

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO
NÍTRICO EM MACRÓFAGOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA INFECTADOS COM *Leishmania (Viannia) braziliensis***

ALAN ROCHA DOS SANTOS

Salvador - Bahia

2023

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO
NÍTRICO EM MACRÓFAGOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA INFECTADOS COM *Leishmania (Viannia) braziliensis***

ALAN ROCHA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

Coorientador: Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso

Salvador - Bahia

2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

S237a Santos, Alan Rocha dos

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em macrófagos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Alan Rocha dos Santos. _ Salvador, 2023.

77 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno
Coorientador: Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Leishmaniose. 2. Macrófagos. 3. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).
4. Óxido Nítrico (NO). I. Título.

CDU 616.993.161

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM
MACRÓFAGOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA INFECTADOS COM
Leishmania (Viannia) braziliensis.”**

ALAN ROCHA DOS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 01 de agosto de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br JAIME RIBEIRO FILHO
Data: 08/11/2023 10:24:17-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador em Saúde Pública
Fiocruz/Ceará

Documento assinado digitalmente
gov.br BEATRIZ ROCHA SIMÕES DIAS
Data: 31/10/2023 16:05:25-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Beatriz Rocha Simões Dias
Pós-doutoranda
UT Southwestern Medical Center

Documento assinado digitalmente
gov.br NATÁLIA MACHADO TAVARES
Data: 31/10/2023 15:08:52-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora em Saúde Pública
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Dedico esta dissertação à minha mãe, Maria José de Santana Rocha, em reconhecimento ao seu apoio inabalável e motivação constantes ao longo dos desafios da vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria José de Santana Rocha, por ser a minha maior inspiração e meu exemplo de força, coragem e amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso, meus sinceros agradecimentos, pela paciência, dedicação e orientação durante todo o processo de pesquisa. Além da disponibilidade em executar experimentos fora do horário de expediente. Sua instrução foi crucial para a realização deste projeto.

À Prof. Dra. Karine Araújo Damasceno, do Laboratório de Patologia Experimental, pela disponibilidade de orientação e colaboração com as análises.

Aos colegas da Pós-Graduação, principalmente à Lee Senhorinha de Almeida Andrade, Carina Fernandes Silva e Camila Santos da Silva, por me alegrarem nos momentos difíceis e por me ajudarem a manter a sanidade durante os períodos de estresse.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Clínica, pela parceria, apoio e colaboração no desenvolvimento deste e de outros projetos, em especial à Débora Leal Viana e Ilza Cristina Madalena Pires Soares, pela colaboração, motivação e ajuda prestada na execução dos experimentos.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e pelo apoio demonstrado, em especial à Manoel Felipe Borges de Lima Dantas, Talita Andrade da Anunciação e Ana Paula César, que representam a minha rede de apoio e estão sempre presentes em minha vida.

À equipe do Serviço de Imunologia da UFBA pela colaboração na execução deste projeto, em especial ao Dr. Pedro Paulo Carneiro e a Dra. Maria Olívia Ramos Bacellar pelo gentil e imprescindível apoio, tanto com a contribuição com as sondas de detecção das espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico quanto na execução dos protocolos experimentais.

À equipe do Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Dr. Jackson Maurício Lopes Costa, que trabalham diariamente com os pacientes com muito profissionalismo e contribuem para levar melhores condições de vida para a população da região de Corte de Pedra.

Aos pacientes do povoado de Corte de Pedra e região adjacente do município de Presidente Tancredo Neves por aceitarem participar deste estudo.

Aos indivíduos sadios que doaram sangue para execução do presente projeto.

À Rede de Plataformas Tecnológicas da Fundação Oswaldo Cruz, pela disponibilização de uma estrutura avançada com equipamentos de ponta, que permitiram a execução e mensuração de dados fundamentais para este projeto, em especial para Arlene Souza Lessa,

Cláudio Pereira Figueira, Liliane Monteiro Cunha e Márcio Ferreira dos Santos pelo apoio e motivação.

À Fundação Oswaldo Cruz, pelos recursos, infraestrutura e oportunidades oferecidas durante todo o curso, além do suporte acadêmico e científico.

À FAPESB pela disponibilização da bolsa de mestrado, sem a qual não seria possível que eu realizasse minhas atividades de pesquisa.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

(Carl Sagan)

SANTOS, Alan Rocha dos. **Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em macrófagos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2023. 77 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esses parasitos intracelulares obrigatórios podem causar um amplo espectro de doenças no ser humano, como a leishmaniose disseminada (LD) e cutânea (LC). Estudos compararam a resposta imune de monócitos de pacientes com LD e com LC após infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, revelando que isolados de LD induziram maior explosão oxidativa nos monócitos, independentemente da origem dos mesmos. Outra pesquisa demonstrou maior explosão oxidativa em monócitos de pacientes com LC em relação a indivíduos saudáveis, atribuindo isso ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em vez de óxido nítrico (NO). Existem evidências que sugerem que a resposta imunológica durante a LTA varia entre diferentes formas clínicas da doença, com diferenças na produção de citocinas, resposta oxidativa e capacidade de controle do parasita. Diante desse cenário, a hipótese testada foi que a produção de ROS e NO em macrófagos de pacientes com LD difere daquela observada em macrófagos de pacientes com LC após a infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*. **OBJETIVO:** Comparar a produção de ROS e NO em macrófagos de pacientes com LD e com LC após a infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi realizada a comparação da produção de ROS e NO entre macrófagos de pacientes com LD, com LC e indivíduos saudáveis, após a infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*, utilizando uma proporção de 5:1 promastigotas/macrófagos em intervalos de 2, 4 e 8 horas. A avaliação da carga parasitária foi conduzida através de microscopia óptica, após coloração dos macrófagos com panóptico rápido, para assegurar o sucesso da infecção e a quantificação de amastigotas intracelulares. A expressão da enzima Arginase 1, associada ao metabolismo do NO, foi avaliada por microscopia confocal. A comparação da produção de ROS e NO entre os macrófagos de pacientes com LD e com LC foi executada usando a Citometria de Fluxo, com o auxílio de sondas fluorescentes para mensurar ROS, incluindo superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como o NO. **RESULTADOS:** A carga parasitária apresentou equivalência entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC após a infecção com o isolado LD. A expressão de Arginase 1 mostrou similaridade entre os macrófagos desses grupos. Quanto à produção de ROS, O_2^- e H_2O_2 , os macrófagos de pacientes com LD e com LC exibiram uma resposta semelhante após a infecção com o isolado LD. Além disso, a produção de NO também se mostrou comparável entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC após a infecção com o mesmo isolado. **CONCLUSÕES:** A produção de ROS e NO em macrófagos de pacientes com LD foi semelhante aos macrófagos de pacientes com LC após 2, 4 e 8 horas de infecção. Novos estudos são necessários para uma compreensão abrangente dessa relação e seu possível impacto na LTA.

Palavras-chaves: Leishmaniose. Macrófagos. Espécies reativas de oxigênio. Óxido nítrico.

SANTOS, Alan Rocha dos. **Evaluation of reactive oxygen species and nitric oxide production in macrophages from patients with american tegumentary leishmaniasis infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2023. 77 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

ABSTRACT

INTRODUCTION: American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a non-contagious infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. These obligatory intracellular parasites can lead to a wide spectrum of human diseases, such as disseminated leishmaniasis (DL) and cutaneous leishmaniasis (CL). Studies have compared the immune response of monocytes from DL and CL patients after infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, revealing that DL isolates induced higher oxidative burst in monocytes, regardless of their origin. Another research demonstrated greater oxidative burst in monocytes from CL patients compared to healthy individuals, attributing this to an increase in reactive oxygen species (ROS) rather than nitric oxide (NO). There is evidence suggesting that the immune response during ATL varies among different clinical forms of the disease, with differences in cytokine production, oxidative response, and parasite control. In light of this scenario, the hypothesis tested was that ROS and NO production in macrophages from DL patients differs from that observed in macrophages from CL patients after infection with DL isolate of *L. (V.) braziliensis*. **OBJECTIVE:** To compare ROS and NO production in macrophages from DL and CL patients after infection with DL isolate of *L. (V.) braziliensis*. **MATERIALS AND METHODS:** ROS and NO production was compared between macrophages from DL patients, CL patients, and healthy individuals after infection with DL isolate of *L. (V.) braziliensis*, using a 5:1 promastigote/macrophage ratio at 2, 4, and 8 hour intervals. Parasite load evaluation was conducted through optical microscopy after panoptic rapid staining of macrophages to ensure successful infection and quantification of intracellular amastigotes. Expression of Arginase 1, associated with NO metabolism, was assessed by confocal microscopy. Comparison of ROS and NO production between macrophages from DL and CL patients was performed using Flow Cytometry, with the aid of fluorescent probes to measure ROS, including superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), as well as NO. **RESULTS:** Parasite load showed equivalence between macrophages from DL and CL patients after infection with the DL isolate. Expression of Arginase 1 exhibited similarity between macrophages of these groups. Regarding ROS production, O_2^- and H_2O_2 , macrophages from DL and CL patients displayed a similar response after infection with the DL isolate. Furthermore, NO production also proved comparable between macrophages from DL and CL patients after infection with the same isolate. **CONCLUSIONS:** ROS and NO production in macrophages from DL patients were similar to macrophages from CL patients at 2-, 4-, and 8-hours post-infection. Further studies are needed for a comprehensive understanding of this relationship and its potential impact on ATL.

Keywords: Leishmaniasis. Macrophages. Reactive oxygen species. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Status de endemicidade da LC no mundo no ano de 2020	20
Figura 2	Ciclo de vida do parasita	24
Figura 3	Diferença na produção de ROS pela célula hospedeira após infecção por uma partícula estranha ou <i>Leishmania sp</i>	28
Figura 4	Relação entre iNOS e Arginase 1 em macrófagos e seu efeito em <i>Leishmania</i>	30
Figura 5	Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Dr. Jackson Maurício Lopes Costa	33
Figura 6	Lesões papulares, acneiformes e ulceradas em paciente com leishmaniose disseminada	34
Figura 7	Lesões papulares, acneiformes e ulceradas em paciente com leishmaniose disseminada	34
Figura 8	Lesões cutâneas em pacientes com leishmaniose cutânea. Fotografias obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea residentes da área endêmica de Corte de Pedra - Bahia	36
Figura 9	Representação esquemática das etapas utilizadas no <i>ImageJ</i>	40
Figura 10	Fluxograma do desenho experimental	42
Figura 11	Macrófagos corados com Panótico Rápido	44
Figura 12	Imagens de imunofluorescência confocal da expressão de Arginase 1 e ROS	46

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Comparação da efetividade da infecção e carga parasitária intracelular em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC infectados com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis* durante um período de 2 horas 45
- Gráfico 2** Comparação da expressão de Arginase 1 e ROS 47
- Gráfico 3** Estratégia de *FACS gating* empregada nas análises dos dados da Citometria de Fluxo 48
- Gráfico 4** Cinética da produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC 49
- Gráfico 5** Cinética da produção de superóxido (O_2^-) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC 51
- Gráfico 6** Cinética da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC 53
- Gráfico 7** Cinética da produção de Óxido Nítrico (NO) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Painel de marcadores utilizados na microscopia confocal.	39
Tabela 2	Painel de marcadores utilizados na citometria de fluxo.	41
Tabela 3	Característica clínicas e demográficas dos indivíduos sadios e pacientes com LD e com LC	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	<i>anti-human/mouse</i> Arginase 1
CD	Do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i> (Grupamento de Diferenciação)
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CO₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DHR 123	<i>dihydrorhodamine</i> 123
DTH	Do inglês: <i>Delayed-Type Hypersensitivity</i> (Hipersensibilidade Tardia)
eNOS	Do inglês: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Endotelial)
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	Do inglês: <i>Foward Scatter</i> (Tamanho Celular)
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
iNOS	Do inglês: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Induzível)
ITP	Inibidor de Transporte de Proteína
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTCP	Leishmaniose Tegumentar de Corte de Pedra
MIF	Média da Intensidade de Fluorescência
NaCl	Cloreto de Sódio

nNOS	Do inglês: <i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Neuronal)
NO	Do inglês: <i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
NOS	Do inglês: <i>Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase)
NOX2	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase 2
O₂⁻	Superóxido
OH⁻	Radicais Hidroxila
PCR	Do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomicina
PFA	Paraformaldeído
ROD	Rodamina
ROS	Do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SFB	Soro Fetal Bovino
SLA	Antígeno Solúvel de <i>L. (V.) braziliensis</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SSC	Do inglês: <i>Side Scatter</i> (Granulosidade Celular)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
%	Porcentagem
.	Multiplicado por
/	Divido por
+	Mais
<	Menor que
=	Igual a
>	Maior que
±	Mais ou menos
≥	Maior que ou igual a
μm²	Micrômetro Quadrado
DP	Desvio Padrão
G	Força G
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mm²	Milímetro Quadrado
nm	Nanômetros
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Agente etiológico, ciclo da doença e transmissão	23
2.2	Interação <i>Leishmania</i>-macrófago	24
2.3	Espécies reativas de oxigênio	26
2.4	Óxido nítrico	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Considerações éticas	32
4.2	Cálculo amostral	32
4.3	Seleção e diagnóstico de pacientes e indivíduos sadio	32
4.4	Células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	37
4.5	Diferenciação dos monócitos em macrófagos	37
4.6	Parasitas	37
4.7	Infecção dos macrófagos com <i>L. (V.) braziliensis</i>	38
4.8	Comparação da carga parasitária	38
4.9	Comparação da expressão de arginase 1 E ROS	39
4.10	Comparação da produção de ROS, O₂⁻, H₂O₂ E NO	41
4.11	Análise estatística	41
4.12	Desenho experimental	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Dados epidemiológicos	43
5.2	Comparação da carga parasitária	44
5.3	Comparação da expressão de arginase 1 e ROS	45
5.4	Comparação da produção de ROS, O₂⁻, H₂O₂ E NO	48
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	60
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose configura-se como um desafio na esfera da saúde pública, sendo causada por uma variedade de espécies de *Leishmanias* transmitidas através da picada de flebotomíneos infectados (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Esta enfermidade engloba 85 países que se estendem por quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), encontrando maior incidência em regiões caracterizadas por climas tropicais, áridos e mediterrâneos (PORTELLA; KRAENKEL, 2021), com a notificação anual de um espectro de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos. É considerada uma das seis patologias infecciosas de mais significativa relevância pela Organização Mundial da Saúde, com base em seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2017).

O Brasil apresenta alta incidência dessa enfermidade e figura entre os sete países mais afetados, em ordem alfabética: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e República Árabe da Síria, como visto na Figura 1. Cada um desses reportou mais de 5.000 casos de leishmaniose cutânea (LC), representando mais de 80% dos casos em todo o mundo (WHO, 2021). É no Brasil que se concentra a grande maioria dos casos de LC na região americana, com uma média anual de novas infecções atingindo 28.166 pessoas no período de 2001 a 2005, e uma média de 21.632 casos anuais entre 2006 e 2011. Por meio da análise de dados concernentes aos casos de LC providos pelo Ministério da Saúde do Brasil no período de 2001 a 2017, pôde-se observar um declínio geral no número de ocorrências de LC no país, passando de uma taxa de 15,3 casos por 100 mil habitantes para 8,4 casos por 100 mil habitantes. Apesar dessa tendência de queda, é importante ressaltar que 3,2% dos municípios ainda apresentam um aumento na tendência de incidência de LC, enquanto 72,5% dos municípios não exibiram qualquer tendência distinta em relação à doença (PORTELLA; KRAENKEL, 2021).

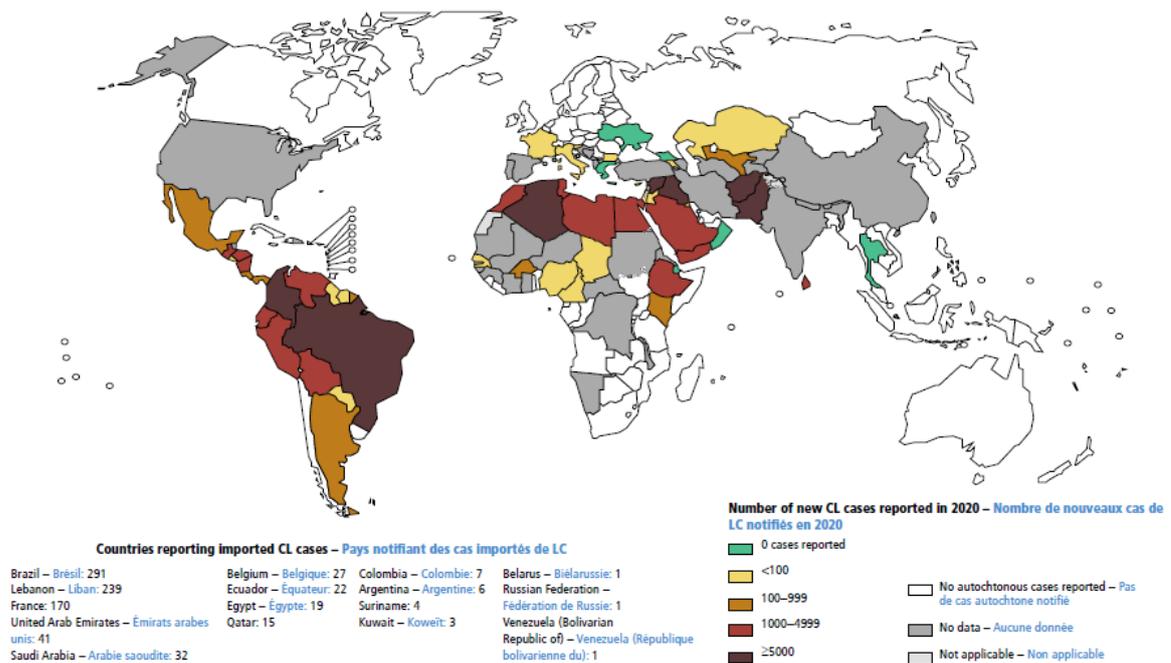


Figura 1 - Status de endemicidade da LC no mundo no ano de 2020.
Fonte: (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Na Bahia, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) exibe uma incidência consideravelmente alta, registrando cerca de 22 casos por 100.000 habitantes. Essa ocorrência se concentra em regiões caracterizadas por atividades agrícolas, áreas impactadas pelo desmatamento e invasão da área silvestre, principalmente na região do recôncavo baiano que apresenta incidência de 24-27 casos por 100.000 habitantes. A área geográfica do povoado de Corte de Pedra, município de Presidente Tancredo Neves na Bahia é zona endêmica de LTA com mais de 500-1.300 novos casos diagnosticados anualmente (JIRMANUS *et al.*, 2012). A enfermidade impacta de maneira notória indivíduos jovens, inclusive crianças, que se expõem ao risco de infecção, com uma prevalência particularmente acentuada entre aqueles envolvidos em atividades ligadas à agricultura (COSTA *et al.*, 1998).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que causa um amplo espectro de doenças no ser humano, variando desde lesões cutâneas localizadas, na LTA até as formas viscerais. A LTA manifesta-se clinicamente em diferentes formas da doença: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose mucosa (LM), causadas principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, além da leishmaniose cutânea difusa, causada principalmente pela *Leishmania (Leishmania) amazonenses*. (MARSDEN, 1990a, 1990b, 1990c; YURDAKUL, 2005).

A LC, forma clínica clássica de leishmaniose, representa cerca de 90 a 95% dos casos

de LTA (JOHNSON et al., 1987). Caracteriza-se, clinicamente, por uma úlcera cutânea bem delimitada com bordas elevadas, com um fundo geralmente granuloso (JOHNSON et al., 1987). A lesão da LC aparece no sítio de inoculação do parasita após período de incubação estimado de uma a duas semanas (GONZÁLEZ et al., 2009). Em contrapartida, a LD é definida pelo desenvolvimento de uma doença febril em um indivíduo com uma úlcera primária seguida pelo aparecimento repentino e veloz de 10 ou mais lesões papulosas em partes distantes do corpo à lesão primária (CARVALHO et al., 1994; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; TURETZ et al., 2002). Essas lesões demonstram infiltrado celular com perfil inflamatório maior que o observado nas lesões cutâneas de pacientes com LC, um maior número de células B regulatórias, bem como maiores níveis de anticorpos anti-*Leishmania* (CARVALHO et al., 1994; DANTAS et al., 2014; MACHADO et al., 2011). Aproximadamente 3% dos pacientes com LC desenvolvem a LM que afeta principalmente a região nasofaríngea, concomitantemente ou meses após o aparecimento da úlcera cutânea (JOHNSON et al., 1987). Estes pacientes apresentam uma forte resposta Th1 com grande produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF) e com baixos níveis ou ausência de Interleucina 10 (IL-10) em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (SLA) (BACELLAR et al., 2002).

É bem documentado que as diferentes manifestações clínicas da doença estão relacionadas a fatores intrínsecos do parasita, a exemplo da espécie de *Leishmania* e sua virulência, mas também fatores relacionados a resposta imune do hospedeiro (JOHNSON et al., 1987). Diferenças genotípicas entre as espécies de *L. (V.) braziliensis* têm sido correlacionadas a diferentes formas clínicas da doença (GUIMARÃES et al., 2016; QUEIROZ et al., 2012; SCHRIEFER et al., 2004).

Pesquisadores compararam a função de monócitos obtidos de pacientes com LC e com LD em resposta à infecção por isolados de *L. (V.) braziliensis* de ambas as formas clínicas da doença, revelando que os isolados de LD induziram maior explosão oxidativa nos monócitos em comparação com os isolados de LC, independentemente da origem dos monócitos (OLIVEIRA et al., 2021).

Em outra abordagem de pesquisa, Carneiro et al. (2016) demonstraram que a explosão oxidativa é maior em monócitos de pacientes com LC em comparação com monócitos de indivíduos saudáveis. Essa maior explosão oxidativa é atribuída principalmente ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em vez de óxido nítrico (NO). Entretanto, embora a produção de ROS participe da morte da *Leishmania*, ela é insuficiente para impedir a multiplicação do parasita, e a produção de NO está associada ao dano tecidual.

Além disso, Leopoldo et al. (2006) avaliou a produção *in vitro* de citocinas por CMSP de pacientes com LC e com LD após estimulação com SLA genotipados como isolados de LC e LD. Os resultados mostraram que CMSP de pacientes com LC produziram significativamente mais IFN- γ do que CMSP de pacientes com LD, independentemente da fonte dos antígenos de *L. (V). braziliensis*, o que pode favorecer a disseminação do parasita e conseqüentemente as lesões disseminadas (MACHADO *et al.*, 2011).

Em conjunto, esses estudos evidenciam que a resposta imunológica durante a LTA varia entre diferentes formas clínicas da doença, com diferenças na produção de citocinas, resposta oxidativa e capacidade de controle do parasita. Nossa hipótese foi que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) em macrófagos de pacientes com LD difere daquela observada em macrófagos de pacientes com LC, o que pode ter implicações na manutenção e disseminação de parasitas viáveis. Considerando que a leishmaniose pode se manifestar de diferentes formas clínicas, é plausível supor que as respostas imunológicas e, mais especificamente, a produção de ROS e NO pelos macrófagos, possam variar de acordo com a forma da doença. A investigação dessa hipótese pode fornecer *insights* importantes sobre a resposta imunológica envolvida na LTA e contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico, ciclo da doença e transmissão

Aproximadamente 53 espécies de *Leishmanias* já foram descritas, e dentre essas espécies, 20 são capazes de causar leishmaniose humana. Nas Américas as principais espécies patogênicas são as do subgênero *Viannia* (*V.*) como a *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* e *Leishmania* (*V.*) *panamensis* (AKHOUNDI et al., 2016; DESJEUX, 1992).

A transmissão da *Leishmania*, conforme ilustrado na Figura 2 (CDC, 2020), se dá pela picada da fêmea de flebotomíneo infectada, que inocula na pele do hospedeiro formas promastigotas metacíclicas infectantes, suspensas na saliva do flebotomíneo (TITUS; RIBEIRO, 1988). As formas promastigotas de *Leishmania* (*V.*) *spp.* colonizam o trato digestivo das fêmeas de flebótomos, do gênero *Lutzomyia spp.*, onde se multiplicam e realizam diferenciação para as formas evolutivas denominadas promastigotas metacíclicas. Uma vez fagocitadas pelos macrófagos, as promastigotas transformam-se em amastigotas que se reproduzem no interior dos macrófagos por divisão binária. A reprodução ocorre ao ponto de provocar o rompimento dos macrófagos infectados, liberando a forma amastigota, que pode ser fagocitada por um outro macrófago, ou no ato do repasto sanguíneo, infectar um outro flebótomo (COURRET *et al.*, 2002; SACKS, 1989).

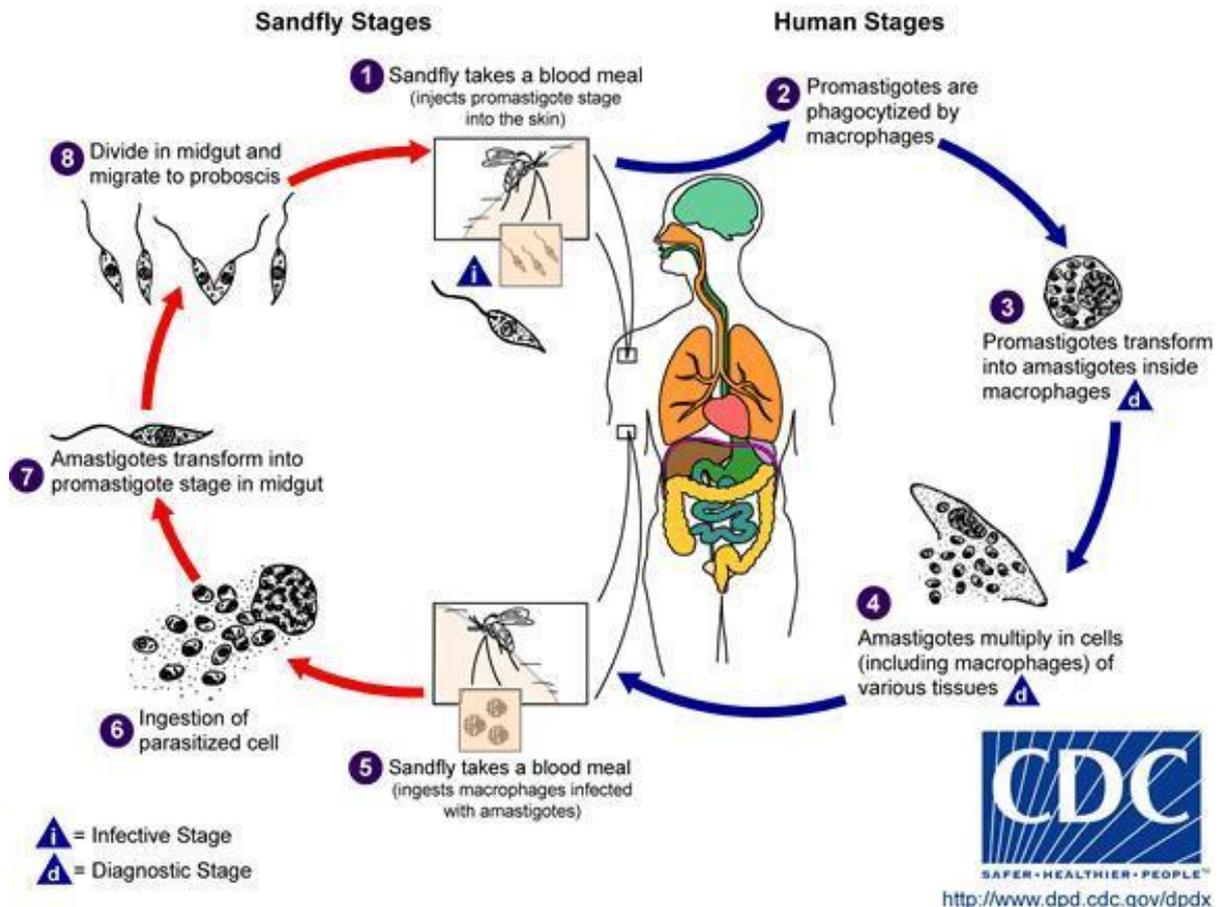


Figura 2 - Ciclo de vida do parasita.

Fonte: (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020).

2.2 Interação *Leishmania*-macrófago

A inoculação das formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* desencadeia uma resposta imune no hospedeiro, recrutando células de defesa, como monócitos/macrófagos, células *natural killer* e neutrófilos polimorfonucleares, além de liberar fatores solúveis como a proteína C reativa e componentes do sistema complemento. Esses eventos são fundamentais na resposta imune inicial contra a infecção por *Leishmania* (SOLBACH; LASKAY, 2000).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção, atraídos por um fator quimiotático liberado pelas promastigotas metacíclicas (AGA et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2002). Além disso, os neutrófilos desempenham um papel importante na produção de quimiocinas que recrutam outras células, como granulócitos, monócitos/macrófagos, células dendríticas imaturas e linfócitos T (CARDOSO et al., 2019; MÜLLER et al., 2001).

Os macrófagos são as principais células hospedeiras para a *Leishmania* e são responsáveis por fagocitar ou serem infectados ativamente por esses parasitas. Isso ocorre por

meio de receptores como CR1 e CR3, que reconhecem e opsonizam as promastigotas com C_{3b} e C_{3bi}, evitando a ativação da cascata oxidativa prejudicial ao parasita (BRITTINGHAM *et al.*, 1995). Além disso, as moléculas de lipofosfoglicano (LPG) e a gp63 (protease da superfície da *Leishmania*) estão envolvidas na invasão dos macrófagos, interagindo com receptores como CR1, CR3 e o sítio lectina-símile bem como CR3 à fibronectina (CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN; BULLEN, 2002). Outros receptores, como o da manose-fucose, CR4 e o receptor de proteína C reativa, também auxiliam na fagocitose das promastigotas (HANDMAN; BULLEN, 2002).

Após o reconhecimento por moléculas de superfície dos macrófagos ou outras células apresentadoras de antígenos, as promastigotas de *Leishmania* são fagocitadas, formando um fagossomo que, posteriormente, se funde com o lisossomo, originando o fagolisossomo (MATTE; DESCOTEAUX, 2016). Esse compartimento é ácido e rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas, que desempenham um papel crucial na degradação dos parasitas (CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN; BULLEN, 2002).

Os macrófagos são células fagocíticas encontradas em vários tecidos dos vertebrados. Eles desempenham um papel importante na defesa contra patógenos, fagocitando-os e destruindo-os dentro do fagolisossomo (ALBERTS, 2017). Para parasitas do gênero *Leishmania*, os macrófagos são as células hospedeiras preferenciais, e a capacidade dos macrófagos em controlar e eliminar eficazmente os parasitas é essencial para prevenir a disseminação do parasita e o desenvolvimento da doença (GIUDICE *et al.*, 2012).

Os parasitas de *Leishmania* desenvolveram estratégias de evasão para sobreviver nos macrófagos, incluindo a formação de compartimentos parasitários semelhantes a fagolisossomos, que possuem propriedades hidrolíticas e proteolíticas (BISTI *et al.*, 2006; BURCHMORE; BARRETT, 2001). Essas estratégias provavelmente evoluíram como mecanismos de resistência contra as respostas inflamatórias do hospedeiro *et al.*, 2017). Além disso, antígenos da *Leishmania*, como o LPG, estão envolvidos na inibição dos mecanismos oxidativos e de vias de transdução de sinal, favorecendo a sobrevivência do parasita (HANDMAN; BULLEN, 2002).

Os macrófagos também desempenham um papel importante na resposta imune contra a infecção por *L. (V.) braziliensis*, são associados a perfis de resistência e suscetibilidade à infecção (GIUDICE *et al.*, 2012a). A resistência ou suscetibilidade à infecção por *L. (V.) braziliensis* está associada à capacidade dos macrófagos em internalizar e eliminar o parasita, bem como à produção de ROS e NO (MUKBEL *et al.*, 2007).

2.3 Espécies reativas de oxigênio

A exposição da *Leishmania* aos macrófagos leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, que desempenham um papel importante na regulação da resposta inflamatória e são controladas pelo sistema de defesa antioxidante celular (PAIVA; BOZZA, 2014). Os macrófagos têm a capacidade de montar complexos de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase 2 (NOX2) na membrana do fagolisossomo, que catalisam a produção de compostos derivados de oxigênio extremamente tóxicos, incluindo superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), em um processo, conhecido como explosão oxidativa (ALBERTS, 2017). A enzima NADPH oxidase é expressa principalmente em fagócitos, como neutrófilos e monócitos/macrófagos (SAHA *et al.*, 2019).

A fagocitose de microrganismos pode desencadear uma explosão oxidativa, ativando o complexo oxidase dependente de NADPH associado à membrana por meio de um intrincado sistema de sinalização bioquímica do fagossoma, onde ocorre a ação oxidante de ROS e NO. O oxigênio é reduzido a O_2^- pela enzima NADPH oxidase, e esse composto é liberado no fagossoma. Posteriormente, o O_2^- rapidamente se transforma em H_2O_2 ou reage com o NO para formar o poderoso oxidante peroxinitrito. O superóxido, produzido em grande quantidade durante a explosão oxidativa dos fagócitos ou em menor quantidade como subproduto da respiração aeróbica normal das células, é facilmente convertido em outras espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 e OH^- (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004). Além da NADPH oxidase, as mitocôndrias representam uma fonte crucial de ROS. Elas desempenham um papel fundamental na produção de ROS, contribuindo de forma substancial para o processo de explosão oxidativa celular. A geração de ROS nas mitocôndrias é controlada pelas proteínas desacopladoras (UCP2 e UCP3) e pela translocase de nucleotídeos de adenina, presentes na membrana mitocondrial interna. Especificamente, a UCP2 exerce uma regulação negativa sobre a produção de ROS (BASU; DAS, 2019).

Em seres humanos, existem sistemas enzimáticos antioxidantes importantes para manter a homeostase. Esses sistemas têm a função de neutralizar compostos potencialmente danosos e atuam na desintoxicação de radicais livres gerados durante o processo de metabolização oxidativa. Essas enzimas desempenham um papel fundamental na proteção das células contra danos causados por ROS, contribuindo para a preservação da integridade celular e a prevenção de danos oxidativos em tecidos e órgãos (KARLSSON; LINDAHL; MARKLUND, 1988; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2012; MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999). A

exemplo da superóxido dismutase (SOD), que é uma metaloenzima essencial para a defesa antioxidante contra o estresse oxidativo em organismos aeróbicos. Sua principal função é neutralizar o excesso de O_2^- e convertê-los em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) (GIULIVI; BOVERIS; CADENAS, 1995; WEISIGER AND; FRIDOVICH, 1973). A SOD2, conhecida como superóxido dismutase mitocondrial, desempenha um papel importante na maquinaria metabólica que lida com as ROS presentes na matriz mitocondrial. Especificamente, a SOD2 regula a conversão do O_2^- em H_2O_2 (PALMA *et al.*, 2020). Dessa forma, a SOD é uma enzima crucial para manter o equilíbrio redox das células, desempenhando um papel vital na proteção contra as ROS produzidas durante infecções por patógenos intracelulares (BABIOR, 2000; STAFFORD; NEUMANN; BELOSEVIC, 2008).

Ao reconhecer uma partícula estranha (Figura 3), uma célula hospedeira ativa as enzimas geradoras de ROS, como a NADPH oxidase e as enzimas mitocondriais. Essas ativações levam à produção de uma quantidade significativa de ROS, capaz de destruir a partícula estranha. Essa produção elevada de ROS tem como objetivo reduzir a persistência dos microrganismos nas células hospedeiras. O ROS atua diretamente causando danos ao DNA dos patógenos, distorcendo suas bases. Indiretamente, o ROS também ativa citocinas pró-inflamatórias, criando um ambiente desfavorável para os microrganismos. Além disso, foi observado que o ROS induz a apoptose das células hospedeiras, garantindo a eliminação completa dos patógenos. Entretanto, ao ocorrer a infecção da célula hospedeira por *Leishmania sp.*, a produção de ROS é inibida por múltiplas vias, permitindo que o parasita habilmente evite esse mecanismo de defesa antimicrobiana dos macrófagos, assegurando, desse modo, sua própria sobrevivência e promovendo com êxito a disseminação da Leishmaniose. A *Leishmania* ativa moléculas reguladoras negativas nos macrófagos, dificultando a ativação de enzimas pró-oxidantes, ou amplia a expressão de moléculas antioxidantes para neutralizar a explosão oxidativa. Esse processo resulta na elevação das enzimas antioxidantes presentes nas células hospedeiras, culminando em uma neutralização abrangente de ROS. Paralelamente, a *Leishmania sp.* direciona seus esforços para degradar seletivamente o grupo heme celular e prejudicar a fosforilação de uma subunidade da NADPH oxidase, componentes essenciais para o funcionamento adequado dessa enzima. A infecção por *Leishmania* também desencadeia um aumento específico na expressão da proteína desacopladora 2 (UCP2), o que resulta em uma redução da geração mitocondrial de ROS. Consequentemente, a diminuição dos níveis de ROS na célula infectada por *Leishmania* proporciona a persistência do parasita no interior da célula, impulsionando, assim, a progressão da doença (BASU; DAS, 2019).

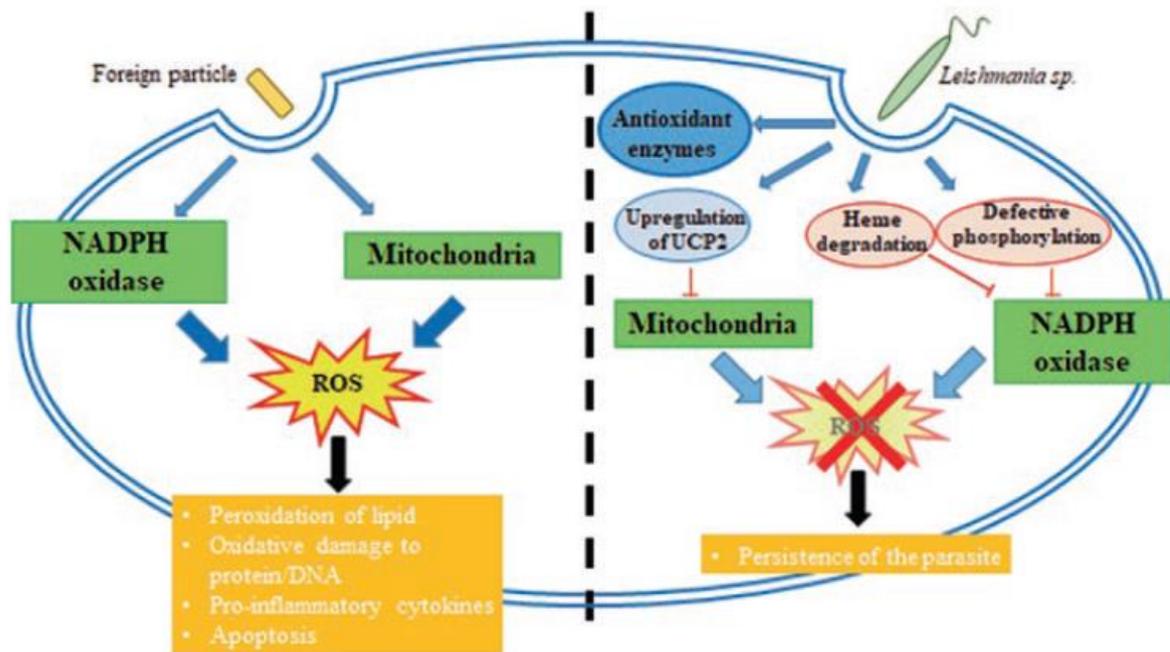


Figura 3 - Diferença na produção de ROS pela célula hospedeira após infecção por uma partícula estranha ou *Leishmania sp.* Quando a célula hospedeira é infectada por uma partícula estranha, através da mitocôndria e da NADPH oxidase, consegue aumentar a produção de ROS, que desencadeia a peroxidação de lipídios, danos oxidativos nas proteínas e no DNA, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e, por fim, a apoptose. Contudo, ao ser infectada pela *Leishmania*, a célula hospedeira reage de maneira diferente. Ela eleva a atividade das enzimas antioxidantes, aumenta a expressão da proteína UCP2, degrada o heme e compromete a fosforilação de uma subunidade essencial para o pleno funcionamento da NADPH oxidase. Em conjunto, essas alterações reduzem a quantidade de ROS intracelular, permitindo a sobrevivência do parasita.

Fonte: (BASU; DAS, 2019).

A capacidade da *Leishmania* de neutralizar ou evitar a ação de ROS é fundamental para sua virulência e capacidade de causar infecções crônicas em indivíduos suscetíveis. A regulação da resposta inflamatória mediada por ROS é crucial para que o parasita possa evitar a ação microbicida dos fagócitos e persistir dentro das células hospedeiras, tornando-se um desafio no tratamento da leishmaniose. A exemplo da *Leishmania donovani*, cuja supressão da explosão oxidativa do hospedeiro é essencial para sua sobrevivência (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004).

2.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma substância antimicrobiana produzida em fagócitos, ativada pelos macrófagos através da ação do óxido nítrico sintase induzível na L-arginina (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004). Essa substância é gerada pelas enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) pela oxidação da L-arginina em L-citrulina, sendo expressas constitutivamente

em duas isoformas (neuronal - nNOS, e endotelial - eNOS) e, induzivelmente, em uma isoforma (iNOS) (CINELLI *et al.*, 2020).

A iNOS é expressa somente quando a célula é induzida ou estimulada, geralmente por citocinas pró-inflamatórias, e tem como principal função gerar quantidades significativas de NO, permanecendo ativa até que a enzima seja degradada (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007). A produção de NO pela iNOS tem um papel crucial na proteção imunológica contra patógenos intracelulares, resultando em sua eliminação. Assim, a iNOS é uma das principais mediadoras da resposta imune a infecções, especialmente as microbianas (BATH *et al.*, 2021; KOPELYANSKIY *et al.*, 2022).

No contexto da *Leishmania*, a regulação do catabolismo da L-arginina através da iNOS e da Arginase 1 é uma estratégia crucial para a sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro. Os macrófagos podem eliminar ou abrigar os parasitas intracelulares de *Leishmania*, dependendo de sua capacidade de metabolizar a L-arginina por meio de iNOS ou Arginase 1, cuja expressão é induzida e regulada diferencialmente nesses fagócitos de acordo com seu estado de ativação (WILKINS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

A resposta imune em camundongos infectados com *L. major* é um modelo bem estudado, especialmente no contexto da interação com macrófagos, que pode seguir dois padrões: resistência ou susceptibilidade, dependendo da linhagem do camundongo. Na resistência, há uma resposta imune dos linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), com predominância de IL-12 e IFN- γ . Nesse cenário, o macrófago é ativado através do IFN- γ , resultando no aumento da expressão de iNOS e produção de NO, o que confere resistência à infecção (ROGERS *et al.*, 2002). Por outro lado, na susceptibilidade os linfócitos T auxiliares são do tipo 2 (Th2) e produzem IL-4 e IL-10. Essas citocinas têm a capacidade de desativar os macrófagos e aumentar a expressão de Arginase 1 (GORDON, 2003). Isso inibe a produção de NO e, ao mesmo tempo, estimula a via metabólica da Arginase, que utiliza o mesmo substrato utilizado na produção de NO. Conseqüentemente, a síntese de NO é regulada negativamente, enquanto a L-arginina produzirá poliaminas como metabólitos finais que favorecem a multiplicação e crescimento do parasito (CASTRO-PINTO; FABRINO; LEON, 2010).

Portanto, as citocinas do perfil Th1, em especial o IFN- γ , estimulam a síntese de NO nas células do hospedeiro, exercendo efeito tóxico sobre o parasito. Enquanto isso, o perfil Th2 inibe a produção de NO e promove a utilização da L-arginina para benefício do crescimento e multiplicação do parasito. Essa regulação cruzada das respostas imunes desempenha um papel crucial no estabelecimento da resistência ou suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *L. major*, como mostra a Figura 4 (CASTRO-PINTO; FABRINO; LEON, 2010).

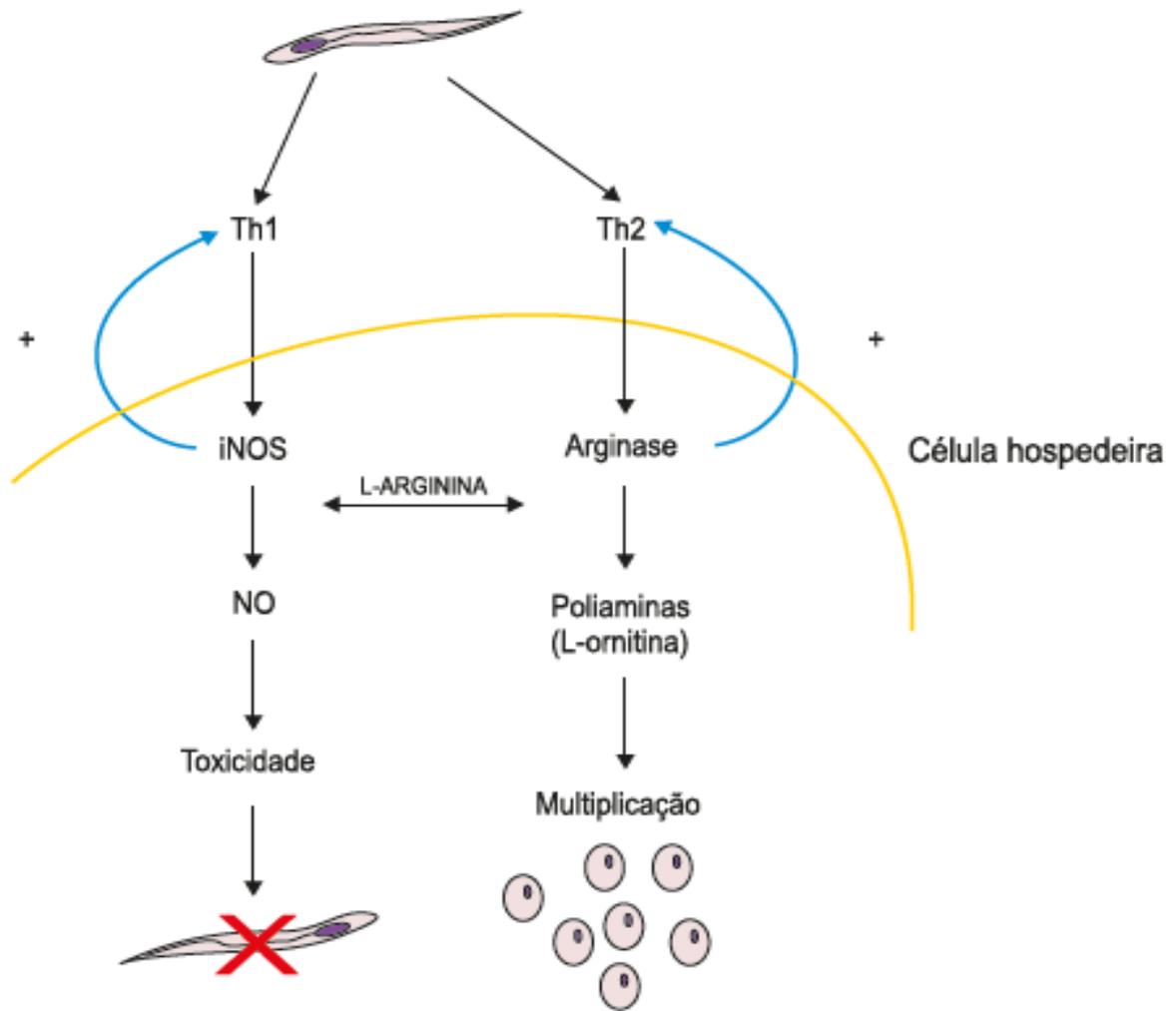


Figura 4 - Relação entre iNOS e Arginase 1 em macrófagos e seu efeito em *Leishmania*. As citocinas do perfil Th1, com destaque para o IFN- γ , estimulam a produção de óxido nítrico (NO) nas células do hospedeiro, causando efeitos tóxicos sobre o parasita. Em contrapartida, o perfil Th2 inibe a síntese de NO e favorece a utilização da L-arginina em prol do crescimento e multiplicação do parasita.

Fonte: (FABRINO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico entre macrófagos provenientes de pacientes com LD e com LC, após a infecção com o isolado LD de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar a carga parasitária dos macrófagos de pacientes com LD e com LC submetidos à infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*;
2. Comparar a expressão intracelular de Arginase 1 e ROS após a infecção dos macrófagos de pacientes com LD e com LC com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*;
3. Comparar a produção de ROS, O_2^- , H_2O_2 e NO após a infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis* em macrófagos de pacientes com LD e com LC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este projeto de pesquisa obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia sob parecer técnico 2.176.975 CAAE 01229212.0.0000.0049.

4.2 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi calculado com base na incidência dos casos de leishmaniose disseminada (LD) e de leishmaniose cutânea (LC) observados durante a última década na área endêmica de Corte de Pedra. Jirmanus e colaboradores demonstraram, durante o período de duas décadas, uma média de 1200 casos de LTA por ano e que em cerca de 3% desses casos há o desenvolvimento de formas clínicas graves como a LD (JIRMANUS et al., 2012). O cálculo amostral foi realizado, com base na casuística de 2020 (500 casos de LTA), utilizando a calculadora amostral on-line “Prática Clínica”:

Fórmula de cálculo: $n = N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p) / Z^2 \cdot p \cdot (1-p) + e^2 \cdot N - 1$, sendo n: amostra calculada, N: população, Z: variável normal, p: real probabilidade do evento, e: erro amostral.

Utilizando a maior diferença relativa encontrada entre os grupos LD e LC e o menor desvio padrão médio como parâmetros para calcular o tamanho amostral para esses experimentos com 95% de intervalo de confiança e erro alfa de 0,05. O resultado do cálculo previu o recrutamento de 20 pacientes com LD e 20 pacientes com LC, além de 10 indivíduos sadios selecionados por conveniência. Não obstante ao cálculo, a casuística de LD e LC no período de execução foi extremamente baixa, impossibilitando o arrolamento da amostra completa. Nesse contexto, o estudo foi conduzido com 6 pacientes com LD, 10 pacientes com LC e 9 indivíduos sadios.

4.3 Seleção e diagnóstico de pacientes e indivíduos sadios

Os pacientes com LD e com LC foram recrutados para o estudo após realização do diagnóstico, com a confirmação da infecção pelo parasita, feita pela equipe multiprofissional do Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Dr. Jackson Maurício Lopes Costa, exibido na Figura 5, localizado no povoado de Corte de Pedra, município de Presidente Tancredo Neves do estado da Bahia, em parceria com as equipes do Laboratório de Pesquisa

Clínica (LAPEC) e do Serviço de Imunologia (SIM) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os mesmos foram avaliados antes do tratamento, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme Anexos A e B. Dados referentes à idade, sexo e exames realizados foram coletados dos prontuários dos pacientes.



Figura 5 - Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Dr. Jackson Maurício Lopes Costa.
Fonte: Autor.

Os pacientes com LD apresentavam múltiplas lesões papulares, acneiformes e ulceradas em pelo menos duas partes diferentes do corpo, como pode ser observado nas Figuras 6 e 7. A identificação do protozoário foi feita por PCR ou cultivo do parasita em biópsias. Exame histopatológico e DTH ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (IDRM) também foram solicitados.

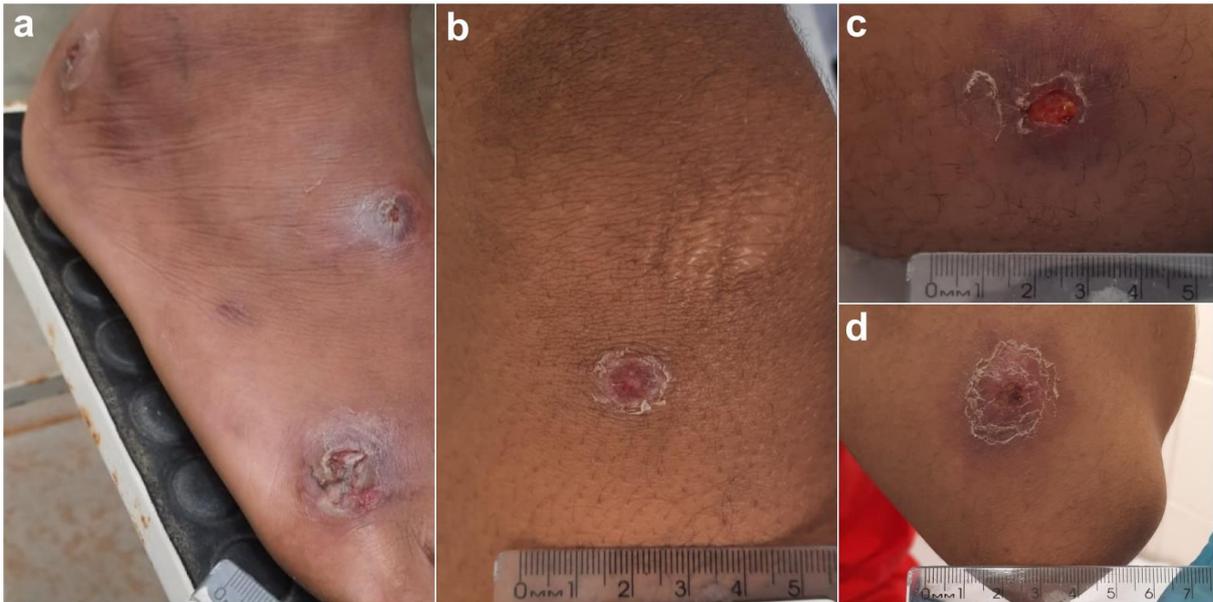


Figura 6 - Lesões papulares, acneiformes e ulceradas em paciente com leishmaniose disseminada. Fotografias obtidas de paciente com leishmaniose disseminada residente da área endêmica de Corte de Pedra - Bahia. (a) Lesões localizadas no dorso do pé, sem escala indicada; (b) Lesão localizada no joelho, escala em centímetros; (c) Lesão localizada na região posterior da coxa, escala indicada em centímetros e (d) Lesão localizada no cotovelo, escala indicada em centímetros.

Fonte: Fotografias cedidas pelo (CENTRO DE REFERÊNCIA EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR DR. JACKSON MAURÍCIO LOPES COSTA, 2023)



Figura 7 - Lesões papulares, acneiformes e ulceradas em paciente com leishmaniose disseminada. Fotografias obtidas de paciente com leishmaniose disseminada residente da área endêmica de Corte de Pedra - Bahia. (a) Lesões disseminadas pelo corpo; (b/c) Lesões disseminadas pela face e pescoço e (d/e) Lesões disseminadas pelas pernas e dorso dos pés, sem escala.

Fonte: Fotografias cedidas pelo (CENTRO DE REFERÊNCIA EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR DR. JACKSON MAURÍCIO LOPES COSTA, 2023).

Os pacientes com LC apresentavam lesão cutânea única, com bordas elevadas, característica que pode ser vista na Figura 8, a detecção do parasita foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) ou cultivo do parasita em biópsias. Adicionalmente, também foi realizado o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) ao antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (Intradermoreação de Montenegro - IDRM). Em alguns casos foi solicitado o exame histopatológico, que juntamente com os demais exames contribuiu para fechar alguns diagnósticos.



Figura 8 - Lesões cutâneas em pacientes com leishmaniose cutânea. Fotografias obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea residentes da área endêmica de Corte de Pedra - Bahia. (a) Lesão localizada na região anterior do braço, escala indicada em polegadas; (b) Lesão localizada acima do tornozelo, escala indicada em centímetros; (c) Lesão localizada na região anterior do antebraço, escala indicada em centímetros; (d) Lesão localizada na região anterior da perna, escala indicada em centímetros; (e) Lesão localizada na região posterior do ombro, escala indicada em centímetros; (f) Lesão localizada no joelho, escala indicada em centímetros; (g) Lesão localizada na região posterior da coxa, escala indicada em centímetros; (h) Lesão localizada na região do tornozelo, escala indicada em centímetros e (i) Lesão localizada na região posterior do braço, escala indicada em centímetros.

Fonte: Fotografias cedidas pelo (CENTRO DE REFERÊNCIA EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR DR. JACKSON MAURÍCIO LOPES COSTA, 2023).

Os indivíduos sadios, que compõem o grupo controle, foram selecionados no Instituto Gonçalo Moniz (IGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizado na cidade de Salvador do estado da Bahia. Os mesmos precisavam possuir histórico médico negativo tanto para LD quanto para LC.

A escolha dos pacientes e indivíduos saudáveis ocorreu de setembro de 2021 a março de 2023. Alguns experimentos não incluíram amostras de todos os pacientes e/ou indivíduos saudáveis, porque alguns dos experimentos neste estudo exigiam um número maior de células do que o obtido dos mesmos.

4.4 Células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Os experimentos foram realizados com a obtenção de sangue heparinizado dos pacientes e indivíduos saudáveis selecionados. As CMSP foram obtidas por gradiente de densidade *Ficoll-Hypaque*, em seguida, os monócitos (células CD14⁺) foram separados através da seleção negativa utilizando *beads* magnéticas associadas à anticorpos específicos (*Dynabeads Untouched Human Monocytes Kit*, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Os monócitos obtidos foram então contabilizados em câmara de Neubauer e ajustados à uma concentração de 1×10^5 células/poço para placas de cultura de células de 24 poços e 5×10^4 células/poço para sistemas *lab-tek chamber slide* de 4 poços (Thermo Fisher Scientific) em meio RPMI (Gibco, ThermoFisher Scientific) suplementado com 2mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 1% de Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado.

4.5 Diferenciação dos monócitos em macrófagos

Monócitos obtidos das CMSP foram incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (dióxido de carbono) por 7 dias, para que ocorresse a diferenciação em macrófagos. Para isso, os mesmos foram cultivados com 500µL/poço de RPMI suplementado em dois (2) sistemas *lab-tek chamber slide* de 4 poços para cada paciente com LD, com LC e indivíduos saudáveis, com uma concentração de 5×10^4 monócitos/poço. Concomitantemente, os monócitos também foram cultivados em três (3) placas de cultura de células de 24 poços para cada paciente com LD, com LC e indivíduos saudáveis, com 1000µL/poço de RPMI suplementado na concentração de 1×10^5 monócitos/poço. O RPMI suplementado foi substituído a cada 3 dias e a diferenciação foi acompanhada com o auxílio de microscópio óptico invertido modelo AE31E.

4.6 Parasitas

O isolado utilizado para realização da infecção foi de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que inicialmente foi coletado de lesões papulares (LTCP - 30028 - LD) e cultivado em meio bifásico (NNN) para obtenção de promastigotas a 22°C. O isolado foi obtido a partir de uma

cultura de material coletado da lesão de paciente diagnosticado com leishmaniose disseminada (isolado LD). Alíquotas da cultura do parasita foram criopreservadas em nitrogênio líquido.

As promastigotas foram cultivadas, para realização da infecção *in vitro*, a 23°C em meio *Schneider's Insect* (LGC Biotecnologia, Labtrade do Brasil) suplementado com 20% de SFB inativado (GIBCO BRL *Life Technologies*, Gaithersburg, MD) e 1% de Pen/Strep. Só foram feitas até 3 passagens no cultivo dos protozoários, para garantir a viabilidade e motilidade do parasita.

4.7 Infecção dos macrófagos com *L. (V.) braziliensis*

Após 7 dias de cultura, os macrófagos diferenciados de CMSP de pacientes com LD, com LC e indivíduos sadios foram submetidos a infecção durante um período de 2 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂, com o isolado LD. Para isso, foram realizadas duas lavagens (3000 RPM - 450 G) do isolado com cloreto de sódio (NaCl) 0,9% e posteriormente, quantificação em câmara de Neubauer.

As promastigotas de LD, na fase estacionária, foram ajustadas ao volume necessário para realizar a infecção. A concentração utilizada de parasitas foi de $2,5 \times 10^5$ *L. (V.) braziliensis*/poço, na proporção de 5:1 - *Leishmanias*:macrófago, para a infecção realizada nos sistemas *lab-tek chamber slide* de 4 poços e de 5×10^5 para a infecção nas placas de cultura de células de 24 poços.

4.8 Comparação da carga parasitária

A avaliação da carga parasitária dos macrófagos de pacientes com LD, com LC e indivíduos sadios, submetidos a infecção com o isolado LD, foi realizada por dois operadores.

Os macrófagos infectados cultivados nas lâminas *lab-tek chamber slide* de 4 poços foram submetidos a um conjunto de coloração rápida (Panótico Rápido - Laborclin), com ação de um fixador e duas soluções corantes. Em seguida, utilizando o microscópio óptico Olympus CX23 com a objetiva de 100x (1000 vezes de aumento), foram contados 200 macrófagos, independentemente de estarem infectados ou não. Isso permitiu a identificação do número de macrófagos infectados e a quantificação dos amastigotas presentes em seu interior.

Adotou-se como critério de seleção a identificação de macrófagos com citoplasma íntegro e como critérios de exclusão a observação de macrófagos super corados, lisados, com excesso de *beads* no interior, que comprometessem a visualização de possíveis *Leishmanias*.

As médias da contagem foram calculadas, uma tabela de dados foi compilada no Microsoft Excel com a estratificação em pacientes com LD, com LC e indivíduos saudáveis e os dados foram analisados com o *GraphPad Prism 9.5.1*. (Dotmatics). As mesmas lâminas também foram fotografadas utilizando o Microscópio Leica Dmi8 com a objetiva de 40x (400 vezes de aumento) a título de representação.

4.9 Comparação da expressão de arginase 1 e ROS

Após 2 horas de infecção foi realizada a lavagem dos dois sistemas *lab-tek chamber slide* de 4 poços com NaCl 0,9% e adicionou-se o *BD GolgiPlug* - Inibidor do Transporte de Proteínas (contendo Brefeldina A) diluído em RPMI suplementado em um dos sistemas com os macrófagos infectados e sem infecção, já no outro sistema foi adicionado apenas o RPMI suplementado. A adição *in vitro* do Inibidor de Transporte de Proteínas (ITP) bloqueia processos de transporte de proteínas intracelulares, resultando no acúmulo de proteínas no complexo de Golgi, conseqüentemente, aumentando a detectabilidade de proteínas com coloração imunofluorescente (PRUSSIN; METCALFE, 1995).

Os sistemas, então, foram levados para a estufa para serem incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 6 horas. Em seguida, foi feita a fixação com paraformaldeído (PFA) 2% e adição, conforme evidenciado na Tabela 1, da *anti-human/mouse Arginase 1* (RD Systems) (AOKI et al., 2017; ROBERTS et al., 2004) e do marcador de ROS (*dihydrorhodamine 123* - Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (NOVAIS et al., 2014). A montagem da lâmina foi realizada com o DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) (Vector Laboratories), após remoção da câmara utilizada para o cultivo dos macrófagos.

Tabela 1 - Painel de marcadores utilizados na microscopia confocal.

Fluorocromo	Canal	Excitação	Marcação
<i>anti-human/mouse Arginase 1</i>	ROD	552 nm	Arginase
<i>dihydrorhodamine 123</i>	FITC	488 nm	ROS
DAPI	DAPI	405 nm	Núcleo

Fonte: Autor

Para obtenção de imagens de alta resolução, as lâminas foram examinadas com o microscópio confocal Leica TCS SP8 usando a objetiva de imersão em óleo de 63x e ampliação 2x. A aquisição das imagens foi realizada no *software LAS AS* (Leica), com os comprimentos de onda de excitação de 552 nm (Rodamina - ROD) para detectar a *anti-human/mouse Arginase*

1, 488 nm (Isotiocianato de Fluoresceína - FITC) para detectar a *dihydrorhodamine* 123 e de 405 nm (DAPI) para detectar o DAPI.

A avaliação da expressão de Arginase 1 e ROS foi realizada com o propósito demonstrativo. Para esse fim, para garantir a precisão dos dados, adotou-se critérios de inclusão, que consistiram na seleção de imagens de 3 indivíduos sadios/pacientes, onde aproximadamente 10 macrófagos de cada condição (sem infecção e infectados com o isolado LD) foram contados. Apenas os macrófagos que apresentavam o núcleo da *Leishmania* corado com o DAPI foram considerados na condição com infecção. Por outro lado, alguns critérios de exclusão também foram adotados. As células que apresentavam marcação inespecífica para todos os fluorocromos foram excluídas, bem como as células cortadas cujas imagens não abrangeram toda a superfície celular. Esses critérios visavam assegurar que apenas as células relevantes para a análise foram incluídas no estudo.

As imagens de imunofluorescência foram quantificadas usando o *software ImageJ* (*National Institutes of Health* - NIH), no qual foi mensurado a densidade integrada (pixels), que se refere à intensidade de marcação, e a área da região citoplasmática e nuclear (μm^2) (XU et al., 2019). Para a avaliação da intensidade de marcação, como visto na Figura 9, a seleção da região citoplasmática dos macrófagos foi baseada na fluorescência verde (*dihydrorhodamine* 123) e da região nuclear foi considerada a partir da fluorescência azul do DAPI. Foi aplicado *threshold* nas imagens do canal ROD, para isolar a coloração do *background*. A área e fluorescência do núcleo foi subtraída da área total da célula. O valor obtido da intensidade de marcação total foi dividido pelo valor de toda a área citoplasmática (BOUZIN, [s.d.]).

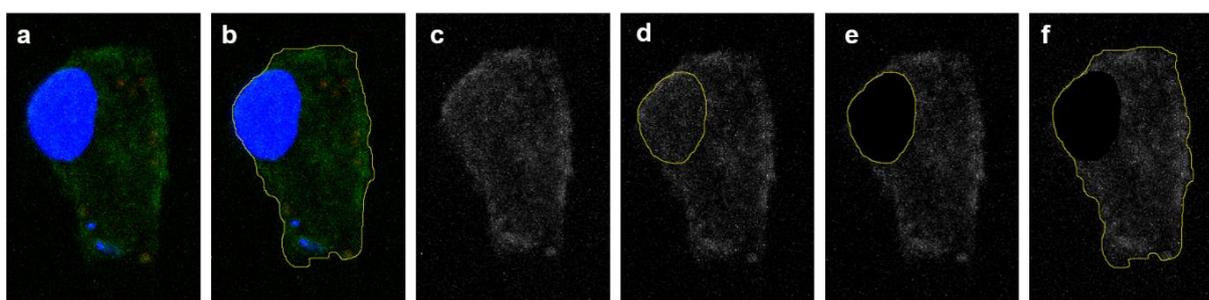


Figura 9 - Representação esquemática das etapas utilizadas no *ImageJ*. (a) Macrófago com citoplasma corado com *dihydrorhodamine* 123 (verde) e núcleo corado com o DAPI (azul); (b) Macrófago com citoplasma selecionado; (c) Marcação da *dihydrorhodamine* 123; (d) Macrófago com núcleo selecionado; (e) Fluorescência do núcleo subtraída e (f) Macrófago com apenas o citoplasma selecionado, sem considerar a fluorescência do núcleo.

Fonte: Autor.

Todas as imagens foram tratadas no *ImageJ* com a mesma configuração de *color balance* para representação das imagens. Os dados foram analisados com o *GraphPad Prism*

9.5.1. (Dotmatics).

4.10 Comparação da produção de ROS, O₂⁻, H₂O₂ E NO

Após 2 horas de infecção, procedeu-se a lavagem das placas de cultura de células de 24 poços com NaCl 0,9% e adicionou-se, como visto na Tabela 2, *dihydrorhodamine* 123, *dihydroethidium* (Life Technologies), CM-H2DCFDA (diacetato de carboximetil-H2-diclorofluoresceína) (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific) e DAF-FM diacetate (Life Technologies) (CARNEIRO et al., 2016), diluídos em RPMI suplementado, individualmente nos macrófagos, tanto os infectados com o isolado LD quanto os não infectados.

Tabela 2 - Painel de marcadores utilizados na citometria de fluxo.

Fluorocromo	Canal	Excitação	Tipo de marcação
<i>dihydrorhodamine</i> 123	FITC	495 nm	Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)
<i>dihydroethidium</i>	Horizon V450	405 nm	Superóxido (O ₂ ⁻)
CM-H2DCFDA	FITC	495 nm	Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)*
DAF-FM <i>diacetate</i>	FITC	495 nm	Óxido Nítrico (NO)

Nota: (*) Através de uma estratégia de *FACS gating* a fluorescência da *dihydrorhodamine* 123 e do *dihydroethidium* foi subtraída da fluorescência do CM-H2DCFDA, com o intuito de mensurar apenas o H₂O₂.

Fonte: Autor

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 2, 4 e 8 horas. Ao final de cada período da cinética, as células foram removidas da placa com adição de PBS 1x + EDTA à 4°C e fixadas com PFA 2%.

A Citometria de Fluxo (Citômetro de Fluxo - LSRFortessa) foi empregada na mensuração da média de intensidade de fluorescência (MIF) referente à produção de ROS, O₂⁻, H₂O₂ e NO durante a cinética de infecção de macrófagos de pacientes com LD, com LC e indivíduos saudáveis. Os dados gerados foram analisados no *software FlowJoTM* (Versão 7.6.5. Ashland, Beckton, Dickson and Company; 2023), no qual gráficos foram gerados. A análise estatística foi feita no *GraphPad Prism* 9.5.1. (Dotmatics).

4.11 Análise estatística

Durante a análise descritiva da amostra foram realizados os testes de normalidade de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Komogorov Smirnov, sendo as distribuições consideradas não paramétricas. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste não paramétrico

de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn para a avaliação dos dados gerados na carga parasitária, imagens de imunofluorescência e para avaliação da produção de ROS, O_2^- , H_2O_2 e NO detectados pelas sondas moleculares. O *software FlowJoTM* (Versão 7.6.5. Ashland, Beckton, Dickson and Company; 2021) foi utilizado para todas as análises dos dados de citometria, bem como o *software GraphPad Prism 9.5.1* (Dotmatics) foi utilizado para desenvolvimento dos gráficos e análises estatísticas. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.12 Desenho experimental

As etapas que envolveram a execução do presente projeto podem ser contempladas de forma resumida e esquemática na Figura 10.

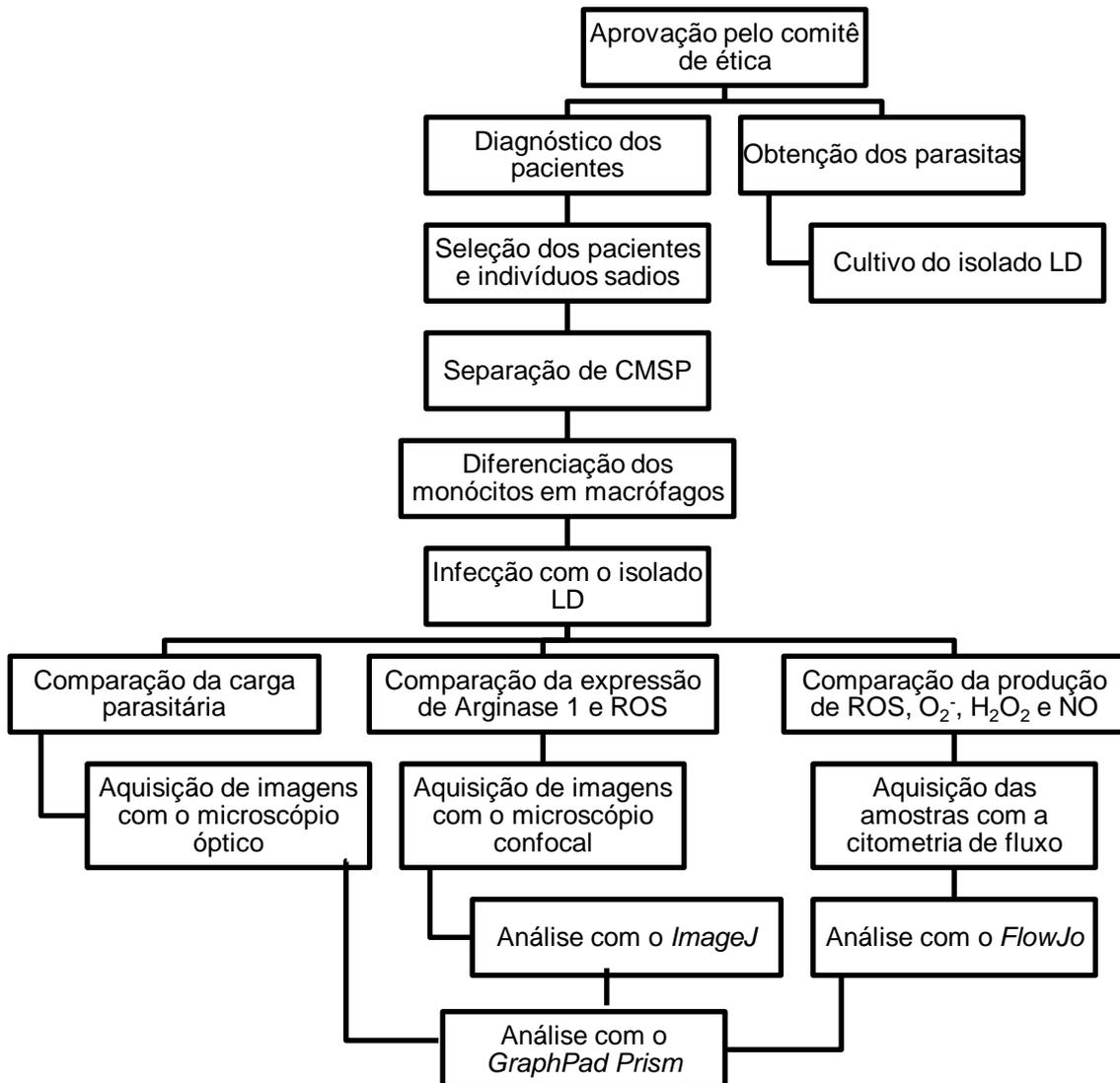


Figura 10 - Fluxograma do desenho experimental.

Fonte: Autor

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos dos pacientes diagnosticados, seguindo os critérios clínicos e laboratoriais previamente estabelecidos (MARSDEN, 1990a, 1990b, 1990c), com leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose cutânea (LC) e indivíduos sadios (controles), que foram utilizados neste estudo, estão apresentados de forma detalhada na Tabela 3. O grupo controle foi composto por 9 indivíduos sadios, dos quais 45% eram do sexo masculino e 55% do sexo feminino, com uma idade média de 33 anos. O grupo de pacientes com LD foi composto por 6 indivíduos, sendo 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino, com idade média de 37 anos. A IDRm foi considerada positiva em 67% dos casos, e o PCR apresentou resultado positivo em 83% dos pacientes com LD. Por outro lado, no grupo de pacientes com LC, participaram 10 pessoas, sendo 70% do sexo masculino e 30% do sexo feminino, com uma idade média de 37 anos. Todos os pacientes com LC tiveram resultado positivo para a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), enquanto 90% apresentaram resultado positivo para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Tabela 3 - Característica clínicas e demográficas dos indivíduos sadios e pacientes com LD e com LC. A amostra refere-se ao quantitativo de indivíduos selecionados de cada população estudada. O sexo biológico foi apresentado em porcentagem, bem como os resultados da PCR. A idade foi representada em média. Os resultados da IDRm foram apresentados em porcentagem e a área em mediana (mm²).

Características	Indivíduos Sadios	Leishmaniose Disseminada	Leishmaniose Cutânea
Amostra	9	6	10
Sexo			
Masculino (%)	45%	50%	70%
Feminino (%)	55%	50%	30%
Idade	33	37	37
IDRM			
Resultado positivo (%)	-	67%	100%
Resultado negativo (%)	-	33%	0%
Área IDRm (mediana)	-	165,33 mm ²	176,71 mm ²
PCR			
Resultado positivo (%)	-	83%	90%
Resultado negativo (%)	-	17%	10%

Fonte: Autor

Como demonstrado na Tabela 3, nem todos os pacientes com LD e com LC apresentaram resultados positivos nos exames de IDRM e PCR. Por isso, além desses exames, também foi realizado o exame histopatológico de biópsias retiradas das lesões dos pacientes. A análise histopatológica, juntamente com a avaliação clínica, desempenha um papel crucial na confirmação e esclarecimento de possíveis diagnósticos ambíguos.

5.2 Comparação da carga parasitária

A carga parasitária foi comparada por dois operadores com o auxílio de um microscópio óptico, com o objetivo de investigar possíveis diferenças na infecção realizada. Os dados detalhados da contagem realizada podem ser conferidos no Anexo C. Além disso, foram obtidas imagens representativas de macrófagos, tanto sem infecção quanto infectados com o isolado LD, corados com Panótico Rápido para fins de demonstração, como pode ser observado na Figura 11.

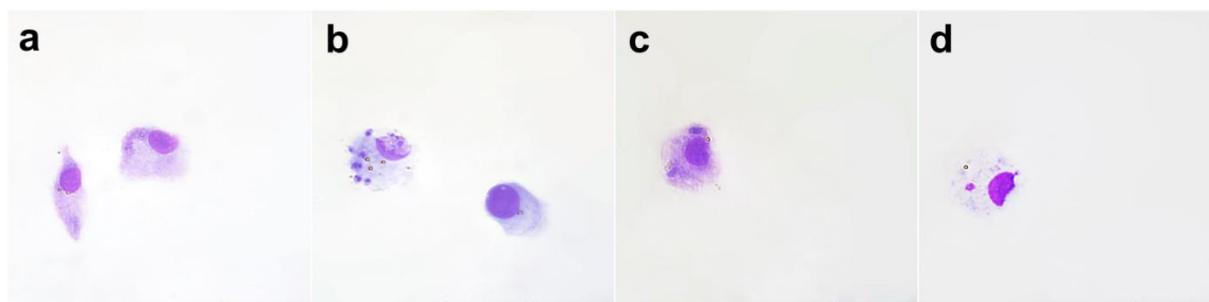


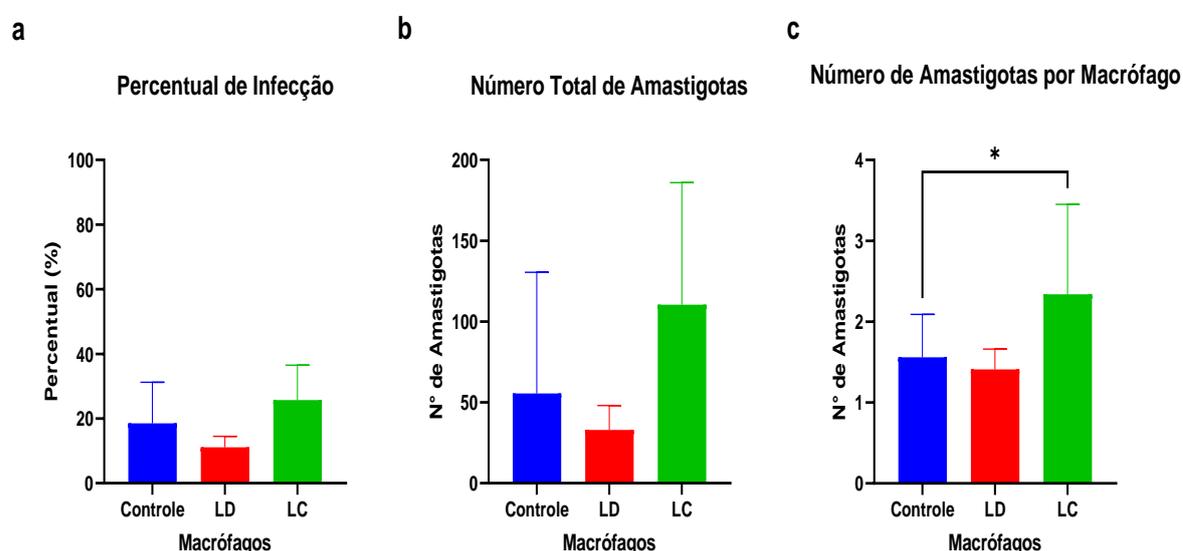
Figura 11 - Macrófagos corados com Panótico Rápido. Imagens de macrófagos, com escala de 50 µm, não infectados e infectados com *L. (V.) braziliensis* aderidos em sistemas *lab-tek chamber slide* e corados com panótico rápido. (a) Macrófagos não infectados; (b) Macrófagos de indivíduo sadio (controle) infectados com o isolado LD; (c) Macrófago de paciente com LD infectado com o isolado LD e (d) Macrófago de paciente com LC infectado com o isolado LD.

Fonte: Autor

Com base nos resultados apresentados no Gráfico 1, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) no percentual de infecção (Gráfico 1a) e no número total de amastigotas (Gráfico 1b) entre macrófagos de indivíduos sadios, pacientes com LD e com LC. Em outras palavras, não foram encontradas discrepâncias estatisticamente relevantes entre esses grupos em relação a infecção realizada com o isolado LD. Essas medidas se mantiveram semelhantes mesmo após 2 horas de infecção, indicando uma resposta similar dos macrófagos à infecção com o isolado LD. Entretanto, ao considerar o número de amastigotas por macrófago infectado com o isolado LD (conforme gráfico 1c), uma discrepância mais significativa surgiu: os macrófagos dos pacientes com LC apresentaram uma proporção mais elevada de amastigotas

em comparação aos macrófagos dos indivíduos sadios ($p = 0.0422$). A infecção, contudo, pode ser considerada baixa, tendo em vista que apresentou mediana inferior a 20% nos macrófagos dos controles e pacientes com LD e aproximadamente 30% nos macrófagos dos pacientes com LC.

Gráfico 1 - Comparação da efetividade da infecção e carga parasitária intracelular em macrófagos de indivíduos sadios, pacientes com LD e com LC infectados com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis* durante um período de 2 horas. Gráficos elaborados no *GraphPad Prism* com a mediana e o intervalo de confiança de 95% evidenciados. Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. (a) Percentual de infecção de macrófagos de indivíduos sadios (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde) com o isolado LD, $p > 0.05$; (b) Número total de amastigotas, contadas no microscópio óptico, que foram encontradas internalizadas em macrófagos de indivíduos sadios, pacientes com LD e com LC infectados com o isolado LD, $p > 0.05$; (c) Relação entre o número total de amastigotas por macrófago infectado com o isolado LD, $p = 0.0422$. A amostra compreendeu 5 indivíduos saudáveis, 2 pacientes com LD e 5 pacientes com LC.



Fonte: Autor

5.3 Comparação da expressão de arginase 1 e ROS

As imagens obtidas através do microscópio confocal Leica TCS SP8 demonstram a representação visual da expressão de Arginase 1 e ROS em macrófagos sem infecção e infectados com o isolado LD, como pode ser visto na Figura 12. Através destas imagens, a expressão de Arginase 1 e ROS foram quantificadas.

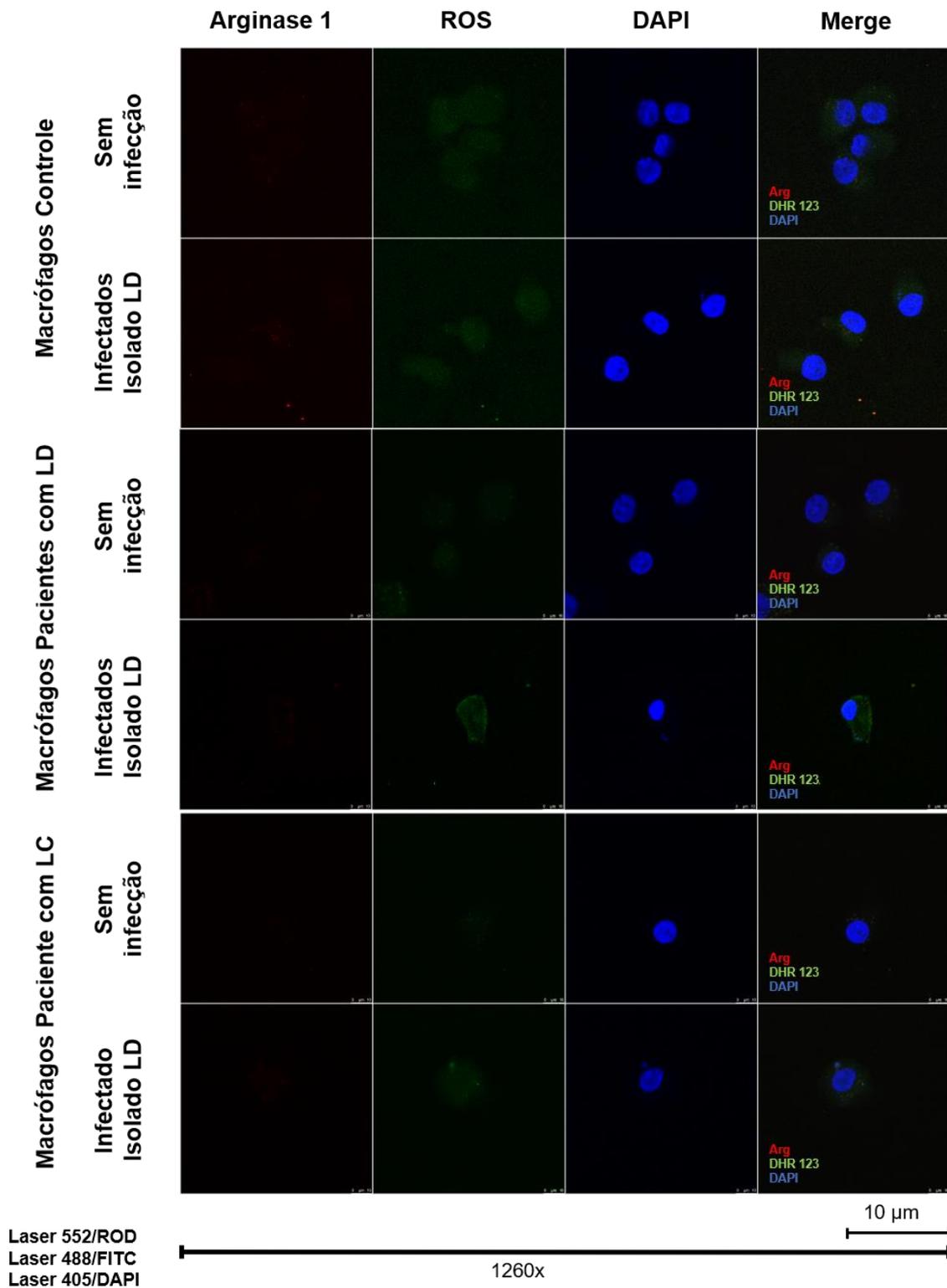


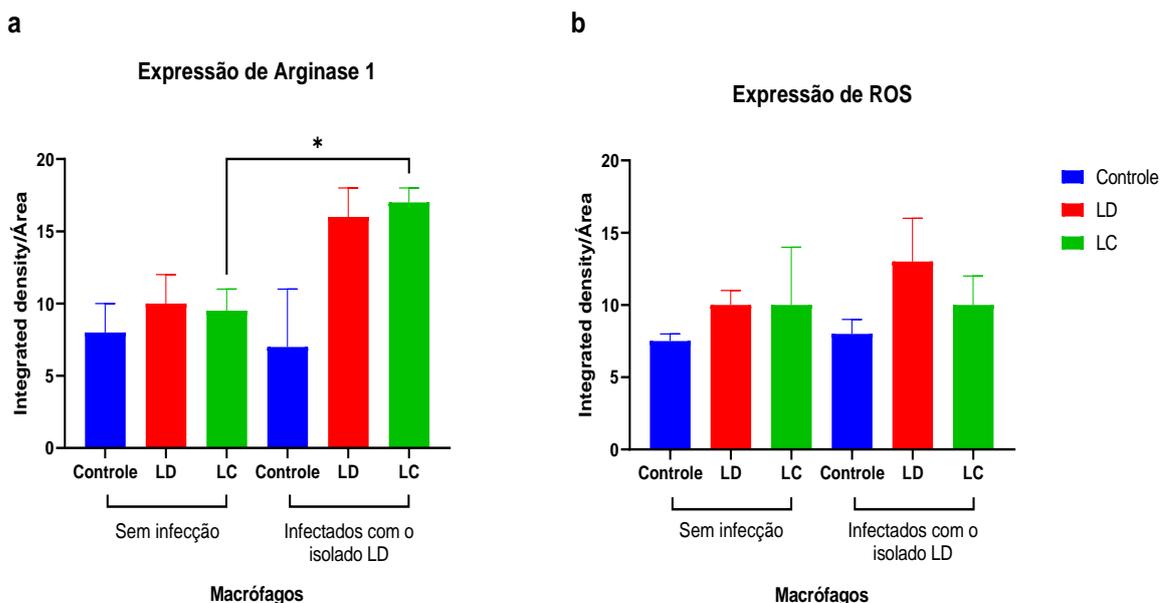
Figura 12 - Imagens de imunofluorescência confocal da expressão de Arginase 1 e ROS. A figura mostra uma comparação entre os macrófagos de indivíduos saudáveis (Controle), pacientes com LD e com LC infectados com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis* e sem infecção. Imagens de imunofluorescência obtidas com a objetiva de 63x e ampliação de 2x com imersão de óleo e com escala representada de 10 μ m. O DAPI (laser 405) foi utilizado para corar o núcleo, dessa forma é possível observar o núcleo de cada macrófago corado na cor azul, assim como o da *Leishmania*. A *dihydrorhodamine* 123 - DHR 123 (laser 488) está corando ROS na cor verde e *anti-human/mouse* Arginase - Arg (laser 552) está corando na cor vermelha. O merge representa a sobreposição dos canais de fluorescência utilizados.

Fonte: Autor

A comparação da expressão de Arginase 1, após 2 horas de infecção com o isolado LD e 6 horas de incubação com o inibidor de transporte de proteínas (ITP), aqui empregado para aumentar a detectabilidade da Arginase 1, em macrófagos indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC evidenciou um aumento na expressão da Arginase 1 após infecção com o isolado LD nos macrófagos de pacientes com LD e com LC, demonstrando que os macrófagos dos pacientes respondem de maneira semelhante quanto a expressão intracelular dessa enzima, como mostra o Gráfico 2a. Além disso, macrófagos de pacientes com LC apresentam um aumento significativo da expressão de Arginase 1 após infecção com o isolado LD ($p = 0.0222$) em comparação com os macrófagos dos mesmos pacientes, porém sem infecção.

Em contrapartida, a comparação da expressão de ROS avaliada pela fluorescência da *dihydrorhodamine* 123, após 2 horas de infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis* e 6 horas de incubação com o ITP, aqui também utilizado para aumentar a detectabilidade da expressão de ROS, em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC demonstrou uma resposta semelhante ($p > 0.05$) nos macrófagos, conforme visto no Gráfico 2b.

Gráfico 2 - Comparação da expressão de Arginase 1 e ROS. Gráficos elaborados no *GraphPad Prism*, apresentando a mediana como medida central e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. (a) Comparação da intensidade de marcação da *anti-human/mouse* Arginase 1 entre os macrófagos de controles (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde) tanto sem infecção quanto infectados com o isolado LD ($p = 0.0222$) e (b) Comparação da intensidade de marcação *dihydrorhodamine* 123 (ROS) entre os macrófagos de controles (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde) tanto sem infecção quanto infectados com o isolado LD ($p > 0.05$).

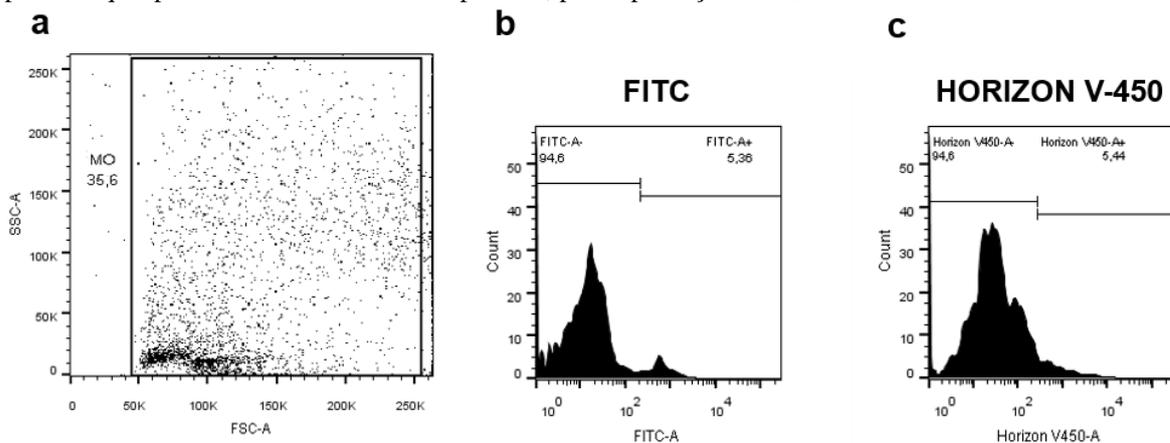


Fonte: Autor

5.4 Comparação da produção de ROS, O₂⁻, H₂O₂ E NO

A produção de ROS, O₂⁻, H₂O₂ e NO foi avaliada por meio da técnica de citometria de fluxo. Essas mensurações foram conduzidas em intervalos de tempo distintos: 2, 4 e 8 horas após a infecção de macrófagos de indivíduos saudáveis (Controles), pacientes com leishmaniose disseminada (LD) e com leishmaniose cutânea (LC) com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, provenientes de um isolado LD. Utilizando o *software FlowJo* empregou-se uma estratégia de *FACS gating*, como exibido no Gráfico 4, para realizar uma análise quantitativa da média da intensidade de fluorescência (MIF) em populações de macrófagos após marcação com sondas fluorescentes.

Gráfico 3 - Estratégia de *FACS gating* empregada nas análises dos dados da Citometria de Fluxo. Gráficos representativos desenvolvidos no *FlowJo*. (a) Dot plot de tamanho relativo celular (FSC - *Forward Scatter*) versus granulidade celular (SSC - *Side Scatter*) com população de macrófagos selecionada; (b) *Cut-off* empregado nos fluorocromos do canal do FITC, delimitando a partir de qual ponto foram considerados como positivos, para a produção de ROS, H₂O₂ e NO; (c) *Cut-off* empregado no fluorocromo do canal do HORIZON V-450, delimitando a partir de qual ponto foi considerado como positivo, para a produção de O₂⁻.



Fonte: Autor

A comparação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ao longo das 2, 4 e 8 horas após infecção com o isolado LD (Gráfico 5) revelou notáveis diferenças na resposta dos macrófagos dos pacientes com LC em relação aos controles. Durante as primeiras 2 e 4 horas após a infecção com o isolado LD, os macrófagos dos pacientes com LC exibiram uma Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) significativamente mais baixa, contrastando com os macrófagos dos indivíduos saudáveis. Essa discrepância não foi observada nos macrófagos dos pacientes com LD infectados com o mesmo isolado.

A produção de ROS pelos macrófagos dos controles superou consistentemente a dos pacientes com LD e com LC ao longo das 2, 4 e 8 horas de observação. Isso foi especialmente evidente nas análises de 2 (p =0.0010) e 4 horas (p =0.0054), nas quais as diferenças entre os

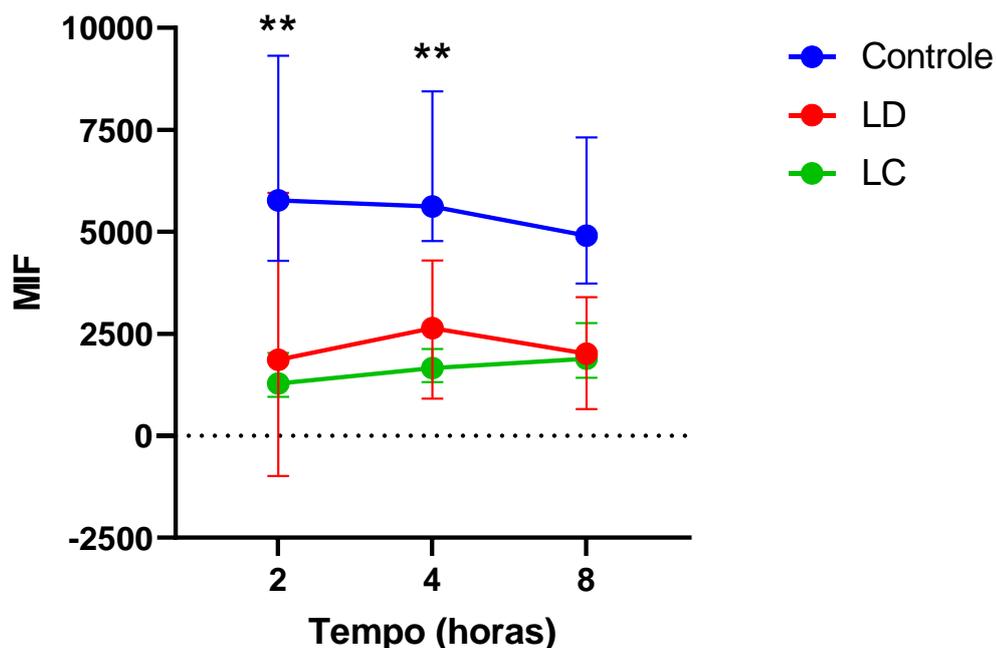
macrófagos dos controles e dos pacientes com LC foram estatisticamente significativas. Por outro lado, não foi identificada uma discrepância notável entre os pacientes com LD e com LC, indicando uma resposta semelhante em termos de produção de ROS.

A dinâmica temporal da produção de ROS também se destacou nos diferentes grupos. Os macrófagos dos controles exibiram uma alta produção de ROS às 2 horas após a infecção com o isolado LD, com uma subsequente diminuição ao longo da cinética de 8 horas. Em contraste, os macrófagos dos pacientes com LD atingiram seu pico de produção de ROS às 4 horas, seguido por uma queda às 8 horas. Notavelmente, os pacientes com LC demonstraram um padrão de produção de ROS em ascensão, culminando no ponto mais alto às 8 horas.

Essas observações sugerem que os macrófagos dos pacientes com LC e LD apresentam uma capacidade reduzida de ativar a produção de ROS em resposta à infecção por promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, quando comparados aos macrófagos de indivíduos saudáveis.

Gráfico 4 - Cinética da produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC. Gráfico elaborado no GraphPad Prism com a mediana como medida central e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. A Média da intensidade de fluorescência (MIF) de ROS com 2, 4 e 8 horas após infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*. Dados refletem a infecção realizada em macrófagos de controles (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde). Asteriscos indicam significância estatística entre macrófagos de controles e pacientes com LC em 2 horas ($p = 0.0010$) e 4 horas ($p = 0.0054$).

Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)



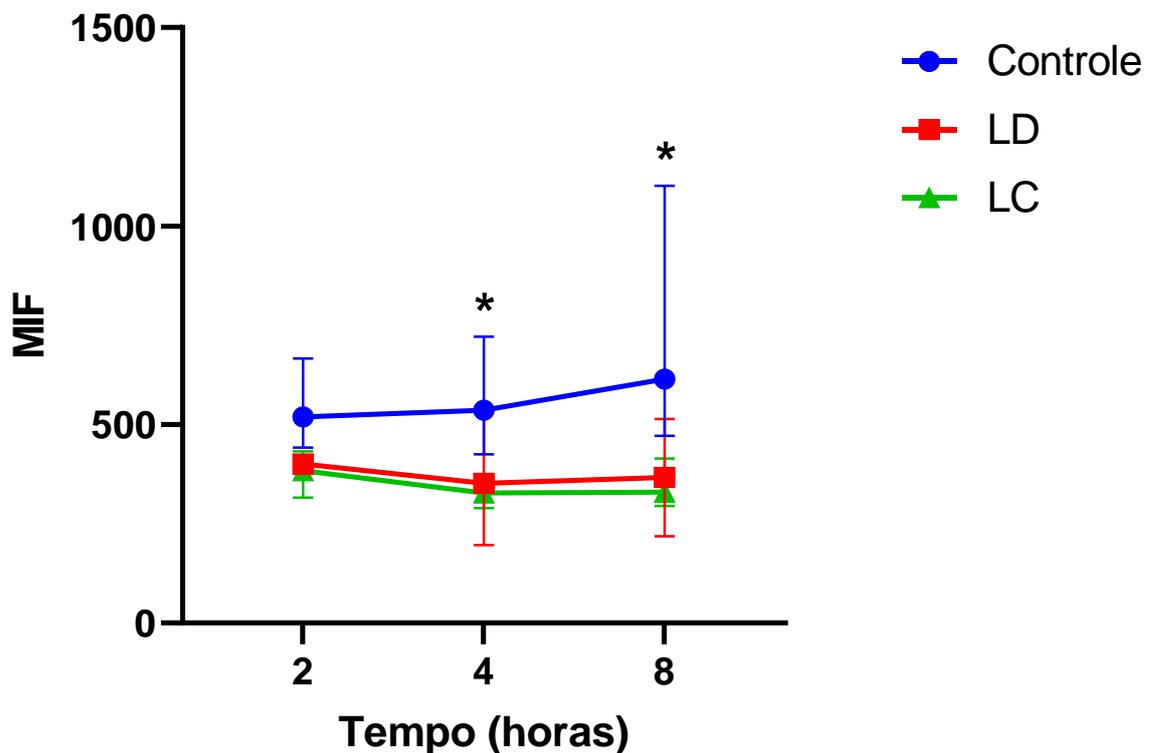
De maneira análoga, a produção de superóxido (O_2^-) pelos macrófagos dos controles também se revelou mais proeminente em comparação aos macrófagos dos pacientes com LD e com LC. Essa disparidade atingiu significância estatística quando se compararam os macrófagos dos controles e dos pacientes com LC, notadamente com 4 ($p = 0.0430$) e 8 horas ($p = 0.0296$), conforme retratado no Gráfico 6. No entanto, os macrófagos dos pacientes com LD e com LC tiveram uma produção de O_2^- muito semelhante, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$).

Em relação à cinética da produção de O_2^- , os macrófagos dos controles adotaram um padrão oposto ao observado nos pacientes com LD e LC. No grupo de controle, a geração de O_2^- aumentou progressivamente à medida que o período da cinética progredia, culminando em um pico de produção após 8 horas. Em contraste, os pacientes com LD e LC apresentaram uma redução na produção de O_2^- , sendo que os pacientes com LD atingiram o ponto mais baixo às 4 horas e os pacientes com LC às 8 horas.

Esses resultados parecem refletir, de forma semelhante aos dados de produção de ROS, uma menor capacidade dos macrófagos provenientes dos pacientes com LC em instigar os mecanismos que desencadeiam a produção dessas espécies reativas de oxigênio, quando comparados aos macrófagos de indivíduos saudáveis.

Gráfico 5 - Cinética da produção de superóxido (O_2^-) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC. Gráfico elaborado no *GraphPad Prism* com a mediana como medida central e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. A Média da intensidade de fluorescência (MIF) de O_2^- com 2, 4 e 8 horas após infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*. Dados refletem a infecção realizada em macrófagos de controles (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde). Asterisco indica significância estatística entre macrófagos de controles e pacientes com LC em 4 horas ($p = 0.0430$) e 8 horas ($p = 0.0296$).

Produção de Superóxido (O_2^-)



Fonte: Autor

Em relação à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), torna-se notório que os macrófagos pertencentes ao grupo controle, quando infectados com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*, exibiram uma produção mais substancial em comparação aos macrófagos dos pacientes com LD e com LC. Essa discrepância ganha importância estatística, demonstrando significância nos intervalos de 2 ($p = 0.0028$), 4 ($p = 0.0168$) e 8 horas ($p = 0.0031$) entre os macrófagos dos controles e os dos pacientes com LC após infecção com o mesmo isolado, como evidenciado no Gráfico 7.

Embora a diferença não tenha atingido significância estatística, é perceptível que os macrófagos dos pacientes com LD tendem a apresentar uma produção mais elevada de H_2O_2

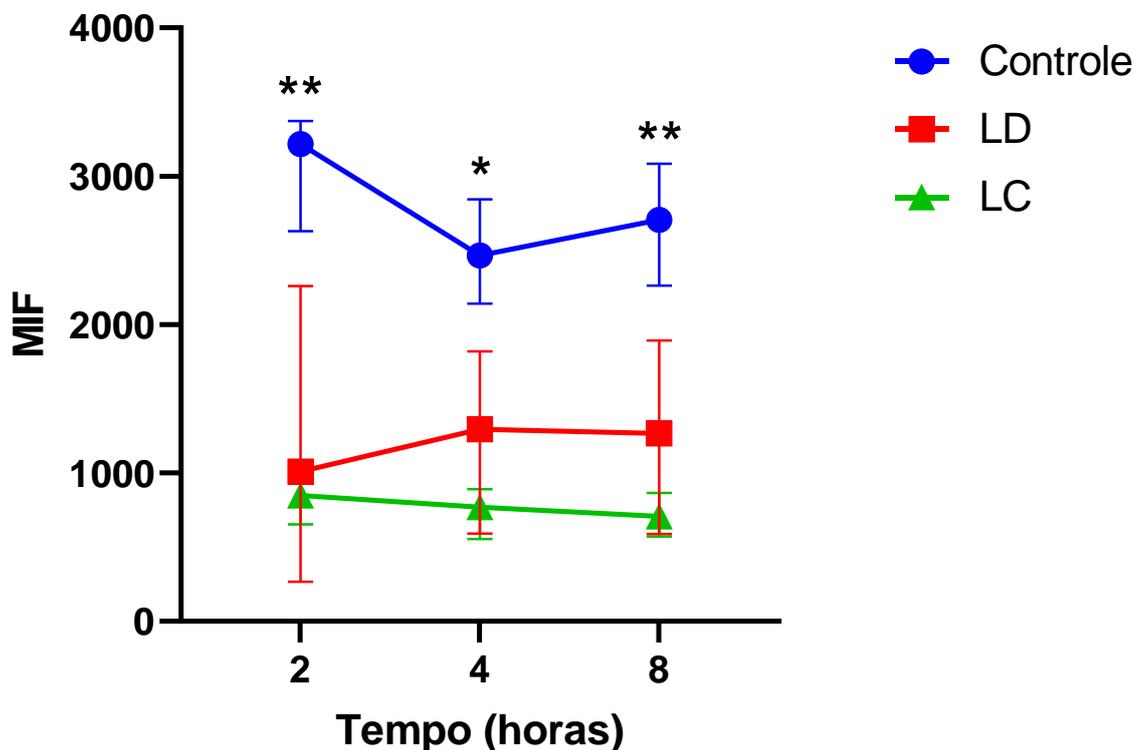
em comparação aos macrófagos dos pacientes com LC.

Ao observar a cinética de produção de H_2O_2 após a infecção com o isolado LD, emerge um padrão diferenciado entre os grupos. Nos macrófagos dos controles, a produção máxima de H_2O_2 ocorreu às 2 horas, seguida por uma redução às 4 horas e, posteriormente, um aumento às 8 horas. Em contraste, os macrófagos dos pacientes com LD manifestaram um aumento contínuo na produção de H_2O_2 até as 4 horas, seguido por uma leve diminuição. Por outro lado, nos macrófagos dos pacientes com LC, a produção de H_2O_2 diminuiu de maneira gradual ao longo do período de observação, tendo o ponto mais alto após 2 horas da infecção com o isolado LD.

Em síntese, os resultados destacam que os macrófagos dos indivíduos sadios têm uma tendência a produzir quantidades mais expressivas de H_2O_2 após a infecção com o isolado LD, em comparação aos macrófagos dos pacientes com LD e LC. Além disso, as diferentes trajetórias cinéticas sugerem que a regulação da produção de H_2O_2 pode variar entre esses grupos.

Gráfico 6 - Cinética da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos saudáveis, pacientes com LD e com LC. Gráfico elaborado no *GraphPad Prism* com a mediana como medida central e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. A Média da intensidade de fluorescência (MIF) de H_2O_2 com 2, 4 e 8 horas após infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*. Dados refletem a infecção realizada em macrófagos de controles (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde). Asteriscos indicam significância estatística entre macrófagos de controles e pacientes com LC em 2 horas ($p = 0.0028$), 4 horas ($p = 0.0168$) e 8 horas ($p = 0.0031$).

Produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)



Fonte: Autor

Não foram identificadas associações significativas em relação ao óxido nítrico (NO) após a infecção com o isolado LD. Apesar da ausência de diferença estatisticamente relevante, a produção de NO nos macrófagos do grupo controle se manifestou mais intensa em comparação à observada nos macrófagos dos pacientes com LD e com LC.

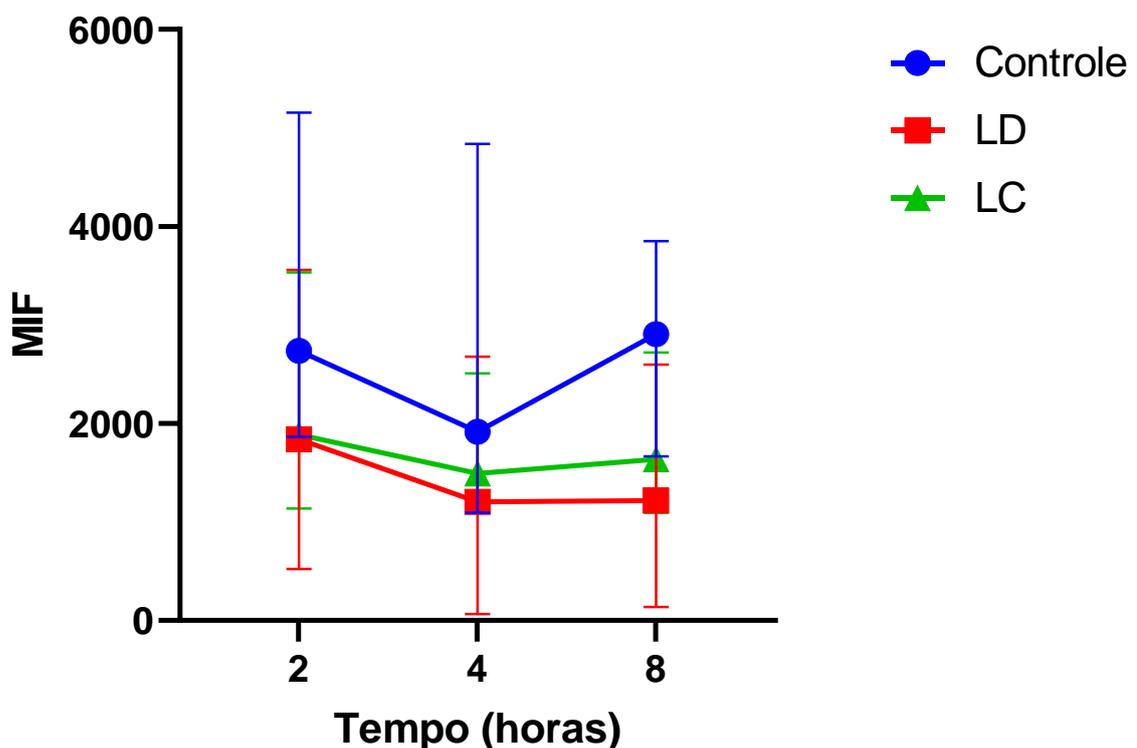
A trajetória da produção de NO nos macrófagos do grupo controle exibiu uma diminuição após 4 horas, seguida por um pico máximo de produção após 8 horas do período de investigação da cinética. Nos macrófagos dos pacientes com LD e LC, o ponto de produção mais elevado ocorreu às 2 horas, em consonância. Subsequentemente, percebeu-se um declínio na produção nos macrófagos dos pacientes com LD, enquanto nos macrófagos dos pacientes

com LC houve um aumento leve, porém menos substancial do que o registrado às 2 horas.

Em resumo, apesar da falta de significância estatística, os resultados indicam uma tendência de maior produção de NO nos macrófagos dos indivíduos sadios após a infecção com o isolado LD. As nuances das trajetórias cinéticas apontam para possíveis variações na regulação da produção de NO entre os grupos investigados.

Gráfico 7 - Cinética da produção de Óxido Nítrico (NO) após infecção com o isolado LD em macrófagos de indivíduos sadios, pacientes com LD e com LC. Gráfico elaborado no *GraphPad Prism* com a mediana como medida central e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. A Média da intensidade de fluorescência (MIF) de NO com 2, 4 e 8 horas após infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis* ($p > 0.05$). Dados refletem a infecção realizada em macrófagos de controles (azul), pacientes com LD (vermelho) e com LC (verde).

Produção de Óxido Nítrico (NO)



Fonte: Autor

Era esperado observar uma resposta diferente na produção de ROS, O_2^- , H_2O_2 e NO após a infecção com o isolado LD entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC. Entretanto, o que se constatou foi uma notável semelhança na produção das espécies reativas entre esses grupos de pacientes, mas com níveis substancialmente inferiores quando comparados aos macrófagos dos controles que foram infectados com o mesmo isolado.

De modo geral, os resultados apontam para uma maior produção de ROS, H₂O₂, O₂⁻ e NO nos macrófagos dos controles em contraste com os macrófagos dos pacientes com LD e com LC após a infecção com o isolado LD de *L. (V.) braziliensis*. Esses dados demonstram uma menor capacidade de ativação da explosão oxidativa nos macrófagos de pacientes com LD e com LC quando infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, comparados aos macrófagos de indivíduos saudáveis.

Os principais resultados podem ser resumidos da seguinte forma:

1. A carga parasitária mostrou-se equivalente entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC após infecção com o isolado LD;
2. A expressão de Arginase 1 foi similar entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC. No entanto, essa expressão foi maior nos macrófagos dos pacientes com LC após infecção com o isolado LD, em comparação com os mesmos macrófagos não infectados;
3. A produção de ROS, O₂⁻ e H₂O₂ pelos macrófagos dos pacientes com LD e com LC teve uma resposta similar após a infecção com o isolado LD. Entretanto, os macrófagos de pacientes com LC apresentaram uma produção menor do que os macrófagos dos controles após a infecção com o mesmo isolado.
4. A produção de NO foi semelhante entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC após a infecção com o isolado LD.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram realizados experimentos com macrófagos derivados de monócitos de pacientes com LD e com LC para avaliar a capacidade dessas células em produzir espécies reativas durante os primeiros momentos da infecção *in vitro* com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Uma vez que a resposta de macrófagos contra *Leishmania* podem controlar a carga parasitária, diminuindo o número de parasitas intracelulares, dificultando a proliferação desses parasitas e conseqüentemente uma possível disseminação da doença, diferenças quanto o tempo necessário para a ativação e a quantidade produzida de espécies reativas podem ser elemento fundamental no desenvolvimento de diferentes formas clínicas de LTA.

Macrófagos são células produtoras de diversas quimiocinas e citocinas associadas ao desenvolvimento de uma resposta celular tipo Th1, com produção de IFN- γ e TNF, que são essenciais para a eliminação do parasita. Entretanto, essa resposta inflamatória também é responsável pela patologia que leva à lesão tecidual (BACELLAR *et al.*, 2002) e as diferentes manifestações clínicas da LTA estão associadas a fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro (CARVALHO *et al.*, 2012). É bem conhecido que a explosão oxidativa é um mecanismo importante para matar a *Leishmania* intracelular em modelos animais (MUKBEL *et al.*, 2007). A resistência à infecção é conferida pela ativação do macrófago, através do IFN- γ , com aumento da expressão de iNOS e produção de NO (NATHAN; SHILOH, 2000). No entanto a relevância dessas espécies reativas na morte da *Leishmania* é controversa em humanos (NOVAIS *et al.*, 2009).

Macrófagos de indivíduos resistentes à infecção por *L. (V.) braziliensis* têm uma capacidade aumentada de eliminar *Leishmania* (GIUDICE *et al.*, 2012), embora apresentem produção de ROS e NOS similares aos indivíduos sadios e menor que os pacientes com LC e LM (GIUDICE *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que os monócitos de pacientes com LC produzem maior quantidade de ROS e NO em comparação com indivíduos sadios (CARNEIRO *et al.*, 2016) e, a despeito disso, não controlam a infecção, o que sugere que a explosão oxidativa, *per se*, não é responsável pela morte da *Leishmania* intracelular.

Uma vez que a carga parasitária pode influenciar na produção de espécies reativas, bem como na subversão desses fatores antiparasitários, (REVERTE; SNÄKÄ; FASEL, 2022) foram avaliadas as cargas parasitárias nos macrófagos de pacientes com LD e com LC, revelando baixo número de amastigotas e valores equivalentes entre as células infectadas após 2 horas de infecção, o que pode explicar uma resposta semelhante quanto a produção das espécies reativas de ROS e NO. Macrófagos de pacientes com LD e com LC demonstraram uma carga parasitária

semelhante embora macrófagos de LC apresentarem maior carga parasitária comparados aos macrófagos do grupo controle.

Alguns questionamentos podem ser aventados quanto a resposta observada: 1. Macrófagos de pacientes com LC são mais susceptíveis à infecção pelo parasita? 2. Embora com cargas parasitárias semelhantes, os macrófagos de LD e LC apresentam diferente resposta quanto as espécies reativas comparados com os macrófagos dos controles? 3. Os macrófagos de pacientes com LD e com LC são “silenciados” pelos parasitas, quanto a produção de espécies reativas, uma vez que são obtidos de indivíduos com a doença ativa?

Oliveira *et al.* (2021), observaram uma carga parasitária inferior em monócitos de pacientes com LD em comparação com aqueles de pacientes com LC, tanto após 2 horas quanto após 48 horas de infecção, quando infectados com o isolado de LC. É importante ressaltar que este estudo envolveu tipos celulares e isolados diferentes. Além disso, o estudo destacou que apenas após 48 horas de infecção, monócitos de pacientes com LC apresentaram uma carga parasitária menor em comparação com os controles Oliveira *et al.* (2021). Esses dados surgem que essas células, provenientes de pacientes com LD e com LC são ativadas de maneira também similar.

Demonstramos aqui que macrófagos de pacientes com LD e com LC respondem de maneira semelhante após a infecção quanto a expressão de Arginase 1 e ROS logo nas primeiras horas de infecção. Quanto a expressão de Arginase 1, com exceção dos macrófagos de pacientes LC infectados comparados com os macrófagos de paciente LC não infectados, resultados semelhantes foram observados entre os macrófagos de LD e controles. Uma vez que Arginase 1 está associada à sobrevivência e multiplicação do parasita na fase inicial da infecção natural devido ao aumento da atividade da Arginase 1 por proteofosfoglicanos do parasita (ROGERS *et al.*, 2009), e a expressão aumentada só foi observada em macrófagos de LC, essas células são mais susceptíveis aos mecanismos de subversão pelos parasitas?

A enzima Arginase 1 compete com a iNOS pela L-arginina e a converte em L-ornitina e uréia (GOERDT; ORFANOS, 1999; MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998) a inibição dessa enzima por fatores produzidos pelo parasita permite um maior aporte de L-arginina à iNOS com consequente aumento da produção de NO (HECKER *et al.*, 1995).

A capacidade dos macrófagos de pacientes com LC em manter uma maior produção de Arginase 1 durante os primeiros momentos da infecção, pode contribuir para a manutenção de parasitas intracelulares viáveis devido ao mecanismo de regulação indireta exercido pela Arginase 1 na atividade de iNOS.

Embora o papel do NO em controlar parasitas intracelulares (*L. major*) em modelo animal seja bem documentado (LIEW; COX, 1991) o efeito do NO pode não ser diretamente contra o parasita como demonstrou recentemente Formaglio *et al* (2021) mostrando que o NO controla a proliferação de *L. major* inibindo o recrutamento de células hospedeiras permissivas ao parasita. O mesmo não é observado em humanos, porém o papel do NO com o desfecho da infecção torna-se cada vez mais evidente. Os pacientes infectados com *Leishmania* resistente ao NO apresentaram lesões significativamente maiores do que os pacientes infectados com isolados susceptíveis ao NO. Além disso, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* resistentes ao NO multiplicaram-se significativamente melhor em macrófagos humanos do que isolados susceptíveis ao NO (GIUDICE *et al.*, 2007). Adicionalmente, Carneiro *et al* (2016) demonstraram uma correlação positiva entre a produção de NO e o tamanho das lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis*.

Como demonstrado aqui, não há diferença na produção de NO entre os macrófagos dos pacientes com LD e com LC durante os primeiros momentos (até 8 horas) após a infecção. Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro *et al.* e Oliveira *et al.*, onde estes autores demonstraram uma cinética de infecção similar em monócitos de pacientes com LD e com LC, após infecção com diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. (CARNEIRO *et al.*, 2016).

A expressão de ROS, avaliada por meio da *dihydrorhodamine* 123 na microscopia confocal, revela que os macrófagos de pacientes com LD, com LC e controles apresentam respostas semelhantes após a infecção. No entanto, ao examinarmos a dinâmica da infecção utilizando citometria de fluxo, notamos que os macrófagos de pacientes com LC exibem uma menor produção de ROS nas primeiras 2 e 4 horas da infecção, em comparação com os macrófagos dos controles, embora as cargas parasitárias sejam semelhantes. Isso sugere uma possível limitação na capacidade de ativação dos macrófagos de pacientes com LC durante os estágios iniciais da infecção, uma vez que a maturação do fagossoma está intimamente ligada a características tanto dos parasitas (DA SILVA VIEIRA *et al.*, 2019a) quanto das células dos pacientes com LTA. Não obstante, não observamos uma discrepância significativa entre os pacientes com LD e com LC, indicando uma resposta semelhante em termos de produção de ROS. Essas observações sugerem que os macrófagos de pacientes com LD e com LC possuem uma capacidade reduzida de ativar a produção de ROS em resposta à infecção por promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, quando comparados aos macrófagos de indivíduos saudáveis.

Além disso, é importante destacar que a maturação e migração de fagócitos profissionais podem desempenhar um papel crucial nos desfechos da doença, inclusive contribuindo para a disseminação dos parasitas de diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo *L. (V.) braziliensis*

(REBOUÇAS *et al.*, 2021).

Durante a análise da cinética de infecção, onde avaliamos a produção de H_2O_2 e O_2^- , componentes diretos da produção total de ROS, observamos que os macrófagos de pacientes com LD e com LC respondem de forma semelhante quando infectados. No entanto, notamos uma redução na produção de H_2O_2 e O_2^- nos macrófagos de pacientes com LC em comparação com os controles. Essa diminuição na capacidade de ativação dos ROS, principalmente do H_2O_2 , pode contribuir para a manutenção dos parasitas por intervalos de tempo mais longos durante a infecção, como indicado por resultados anteriores de estudos realizados por Carneiro *et al.* (2016) e Oliveira *et al.* (2019).

Um estudo demonstrou recentemente, em modelo murino, que a diferença na ativação fagolisossômica após a infecção de macrófagos com isolado de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com LM, expressam menos LAMP-1 (DA SILVA VIEIRA *et al.*, 2019b) (associada a maior expressão de LPG (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012) e tem maior acidificação do compartimento fagolisossômico (associada a maior expressão de GP63 pelo parasita (OLIVIER *et al.*, 2012). Esses achados ocorreram após 24 horas de infecção sendo os achados de 2 horas, similares entre os isolados de *L. (V.) braziliensis*.

Uma vez que esse processo está diretamente associado a produção de ROS e NO, observamos em macrófagos humanos (de pacientes com LD e com LC) uma resposta similar após 2, 4 e 8 horas de infecção, sugerindo que os macrófagos desses pacientes respondem da mesma forma durante os primeiros momentos da infecção, o que não se observa nos macrófagos de indivíduos saudáveis (maior expressão de ROS durante a cinética de infecção).

Embora tenhamos investigado a possível diferença na produção de ROS e NO entre os macrófagos de pacientes com LD e com LC após a infecção com o isolado LD, nossos resultados não evidenciaram essa diferença. Este estudo é de grande importância, uma vez que conseguimos fornecer dados sobre a produção de ROS e NO especificamente em macrófagos, preenchendo uma lacuna na literatura que até então se concentrava em monócitos. Considerando que os macrófagos são as principais células hospedeiras para *Leishmania*, nossa investigação é de fundamental importância para uma compreensão mais abrangente do processo de infecção.

Em resumo, os resultados indicam uma redução na capacidade de ativação da explosão oxidativa nos macrófagos de pacientes com LD e com LC quando infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, em comparação com os macrófagos de indivíduos saudáveis. Notavelmente, os macrófagos de pacientes com LC parecem produzir menos ROS em comparação com os controles, especialmente nas primeiras horas de infecção.

7 CONCLUSÃO

Contrariando à nossa hipótese, a produção de espécies reativas de oxigênio nos macrófagos dos pacientes com LD não apresentou comparados com os macrófagos dos pacientes com LC. Entretanto, a produção dessas espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos dos pacientes com LD e com LC é menor do que a observada nos macrófagos de indivíduos saudáveis. Além disso, constatou-se que a produção de óxido nítrico também não exibiu variações significativas entre os macrófagos de pacientes com LD e com LC, após a infecção com o isolado LD. Esses dados oferecem uma compreensão valiosa de que, apesar das disparidades na resposta imune na LTA, não se verifica uma distinção significativa na produção de ROS e NO entre pacientes com LD e com LC.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Destaca-se a importância de realizar investigações experimentais adicionais e análises detalhadas da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em macrófagos de pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose, comparando-os com macrófagos de indivíduos saudáveis. Evidências obtidas a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* podem fornecer uma compreensão mais abrangente e conclusiva sobre a relação entre a produção de ROS e NO pelos macrófagos e a progressão da leishmaniose.

O maior desafio do projeto foi a sua execução em um período de pandemia de SARS-CoV-2, durante os anos de 2021 e 2022, considerando que parte do nosso grupo de pesquisa trabalha diretamente com pacientes suspeitos de leishmaniose no Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Dr. Jackson Maurício Lopes Costa. Segundo a equipe do Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar, o registro de casos observados nos últimos anos, especialmente durante a pandemia, diminuiu significativamente. Essa redução possivelmente ocorreu devido a casuística de leishmaniose tegumentar, em suas mais variadas formas clínicas, em Corte de Pedra - BA, ocorrerem de maneira sazonal, ou devido a particularidades, como o medo de sair de casa em um contexto de pandemia.

Essa diminuição na casuística impactou a realização dos experimentos, uma vez que, em alguns meses, não recebemos nenhum material vindo de Corte de Pedra e precisávamos do sangue de pacientes e indivíduos saudáveis para os experimentos. Além disso, esse declínio afetou a correspondência entre os grupos de avaliação, especialmente no caso dos pacientes com LC, em que a proporção de mulheres acabou sendo significativamente menor. É notório que as respostas imunológicas podem variar entre os gêneros. Com efeito, as mulheres tendem a apresentar respostas imunológicas mais robustas que os homens, fenômeno que é em parte atribuído aos efeitos dos hormônios sexuais. Estes desempenham uma função intrincada na modulação da resposta imune, impactando tanto a intensidade quanto a natureza das reações imunológicas.

Adicionalmente, é importante mencionar que ao longo do desenvolvimento deste projeto, deparámo-nos com alguns obstáculos inerentes ao cultivo de células e a infecção com parasitas. Entre esses desafios, destacam-se a ocorrência de contratempos esperados, como a contaminação das culturas de células e das próprias *Leishmanias*, além das dificuldades no crescimento microbiológico do parasita. Também enfrentamos situações em que a infecção exibiu uma taxa de incidência mais baixa do que a desejada, o que implicou uma análise criteriosa dos resultados e uma busca contínua por soluções apropriadas para garantir a validade e a relevância dos experimentos em questão. Diante desse cenário, ficou evidente a necessidade de aumentar a proporção de *Leishmanias* utilizadas para a infecção, como parte dos esforços para superar esses desafios.

REFERÊNCIAS

- AGA, E. *et al.* Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898–905, 15 jul. 2002.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. [s.l.: s.n.].
- AOKI, J. I. *et al.* RNA-seq transcriptional profiling of *Leishmania amazonensis* reveals an arginase-dependent gene expression regulation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006026, 27 out. 2017.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 28 jul. 2000.
- BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, dez. 2002.
- BASU, M.; DAS, P. K. Role of reactive oxygen species in infection by the intracellular *Leishmania* parasites. **Oxidative Stress in Microbial Diseases**, p. 297–311, 1 jan. 2019.
- BATH, P. M. *et al.* Nitric oxide for the prevention and treatment of viral, bacterial, protozoal and fungal infections. **F1000Research**, v. 10, 2021.
- BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 19 fev. 2022.
- BISTI, S. *et al.* The prevention of the growth of *Leishmania major* progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 6, p. 1464–1472, 1 maio 2006.
- BRITTINGHAM, A. *et al.* Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102–3111, 15 set. 1995.
- BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1311–1320, 1 out. 2001.
- CARNEIRO, P. P. *et al.* The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 1 fev. 2016.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. OCT, 2012.

CDC. **Leishmaniasis - Biology**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

CINELLI, M. A. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase: Regulation, Structure, and Inhibition. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 1, p. 158, 1 jan. 2020.

COSTA, J. M. et al. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 279–288, 1998.

COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2303–2316, 1 jun. 2002.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–141, 1 abr. 2002.

DA SILVA VIEIRA, T. et al. *Leishmania braziliensis*: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 462756, 6 set. 2019a.

DANTAS, M. L. et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 202–209, 2014.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales**, v. 45, n. 2–3, p. 267–275, 1992.

FORMAGLIO, P. et al. Nitric oxide controls proliferation of *Leishmania major* by inhibiting the recruitment of permissive host cells. **Immunity**, v. 54, n. 12, p. 2724, 12 dez. 2021.

GASPAROTTO, J. et al. N-acetyl-cysteine inhibits liver oxidative stress markers in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 146, 1 fev. 2017.

GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 7, 2007.

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

9, 29 mar. 2012.

GIULIVI, C.; BOVERIS, A.; CADENAS, E. Hydroxyl Radical Generation During Mitochondrial Electron-Transfer and the Formation of 8-Hydroxydesoxyguanosine in Mitochondrial-DNA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 2, p. 909–916, 1 fev. 1995.

GOERDT, S.; ORFANOS, C. E. Other functions, other genes: Alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 10, n. 2, p. 137–142, 1 fev. 1999.

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

GONZÁLEZ, U. *et al.* Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 2, 2009.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology** **2003 3:1**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.

GUIMARÃES, L. H. *et al.* Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005100, 1 dez. 2016.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 1 ago. 2002.

HECKER, M. *et al.* Inhibition of arginase by in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. **FEBS Letters**, v. 359, n. 2–3, p. 251–254, 13 fev. 1995.

JIRMANUS, L. *et al.* Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426–433, mar. 2012.

JOHNSON, W. D. *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of infectious diseases**, v. 156, n. 1, p. 73–83, 1987.

KARLSSON, K.; LINDAHL, U.; MARKLUND, S. L. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 1, p. 29, 11 nov. 1988.

KOPELYANSKIY, D. *et al.* *Leishmania guyanensis* suppressed inducible nitric oxide synthase provoked by its viral endosymbiont. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 12 ago. 2022.

KRISHNAMURTHY, P. *et al.* Antioxidant Enzymes and Human Health. **Antioxidant Enzyme**, 3 out. 2012.

LIEW, F. Y.; COX, F. E. G. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide.

Immunology today, v. 12, n. 3, 1991.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 09–16, 1 jan. 2019.

MACHADO, P. R. *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438, ago. 2011.

MARSDEN, P. D. Cutaneous leishmaniasis. **British Medical Journal**, v. 300, n. 6741, p. 1716, 1990a.

MARSDEN, P. D. Mucocutaneous leishmaniasis. **British Medical Journal**, v. 301, n. 6753, p. 656, 1990b.

MARSDEN, P. D. Leishmaniasis. **British Medical Journal**, v. 300, n. 6725, p. 666, 1990c.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1 nov. 1999.

MATTE, C.; DESCOTEAUX, A. Exploitation of the Host Cell Membrane Fusion Machinery by *Leishmania* Is Part of the Infection Process. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 12, 8 dez. 2016.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: Implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 835–846, ago. 2004.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 121, 2012.

MUKBEL, R. M. *et al.* MACROPHAGE KILLING OF *Leishmania amazonensis* AMASTIGOTES REQUIRES BOTH NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 669–675, 1 abr. 2007.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4⁺ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 11, p. 5347–5354, 1 jun. 1998.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8841, 8 ago. 2000.

NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 15 dez. 2009.

NOVAIS, F. O. *et al.* Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species. **The Journal of Infectious Diseases**, v.

209, n. 8, p. 1288, 4 abr. 2014.

OLIVEIRA, W. N. et al. The Influence of Infection by Different *Leishmania (Viannia) braziliensis* Isolates on the Pathogenesis of Disseminated Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 10 set. 2021.

OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 1 dez. 2012.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000, 2 fev. 2014.

PALMA, F. R. et al. Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 32, n. 10, p. 701, 1 abr. 2020.

PORTELLA, T. P.; KRAENKEL, R. A. Spatial–temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2021.

PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 188, n. 1, p. 117–128, 15 dez. 1995.

QUEIROZ, A. et al. Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain Polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4028, dez. 2012.

REVERTE, M.; SNÄKÄ, T.; FASEL, N. The Dangerous Liaisons in the Oxidative Stress Response to *Leishmania* Infection. **Pathogens 2022, Vol. 11, Page 409**, v. 11, n. 4, p. 409, 28 mar. 2022.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase Plays a Pivotal Role in Polyamine Precursor Metabolism in *Leishmania*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23668–23678, 1 maio 2004.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 1, p. 1–7, 1 mar. 2002.

ROGERS, M. et al. Proteophosphoglycans Regurgitated by *Leishmania*-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, ago. 2009.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100–103, 1989.

SCHRIEFER, A. et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 508, jan. 2004.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Advances in immunology**, v. 74, n. 74, p. 275–317, 2000.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-Mediated Innate Host Defense Against Protozoan Parasites. <http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046731>, v. 28, n. 3, p. 187–248, 2008.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4845, p. 1306–1308, 1988.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 15 dez. 2002.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4177, 2002.

WEISIGER AND, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial Superoxide Dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 13, p. 4793–4796, 1973.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A. et al. Differential Regulation of L-Arginine Metabolism through Arginase 1 during Infection with *Leishmania mexicana* Isolates Obtained from Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 7, 22 jun. 2020.

WHO. **Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

XU, Y. et al. Quantifying blood-brain-barrier leakage using a combination of evans blue and high molecular weight FITC-Dextran. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 325, p. 108349, 1 set. 2019.

YURDAKUL, P. Immunopathogenesis of *Leishmania* infections. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 39, n. 3, p. 363–381, 1 jul. 2005.

Anexo A - TCLE para leishmaniose disseminada

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA
RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA**

Nome do Projeto: Inflamação na Patogênese da Leishmaniose Cutânea Disseminada.

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, Faculdade de Medicina da Bahia / UFBA

Largo do Terreiro de Jesus, s/nº - Centro Histórico. CEP:40026-010 - Salvador, Bahia-Brasil.

Comitê de Ética: Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdade de Medicina da Bahia / UFBA

Largo do Terreiro de Jesus, s/nº - Centro Histórico. CEP:40026-010 - Salvador, Bahia-Brasil

Tel. (55) 71 3283-5564 e FAX (55) 71 3283-5567.

Horário de funcionamento: Segundas, Terças e Quintas feiras das 08h-12 horas

Segundas, Quartas e Sextas feiras das 14h-18horas

Nome do Participante: _____

Número de Identificação no Projeto:

Convite e Objetivo: Você é convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas infectadas pela leishmania além de apresentar leishmaniose cutânea também apresentam leishmaniose disseminada. A leishmaniose já é uma doença conhecida nesta região do estudo há muitos anos, com o nome de "*leishmania*" ou "ferida brava". É uma doença transmitida por picadas de pequenos mosquitos que deixa uma ou muitas feridas no corpo ou dentro do nariz, que podem demorar mais de três (3) meses para cicatrizar, podendo prejudicar sua saúde e interferir com suas atividades e seu trabalho. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: Todos os participantes com esta doença que procuram o posto de saúde de Corte de Pedra e que apresentam de 1 a mais de 10 feridas e com duração inferior a 60 dias são convidados a participar deste estudo. A sua participação é voluntária. Você terá tempo para pensar e conversar com algum familiar, se achar necessário, para lhe ajudar a decidir sobre sua participação no estudo.

Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios

dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento caso você tenha a doença cutânea ou cutânea disseminada. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®) que é fornecido pelo governo.

Finalidade do estudo: Esse estudo está sendo feito porque precisamos conhecer melhor a doença, como nós defendemos contra a leishmania e porque após a infecção pela leishmania desenvolvemos feridas na pele e no nariz. Isto é importante para desenvolver novos tratamentos que estimulem a sua defesa contra o parasito e facilitem a cura da doença. Para isto estudaremos o seu sangue, o parasito que causa a doença quando este for isolado, e também o material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, será realizada uma biópsia da lesão caso apresente feridas na pele, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Se você tiver 10 ou mais lesões será realizada biópsia da primeira lesão e de outra lesão localizada em um local diferente do corpo da primeira ferida. A realização de 2 biópsias será feita para sabermos se a leishmania que causou a primeira ferida é diferente da leishmania que causou a ferida secundária.

Você cederá 30 ml de sangue (mais ou menos 3 colheres de sopa), que será coletado de uma veia de seu braço, através de uma seringa com agulha estéril descartável. Nós iremos estudar as células de defesa no sangue avaliando como elas funcionam depois da infecção pela leishmania e se essas células são capazes de matar a leishmania. Os resultados destes exames serão mostrados e explicados a você.

A retirada do pedaço da ferida na pele para o diagnóstico da sua doença será feita após limpeza do local e anestesia local para você não sentir dor. O fragmento da pele, que mede no máximo cinco (5) milímetros, é retirado utilizando um bisturi adequado chamado "punch". Parte deste material será utilizada para os estudos da defesa do seu corpo contra a leishmania. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído. Após as análises se houver sobra das suas amostras, essas serão destruídas. Nós não iremos manter nenhuma amostra de participantes do estudo para análise posterior. O tratamento da leishmaniose é gratuito e fornecido pelo governo. Assim, se você decidir por não participar do estudo você terá o mesmo tratamento (Glucantime®) dos indivíduos que participarão do estudo.

Desconfortos e riscos: Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma, infecção e síncope. As chances destes riscos são mínimas. Os riscos relativos à realização da biópsia incluem sangramento e infecções. As chances de essas complicações acontecerem são pequenas. Caso algum desses eventos ocorra você terá assistência imediata dos médicos do Posto de Saúde de Corte de Pedra (Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães), e será tratado com medicamento ou procedimento adequado para cada caso, sem nenhum custo para você. No caso de infecção será tratado com o antibiótico adequado.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e avaliação diagnóstica sua participação no estudo terá a duração de um (1) dia.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Está assegurado que você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nos registros ou nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: Caso esteja doente, o tratamento que você receberá será o (Glucantime®), medicamento padrão fornecido pelo Ministério da Saúde para tratar a doença. Esse tratamento é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você. Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma, infecção e síncope. As chances destes riscos são mínimas. Os riscos relativos à realização da biópsia incluem sangramento e infecções. As chances de essas complicações acontecerem são pequenas.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: As leishmanioses são doenças relacionadas à reação do seu organismo contra a leishmania e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose.

Custos: Você não terá custos com o tratamento com antimônio (Glucantime®) ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso, pois essas drogas são fornecidas pelo governo. No entanto se você quiser participar do estudo, nós ressarciremos

todos os gastos relacionados a sua participação, incluindo transporte e alimentação para você e para o seu acompanhante nos dias em que for necessária a sua presença no Posto de Saúde para realização de exames.

Garantia de assistência, acompanhamento, por dano decorrente da pesquisa: Em caso de você apresentar algum dano direto ou indireto, imediato ou tardio devido a sua participação na pesquisa, você será acompanhado por médicos do posto de saúde e pelos médicos responsáveis pelo estudo assim como será fornecido os medicamentos necessários sem nenhum custo para você e para o Sistema Único de Saúde (SUS) ou planos de saúde privados até que os sintomas desapareçam.

Garantia de ressarcimento e indenização: Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo. Todavia você receberá recursos para alimentação e transporte, e caso tenha qualquer prejuízo pela sua participação no estudo, o grupo de pesquisa vai assumir ou ressarcir qualquer destes custos.

Formas de assistência ou acompanhamento e retorno de todas as análises das amostras biológicas: Você será acompanhado de acordo com as visitas que regularmente são programadas para todos os pacientes que são atendidos no posto de saúde. Você poderá voltar ao posto de saúde qualquer dia caso tenha alguma dúvida sobre a evolução de sua doença. Você receberá os resultados de todos os exames laboratoriais relacionados ao seu diagnóstico e acompanhamento. As amostras obtidas serão armazenadas durante 5 anos, sendo descartadas ao fim deste período. Estas amostras não serão utilizadas em estudos futuros.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone (71) - 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. Paulo Machado. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos você pode procurar o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Bahia (UFBA), cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) - 3283-5564. O CEP é um comitê formado por pessoas de diferentes origens na sociedade que avalia os aspectos éticos do projeto, acompanha o andamento do estudo e se todos os direitos dos participantes estão claramente informados e seguidos.

**Horário de funcionamento: Segundas, Terças e Quintas feiras das 08h-12 horas
Segundas, Quartas e Sextas feiras das 14h-18horas**

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo. A você será entregue uma via original deste documento para guardar e a outra ficará com o pesquisador. O pesquisador também rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.

Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para estudo.

Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para estudo.

_____	_____	_____
Assinatura do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discutir as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data	Hora

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CONEP em 12/06/2017

Parecer número: 2.114.874

Anexo B - TCLE para leishmaniose cutânea.

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES

Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

"Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea"

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador - Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador - Bahia. Tel.: (71) 3283-8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo - Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo será solicitado a assinar este termo de consentimento.

Participação Voluntária - A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, ou seja, agora ou durante a resposta ao questionário e ao exame físico. Você tem liberdade de se recusar a responder qualquer pergunta do questionário que considere invasão de privacidade, causadora de constrangimento e/ou desconforto moral. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar a sua participação, este será feito sem qualquer

prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá todos os cuidados médicos dispensados aos pacientes com leishmaniose.

Finalidade - O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores se você irá desenvolver lesão após você ser infectado pela Leishmania. Para tal nós analisaremos seu sangue, e material da lesão (caso você apresente uma) obtida através de um pequeno fragmento da sua pele.

Procedimento - Você será examinado por um médico e será feito um teste na pele de rotina. Nós iremos realizar procedimentos de rotina para definir o diagnóstico da leishmaniose, como biópsia ou aspirado da lesão com agulha ou aspirado do linfonodo. Caso você concorde em participar do estudo você doará de 30 ml a 60ml de sangue (cerca de 3 a 6 colheres de café). Nós usaremos esse sangue para realizar os testes, incluindo gravidez, açúcar no sangue, função renal, HIV, que irão esclarecer o mecanismo envolvido na sua defesa contra a Leishmania. Caso o seu teste de HIV seja positivo nós iremos direcionar você para um médico no departamento de doenças infecciosas no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Ba. Em caso de não confirmado o diagnóstico de leishmaniose, nós iremos destruir qualquer amostra de sangue ou tecido que tenham sido coletadas para esta pesquisa. Os procedimentos seguintes são envolvidos neste estudo. **Coleta de sangue:** Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool. Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você se sentar até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Isso é muito menos do que a Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue. **Biópsia da Lesão:** a biópsia do tecido será realizada no centro de uma lesão cutânea após anestesia.

Período do Estudo - Sua participação neste estudo começa com a coleta de sangue e biópsia da lesão, no caso de você ter uma. Após realização da coleta de sangue e biópsia, sua participação no estudo está terminada. Nós iremos pedir que você retorne a cada mês durante um ano como parte de seu acompanhamento. Essas visitas irão ajudar a determinar a cura ou a necessidade de um novo ciclo de tratamento com Glucantime ou outra droga, a qual também será dada sem custo para você. Isso não faz parte da pesquisa.

Confidencialidade - Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em

pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. Você e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios - Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local e infecção. Biópsia da lesão: os riscos de biópsia da lesão são os mesmos da coleta de sangue e além destes uma cicatriz da biópsia. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a biópsia da lesão ou coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele ou membrana mucosa e da lesão com assepsia antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e aplicação de pressão no local da lesão após a biópsia para parar sangramento. Perda potencial da confidencialidade pode ocorrer.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade - A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do seu corpo contra a infecção pela Leishmania. O conhecimento das reações do seu corpo pode contribuir não somente para a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, sua participação no estudo não trará nenhum benefício direto a você. O tratamento que você vai receber (Glucantime) é o mesmo tratamento recebido por qualquer paciente.

Custos - Você não terá nenhum custo com o tratamento com antimoniais ou qualquer outra droga contra a leishmaniose que seja necessária. Você não terá custos com a sua participação no estudo.

Esclarecimento - Caso você precise de esclarecimentos preliminares pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr. Luiz Henrique Guimarães.

Se você tem qualquer pergunta sobre seus direitos como um sujeito da pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado), telefone número: (71) 3203-2740.

Consentimento - Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste

formulário para guardar.

_____	_____	_____
Assinatura do Participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura do Pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da Testemunha	Data	Hora

Anexo C - Dados adicionais relativos à comparação da carga parasitária.

	Indivíduos Sadios		Leishmaniose Cutânea		Leishmaniose Disseminada	
	Infecção LC	Infecção LD	Infecção LC	Infecção LD	Infecção LC	Infecção LD
Número de macrófagos	200	200	200	200	200	200
Macrófagos infectados	26,9	39,4	29,8	39,2	15,3	22,3
Porcentagem de infecção	13,45%	19,70%	14,92%	21,30%	7,67%	11,13%
Macrófagos não infectados	173,1	160,6	170,2	157,4	184,7	177,8
Porcentagem de não infecção	86,55%	80,30%	85,08%	78,70%	92,33%	88,88%
Número de amastigotas	45,9	69	80,8	103,3	44,5	33
Número de amastigotas por macrófago infectado	1,92	1,73	2,31	2,55	2,89	1,41

Tabela 4 - Avaliação da carga parasitária. Os dados apresentados referem-se às médias dos macrófagos e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* contados no microscópio óptico.