duplo-negativas, demonstrando que pacientes com LC ativa apresentaram um perfil imunológico alterado evidenciado pelo aumento de receptores de exaustão e inibitórios;
- As células T CD4conv demonstraram elevada expressão de receptores de exaustão como PD-1 e TIGIT pelo grupo antes do tratamento, sugerindo uma tentativa de modulação da resposta Th1 que, contudo, compromete a eficácia na eliminação do parasita;
- Já a alta expressão dos receptores 2B4 e CD160 pelo grupo pós-tratamento em células T CD8+ sugerem uma recuperação do sistema imune, visando regular a atividade citotóxica das células e restabelecimento da homeostase;
- As células T reguladoras (Treg) tiveram um aumento no grupo antes do tratamento na frequência de TIGIT e diminuição de TIM-3, sugere para um perfil que pode contribuir para um desequilíbrio regulatório;
- As alterações em marcadores CD28 e CD160 nas células duplo-negativas do grupo pós-tratamento possivelmente colaboram para o reequilíbrio do sistema imunológico e retorno da homeostase;
- Nos ensaios de CBA observou-se que, enquanto pacientes com LC ativa manifestam uma resposta pró-inflamatória que pode contribuir para a cronicidade da doença, o aumento dessas citocinas, como TNF, IL-6 e IL-8 no grupo pós-tratamento pode indicar uma modulação na resposta inflamatória e tentativa de restauração da homeostase;
- A análise transcriptômica por RNAseq confirmou a sobre-expressão de genes associados à exaustão celular, reforçando os achados fenotípicos e demonstrando que os mecanismos de exaustão dos linfócitos T estão presentes em lesões de LC, resultando na cronicidade da doença;

- Os resultados de t-SNE reforçaram a nossa hipótese que a expressão de receptores de exaustão, como PD-1, em pacientes com a doença ativa podem contribuir para o estado de exaustão de células T;
- A integração dos dados clínicos, imunofenotípicos e transcriptônicos ofereceu uma visão abrangente dos mecanismos imunológicos na LC, evidenciando como a infecção ativa pode induzir um estado de exaustão que favorece a cronicidade da doença;
- Esse estudo pode servir de apoio para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que visem reverter a exaustão dos linfócitos T, melhorar a resposta imune e, consequentemente, controlar a disseminação e os impactos econômicos e psicossociais da doença.

REFERÊNCIAS

ALLOS, H. et al. Regulatory T Cells for More Targeted Immunosuppressive Therapies. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 1, p. 1–13, mar. 2019.

AMORIM, C. F. et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 519, 20 nov. 2019.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, Associacao Medica Brasileira, 1 mar. 2018.

ASANO, T. et al. PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy. **Blood,** v. 129, n. 15, p. 2186–2197, 13 abr. 2017.

AVILA, J. P. et al. T Cell Dysfunction in Cutaneous Leishmaniasis at Single-Cell Resolution, 25 fev. 2025.

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

BANERJEE, H. et al. Expression of Tim-3 drives phenotypic and functional changes in Treg cells in secondary lymphoid organs and the tumor microenvironment. **Cell Reports,** v. 36, n. 11, p. 109699, set. 2021.

BARRAL, A. et al. Lesion Size Correlates with Leishmania Antigen-Stimulated TNF-Levels in Human Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 70–73, 1 jul. 2011.

BARROSO, D. H. et al. PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 11 maio 2018.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, out. 2012.

BUNN, P. T. et al. Distinct Roles for CD4+ Foxp3+ Regulatory T Cells and IL-10–Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 11, p. 3362–3372, 1 dez. 2018.

BUZANOVSKY, L. P. et al. Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in Brazil - a systematic literature review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

CAETANO, D. et al. Parâmetros clínicos, diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 2087–2105, 30 jun. 2019.

CARDOSO, T. M. et al. Protective and Pathological Functions of CD8 + T Cells in *Leishmania braziliensis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, mar. 2015.

CARVALHO, A. M.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 466, 14 abr. 2022.

CHEN, C. et al. Cutting Edge: 2B4-Mediated Coinhibition of CD4+ T Cells Underlies Mortality in Experimental Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 6, p. 1961–1966, 15 set. 2017.

CLOUGH, E.; BARRETT, T. The Gene Expression Omnibus Database. Em: [s.l: s.n.]. p. 93–110.

COLLIN, M.; BIGLEY, V. Human dendritic cell subsets: an update. **Immunology**, v. 154, n. 1, p. 3–20, maio 2018.

COSTA, D. L. et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1491–1500, dez. 2013.

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

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 1 maio 2008.

COVRE, L. P. et al. Lesional senescent CD4+ T cells mediate bystander cytolysis and contribute to the skin pathology of human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 21 out. 2024.

CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design,** v. 8, n. 4, p. 319–342, 1 fev. 2002.

COUTINHO AB, SOUZA GA, COSTA DL. Epidemiology and challenges for control of cutaneous leishmaniasis in Brazil. ***Rev Soc Bras Med Trop***. 2022;55:e20210125.

CUNHA, C. F. et al. Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+CD56+NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, 2020.

DA FONSECA-MARTINS, A. M. et al. Leishmania Parasites Drive PD-L1 Expression in Mice and Human Neutrophils With Suppressor Capacity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 15 jun. 2021.

DAS, M.; ZHU, C.; KUCHROO, V. K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. **Immunological ReviewsBlackwell** Publishing Ltd, 1 mar. 2017.

DAVIS, S.; MELTZER, P. S. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1846–1847, 15 jul. 2007.

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, 2020.

DUHALDE VEGA, M. et al. PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β-coronavirus disease. **Science Advances**, v. 8, n. 38, 23 set. 2022.

EGUI, A. et al. Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 19 nov. 2018.

EJRNAES, M. et al. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 11, p. 2461–2472, 30 out. 2006.

ELINA PANAHI et al. Protective and Pathogenic Immune Responses to Cutaneous Leishmaniasis. Em: DE AZEVEDO CALDERONON, L. (Ed.). Leishmaniasis - General Aspects of a Stigmatized Disease. [s.l.] IntechOpen, 2022.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M.; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111671, jul. 2021.

ESTUMANO, J. C.; SÁ, L. L.; MACÊDO, C. G. Leishmaniose tegumentar americana: Análise epidemiológica de uma década no interior da Amazônia, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 36311–36325, 2020.

FILHO, A. A. P. et al. Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106152, dez. 2021.

FIRMINO RODRIGUES NETO, J. Costimulatory molecules and Visceral leishmaniasis. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 5, p. 1–42, 15 ago. 2022.

FREITAS E SILVA, R. DE et al. Programmed Cell Death Ligand (PD-L)-1 Contributes to the Regulation of CD4+ T Effector and Regulatory T Cells in Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 22 out. 2020.

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

GANNAVARAM, S. et al. Modulation of Innate Immune Mechanisms to Enhance Leishmania Vaccine-Induced Immunity: Role of Coinhibitory Molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 13 maio 2016.

GARCIA DE MOURA, R. et al. PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology,** v. 12, 9 mar. 2021.

GAUTRON, A. et al. Enhanced suppressor function of TIM-3 + FoxP3 + regulatory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 9, p. 2703–2711, 16 set. 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003.

GONZÁLEZ-TAFOYA, E. et al. TNF contributes to T-cell exhaustion in chronic L. mexicana infections of mice through PD-L1 up-regulation. Cellular Immunology, v. 358, 1 dez. 2020.

GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately followingLeishmania donovani infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–695, fev. 1998.

GRIFFERTY, G. et al. Vulnerabilities to and the Socioeconomic and Psychosocial Impacts of the Leishmaniases: A Review. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 12, p. 135–151, jun. 2021.

GU, Z. Complex heatmap visualization. **iMeta**, v. 1, n. 3, set. 2022.

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

HARJUNPÄÄ, H.; GUILLEREY, C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. **Clinical and Experimental ImmunologyBlackwell** Publishing Ltd, 1 maio 2020.

HUANG, Y. et al. Loss of CD28 expression associates with severe T-cell exhaustion in acute myeloid leukemia. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 7 mar. 2023.

HURDAYAL, R. et al. Inflammatory Dendritic Cells, Regulated by IL-4 Receptor Alpha Signaling, Control Replication, and Dissemination of Leishmania major in Mice. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 9, 24 jan. 2020.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, maio 2016.

JAFARZADEH, A. et al. The expression of PD-1 and its ligands increases in Leishmania infection and its blockade reduces the parasite burden. **Cytokine**, v. 153, p. 155839, maio 2022.

JAWED, J. J.; DUTTA, S.; MAJUMDAR, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 117, p. 109098, set. 2019.

JOHANSSON, U. et al. Dendritic cells are able to produce IL-12p70 after uptake of apoptotic cells. **Immunobiology**, v. 216, n. 1–2, p. 251–255, jan. 2011.

JOHNSTON, R. J. et al. The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8 + T Cell Effector Function. **Cancer Cell**, v. 26, n. 6, p. 923–937, dez. 2014.

JOSEFSSON, S. E. et al. T Cells Expressing Checkpoint Receptor TIGIT Are Enriched in Follicular Lymphoma Tumors and Characterized by Reversible

Suppression of T-cell Receptor Signaling. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 4, p. 870–881, 15 fev. 2018.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 15 jan. 2001.

KHAN, O. et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. **Nature**, v. 571, n. 7764, p. 211–218, 17 jul. 2019.

KURTULUS, S. et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 11, p. 4053–4062, 28 set. 2015.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, 5 dez. 2014.

MARTINEZ, G. J. et al. The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8 + T Cells. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 265–278, fev. 2015.

MATTOS, A. B. N. DE; TUMELERO, J. L. Perfil epidemiológico da Leishmaniose tegumentar no Brasil de 2015-2020. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 3, p. e17212340385, 6 mar. 2023.

MESSLINGER, H. et al. Monocyte-Derived Signals Activate Human Natural Killer Cells in Response to Leishmania Parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 24 jan. 2018.

MEYIAH, A. et al. Co-expression of PD-1 with TIGIT or PD-1 with TIM-3 on tumor-infiltrating CD8+ T cells showed synergistic effects on improved disease-free survival in treatment-naïve CRC patients. **International Immunopharmacology**, v. 119, p. 110207, jun. 2023.

MIGGELBRINK, A. M. et al. CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer? **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 21, p. 5742–5752, 1 nov. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Painel de casos de leishmanioses no Brasil.

MOLLAVELIOGLU, B. et al. High co-expression of immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, and TIGIT on tumor-infiltrating lymphocytes in early-stage breast cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 349, 21 out. 2022.

MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M. Slow Down and Survive: Enigmatic Immunoregulation by BTLA and HVEM. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 389–411, 1 mar. 2010.

NNAMDI, M. I. et al. Leishmania immunity: Advancing immunotherapy and vaccine development. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 1201. 2020.

NOVAIS, F. O.; NGUYEN, B. T.; SCOTT, P. Granzyme B Inhibition by Tofacitinib Blocks the Pathology Induced by CD8 T Cells in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 575–585, mar. 2021.

NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 251–259, 24 maio 2015.

NÜSSING, S.; TRAPANI, J. A.; PARISH, I. A. Revisiting T Cell Tolerance as a Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 set. 2020.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmaniasis: epidemiological report in the Americas. Washington, D.C.: OPAS, 2019.

PHILIP, M.; SCHIETINGER, A. CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 4, p. 209–223, 12 abr. 2022.

RALLÓN, N. et al. Expression of PD-1 and Tim-3 markers of T-cell exhaustion is associated with CD4 dynamics during the course of untreated and treated HIV infection. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193829, 8 mar. 2018.

RODRIGUES, L. S. et al. Multifunctional, TNF-α and IFN-γ-Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8High T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 28 out. 2021.
SAEIDI, A. et al. T-cell exhaustion in chronic infections: Reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, 9 nov. 2018.

SANTOS, C. DA S. et al. CD8+ Granzyme B+–Mediated Tissue Injury vs. CD4+IFNγ+–Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–1540, jun. 2013.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 18 set. 2016.

SEKINE, T. et al. TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8 + T cellsSci. **Immunol.** [s.l: s.n.].

SERRANO-COLL, H.; CARDONA-CASTRO, N.; RAMOS, A. P.; LJANOS-CUENTAS, A. Innate immune response: ally or enemy in cutaneous leishmaniasis? Pathog Dis., v. 8, p.78, jun. 2021.

SIMON, S.; LABARRIERE, N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? **OncoImmunologyTaylor and Francis Inc**., 2 jan. 2018.

ŠUNINA, M. et al. Human CD4 + and CD8 + T lymphocyte subpopulations have significantly different surface expression patterns of CD226 and TIGIT molecules. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 94, n. 3, 4 set. 2021.

TARAGHIAN, M. et al. The Comparison of the IFN-ɤ, TNF-α and IL-10 Cytokines in Healing and Non-healing Cutaneous Leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**, 6 set. 2021.

TRAJKOVIC, V. et al. Amphotericin B potentiates the activation of inducible nitric oxide synthase and causes nitric oxide-dependent mitochondrial dysfunction in cytokine-treated rodent astrocytes. **Glia**, v. 35, n. 3, p. 180–188, set. 2001.

VELIKKAKAM, T.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression. **Immunology**, v. 165, n. 4, p. 371–385, 5 abr. 2022.

VON STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 340–346, abr. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. 2023.

YASMIN, H. et al. Host–Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies. **Immuno**, v. 2, n. 1, p. 218–254, 9 mar. 2022.

ZELLE-RIESER, C. et al. T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 3 nov. 2016.

ZHANG, L. et al. CD160 Plays a Protective Role During Chronic Infection by Enhancing Both Functionalities and Proliferative Capacity of CD8+ T Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 11 set. 2020.

ZHONG, X. et al. TIGIT regulates CD4+ T cell immunity against polymicrobial sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 13 mar. 2024.

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

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

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

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

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

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

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

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

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

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

Rubricas _____ (Participante) 1/2

_____ (Pesquisador)

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Recife, _____/_____/ 201 ___.

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

Impressão digital

Assinatura da participante:_____

Assinatura Testemunha: _____

Assinatura do entrevistador_____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

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

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

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

Rubricas _____ (Participante)

_____ (Pesquisador)

APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

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

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

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

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

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

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

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o você concordar. Você poderá contactar o CEP/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 Magahães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

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

Rubricas _____ (Participante)

_____ (Pesquisador)

1/2

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Recife, _____ /_____/ 20 ___.

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

Assinatura da menor:_____

Impressão digital

Assinatura Testemunha: _____

Assinatura do entrevistador_____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

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

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

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

Rubricas _____ (Participante)

_____ (Pesquisador)

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PAIS OU RESPONSÁVEIS

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PAIS OU RESPONSÁVEIS

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

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

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

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

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

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

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

Rubricas _____ (Participante)

_____ (Pesquisador)

1/2

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

DECLARAÇÃO DO RESPONSÁVEL

Recife. _____ /_____/ 201 ___.

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

Impressão digital

Assinatura do responsável:_____

Assinatura Testemunha: _____

Assinatura do entrevistador_____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

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

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas,
localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE. CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. 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

Rubricas _____ (Participante)

_____ (Pesquisador)

APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

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)

_____ (Pesquisador)

1/2

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:_____

Impressão digital

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: comitetica@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.

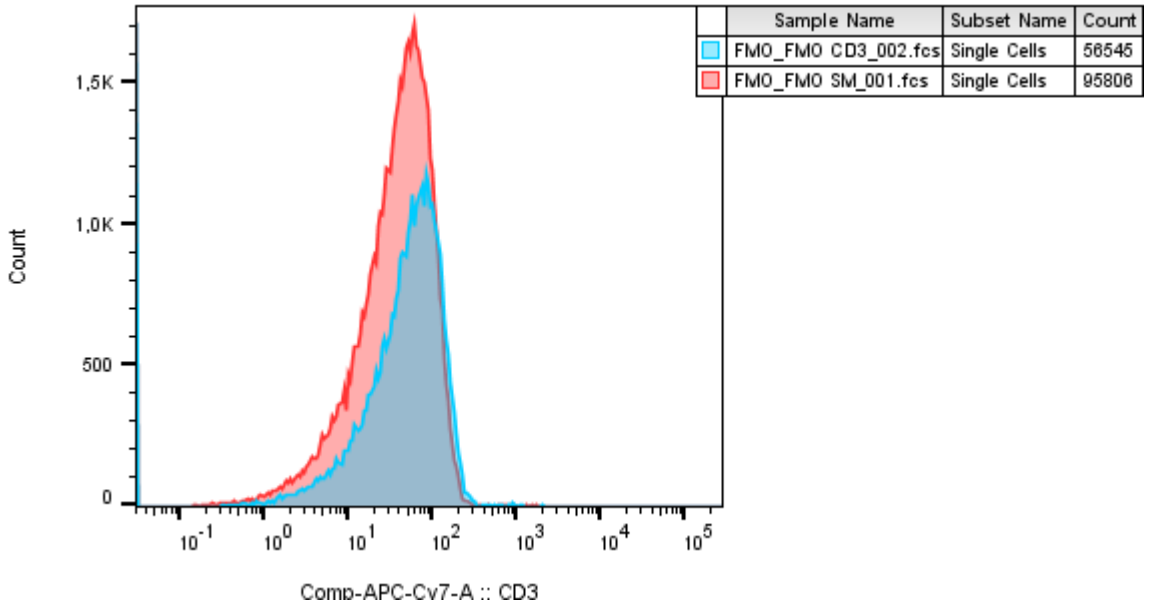
Esse projeto antes de seu inicio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

Rubricas _____ (Participante)

_____ (Pesquisador)

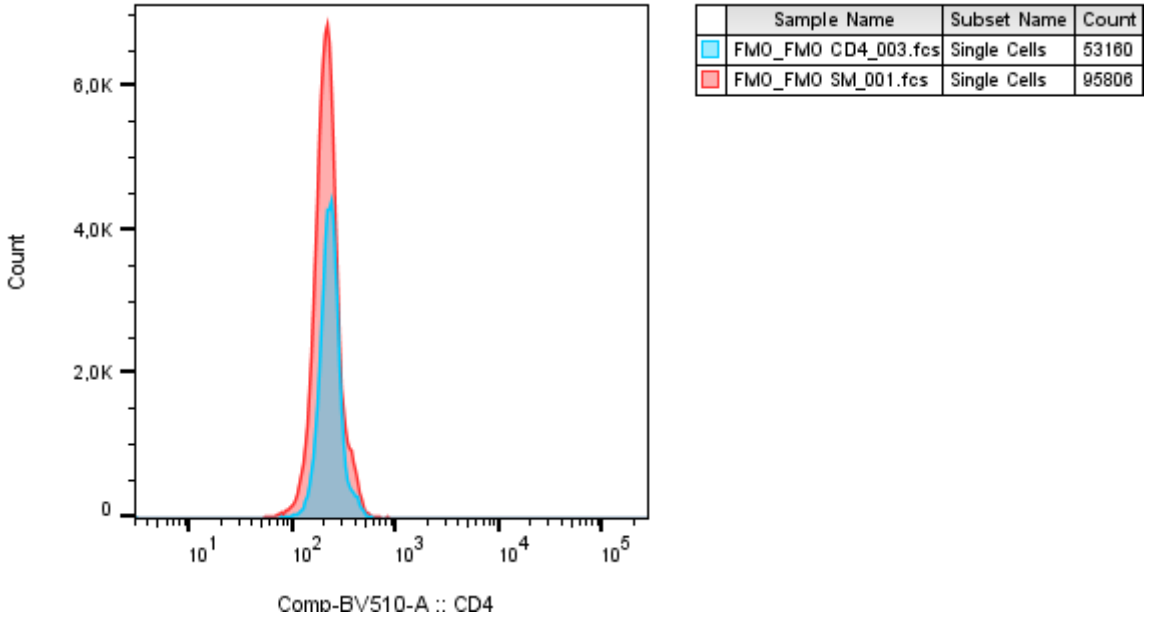
APÊNDICE E – *FLUORESCENCE MINUS ONE* DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Figura 30 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD3 (APC-CY7)



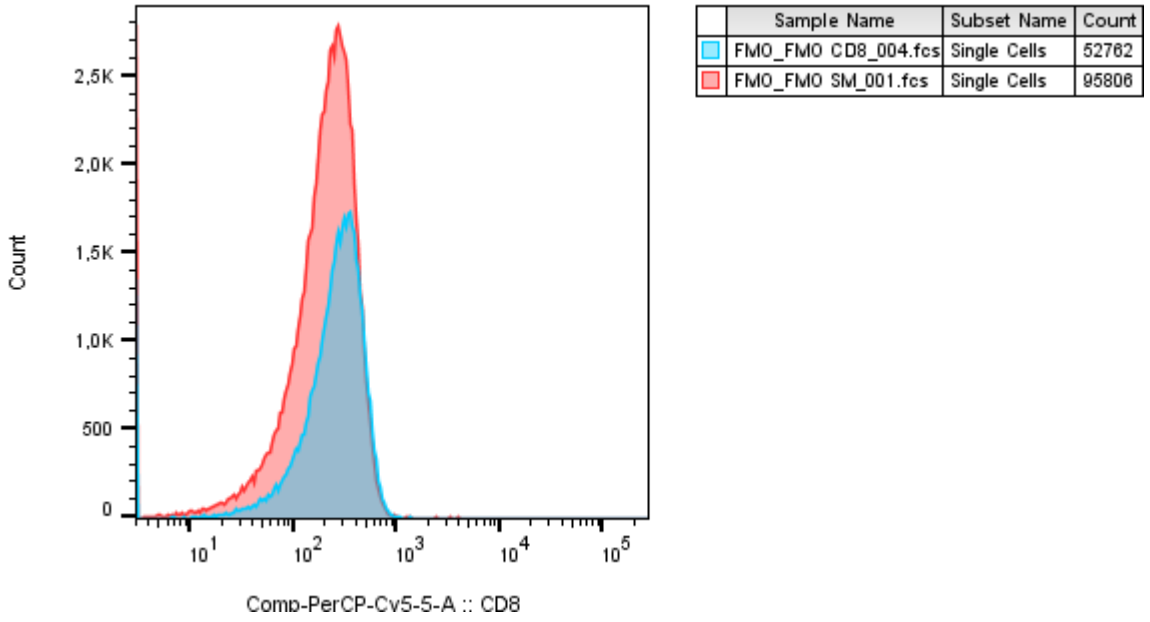
Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

Figura 31 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD4 (BV510)



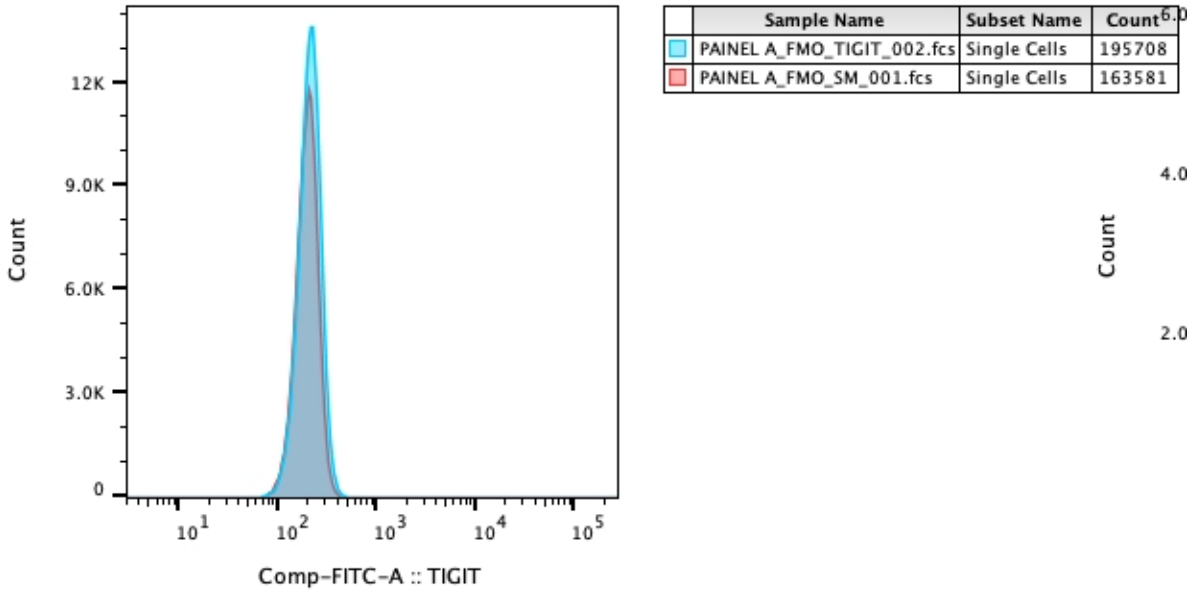
Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

Figura 32 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD8 (PerCP)



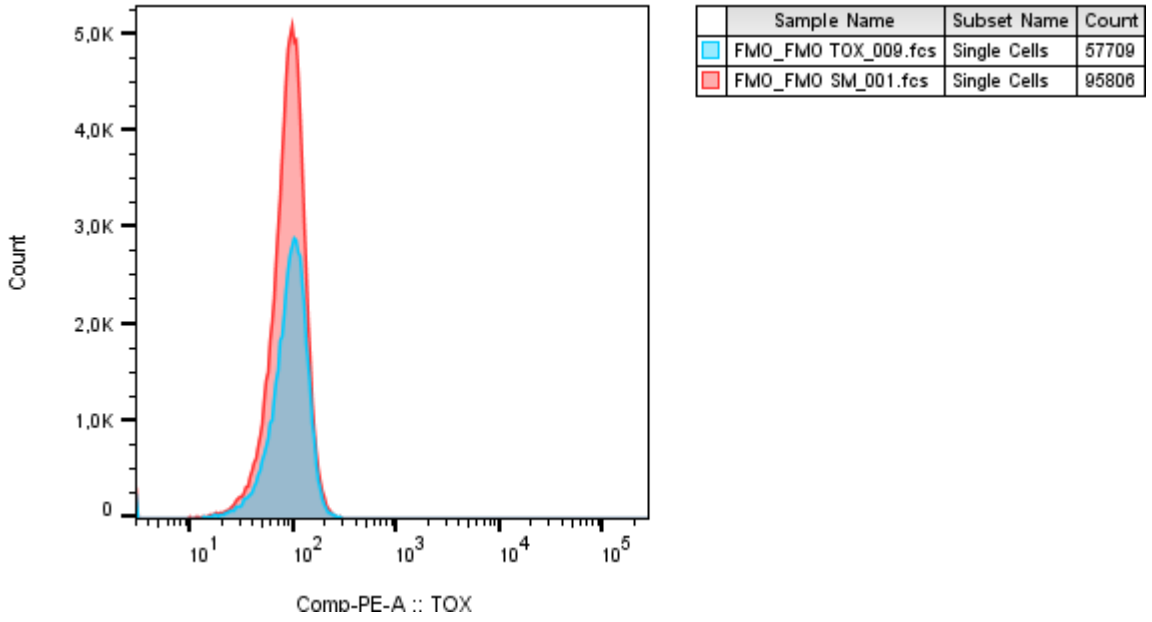
Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

Figura 33 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo TIGIT (FITC)



Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

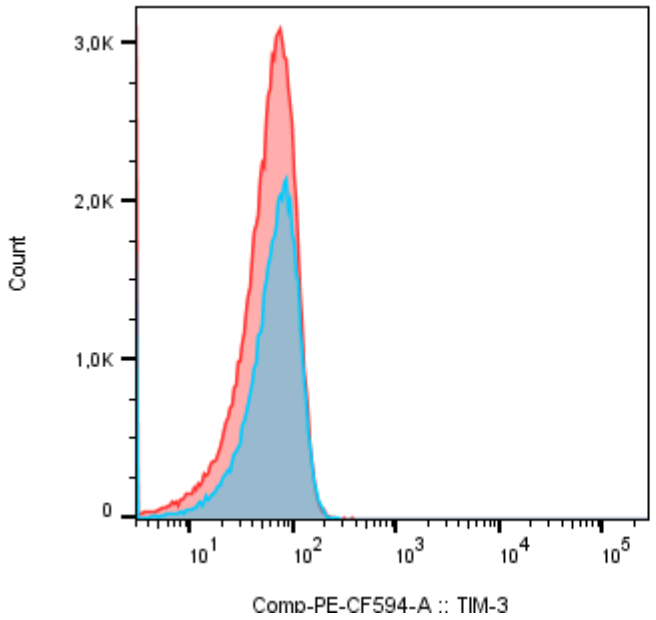
Figura 34 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo TOX (PE)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO_FMO TOX_009.fcs	Single Cells	57709
	FMO_FMO SM_001.fcs	Single Cells	95806

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

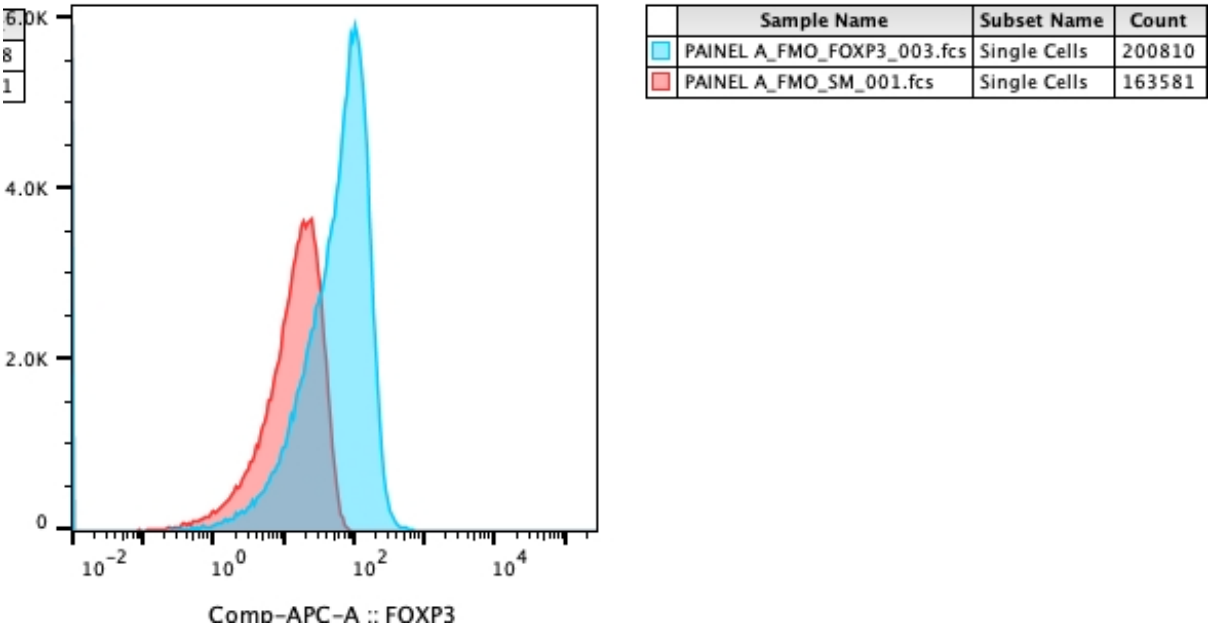
Figura 35 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo TIM-3 (PE/DAZZLE)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO_FMO TIM3_007.fcs	Single Cells	59512
	FMO_FMO SM_001.fcs	Single Cells	95806

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

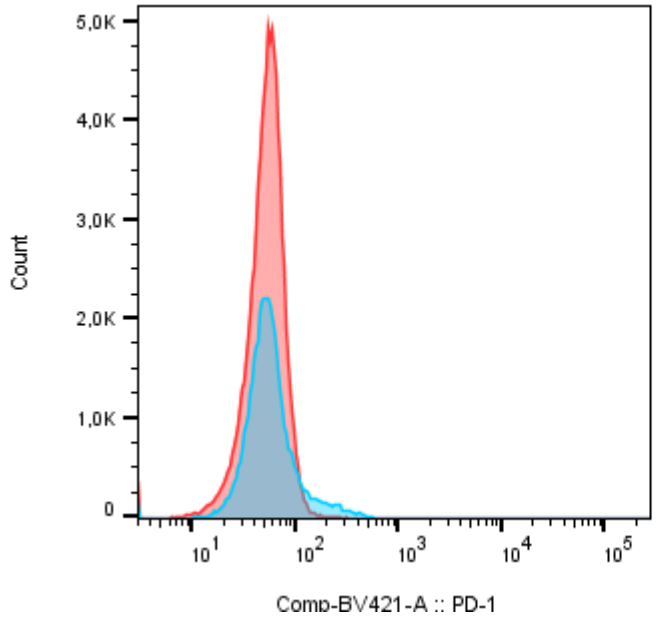
Figura 36 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo FOXP3 (APC)



	Sample Name	Subset Name	Count
	PAINEL A_FMO_FOXP3_003.fcs	Single Cells	200810
	PAINEL A_FMO_SM_001.fcs	Single Cells	163581

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

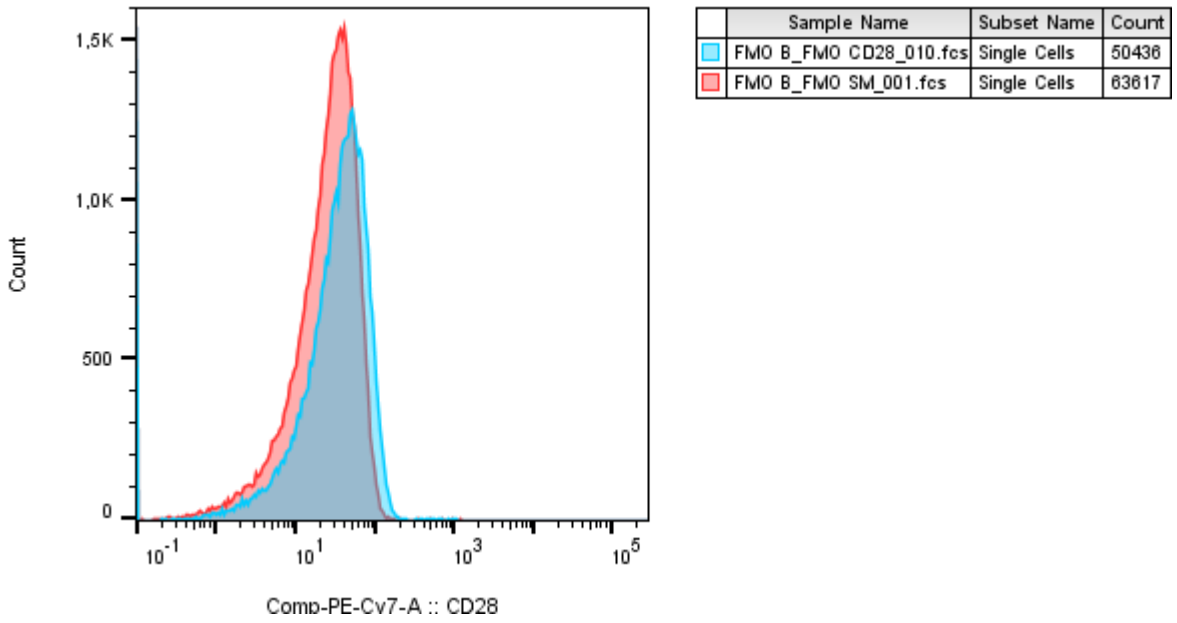
Figura 37 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo PD-1 (BV421)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO_FMO PD1_006.fcs	Single Cells	51289
	FMO_FMO SM_001.fcs	Single Cells	95806

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

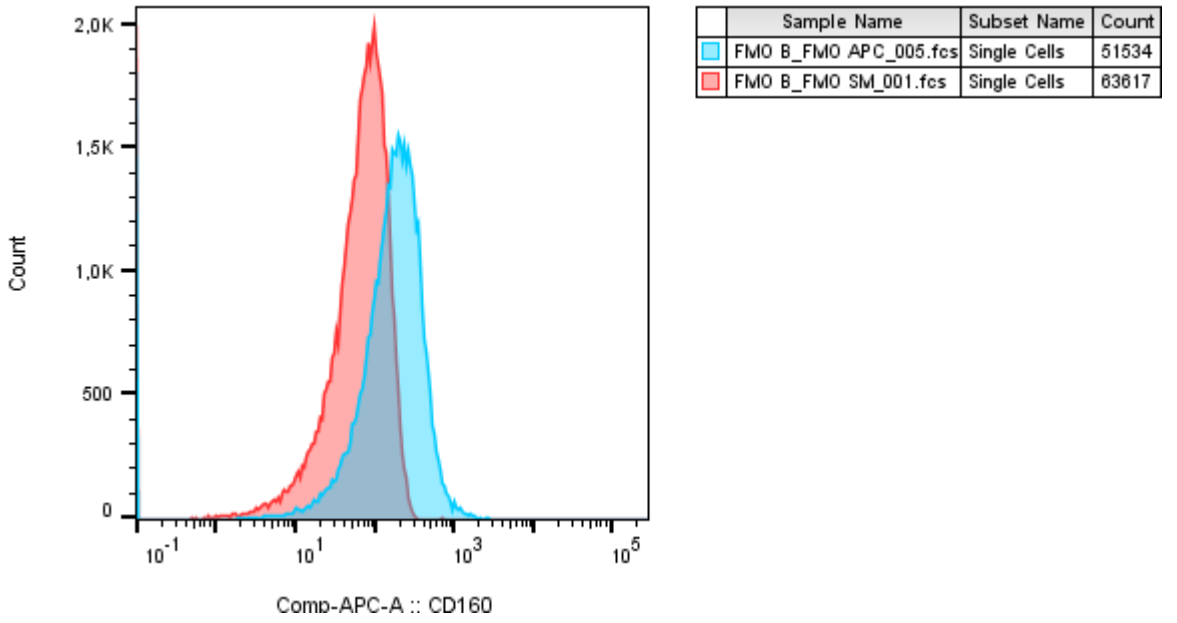
Figura 38 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD28 – (PE-CY7)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO B_FMO CD28_010.fcs	Single Cells	50436
	FMO B_FMO SM_001.fcs	Single Cells	63617

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

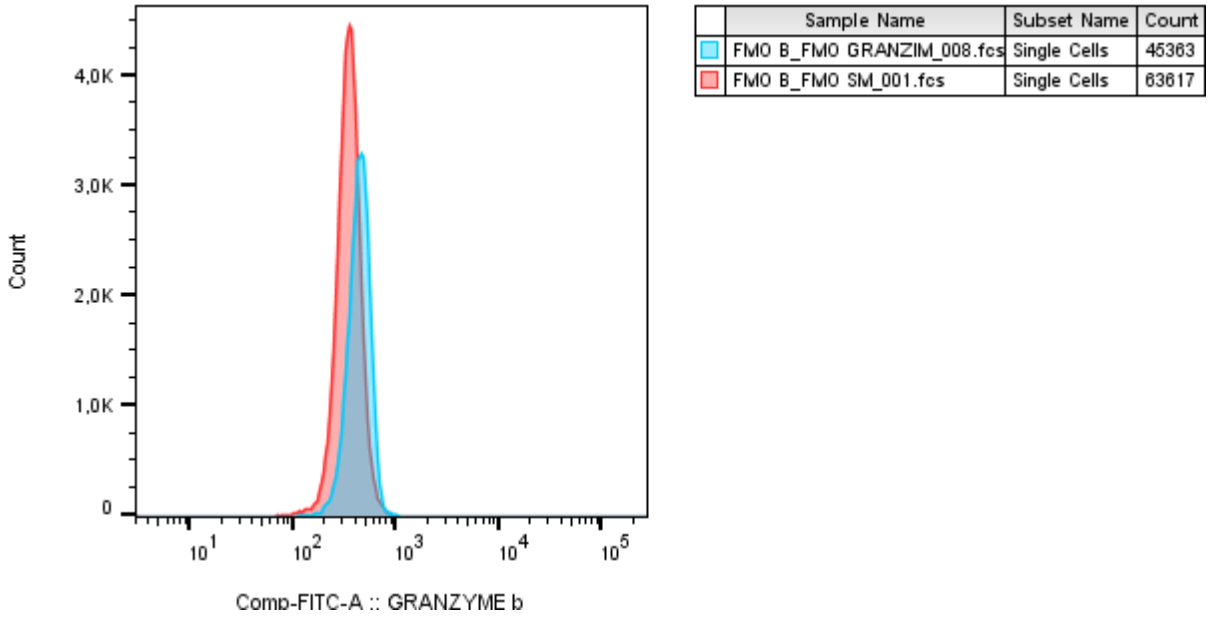
Figura 39 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo CD160 – (APC)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO B_FMO APC_005.fcs	Single Cells	51534
	FMO B_FMO SM_001.fcs	Single Cells	63617

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

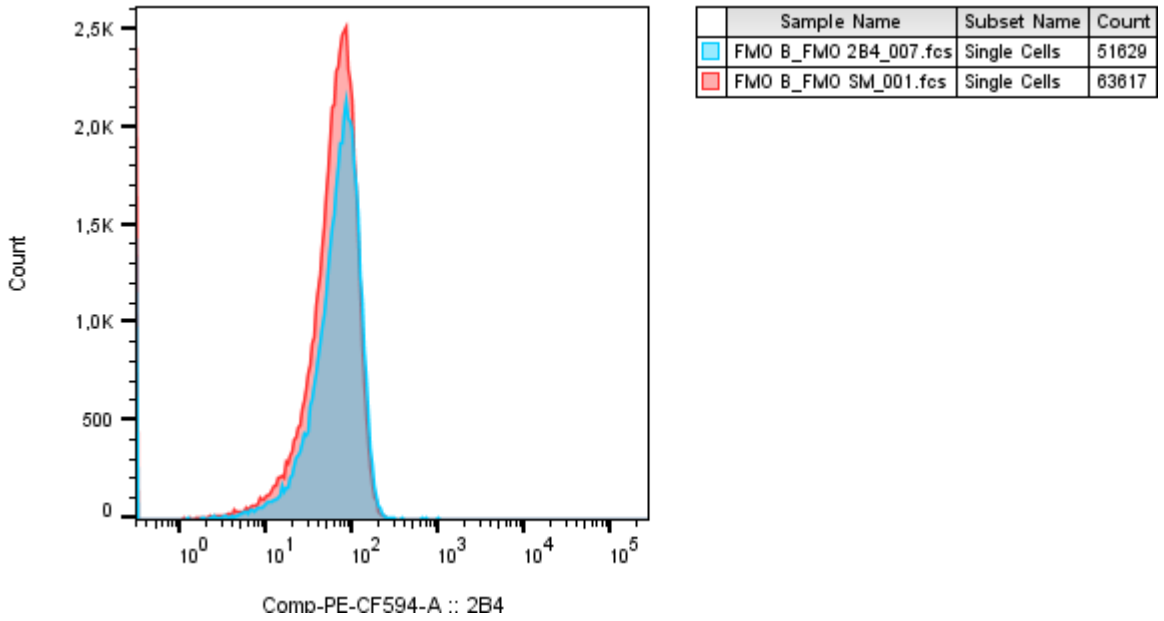
Figura 40 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo GRAZIMA B – (FITC)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO B_FMO GRANZIM_008.fcs	Single Cells	45363
	FMO B_FMO SM_001.fcs	Single Cells	63617

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

Figura 41 – *Fluorescence Minus One* do anticorpo 2B4 – (PE/DAZZLE)



	Sample Name	Subset Name	Count
	FMO B_FMO 2B4_007.fcs	Single Cells	51629
	FMO B_FMO SM_001.fcs	Single Cells	63617

Fonte: Dados obtidos do Software FlowJo versão 10.9.0.

APÊNDICE F – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: CHEMOKINE RECEPTORS ON HUMAN REGULATORY T CELLS DURING CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Received: 21 September 2022 | Revised: 30 December 2022 | Accepted: 2 January 2023
DOI: 10.1111/pim.12966

ORIGINAL ARTICLE

Parasite Immunology WILEY

Chemokine receptors on human regulatory T cells during cutaneous leishmaniasis

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro[1,2] | Rafael de Freitas e Silva[1,3,4] | Marton Kaique de Andrade Cavalcante[1,2] | Larissa Layne Soares Bezerra Silva[1,2] | Fabiana Oliveira Santos dos Gomes[5] | Maria Edileuza Felinto de Brito[1] | Valéria Rêgo Alves Pereira[1]

[1]Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute - Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil
[2]Parasitology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil
[3]University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
[4]Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
[5]Division of Immunobiology, Institute of Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Correspondence
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute - Oswaldo Cruz Foundation, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
Email: carolina.brelaz@gmail.com

Present address
Rafael de Freitas e Silva, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Funding information
MCTIC/CNPq N. 28/2018 - 432389/2018-0; Process 400325/2019-5, Call N. 39/2018; UFPE- Propesq nº 12/2021 (Process: 23076.090891/2021-10); Universal-CNPq (Process: 424889/2018-8)

Abstract

The aim of this work was to define the population of regulatory T cells (Tregs) which are circulating in the blood of *Leishmania* infected individuals clinically displaying a lesion (active disease–AD) and sub-clinical (SC) ones. We have individually collected blood samples, processed the PBMC and stained with fluorochrome-conjugated antibodies against CD3, CD4, Foxp3, CD25, CTLA-4, Ki-67, CCR4, CCR5, and CCR7. Cells were analyzed by flow cytometry. Our results suggest that CD25 and CTLA-4 are upregulated in Tregs of AD patients when compared to SC and uninfected (UN) controls. Moreover, Tregs proliferate upon infection based on Ki-67 nuclear antigen staining. Finally, we have observed that these Tregs of SC and AD patients upregulate CCR4, but not CCR5 and CCR7. There is an increase in the number of circulating Tregs in the blood of *Leishmania* infected individuals. These cells are potentially more suppressive based on the increased upregulation of CD25 and CTLA-4 during clinical infection (AD) when compared to SC infection. Tregs of both SC and AD cohorts are proliferating and express CCR4, which potentially guide them to the skin, but do not upregulate CCR5 and CCR7.

KEYWORDS
C-C chemokine receptors, co-inhibitory receptors, *leishmania* spp., parasitic infection, regulatory T cells

1 | INTRODUCTION

Global warming is changing the distribution of human pathogens transmitted by vectors such as *Leishmania* that can cause cutaneous leishmaniasis (CL).[1] CL is public health issues that affect people's health and productivity, and the World Health Organization (WHO) estimates 600,000 to 1 million new cases annually.[2] CL affects mainly poor people from low-income countries and is associated with poor housing, population displacement, malnutrition and compromised immune system. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main endemic species causing CL in North and Northeast of Brazil.[3] Leishmania injection in the skin by sand flies triggers complex cellular and molecular interactions that may result in sub-clinical (SC) infection or in disease manifestation with single or

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro and Rafael de Freitas e Silva have contributed equally to this work.

© 2023 John Wiley & Sons Ltd.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES (IAM)

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: 10

CAAE: 11083812.7.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.991.844

Apresentação do Projeto:

Emenda apresentada para prorrogação de cronograma. Porém, essa emenda está sendo submetida pela terceira vez, sem atender as pendências descritas nos seguintes pareceres:

Número do Parecer: 5.038.050, de 14 de Outubro de 2021

Número do Parecer: 5.644.529, de 15 de Setembro de 2022.

Objetivo da Pesquisa:

Não sofreram alterações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não sofreram alterações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa em andamento desde a aprovação em março de 2013. Tem enviado relatórios parciais, porém pendências da Emenda 2 (E2), cuja primeira versão data de outubro de 2021, continuam sem ser atendidas. Devido a solicitação de prorrogação de cronograma, que se estende por mais de 10 anos, serão ainda solicitados atualização na formação do biorrepositório.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

carta_respostaValeria.pdf

TERMOBIOREPOSITORIO.pdf

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº S/N -Térreo, Bloco G, Sala do CEP -Campus da UFPE
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2500 **E-mail:** cep.iam@fiocruz.br

DECLARACAO_DA_EQUIPE_ATUALIZADA.pdf
relatorio_parcial_cep_valeria_marco_2023.docx
Projeto_IAM_PereiraV_marco_2023.doc
FOLHADEROSTO_ATUALIZADA2023.PDF

Recomendações:

Os relatórios devem ser enviados via notificação, como informado em parecer anterior.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Número do Parecer: 5.038.050, de 14 de Outubro de 2021

1. Incluir Virginia Paiva como membro de equipe na Plataforma Brasil. Os membros (Amanda Ferreira de Almeida, Andresa Pereira de Oliveira, Lucas Ferreira Rocha, Thais Miranda de Almeida, Marina de Assis Souza, Mª Carolina Accioly) não fazem mais parte do projeto? Se sim, inserir como membros de equipe na PB.

Essas atualizações devem constar no relatório parcial que deve ser enviado via notificação. Relatoria: a equipe foi atualizada com os seguintes nomes: Elis Dionisio da Silva, MARIA EDILEUZA FELINTO DE BRITO, Angela Cristina Rapela Medeiros, Beatriz Coutinho de Oliveira, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE, Vanessa Lucília Silveira de Medeiros. Todos mencionados assinam o doc DECLARACAO_DA_EQUIPE_ATUALIZADA.pdf. ATENDIDA.

Número do Parecer: 5.644.529, de 15 de Setembro de 2022.

1. Sobre FOLHADEROSTO_ATUALIZADA_jul2022.pdf, o campo patrocinador precisa está assinado pelo responsável do IAM.

Até o presente momento, a folha de rosto devidamente assinada não foi apresentada. ATENDIDA.

Pendências Parecer: 5.873.403:

1. Solicita-se apresentar Termo de formação de Biorrepositório. ATENDIDA.
2. Declaração de equipe atualizada com as funções de cada integrante. ATENDIDA.
3. O número de participante de 230 continua inalterado? Se não, apresentar nova folha de rosto com número atualizado.

Resposta em carta_respostaValeria.pdf: O número de participantes permanece o mesmo. ATENDIDA.

O relatorio_parcial_cep_valeria_marco_2023.docx encontra-se aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	carta_respostaValeria.pdf	07/03/2023 15:52:28	Maria Almerice Lopes da Silva	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1776615_E2.pdf	06/03/2023 12:57:40		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMOBIOREPOSITORIO.pdf	06/03/2023 12:20:35	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DA_EQUIPE_ATUALIZADA.pdf	06/03/2023 12:20:15	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	relatorio_parcial_cep_valeria_marco_2023.docx	06/03/2023 12:16:22	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_IAM_PereiraV_marco_2023.doc	06/03/2023 12:15:53	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_ATUALIZADA2023.PDF	06/03/2023 12:08:14	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	ANUENCIA_HC_20_05_2022.pdf	20/05/2022 16:20:11	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	lattes_vanessa.pdf	22/09/2021 22:30:46	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	LATTES_ELIS.pdf	22/09/2021 22:30:02	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	ANUENCIA_VANESSA.pdf	22/09/2021 22:27:30	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	ANUENCIA_ELIS.pdf	22/09/2021 22:25:10	Valéria Pereira Hernandes	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 /	tclecontrole.pdf	03/12/2019 12:41:31	Valéria Pereira Hernandes	Aceito

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
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

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 10 de Abril de 2023

Assinado por:
Maria Almerice Lopes da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº S/N -Térreo, Bloco G, Sala do CEP -Campus da UFPE
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2500 **E-mail:** cep.iam@fiocruz.br