



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

ROGÉRIO SILVA SANTOS

**Níveis séricos de CXCL12 nas diferentes formas e fases
clínicas da Leishmaniose Visceral**

Lagarto – SE
Agosto, 2024

ROGÉRIO SILVA SANTOS

**Níveis séricos de CXCL12 nas diferentes formas e fases clínicas da
Leishmaniose Visceral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde para qualificação no Curso de Mestrado da Universidade Federal de Sergipe, Campus Lagarto.

Lagarto – SE
Agosto, 2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CAMPUS DE LAGARTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Santos, Rogério Silva

S237n Níveis séricos de CXCL12 nas diferentes formas e fases clínicas da Leishmaniose visceral / Rogério Silva Santos ; orientadora Priscila Lima dos Santos. – Lagarto, SE, 2024.
41f. ; il.

Dissertação (mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Doenças infecciosas. 2. Leishmaniose visceral. 3. Quimiocinas. I. Santos, Priscila Lima dos, orient. II. Título.

CDU 616.993.161

CRB5/ 1810

ROGÉRIO SILVA SANTOS

**Níveis séricos de CXCL12 nas diferentes formas e fases
clínicas da Leishmaniose Visceral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde para qualificação no Curso de Mestrado da Universidade Federal de Sergipe, Campus Lagarto.

Aprovado em: ___/___/___

Presidente: Prof.^a Dr.^a Priscila Lima dos Santos

Examinador 1: Prof. Dr. Lucas Sousa Magalhães

Examinador 2: Prof.^a Dr.^a Roseane Campos Nunes

PARECER

RESUMO

Níveis séricos de CXCL12 nas diferentes formas e fases clínicas da Leishmaniose Visceral

Rogério Silva Santos, Lagarto, 2024.

Introdução: As leishmanioses são doenças endêmicas em regiões tropicais que podem se manifestar nas formas cutânea, mucocutânea e visceral (LV), conhecida como calazar. A resposta imunológica à infecção pelo parasita é complexa e o curso desta depende dos agentes celulares e moleculares presentes no momento da infecção. A quimiocina CXCL12, possui ação pleiotrópica e crucial em processos fisiológicos como embriogênese, hematopoiese, angiogênese e inflamação, pois ativa e induz a migração de células-tronco hematopoiéticas, células endoteliais na maioria dos leucócitos. Tendo essa molécula uma participação relevante na ativação e diferenciação hematopoiética, alvo da Leishmania sp., torna-se necessário investigá-la nessa comorbidade. **Objetivo:** Avaliar os níveis séricos da quimiocina CXCL12 nas diferentes formas e fases clínicas da LV. **Metodologia:** Trata de um estudo caso-controle realizada no LIBM do HU-UFS, seguindo normas éticas, os participantes foram divididos em grupos casos (diagnosticados com LV) e controles (DTH+ e controles endêmicos). O soro foi extraído e analisado para citocinas e quimiocinas via multiplex. Dados clínicos e laboratoriais foram coletados dos prontuários médicos, e a análise estatística utilizou testes de Kruskal-Wallis e correlação de Spearman, considerando significativos valores de $p < 0,05$. **Resultados:** Indivíduos com a forma sintomática e ativa da LV apresentam elevados níveis séricos CXCL2, quando comparados com indivíduos assintomáticos. Ao longo do tratamento observou-se diminuição da concentração de CXCL2 chegando a média semelhante ao grupo controle. A correlação entre quimiocinas foram majoritariamente positivas, indicando uma ação sinérgica entre as moléculas. A correlação entre CXCL12 e hematócrito apresentou um coeficiente de Spearman (Rho) de -0,48, enquanto a correlação entre CXCL12 e hemoglobina teve Rho=-0,53 com p valor significativo. Esses valores negativos indicam que, à medida que a expressão de CXCL12 aumenta, os níveis de hematócrito e hemoglobina tendem a diminuir. Esta relação inversa sugere que CXCL12 pode desempenhar um papel regulador na diminuição dos níveis de hematócrito e hemoglobina, possivelmente interferindo no equilíbrio normal dessas moléculas no sangue. A ausência de estudos sobre CXCL12 em humanos com LV é destacada, embora estudos em modelos murinos indiquem que CXCL12 influenciam a atração de progenitores hematopoiéticos. **Conclusão:** O estudo indica que a expressão sérica de CXCL12 diminui durante o tratamento de LV, alinhando-se com a recuperação clínica dos pacientes. A pesquisa contribui para a compreensão da dinâmica imunológica em LV e sugere que a CXCL12 pode ser um importante biomarcador na monitorização do tratamento. No entanto, mais estudos são necessários para explorar o envolvimento da CXCL12 no desenvolvimento da LV.

Palavras-chaves: Leishmaniose Visceral; SDF-1; Quimiocina.

RESUMO

Serum Levels of CXCL12 in Different Forms and Clinical Stages of Visceral Leishmaniasis

Rogério Silva Santos, Lagarto, 2024.

Introduction: Leishmaniasis is an endemic disease in tropical regions that can manifest in cutaneous, mucocutaneous, and visceral (VL) forms, known as kala-azar. The immune response to parasitic infection is complex, and its course depends on the cellular and molecular agents present at the time of infection. The chemokine CXCL12 plays a pleiotropic and crucial role in physiological processes such as embryogenesis, hematopoiesis, angiogenesis, and inflammation, as it activates and induces the migration of hematopoietic stem cells and endothelial cells in most leukocytes. Given this molecule's significant role in hematopoietic activation and differentiation, which is targeted by *Leishmania* sp., it is necessary to investigate its involvement in this comorbidity. **Objective:** To evaluate serum levels of the chemokine CXCL12 in different forms and clinical stages of VL. **Methodology:** This is a case-control study conducted at LIBM of HU-UFS, following ethical standards. Participants were divided into case groups (diagnosed with VL) and control groups (DTH+ and endemic controls). Serum was extracted and analyzed for cytokines and chemokines using multiplex. Clinical and laboratory data were collected from medical records, and statistical analysis employed Kruskal-Wallis tests and Spearman correlation, considering p-values <0.05 as significant. **Results:** Individuals with the symptomatic and active form of VL had elevated serum levels of CXCL12 compared to asymptomatic individuals. During treatment, CXCL12 concentration decreased to levels similar to the control group. The correlations between chemokines were predominantly positive, indicating a synergistic interaction among the molecules. The correlation between CXCL12 and hematocrit showed a Spearman coefficient (Rho) of -0.48, while the correlation between CXCL12 and hemoglobin had Rho=-0.53 with significant p-values. These negative values indicate that as CXCL12 expression increases, hematocrit and hemoglobin levels tend to decrease. This inverse relationship suggests that CXCL12 may play a regulatory role in decreasing hematocrit and hemoglobin levels, possibly interfering with the normal balance of these molecules in the blood. The lack of studies on CXCL12 in humans with VL is noted, although studies in murine models indicate that CXCL12 influences the attraction of hematopoietic progenitors. **Conclusion:** The study indicates that serum expression of CXCL12 decreases during VL treatment, aligning with the clinical recovery of patients. The research contributes to understanding the immunological dynamics in VL and suggests that CXCL12 may be an important biomarker for monitoring treatment. However, further studies are needed to explore the involvement of CXCL12 in the development of VL.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; SDF-1; Chemokines.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses consistem em um conjunto de doenças zoonóticas e antroponótica, endêmicas em regiões tropicais que podem se manifestar nas formas cutânea, mucocutânea e visceral (LV), também conhecida como calazar. O ciclo biológico do parasita inicia-se a partir do depósito da leishmania pelo vetor, um flebotomíneo. As diferentes formas clínicas resultam de diferenças entre as espécies de Leishmanias, os reservatórios naturais, vetores e as populações infectadas (WHO, 2024).

A LV consiste em uma protozoose que pode ser caracterizada do ponto de vista clínico e anatomo-patológico como uma doença grave e crônica e potencialmente fatal na ausência de tratamento. A infecção acomete principalmente o sistema fagocítico mononuclear, em órgãos como o fígado e o baço. É uma doença negligenciada, afeta todas as faixas etárias, tornando-se um problema de saúde pública devido a ascendente disseminação descontrolada e de difícil prevenção (VERAS et al. 2023).

A resposta imunológica na LV é complexa e depende da interação entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro. Geralmente, a resposta imune é mediada por células T, células B e citocinas, com diferentes padrões de resposta dependendo da forma clínica da doença e da susceptibilidade do hospedeiro. O equilíbrio entre resposta imune protetora e evasão do parasita é crucial para o desfecho da infecção (ELMAHALLAWY et al., 2021).

Clinicamente, a infecção é caracterizada por febre, redução do peso e hepatoesplenomegalia. Os pacientes apresentam ainda pancitopenia e linfadenopatia, podendo evoluir para uma forma grave com edema generalizado, episódios hemorrágicos, além de hiperventilação, cianose e grave inflamação sistêmica. Além disso, esses pacientes apresentam maior risco de morte por infecções bacterianas secundárias resultante de uma severa imunossupressão (BRAZ, 2016).

O curso da infecção é direcionado pelas moléculas T help (Th) 1 e 2. O primeiro tipo possui atividade leishmanicida ao expressar moléculas, como interleucina (IL)-1 β , IL-12 e interferon-gama (IFN- γ), e induzir o estresse oxidativo, eliminando o parasita. Já o Th2 permite a progressão da infecção ao inibir a Th1 com IL-4 e IL-10. Apesar dessa dicotomia, pacientes com a forma ativa da LV apresentam

uma tempestade de citocinas, ou seja, exacerbação da liberação de múltiplas citocinas de ambos os padrões, como IFN- γ , IL-27, IL-10 e IL-6. Esse evento está associado a causas diretas da LV, uma vez que a liberação de mediadores inflamatórios pode provocar danos teciduais e favorecer a gravidade da doença (DE FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013).

Todo esse padrão molecular é dependente da ativação de células que respondem de forma peculiar à *Leishmania*. Descreve-se que tanto características do ambiente salivar do vetor, quanto moléculas expressas na membrana do parasito e o ambiente inflamatório do hospedeiro no momento da infecção se somam para compor e direcionar o perfil dessa resposta celular. Sabe-se também que, nos indivíduos sintomáticos e no início da infecção, há uma diferenciação para um perfil das células imunológicas mais permissiva à infecção. Entretanto, não é conhecido como acontece de fato o recrutamento dessas células bem como acontece essa modulação celular (TEIXEIRA et al., 2014; VOLPEDO et al., 2021).

A quimiocina CXCL12, também denominada Fator 1 derivado do estroma da medula óssea (SDF1), é uma quimiocina de ação pleiotrópica e crucial em processos fisiológicos como embriogênese, hematopoiese, angiogênese e inflamação, pois ativa e induz a migração de células-tronco hematopoiéticas, células endoteliais na maioria dos leucócitos. Inicialmente reconhecida como mediadora de doenças inflamatórias, CXCL12 é fortemente associada como uma ponte de comunicação entre células tumorais e estromais, criando um ambiente que favorece o crescimento tumoral (HO et al., 2012).

Utilizando de camundongos para LV, HOANG et al., (2010) relataram que CXCL12 e CCL8 favorecem a atração de progenitores hematopoiéticos com potencial para se diferenciarem em células dendríticas. Já em modelo canino, níveis elevados de CXCL12 foram associados à ativação extrafolicular de células B, novamente redirecionando a diferenciação celular para um tipo específico de célula (O'HARE et al., 2016). Os dados de CXCL12 na LV humana são escassos. Tendo essa molécula uma participação relevante na ativação e diferenciação hematopoiética, alvo da *Leishmania* sp., torna-se necessário investigá-la nessa comorbidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente letal, evoluindo gravemente em 90% dos casos que não recorre a tratamento previamente a sintomatologia mais grave, com letalidade de 8,2% frente aos casos notificados nos últimos anos. Nas américas a LV ocorre em 13 países e o Brasil é o que mais registra casos, chegando a mais de 90% (PAHO, 2024).

A explosão da leishmaniose visceral como problema de saúde pública foi em 1934, durante o aumento de demanda e pesquisas de rotina relacionadas febre amarela, a outra doença infecciosa que apresentava semelhança em sintomatologia e vias de transmissão (BENCHIMOL et al., 2019).

O primeiro caso de leishmaniose visceral *in vivo* foi registrado em Aracaju/SE, no ano de 1936, detectado por Evandro Chagas, identificado em um paciente de 16 anos cujo apresentava doença em estado avançado, confirmando posteriormente a LV. Observando-se que a condição até então apresentava-se diferente dos exemplares já observados naquele momento, surgindo a hipótese de uma variação em Leishmania (MARZOCHI, 2018).

Até hoje, a LV é endêmica em 76 países. No Brasil, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes. E ainda, observa-se que nos últimos anos, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012. No último boletim epidemiológico, em 2022, foram identificados aproximadamente 2.000 casos de LV, sendo a região nordeste com os maiores índices de registro, seguido pela região norte e posteriormente a região Sudeste. O pico da incidência de LV no Brasil ocorreu em 2017, apresentando um coeficiente de incidência de 2,5, onde houve uma explosão de casos e registrou-se aproximadamente 4.000 casos no país (BRASIL, 2024).

A constante transformação no ambiente, sendo popularmente provocadas pelo intenso processo migratório, por necessidades econômicas ou sociais, a dificuldade é insuficiente justiça em distorções na distribuição de renda tornando o processo de urbanização crescente, transformando o processo de esvaziamento rural e acarretando a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos

focos endêmicos. Esta transformação tende a levar a uma redução do espaço ecológico da doença, adaptando-a a novos habitats e facilitando a ocorrência de epidemias. O ambiente mais característico e propício à ocorrência da LV tende a ser aquele de baixo nível socioeconômico ou extrema pobreza, maiores níveis de vulnerabilidade social, sendo prevalente em grande quantidade e intensidade no meio rural e na periferia das grandes cidades (FERREIRA et al., 2022).

A LV está presente em 21 unidades federativas do Brasil, ocorrendo predominantemente nas regiões norte e nordeste. Quanto a incidência da doença por região, o Nordeste é a localidade que apresenta o maior número de casos em todo território nacional, destacando o ano de 2000, com 4.029 novos casos registrados e coeficiente de incidência de 8,44 casos por 100.000 mil habitantes (BRASIL, 2024). A tendência de transmissão da LV manteve-se estável no Nordeste até 2010, todavia foi identificado um crescimento de 3,6 casos por ano até 2017 (RIBEIRO et al., 2021).

Sabe-se que a LV era uma infecção até então considerada ausente na região Sul até 2009, quando foi notificado o primeiro caso autóctone humano no Rio Grande do Sul. Posteriormente, em 2015 e 2017, Paraná e Santa Catarina registraram seus primeiros casos em humanos, respectivamente. Nessa região, a LV se manifesta principalmente em cidades fronteiriças com o Uruguai, Paraguai e Argentina, países com aumento na crescente notificação de casos (DIAS et al., 2022).

No território brasileiro, a principal forma possível de transmissão é através do repasto sanguíneo dos vetores - *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi* – infectados pela Leishmania. Algumas pesquisas investigam a possibilidade de a transmissão ocorrer entre a população canina através da ingestão de carrapatos infectados e mesmo através de mordeduras, ingestão de vísceras contaminadas, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos. Não existe registro da ocorrência de transmissão direta da LV de pessoa a pessoa (AMARA et al., 2022).

Os agentes etiológicos da LV são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular, com presença obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada, sendo encontrada facilmente no tubo digestivo do vetor e outra aflagelada encontrada nos tecidos dos vertebrados (VASCONCELOS. et al, 2022).

Considerando a migração e avanço nas áreas urbanas, o cão doméstico costuma ser a principal fonte de infecção, sendo esse, o mamífero com maior prevalência da infecção. Já no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas e os marsupiais. Atualmente no Brasil, as raposas foram encontradas mais facilmente infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica (SILVA, 2018).

2.2 Ciclo Evolutivo e Transmissão da Leishmaniose Visceral

Essa doença é causada por um protozoário heterogênico, intracelular obrigatório, que infecta as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos suscetíveis, principalmente do baço, fígado, linfonodo e medula óssea. Os vetores são insetos razoavelmente pequenos, medindo cerca de 2 a 3 mm de comprimento. São facilmente reconhecíveis ao voar em pequenos saltos podendo sobrevoar até 1 quilometro (MAGALHÃES, 2021; MARCONDES, 2022).

Os flebotomos são facilmente adaptáveis ao ambiente, principalmente durante a fase adulta, mas na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. O metabolismo do vetor necessita de carboidratos como fonte energética e as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento e nutrição dos ovos (CALDERÓN-ANYOSA et al., 2018).

O ciclo biológico dos vetores flebotomíneos têm predominância ao entardecer e noturna. Na região próxima a domicílios, tendem a ser encontrados principalmente próximas a uma fonte de alimento. Durante o dia, os vetores ficam em repouso, preferindo os lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais. A leishmania adapta-se facilmente as regiões próximas a domicílios e com flutuação de temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. Observa-se que o período de maior transmissão da LV tende a ocorrer principalmente durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (VASCONCELOS et al., 2022).

As fêmeas são hematófagas obrigatórias, apresentam hábitos ecléticos podendo realizar o compartilhamento sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive em humanos. Em áreas urbanas, o cão doméstico tende a aparecer como a principal fonte de alimentação e apresenta uma longevidade aproximadamente de 20 dias (AMARA et al., 2022).

Ao realizar o repasto sanguíneo no mamífero, a fêmea infectada do flebotomíneo regurgita a forma promastigota metacíclica, que é fagocitada por células do sistema imunológico, tais como neutrófilos e macrófagos. Embora a leishmania seja fagocitada por essas células, a replicação do parasita ocorre exclusivamente nos macrófagos. A internalização das promastigotas nos macrófagos se dá pela ligação com receptores de membrana específicos dessa célula, resultando na formação de um fagossomo, que posteriormente se funde ao lisossomo do macrófago. As promastigotas da leishmania possuem lipofosfoglicano, um glicoconjunto que pode retardar a fusão entre o fagossomo e o lisossomo do macrófago, possibilitando que as promastigotas se diferenciam em amastigotas, uma forma ovoide e mais resistente aos mecanismos microbicidas dos macrófagos (NEVES, 2016).

O aumento da concentração do microrganismo dentro do macrófago, devido à replicação por divisão binária, leva à lise da membrana celular desse fagóctito. Com isso, o parasita é liberado no meio extracelular, podendo infectar outras células fagocíticas e não fagocíticas, como os fibroblastos. Esse processo de liberação das amastigotas e infecção de novas células causa um parasitismo intenso no sistema reticuloendotelial, invadindo principalmente órgãos como fígado, baço e medula óssea e resultando na cronicidade da doença. Além disso, o parasita torna-se disponível para ser ingerido pelo vetor durante a picada (JARALLAH, 2023).

O sangue infectado é ingerido pelo vetor e no trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando os flagelados, que se reproduzem rapidamente e diferenciam-se em promastigotas. As promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais migram e colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem fixadas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes, as promastigotas metacíclica, podendo então reiniciar o ciclo de infecção (NEVES, 2016).

2.3 Aspectos Clínicos e Imunológicos da Leishmaniose Visceral

A resposta imune inata acontece logo após a entrada da *Leishmania* sp. no organismo, através da interação com componentes do soro que ativam o sistema complemento, coma opsonização e eliminação de aproximadamente 90% das leishmanias inoculadas. Apesar desse processo ser eficaz na eliminação da leishmania, esse parasito consegue criar mecanismos que possibilitam a sua evasão

do processo de lise. Células sentinelas, macrófagos, monócitos são alguns tipos de células que realizam a fagocitose e secretam diversas citocinas e quimiocinas que iniciam uma via complexa de sinalização do sistema imune inato e adaptativo (OLIVEIRA et al., 2021; COSTA-DA-SILVA et al., 2022).

O equilíbrio dinâmico entre citocinas pró-inflamatórias T helper (Th) - 1 e anti-inflamatórias Th2 é determinante na leishmaniose. Pacientes com uma resposta Th1 robusta tendem a apresentar menor gravidade da doença, devido à capacidade eficaz de eliminar os parasitos intracelulares. Em contrapartida, indivíduos com uma resposta Th2 predominante são mais susceptíveis à progressão da doença, devido à supressão da imunidade celular através da supressão da resposta Th1 (YADAGIRI et al., 2023).

A resposta Th1 na LV é induzida principalmente pelo interferon-gama (IFN- γ) e pelas interleucinas IL-2, IL-12, IL-17 e IL-22 contribuem para a ativação e manutenção desse perfil de resposta que promove mecanismo de controle do crescimento intracelular da leishmania induzido pelo padrão através da atividade do metabolismo mitocondrial com síntese de espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico (NO) (PASTORINO et al., 2002; SAMANT et al., 2021).

Além disso, o reconhecimento e identificação da leishmania pelos fagócitos através da interação entre os receptores de reconhecimento de patógenos (PPRs) com proteínas moleculares associadas ao patógeno (PAMPs) promove a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B, CBP/P300 e DDIT3 são ativados para regular a resposta inflamatória através da ativação de genes que codificam mais citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão celular, amplificando a resposta imune local (VIVIER, 2021).

Em contra partida, a progressão da LV está relacionada com a resposta Th2, sendo esta uma caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que promovem uma resposta imune humoral que favorecer a sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro. As citocinas IL-4 e IL-13, por exemplo, podem induzir a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, que é menos eficiente na eliminação de Leishmania. Além disso, a IL-10 pode suprimir a resposta Th1 e a produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , essenciais para a ativação de macrófagos e a eliminação do parasita. Essa modulação imunológica cria um ambiente favorável para a persistência e proliferação do parasita, contribuindo para

a cronicidade e severidade da leishmaniose visceral (DAYAKAR *et al.*, 2019; SAMANT *et al.*, 2021).

2.4 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

A sintomatologia desta doença tende a ser inespecífica, apresentando episódios intermitentes de febre, anemia hemolítica, perda de peso progressiva e sem motivos específicos e caquexia, observados tanto em humanos, quanto em animais. Em humanos apresenta-se como uma doença crônica debilitante, de sintomatologia aguda com presença de febre associada à hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento progressivo, anemia, queda de cabelo, podendo ainda apresentar manifestações intestinais e hemorrágicas (VASCONCELOS, 2022).

O diagnóstico parasitológico confiável é o método definitivo de demonstração do parasita obtido de material biológico através de punção hepática, esplênica, de medula óssea, de linfonodos, e biópsia ou escarificação de pele (BRASIL, 2006). Devido à possibilidade de reação cruzada com a Doença de Chagas, é necessário realizar uma avaliação epidemiológica e clínica do animal ou humano infectado, juntamente com os achados laboratoriais, para confirmar que se trata de leishmaniose (TRONCARELLI, 2008).

Existem também os testes sorológicos, que são mais rápidos e de menor custo, sendo amplamente empregados. Eles incluem métodos como imunocromatografia, que utiliza fitas reagentes e é muito utilizado devido à sua praticidade. No entanto, é importante notar que, embora a imunocromatografia seja um método eficiente, geralmente não é considerado o "padrão ouro" absoluto para o diagnóstico, pois pode haver necessidade de confirmação com outros testes (VASCONCELOS, 2022).

Também é realizada uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI), onde é titulada a presença da LV e seu resultado é interpretado como sugestivo a presença ou não da infecção, necessita de repetição para confirmação do diagnóstico. Além dos citados acima, tem a ELISA, que é um ensaio imunoenzimático, apesar de que o mesmo não está disponível na rede pública de saúde; mas, algumas unidades de saúde da rede privada utilizam kits de ELISA registrados e comercializados no Brasil (VAN GRIENSVEN; DINO, 2019).

Além disso, testes de biologia molecular, como a PCR (reação em cadeia da polimerase), são utilizados para detectar o material genético do parasita,

aumentando a precisão do diagnóstico e permitindo a identificação rápida e específica da infecção (PRADELLA *et al.*, 2022).

2.5 CXCL-12

Quimiocinas são pequenas e inúmeras citocinas reguladoras que possuem capacidade de controlar a movimentação de células imunes. Algumas quimiocinas são classificadas como moléculas de ação pró-inflamatórias e sua liberação tende a ser induzida durante uma resposta imune em um local de infecção, enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o manejo de hemorragias, desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos. A importância fisiológica desses mediadores é resultado de sua particularidade e ação específica a cada região e as variedades de quimiocinas induzem ao recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos para o local de lesão ou sinalização (PALOMINO, 2015).

As quimiocinas são classificadas com base no primeiro resíduo de cisteína. As quimiocinas CC (β -quimiocinas) têm genes localizados no cromossomo 17 e atuam majoritariamente em monócitos, podendo influenciar na quimiotaxia de basófilos, eosinófilos, linfócitos-T e células NK. As quimiocinas CXC (α -quimiocinas) possuem um aminoácido entre as duas primeiras cisteínas e estão localizadas no cromossomo 4 e atuam principalmente na quimiotaxia de neutrófilos (OLIVEIRA, 2012).

A quimiocina CXCL12, também denominada Fator 1 derivado do estroma da medula óssea (SDF1), é uma quimiocina de ação pleiotrópica e crucial em processos fisiológicos como embriogênese, hematopoiese, angiogênese e inflamação, pois ativa e induz a migração de células-tronco hematopoiéticas, células endoteliais na maioria dos leucócitos. Sua atividade é rigorosamente regulada por diversos mecanismos. A CXCL12 desempenha suas funções ao interagir com os receptores CXCR4 e ACKR3 e ao se ligar a glicosaminoglicanos nos tecidos e no endotélio, facilitando a apresentação adequada aos leucócitos em trânsito (JANSSENS; STRUYF; PROOST, 2017).

A CXCL12 é produzido ciclicamente em muitos órgãos, incluindo a medula óssea humana, sugerindo um papel importante para as interações CXCL12-CXCR4 em processos homeostáticos de estado insubstituível, como o controle do movimento e mobilização de leucócitos e a retenção de células hematopoiéticas

indiferenciadas e em maturação na medula óssea, tanto em condições normais quanto patológicas (SOARES, 2022).

A dimerização de CXCL12 e seus receptores pode alterar a atividade de sinalização, como visto na sinergia com outras quimiocinas em ensaios de migração de leucócitos. Além disso, modificações pós-traducionais, como a remoção proteolítica de aminoácidos terminais e a citrulinação ou nitração de resíduos, também regulam a atividade de CXCL12 (JANSSENS; STRUYF; PROOST, 2017).

Evidências indicam que a citocina CXCL12 é crucial na biologia do câncer, influenciando crescimento, angiogênese, metástase e progressão. Inicialmente reconhecida como mediadora de doenças inflamatórias, CXCL12 agora é vista como uma ponte de comunicação entre células tumorais e estromais, criando um ambiente que favorece o crescimento tumoral e a metástase. Superexpressa em vários tipos de câncer, a CXCL12 promove a proliferação, migração e invasão das células tumorais (GUO et al., 2016).

Em doenças infecciosas, como na infecção por *Litomosoides sigmodontis* em camundongos, a quimiocina CXCL12 pode ter comportamentos variados. Em camundongos resistentes, a CXCL12 promove a eliminação do parasita, enquanto nos suscetíveis, a baixa resposta de CXCL12 favorece a infecção (BOUCHERY et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os níveis séricos da CXCL12 nas diferentes formas e fases da leishmaniose visceral.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a concentração sérica de CXCL12 em indivíduos com diferentes formas clínicas da LV
- Quantificar os níveis de expressão de CXCL12 em diferentes fases da LV
- Investigar a correlação entre CXCL12 e marcadores inflamatórios, hematológicos e bioquímicos na LV

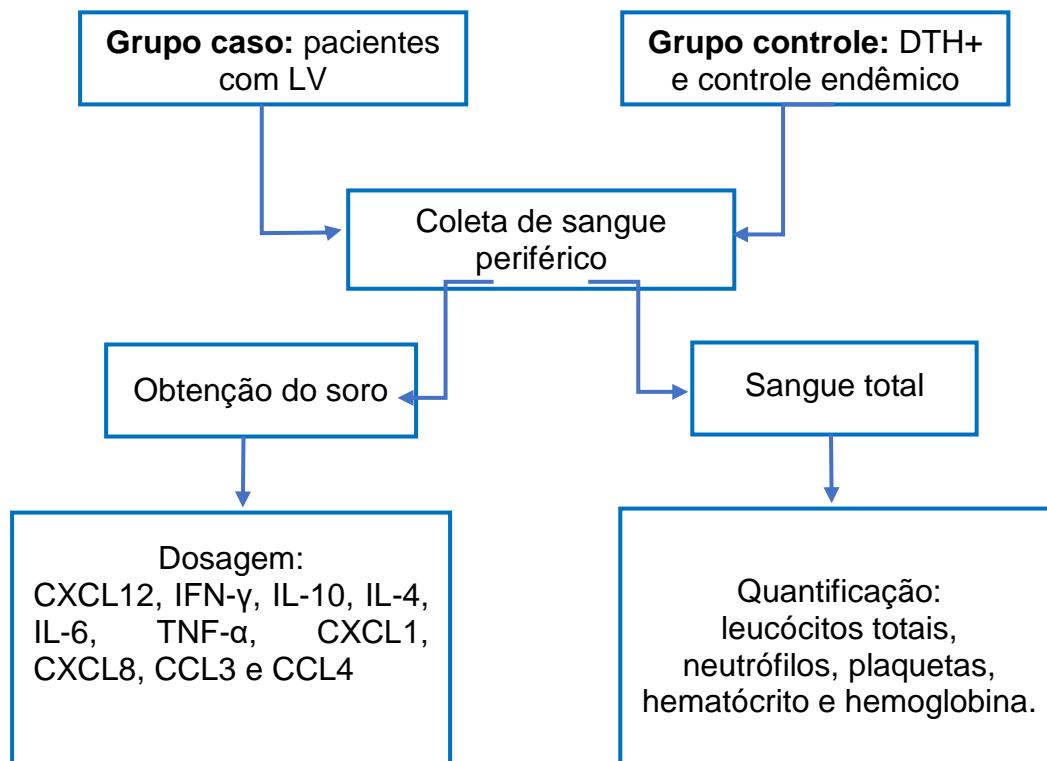
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição da Pesquisa e Aspectos Éticos

Esta pesquisa, do tipo caso-controle, foi realizada no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LIBM) do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), em Aracaju, Sergipe. A investigação faz parte de um projeto maior intitulado “Interação entre os Agentes Infecciosos e Hospedeiros na Patogênese da Leishmaniose Visceral”, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFS (parecer nº 1.353.887; CAAE 51457115.7.0000.5546) (Anexo 1).

A pesquisa foi conduzida em conformidade com a Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Ministério da Saúde, que estabelece diretrizes e normas para pesquisas envolvendo seres humanos. Todos os participantes foram informados sobre o caráter voluntário da participação e o direito à autonomia. A participação foi oficializada por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ver Anexo 2).

Desenho do estudo



4.2 Obtenção das amostras e dos dados clínicos

Os participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos:

- Grupo caso: composto por indivíduos com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral e em internação no HU-UFS em diferentes fases da LV, início sem tratamento (D0), após 30 dias de tratamento (D30) e ao final do tratamento (D180).
- Grupo controle: composto por indivíduos que testaram positivo para o teste de hipersensibilidade tardia de Montenegro (DTH+) e por controles endêmicos (C.E.). Foram considerados C.E. provenientes de regiões residentes em áreas endêmicas de leishmaniose, mas sem a doença ativa.

Foram excluídas desta pesquisa pessoas que apresentavam uma ou mais das seguintes condições: gestantes, para evitar qualquer risco adicional à saúde materna ou fetal decorrente dos procedimentos do estudo, indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH), imunossuprimidos ou com hepatite, portadores de algum tipo de diabetes, pois tais condições podem alterar significativamente as respostas imunológicas e bioquímicas, distorcendo os dados coletados.

4.3 Ensaio experimental

O soro utilizado foi extraído de 4 mL de sangue periférico coletado em tubos sem anticoagulante. Para separar o soro, a amostra de sangue foi centrifugada a 1.600g por 10 minutos a 24°C. O soro obtido foi estocado em a -80°C até seu uso nos ensaios imunológicos.

Os ensaios para análise das citocinas e quimiocinas foram realizados utilizando a técnica de multiplex. Esta abordagem permite a quantificação simultânea de múltiplas proteínas em uma única amostra, oferecendo uma visão abrangente do perfil inflamatório e imunológico dos pacientes. Para garantir a precisão e a reprodutibilidade dos resultados, todos os procedimentos seguiram rigorosamente as orientações fornecidas pelo fabricante do kit de multiplex utilizado (ProcartaPlex Custom Assay Kit). Essas orientações incluem a preparação das amostras, a configuração do equipamento e as condições de incubação e leitura dos sinais.

Os dados bioquímicos e hematológicos, fundamentais para a avaliação clínica dos pacientes com Leishmaniose Visceral, foram obtidos a partir dos prontuários

médicos do HU-UFS. Estes dados incluem medições de leucócitos totais, neutrófilos, plaquetas, índice internacional normalizado (INR), ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina e albumina. A coleta dessas informações clínicas e laboratoriais foi realizada por meio de uma busca ativa nos registros dos pacientes internados.

Esta abordagem permitiu a integração de dados históricos e a avaliação contínua do estado de saúde dos pacientes ao longo do tratamento, proporcionando uma visão detalhada da evolução clínica e ajudando a correlacionar os achados laboratoriais. Entretanto, enfrentamos limitações no acesso completo a todos os dados, especialmente para casos que ocorreram antes da implementação do sistema de prontuário eletrônico, o que dificultou a recuperação de informações históricas mais antigas e detalhadas.

4.4 Estatística e escrita

Os dados coletados foram primeiramente organizados e tabulados utilizando o programa Microsoft Office Excel, versão 2021. Posteriormente, a análise estatística foi conduzida com o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Para a comparação de múltiplos grupos de dados quantitativos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, adequado para amostras independentes com distribuições não paramétricas. Para comparações entre dois grupos específicos, o teste foi seguido por comparações de pares apropriadas.

Adicionalmente, foi realizada a análise de correlação de Spearman para avaliar a relação entre variáveis, com o cálculo do coeficiente de correlação Rho. Este método é particularmente útil para medir a força e a direção da associação entre duas variáveis ordinais ou não lineares.

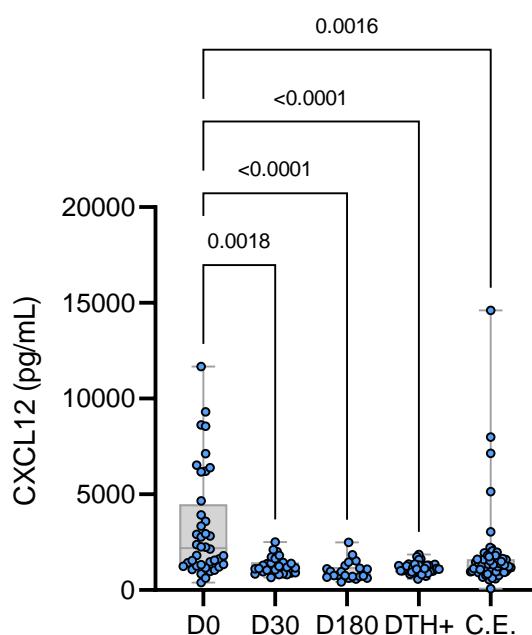
Os resultados das análises foram considerados estatisticamente significantes quando os valores de p foram inferiores a 0,05. Para todas as análises, foi adotado um intervalo de confiança (IC) de 95%, garantindo que os resultados fossem interpretados com um alto grau de confiabilidade.

A correção e melhora do texto foi realizada usando inteligência artificial por meio do software ChatGPT-4 (São Francisco, Califórnia, EUA) com o comando “corrigir escrita sem alterar o sentido”.

5. RESULTADOS

Ao longo do tratamento, foi possível observar uma variação significativa na expressão sérica de CXCL12. Inicialmente, no dia 0 (D0; n=40), os níveis de CXCL12 estavam elevados, indicando uma expressão mais alta dessa molécula no início do tratamento. Conforme o tratamento progrediu, notou-se uma redução gradual nos níveis de CXCL12, com uma expressão menor no dia 30 (D30; n=29) e uma continuidade desse declínio até o dia 180 (D180; n=21). O ponto final em D180 é especialmente relevante, pois é o momento em que o paciente é considerado curado (Figura 1).

Figura 1: Comparação da expressão da CXCL12 ao longo do tratamento da LV (D0, D30 e D180) com a expressão em pacientes DTH+ e controles endêmicos (C.E.). Os dados foram obtidos por ensaio Multiplex. O gráfico mostra a mediana, mínima e máxima dos valores em cada grupo. Para comparar as diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando o valor de $p \leq 0.005$ significativo.



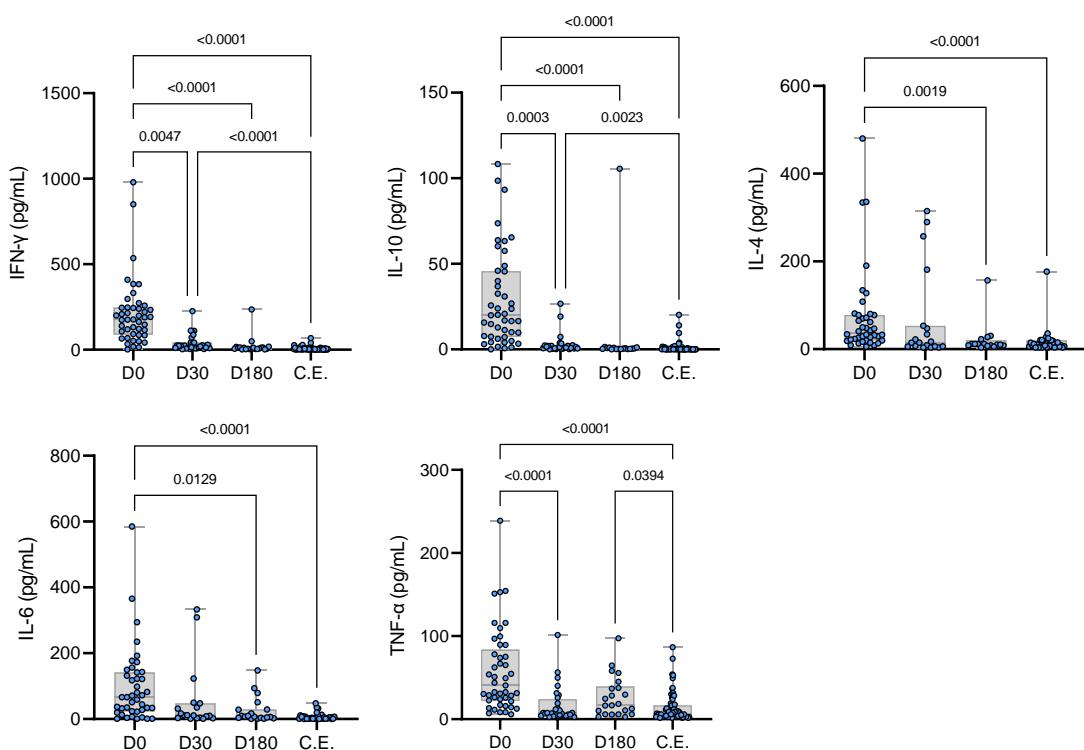
Fonte: Autoria própria.

Os dados revelam ainda que no grupo controle (DTH+ (n=35) e Controle Endêmico - C.E. (n=74)) a expressão de CXCL12 também foi menor em comparação

ao ponto inicial da infecção (D0), alinhando-se com os níveis observados nos indivíduos ao final do tratamento.

A Figura 2 expressa as concentrações de citocinas ao longo do tratamento dos pacientes no D0, D30 e D180, além dos C.E. Essas citocinas já são descritas na literatura por influenciar o processo de patogenicidade durante a infecção por *Leishmania sp.*

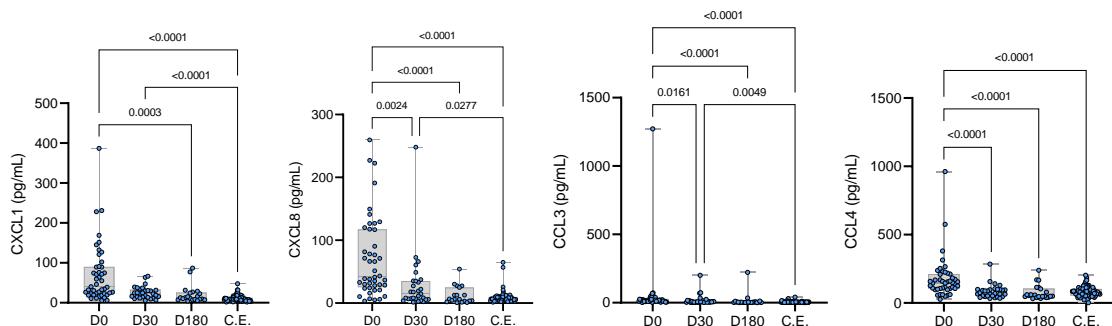
Figura 2: Concentração sérica das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-6 e TNF- α ao longo do tratamento da LV (D0, D30 e D180) com os controles endêmicos (C.E.). Os dados foram obtidos por ensaio Multiplex. O gráfico mostra a mediana, mínima e máxima dos valores em cada grupo. Para comparar as diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando o valor de $p \leq 0.005$ significativo.



Fonte: Autoria própria.

A análise das quimiocinas CXCL1, CXCL8 e CCL4 (Figura 3) seguiu o mesmo padrão das citocinas, com maior expressão no D0, seguindo em progressiva diminuição até a cura no D180. Verifica-se que a expressão da CXCL1 no D30 não teve diferença significativa em relação ao D0 e apesar de uma diferença estatisticamente significativa ter sido observada, a expressão da quimiocina CCL3 permaneceu linear durante todo o período de análise.

Figura 3: Concentração sérica das quimiocinas CXCL1, CXCL8, CCL3 e CCL4 ao longo do tratamento da LV (D0, D30 e D180) com os controles endêmicos (C.E.). Os dados foram obtidos por ensaio Multiplex. O gráfico mostra a mediana, mínima e máxima dos valores em cada grupo. Para comparar as diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando o valor de $p \leq 0.005$ significativo.



Fonte: Autoria própria.

A análise da correlação das citocinas e quimiocinas foi realizada considerando durante as fases da leishmaniose (Figura 4). Foi possível observar que as correlações foram majoritariamente positivas. As principais correlações identificadas no grupo controle foram CXCL8 e IFN- γ (forte e positiva), CCL4 e CXCL12, TNF- α e IL-6, CXCL1 e CCL3 (moderada e positiva). Os resultados das análises do grupo controle apresentam a expressão basais das moléculas analisadas.

Já no D0 foram identificadas correlações entre CXCL8 e CCL4 (forte e positiva), TNF- α e CXCL12, TNF- α e IL-4, CXCL1 e CXCL12 (moderadas e positivas), CCL4 e CXCL12, IL-10 e IFN- γ , CXCL1 e CCL2, CXCL8 e CCL4 e CXCL1 e CCL4 (fracas e positivas). No D30 as principais correlações foram: IL-4 e IFN- γ , IL-6 e CXCL12, IL-6 e IFN- γ , IL-6 e IL-4 (fortes e positivas), IL-10 e IFN- γ , IL-10 e IL-4, TNF- α e IFN- γ , TNF- α e IL-4, CXCL1 e IFN- γ e CXCL1 e IL-4 (moderadas e positivas).

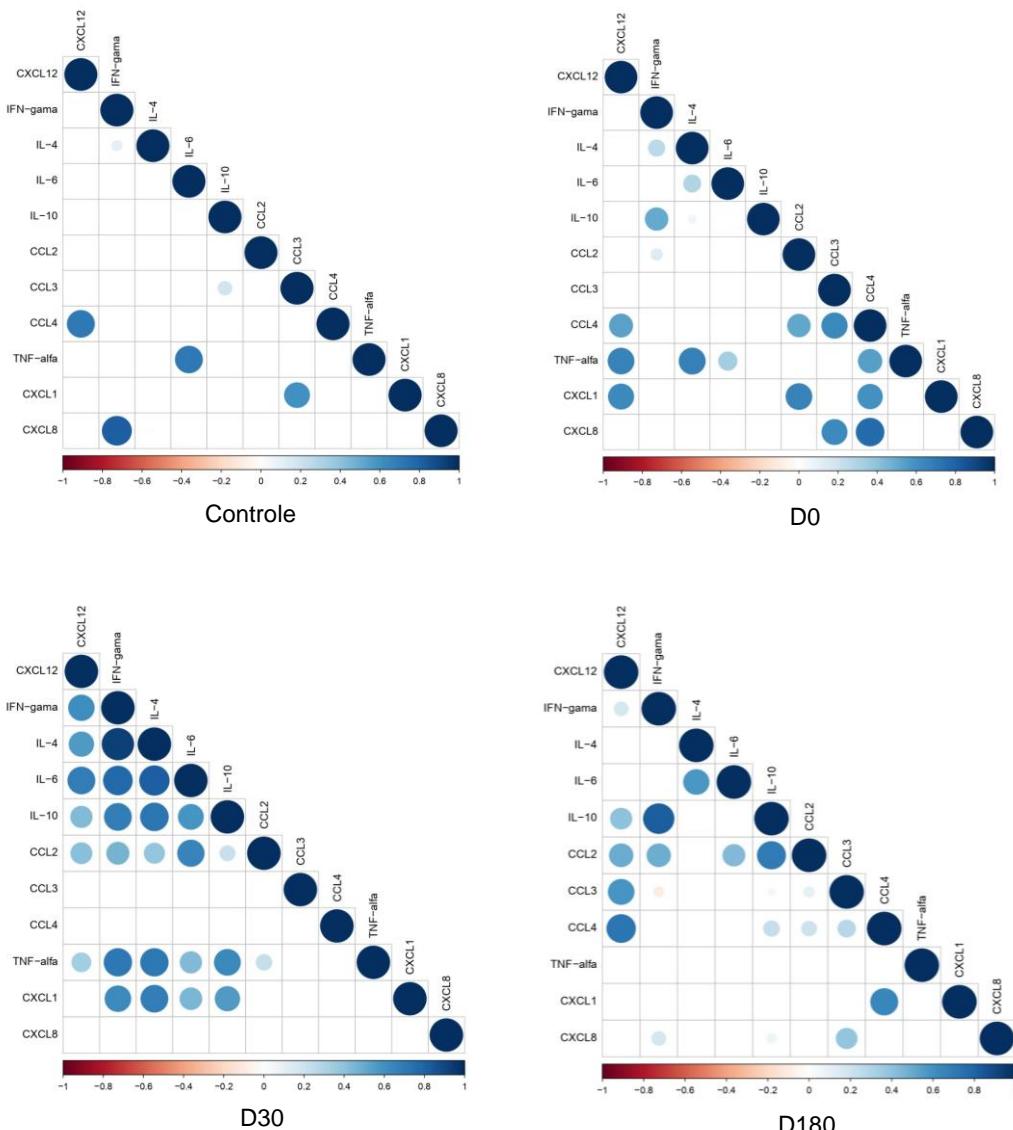
Já nos pacientes curados (D180) foi observado algumas correlações positivas, como entre IL-10 e IFN- γ (forte), CCL4 e CXCL12, IL-10 e IFN- γ e CCL2 e IL-10 (moderadas). Nesse grupo foi observada a única correlação negativa que se apresentou de forma fraca entre CCL3 e IFN- γ .

Algumas correlações se mantiveram presentes em mais de uma fase da infecção, como a CCL4 e CXCL12, que se manteve com intensidade moderada nos controles, D0 e D180. As correlações TNF- α e a IL-6 e TNF- α e a CXCL12 estão

presente nos controles e no D30 e nos pacientes no D0 e D30, respectivamente. Em ambos os casos, as correções iniciam-se moderadas e caem para a intensidade fraca.

Por fim, a interação IL-10 e IFN- γ mostra-se de forma bastante interessante, pois aparece nos dias 0, 30 e 180, e sua intensidade vai diminuindo progressivamente ao longo do tratamento.

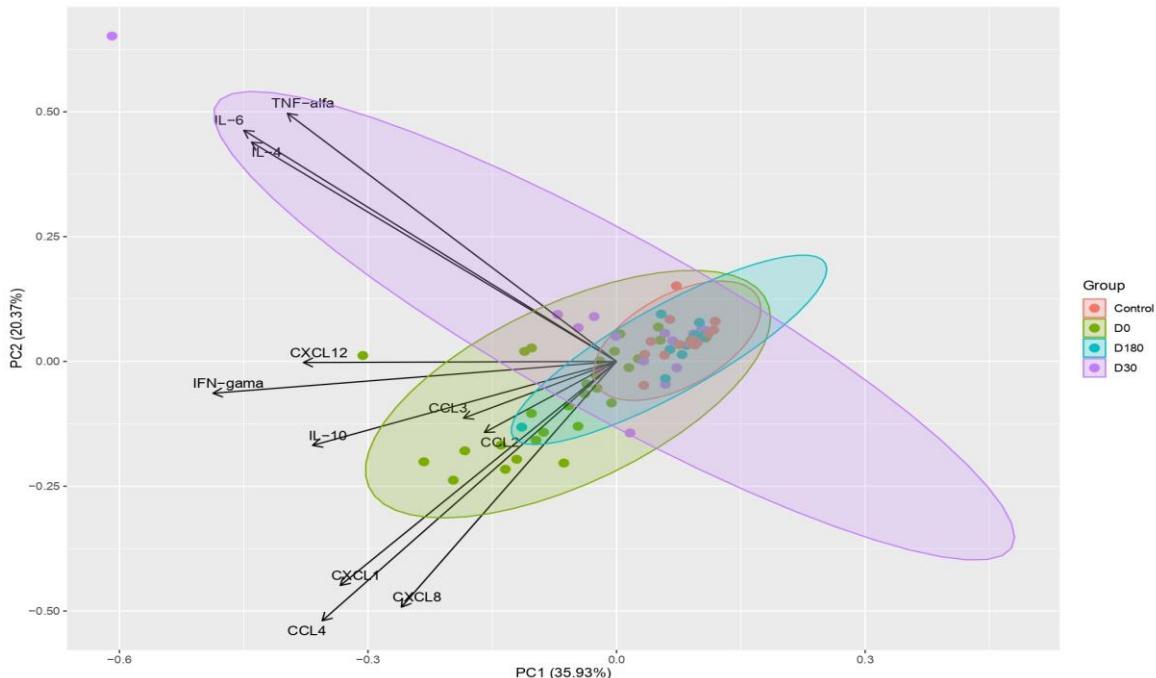
Figura 4: Correlação entre as citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-6, TNF- α e quimiocinas CXCL12, CXCL1, CXCL8, CCL3 e CCL4 ao longo do tratamento da LV (D0, D30 e D180) com os controles endêmicos (C.E.) através do teste de correlação de Spearman.



Fonte: Autoria própria.

A análise multivariada das citocinas e quimiocinas através da análise de componentes principais (ACP) evidenciou que o PC1 é o componente principal com maior peso (35,93%) em comparação ao PC2 (20,37%) e ambos explicam aproximadamente 56,3% dos dados (Figura 5).

Figura 5: Análise multivariada das citocinas e quimiocinas no grupo controle, assim como nos diferentes tempos da infecção foi realizada através da análise de componentes principais (ACP).



Fonte: Autoria própria.

Observa-se na ACP que os pontos do grupo controle se encontram próximo ao centro do gráfico e agrupados em relação aos demais grupos. As citocinas com setas curtas, como a CCL2 e CCL3, estão mais relacionadas a esse grupo. Por outro lado, os pontos dos pacientes D0 encontram-se dispersos no gráfico, condizente com a variabilidade de dados da condição inicial da infecção. A CXCL12 apresenta uma longa seta direcionada ao PC2, colaborando para os achados de que essas quimiocina influência significativamente a fase inicial da infecção, com consequente redução até o D180. Nos controles, a CXCL12 com uma expressão reduzida e estável quando comparada com as demais fases da infecção.

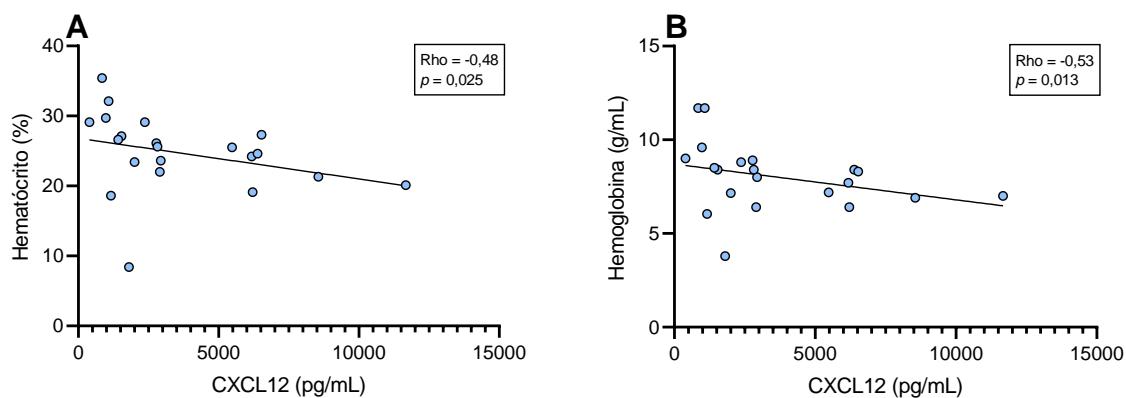
Durante a análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, foi avaliada a relação entre diversos componentes do sangue e biomarcadores inflamatórios, a fim de compreender melhor as interações e possíveis impactos no estado de saúde dos

pacientes. Os parâmetros examinados incluíram a contagem de leucócitos totais, neutrófilos, plaquetas, índice internacional normalizado (INR), ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina e albumina. Cada um desses parâmetros oferece uma visão sobre diferentes aspectos da saúde hematológica e metabólica do paciente.

No entanto, a análise não revelou correlações significativas entre a maioria desses parâmetros e os níveis de CXCL12, sugerindo que, na amostra estudada, a variação de CXCL12 não está diretamente associada com essas medidas hematológicas e bioquímicas. Isso pode indicar que CXCL12 não influencia diretamente esses parâmetros ou que a influência é muito sutil para ser detectada com a amostra disponível.

A análise da relação entre a expressão de CXCL12 e os níveis de hematócrito e hemoglobina nos pacientes estudados foi realizada utilizando a correlação de Spearman. A Figura 6 ilustra estas comparações, onde observamos uma tendência inversa e moderada.

Figura 6: A análise da relação entre a expressão de CXCL12 com valores de hematócrito e hemoglobina nos pacientes de LV. Os dados foram obtidos a partir do ensaio hematológico automatizado. Foi realizada a correlação de Spearman, considerou o valor de $p \leq 0.005$ significativo.



Especificamente, a correlação entre CXCL12 e hematócrito apresentou um coeficiente de Spearman (Rho) de -0,48, enquanto a correlação entre CXCL12 e hemoglobina teve Rho=-0,53. Esses valores negativos indicam que, à medida que a expressão de CXCL12 aumenta, os níveis de hematócrito e hemoglobina tendem a diminuir. Esta relação inversa sugere que CXCL12 pode desempenhar um papel

regulador na diminuição dos níveis de hematócrito e hemoglobina, possivelmente interferindo no equilíbrio normal dessas moléculas no sangue.

6. DISCUSSÃO

A quimiocina CXCL12 desempenha um papel fundamental em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo embriogênese, hematopoiese e inflamação. Ela é crucial pois ativa e induz a migração de células progenitoras e tronco hematopoiético e a maioria dos leucócitos. Devido à sua importância, a atividade da CXCL12 é rigidamente regulada em vários níveis, garantindo que esses processos ocorram de maneira controlada e eficiente. Essa regulação é essencial para manter o equilíbrio fisiológico e responder adequadamente a condições patológicas (JANSSENS; STRUYF; PROOST, 2018).

A CXCL12 é um alvo extensivamente estudado na oncologia devido ao seu papel crucial como marcador prognóstico, em paciente carcinoma seroso ovariano primário a CXCL12 correlacionam-se com melhor sobrevida e menor recorrência dos tumores. Da mesma forma, em câncer de pulmão de células não pequenas, baixa expressão tumoral de CXCL12 está associada a melhores resultados de sobrevida (KOGUE et al., 2023; KÖHN et al., 2023).

Neste trabalho, observou-se que os níveis de CXCL12 estavam significativamente elevados no início do tratamento (D0), provavelmente refletindo uma resposta inflamatória aguda à infecção. Durante o tratamento, os níveis de CXCL12 diminuíram progressivamente nos dias 30 e 180, indicando uma correlação com a resolução da infecção e a recuperação clínica. Não houve diferença estatística significativa entre os pacientes tratados e os controles, o que pode ser explicado pela regulação imunológica adaptativa frente a presença da leishmania.

Atualmente, não existem estudos que investiguem a CXCL12 em humanos com leishmaniose visceral. No entanto, em modelo murino, foi relatado que a quimiocina CXCL12 em conjunto com a CXCL8, derivadas de células estromais, atraem progenitores hematopoiéticos com potencial para se diferenciar em células dendríticas (CD) reguladoras. No entanto, quando comparado com a CXCL8, a CXCL12 foi menos potente indicando, demonstrando mecanismos alternativos que

controlam a atividade hematopoiética e que podem ser explorados por patógenos intracelulares (HOANG et al., 2010).

A CXCL8, assim como a CXCL1, CCL3, CCL4 e as citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-6 e TNF- α estudadas apresentaram níveis elevados no início da infecção, refletindo uma resposta inflamatória intensa. Com o avanço do tratamento, esses níveis diminuíram gradualmente, indicando uma moderação da resposta imune à medida que a infecção foi controlada. No entanto, algumas particularidades foram observadas, como o TNF- α mantendo níveis significativamente elevados até o D180, sugerindo um papel contínuo na recuperação e na manutenção de uma resposta imune vigilante e a CCL3 que não apresentou variações significativas ao longo do tempo, sugerindo que sua expressão pode ser regulada por mecanismos distintos e não diretamente envolvidos na resposta inflamatória aguda.

O padrão observado de elevação inicial e subsequente redução das citocinas são característicos de uma tempestade de citocinas, onde o organismo responde agressivamente à infecção. Esse fenômeno reflete a necessidade de um controle inflamatório inicial robusto, seguido por uma regulação que permita a recuperação clínica. A persistência de níveis elevados de algumas moléculas, como o TNF- α , até o final do tratamento sugere que a resolução completa da tempestade de citocinas é um processo prolongado, necessário para a manutenção da homeostase imunológica pós-infecção.

Os achados dos estudos de Santos et al. (2016) e Santos-Oliveira et al. (2020) indicam que pacientes com LV apresentam uma resposta imunológica intensa, caracterizada por essa tempestade de citocinas. Ambos os estudos relatam elevados níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 e MIF), anti-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13), regulatória (IL-10) e quimiocinas (MCP e MIP-1 β). Além disso, foram observadas associações significativas entre essas moléculas e condições clínicas como neutropenia e trombocitopenia.

O estudo de Santos et al. (2016) destaca também que níveis elevados de IL-6 estão fortemente relacionados com a mortalidade em pacientes com LV. Esses resultados reforçam a complexa dinâmica imunológica envolvida na LV, semelhante aos padrões encontrados em casos de sepse.

As correlações entre citocinas e quimiocinas foram predominantemente positivas, indicando que essas moléculas tendem atuar de forma sinérgica ou que

são reguladas de maneira coordenada na resposta imune. No inicio da infecção é possível observar uma correlação positiva e moderada entre a CXCL12 e TNF- α , indicando um possível papel protetor da CXCL12 ao correlacionar-se com uma citocina que está associada a proteção contra o desenvolvimento da leishmaniose visceral.

Por outro lado, a correlação CCL4 e CXL12 é interessante pois está presente no grupo controle e nos pacientes do D0 e D180. A associação dessas quimiocinas também mostram-se importante na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, pois juntas favorecem a alteração do microambiente do timo através de uma grande alteração regulação da migração de timócitos imaturos e modulação da resposta realizada por células T (MENDES-DA-CRUZ et al., 2006). A CCL4 é uma quimiocina que na LV canina está associada com o aumento do número de macrófagos e diminuição de células como linfócitos, eosinófilos e mastócitos. Esses achados não só se correlacionaram com a progressão da doença, como também estavam associados com o aumento da carga parasitária nos cães estudados (MENEZES-SOUZA et al., 2012).

Por fim, foi observado ainda que a correlação positiva IL-10 e o IFN- γ presente durante todo o curso do tratamento da LV. Esse resultado é bastante interessante pois vai de encontro ao descrito por Jesus e colaboradores (1998), ao destacar que a IL-10 colabora para a progressão da LV promovendo a diminuindo a concentração de IFN- γ .

Esses achados corroboram para um possível efeito dual da CXCL12, ao atuando de forma sinérgica com moléculas associadas a cura e progressão da leishmaniose visceral. Além disso, nota-se que a atuação conjunta de moléculas associada ao padrão Th1 e Th2 durante a infecção pode estar associada ao rompimento dessa dicotomia de resposta da T helper e estabelecimento de uma resposta mista como no evento da tempestade de citocinas.

A análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos não revelou correlações significativas com os níveis de CXCL12 na população estudada, indicando que CXCL12 pode não influenciar diretamente esses marcadores durante a infecção e tratamento. No entanto, observou-se uma relação inversa moderada entre CXCL12 e os níveis de hematócrito e hemoglobina. Essa correlação negativa sugere que um aumento nos níveis de CXCL12 pode estar associado à diminuição desses componentes sanguíneos, potencialmente implicando um papel de CXCL12

na regulação desses parâmetros durante estados de infecção, o que requer investigação adicional para entender melhor suas implicações clínicas.

Na leishmaniose visceral, especialmente em casos graves e não tratados, é comum observar uma diminuição nos níveis de hemoglobina e hematócrito. Isso ocorre devido à destruição e disfunção da eritropoese pela leishmania, uma vez que o parasita se aloja principalmente na medula óssea, onde é realizada a maior parte do processo síntese de células sanguíneas. O resultado desse intenso parasitismo é uma anemia grave e baixo hematócrito, tornado esses sintomas marcadores clínicos importantes da doença (GOTO et al., 2016).

Trabalhos realizados em modelo canino com LV evidenciam que a CXCL12 está altamente expressa no tecido esplênico, sendo associado com o *homing* e acumulo de células plasmáticas para esse tecido, promovendo ruptura da polpa branca do baço e interferindo na resposta imunológica à *Leishmania* e aumentando o risco de coinfecções. Além disso, a plasmocitose por fatores como retenção e sobrevivência prolongada de células plasmáticas no baço foi observada e a destruição da polpa branca esplênica foi associada a disproteinemia grave nos animais estudados (O'HARE et al., 2016).

Os achados deste estudo têm implicações importantes para a compreensão da resposta imunológica e a gestão clínica da LV. A dinâmica da expressão de CXCL12 e das citocinas ao longo do tratamento pode ajudar a identificar biomarcadores úteis para monitorar a progressão da doença e a eficácia do tratamento. Além disso, a ausência de correlações significativas entre CXCL12 e a maioria dos parâmetros hematológicos e bioquímicos sugere que esses marcadores podem operar de forma independente.

Limitações incluíram dificuldades no acesso a dados completos de prontuários devido à transição para um sistema eletrônico e o impacto potencial na completude dos dados históricos. Além disso, o tamanho da amostra e a variabilidade entre os pacientes podem ter influenciado os resultados, especialmente nas análises sem correlações significativas.

7. CONCLUSÃO

Esta pesquisa revelou que indivíduos com Leishmaniose Visceral (LV) ativa apresentam níveis elevados da quimiocina CXCL12, os quais diminuem

progressivamente com o tratamento. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre CXCL12 e parâmetros hematológicos hematócrito e hemoglobina, sugerindo um papel regulador dessa quimiocina na diminuição desses componentes sanguíneos. A análise de outras citocinas e quimiocinas demonstrou padrões de variação importantes que contribuem para a compreensão da resposta imunológica na LV. Esses resultados apontam para o potencial de CXCL12 como biomarcador na monitorização do tratamento da LV, destacando a importância de estudos adicionais para confirmar seu papel no desenvolvimento e tratamento da doença.

REFERÊNCIAS

- AMARA R. D.; OLIVEIRA, B.G. D. S. E.T. Análise temporal dos casos de Leishmaniose notificados nas capitais de Belo Horizonte (MG) e Campo Grande (MS) entre 2010 e 2019. **Geoconexões online**. 2022;1:71–90. doi: 10.53528/geoconexes.v1i1.82.
- ARAÚJO, D. D. et al. TERMINOLOGIA ESPECIALIZADA DE ENFERMAGEM PARA O CUIDADO DE PESSOAS COM LEISHMANIOSE VISCERAL (2023). **Cogitare Enfermagem**, 28, e84101. <https://doi.org/10.1590/ce.v28i0.84101>
- BENCHIMOL, J. L. et al. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, maio 2019.
- BOUCHERY, T. et al. The Chemokine CXCL12 Is Essential for the Clearance of the Filaria Litomosoides sigmodontis in Resistant Mice. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 34971-34971, 12 abr. 2012. **Public Library of Science (PLoS)**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034971>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 07 ago. 2024.
- BRAZ, D. C. **O papel da medula óssea no desenvolvimento da leishmaniose visceral grave: desvendando os mecanismos inflamatórios e imunossupressores**. 2016. 150 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/680>.
- CALDERÓN-ANYOSA, R. et al. Housing Characteristics and Leishmaniasis: A Systematic Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 1547-1554, 2018. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0037
- COSTA-DA-SILVA, Ana Caroline et al. Immune Responses in Leishmaniasis: an overview. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis. **Frontiers In Immunology**, v. 10, n. 1, p. 1-1, 5 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>.

DE FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 193–204, 2013.

DIAS, T. P. et al. Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: análise crítica frente a evolução epidemiológica. **Research, Society And Development**, v. 11, n. 5, p. 45711528361-00, 12 abr. 2022. **Research, Society and Development**. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28361>.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: a review and assessment of recent research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111671, jul. 2021. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>.

FERREIRA, J. R. S. et al. Leishmaniose visceral americana em estado do nordeste brasileiro: aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 82, e238383, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.238383>.

GOTO, Y. et al. Prevalence, severity, and pathogeneses of anemia in visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 457-464, 7 nov. 2016. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5313-x>.

GUO, F. et al. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. **Oncogene**, v. 35, n. 7, p. 816-826, 2016. DOI: 10.1038/onc.2015.139.

HO, Teik K. et al. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. **Cardiology Research And Practice**, v. 2012, p. 1-7, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/143209>.

HOANG, A. T. N. et al. Stromal Cell-Derived CXCL12 and CCL8 Cooperate To Support Increased Development of Regulatory Dendritic Cells Following Leishmania Infection. **The Journal Of Immunology**, v. 185, n. 4, p. 2360-2371, 15 ago. 2010. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903673>

JANSSENS, R.; STRUYF, S.; PROOST, P. The unique structural and functional features of CXCL12. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, p. 299-311, 30 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2017.107>.

JARALLAH, H. Histopathological Changes of Canine Visceral Leishmaniasis in Experimentally Infected Dogs. **Egyptian Journal Of Veterinary Sciences**, v. 54, n. 5, p. 965-970, 1 nov. 2023. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.21608/ejvs.2023.208098.1499>.

JESUS, A. R. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.

KOGUE, Y. et al. Prognostic Value of CXCL12 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Undergoing Tumor Resection. *Pharmaceuticals*. v. 16, n. 2, p. 255-255, 7 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph16020255>.

KÖHN, P. et al. High density of CXCL12-positive immune cell infiltration predicts chemosensitivity and recurrence-free survival in ovarian carcinoma. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology*. v. 149, n. 20, p. 17943-17955, 15 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-023-05466-8>.

MAGALHÃES, A. O. et al. Anatomopathological and immunohistochemical analyses of the spleen and lymph node of dogs seropositives for leishmaniasis in serological tests. *Ciência Animal Brasileira*, v. 22, p. e-68909, 2021.

MARCONDES, C. B. *Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)*. In: REZAEI, Nima (Ed.). *Encyclopedia of Infection and Immunity*. 1. ed. Elsevier, 2022. p. 819-836. ISBN 9780323903035. DOI: [10.1016/B978-0-12-818731-9.00003-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00003-3).

MARZOCHI, M. C. A. Leishmaniose visceral: desafios para o controle no contexto da diversidade dos cenários. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 77, p. e1753, 2018. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/>. Acesso em: 27 jun. 2018.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Higher Expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 Chemokines in the Skin Associated with Parasite Density in Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 4, p. e1566, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001566. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001566>.

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *European Journal of Immunology*, v. 36, n. 6, p. 1486-1493, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200535629>.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. 532 p. ISBN 9788538808087.

O'HARE, J. S. et al. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: changes in homing and survival of plasma cells. *Plos One*, v. 11, n. 5, p. 0156733-0156733, 31 maio 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156733>.

OLIVEIRA, D. K. F. et al. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES DERMOTRÓPICAS E VISCEROTRÓPICAS. *Revista Unimontes Científica*, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 1–14, 2021. DOI: 10.46551/ruc.v23n2a03.

OLIVEIRA, K. B.; FUJITA, T. C.; ODA, J. M. M.; AOKI, M. N.; TATAKIHARA, R. I.; CARNEIRO, J. L. V.; WATANABE, M. A. E. (2012). Envolvimento das quimiocinas e

seus receptores na patogênese de doenças infecciosas e inflamatórias. **Biosaúde**, 9(1/2), 41–64. Recuperado de <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/biosaude/article/view/11978>.

PAHO: Pan American Health Organization. Visceral Leishmaniasis. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis>. Acesso: ago. 2024.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein** (São Paulo) [Internet]. 2015Jul;13(3):469–73. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W. Carneiro-Sampaio MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **J Pediatr** (Rio J) [Internet]. 2002Mar;78(2):120–7. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0021-75572002000200010>.

PRADELLA, G. D. et al. PCR-RLFP characterization of *Leishmania* spp. in domestic animals from the south-western border of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, p. 1-1, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612022035>

RIBEIRO, C. J. N. et al. Space-time risk cluster of visceral leishmaniasis in Brazilian endemic region with high social vulnerability: an ecological time series study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 0009006-0009006, 19 jan. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009006>.

SAMANT, M. et al. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 11, n., p., 18 fev. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.624009>.

SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 0004375, 27 jan. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004375>.

SILVA, G. J. Estudo descritivo da Leishmaniose Canina no Distrito Federal. 2018. 86 f. **Dissertação (Mestrado em Políticas Públicas em Saúde)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2018.

SOARES, F. Análise do papel dos genes CXCL12, EPHA2 e EFNA4 no processo de transição epitelial-mesenquimal em amostras de câncer gástrico. 2022. **Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina)** - Universidade Federal de Pernambuco.

TEIXEIRA, Clarissa et al. *Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted Leishmania major by Exposure to Uninfected Bites*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2781, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002781.

TRONCARELLI, M. Z. Infecção por *Leishmania* spp. e/ou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose canina.

2008. 112 f. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics of North America, Philadelphia**, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>. Acesso em: 10 jul. 2024.

VASCONCELOS G. V. et al. Análise epidemiológica dos casos de leishmaniose visceral no estado de Minas Gerais, Brasil. **Rev Patologia Tocantins**. 2022;9(2):46–52. doi: 10.20873/uft.2446-6492.2022v9n2p46.

VERAS, P. S. T. et al. Elucidating the role played by bone marrow in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023, arti. 1261074. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1261074>.

VOLPEDO, Greta et al. Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 12, artigo 748325, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748325>.

VIVIER, E. The discovery of innate lymphoid cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 10, p. 616-616, 27 set. 2021. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-021-00595-y>.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 28 jul. 2024.

YADAGIRI, G. et a. Immunotherapy and immunochemotherapy in combating visceral leishmaniasis. **Frontiers in Medicine**, v. 10, 2023, p. 1096458. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1096458>.

APÊNDICE

Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR.
Rua Cláudio Batista s/n, Didática V, Bairro Sanatório
CEP: 49060-100 Aracaju/SE
Fone: (79) 3218-1805
E-mail: cephu@ufs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: Interação entre os Agentes Infecciosos e Hospedeiros na Patogênese
da Leishmaniose Visceral

NOME DO PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS,
Aracaju-Sergipe-Brasil.

Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião de uma criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra “você” neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concorde em participar desta pesquisa.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem leishmaniose na medula óssea ou no baço para estudar a doença chamada calazar ou leishmaniose visceral. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes com leishmaniose visceral diagnosticados no Hospital Universitário serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 100 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo no Hospital Universitário.

Finalidade do estudo: Este estudo visa determinar se o estudo da resposta imune do paciente ao parasita e identificar fatores envolvidos na resistência de alguns pacientes ao tratamento com antimonal (Glucantime®) ou anfotericina B.

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo, um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação e seus hábitos. Um médico o examinará para ver as características de sua doença. Você realizará os exames que já são utilizados de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (sorológico), teste cutâneo e aspiração da medula óssea e/ou baço com seringa e agulha para cultura do parasito que causa a doença. Além disso, seu sangue será utilizada para avaliar a resposta imune frente a抗ígenos do parasita, avaliar se o parasita isolado da medula óssea resistente aos medicamentos ou ao óxido nítrico e também seuenciar RNA/DNA de suas células a fim de identificar possíveis marcadores genéticos que são responsáveis pelo surgimento da doença. A participação nesta pesquisa não impede você de participar de outra pesquisa, contanto que não mude o tratamento que vai receber.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Análise de riscos e benefícios: Todos os exames coletados são partes da rotina utilizada para o diagnóstico de Leishmaniose, os quais você faria mesmo se não participasse do estudo, exceto o sangue obtido ao mesmo momento que será utilizado para os estudos da resposta imune, porém não trará novos riscos para você como os previstos para retirada de sangue em rotina normal. A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da medula óssea é também de rotina e não causam riscos iminentes. Porém, ocorrendo complicações, os médicos do projeto e do Hospital cuidarão de você. Após o diagnóstico da doença, você será tratado com antimônio (Glucantime®) Este tratamento será acompanhado no Hospital Universitário.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre o tratamento da leishmaniose visceral e da resposta imune poderão contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicaçāo relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)98823-7244). Caso você queira saber alguma coisa sobre

Apêndice 2: Parecer Comitê de Ética em Pesquisa - CEP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Interação entre os Agentes Infecciosos e Hospedeiros na Patogênese da Leishmaniose Visceral

Pesquisador: Roque Pacheco de Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51457115.7.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.353.887

Apresentação do Projeto:

O Projeto pretende estudar a Patogênese da Leishmaniose Visceral com a hipótese de que diferenças genéticas e/ou fenotípicas do parasito estão relacionadas com a evolução clínica e a resposta terapêutica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação de fatores do parasito e do hospedeiro envolvidos na patogênese das Leishmanioses.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar características fenotípicas e genotípicas do parasito de diferentes isolados de leishmanias e associar à patogênese da doença. Avaliar a regulação de macrófagos humanos na infecção por diferentes isolados de *L. chagasi* através do índice de infecção e da produção de citocinas.
2. Investigar a susceptibilidade ao óxido nítrico em cepas de *L. chagasi*, isoladas de pacientes com LV.
3. Determinar a susceptibilidade ao antimonal em cepas de *L. chagasi*, isoladas de pacientes com LV.
4. Avaliar a expressão dos genes da cis-aconitase, GAPDH, 6PGDH e MRPA assim como determinar o número de cópias destes genes presentes no genoma dos isolados.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



Continuação do Parecer: 1.353.887

5. Identificar proteínas com padrão de expressão diferenciado entre os isolados resistentes e sensíveis ao NO
6. Avaliar o efeito do NO sobre aspectos morfológicos e ultraestruturais de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*
7. Avaliar aspectos do hospedeiro associados à gravidade clínica e resposta terapêutica na LV.
8. Acompanhar a resposta imune da LV humana antes e após o tratamento, através da dosagem de citocinas e utilizá-la como marcador de evolução clínica.
9. Avaliar o papel da IL-17 e IL-22 na infecção por *L. chagasi* utilizando modelos experimentais
10. Realizar sequenciamento do RNA/DNA para identificar possíveis genes associados à patogênese da doença.
11. Avaliar a indução de NETs nos humanos com leishmaniose visceral após estímulo do neutrófilo com promastigotas de *Leishmania infantum*;
12. Comparar a indução de NETs nos humanos saudáveis, após o tratamento da LV e indivíduos DTH+.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pacientes não serão submetidos a riscos adicionais aos que se submetem na rotina habitual de coleta de sangue e punção de medula. A pesquisa apresenta como benefício indireto aos participantes a colaboração na ampliação dos conhecimento sobre a patogênese da leishmaniose visceral humana o que poderá contribuir para novos tratamentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nesse projeto serão propostos os seguintes grupos experimentais: Humanos 1- Indivíduos saudáveis, 2- Pacientes tratados para LV, 3- Indivíduos DTH positivo, com clínica clássica da doença, confirmado por sorologia, rK39 e/ou isolamento do parasita por punção aspirativa da medula óssea. Pretende-se nessa proposta correlacionar os marcadores moleculares da resposta imune e dos eventos iniciais da infecção in vitro de macrófagos do hospedeiro, ao longo do tratamento, com a gravidade clínica da LV. Também serão avaliados: o papel de células Th17 na infecção experimental por *L. chagasi*, e os mecanismos desencadeados que possam levar à diferenciação dessas subpopulações celulares, e possíveis genes envolvidos na gênese da patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios apresentados de acordo com a RES. 466-12.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº	CEP: 49.060-110
Bairro: Sanatório	
UF: SE	Município: ARACAJU
Telefone: (79)2105-1805	E-mail: cephu@ufs.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



Continuação do Parecer: 1.353.887

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_635771.pdf	30/11/2015 14:37:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2016.pdf	30/11/2015 14:36:51	Roque Pacheco de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ROQUE_ALMEIDA_16.pdf	30/11/2015 14:36:39	Roque Pacheco de Almeida	Aceito
Folha de Rosto	FR_Roque_Almeida.pdf	30/11/2015 14:24:53	Roque Pacheco de Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 07 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Anita Herminia Oliveira Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº	CEP: 49.060-110
Bairro: Sanatório	
UF: SE	Município: ARACAJU
Telefone: (79)2105-1805	E-mail: cephu@ufs.br