



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS COM
INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*
APÓS 13 ANOS DE ACOMPANHAMENTO.**

Discente: Vitor Francisco De Assis Oliveira

Orientadora: Maria Olivia Bacellar

SALVADOR

2025

AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* APÓS 13 ANOS DE ACOMPANHAMENTO.

Resumo

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC), causada por *Leishmania braziliensis*, manifesta-se com resposta inflamatória intensa e formação de úlcera cutânea. Em áreas endêmicas, indivíduos expostos podem desenvolver infecção subclínica (SC), controlando o parasita sem apresentar sintomas. Compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na proteção desses indivíduos é essencial para aprimorar estratégias de diagnóstico e prevenção da LC.

Objetivos: Avaliar, após 13 anos, a resposta clínica e imunológica de contatos familiares de pacientes com LC previamente identificados como subclínicos, comparando-os a pacientes com LC ativa, normais endêmicos (NE) e controles sadios (CS). Procurou-se identificar marcadores imunológicos associados à proteção nesses indivíduos.

Materiais e Métodos: Trata-se de um estudo de coorte prospectivo realizado em Corte de Pedra-BA, com 308 contatos familiares seguidos desde 2010. Foi realizada a dosagem de IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17 e Granzima B em culturas de sangue total estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* de 18 SC, 15 NE e 8 CS. A dosagem de citocinas e a detecção de anticorpo foram realizadas através da técnica imunoenzimática (ELISA). A análise estatística incluiu testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e correlação de Spearman.

Resultados: Durante o seguimento, 57 indivíduos desenvolveram LC. Os 18 indivíduos SC avaliados mantiveram produção de IFN- γ após 13 anos, embora em níveis inferiores aos observados nos pacientes com LC. A produção de TNF, IL-1 β , IL-6 e Granzima B também foi menor nos SC em comparação com LC, mas superior aos NE e CS. Não houve correlação direta entre DTH e IFN- γ , mas 77,8% dos DTH positivos apresentaram IFN- γ detectável.

Conclusão: Indivíduos SC apresentaram uma menor resposta inflamatória que pode contribuir para não desenvolvimento da doença. Embora não haja uma correlação linear entre DTH (+) e a produção de IFN- γ , a análise de frequência revelou uma associação significativa entre essas variáveis. Isso indica que o IFN- γ é frequentemente produzido em indivíduos com DTH positivo, mas que sua produção também pode ocorrer independentemente da resposta DTH em alguns casos.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose cutânea; 2. infecção subclínica; 3. *Leishmania braziliensis*; 4. citocinas; 5. resposta imune; 6. DTH.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF INDIVIDUALS WITH SUBCLINICAL *Leishmania braziliensis* INFECTION AFTER 13 YEARS OF FOLLOW-UP.

Abstract

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL), caused by *Leishmania braziliensis*, is characterized by an intense inflammatory response and the development of skin ulcers. In endemic areas, exposed individuals may develop subclinical infection (SC), effectively controlling the parasite without presenting clinical symptoms. Understanding the immunological mechanisms involved in this response is crucial for improving diagnostic and preventive strategies against CL. **Objectives:** To evaluate, after 13 years, the clinical and immunological responses of household contacts of CL patients who were previously identified as subclinically infected, comparing them to individuals with active CL, endemic normals (EN), and healthy controls (HC). This study aimed to identify immunological markers associated with protection in these individuals. **Materials and Methods:** This was a prospective cohort study conducted in Corte de Pedra, Bahia, Brazil, involving 308 household contacts followed since 2010. Levels of IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, and Granzyme B were measured in whole blood cultures stimulated with soluble *Leishmania* antigen from 18 SC individuals, 15 EN, and 8 HC. Cytokine quantification and antibody detection were performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical analyses included the Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test, and Spearman's correlation. **Results:** During the follow-up period, 57 individuals developed CL. The 18 SC individuals maintained IFN- γ production after 13 years, although at lower levels compared to active CL patients. TNF, IL-1 β , IL-6, and Granzyme B production was also lower in SC individuals compared to CL but higher than in EN and HC. No direct correlation was observed between delayed-type hypersensitivity (DTH) and IFN- γ levels; however, 77.8% of DTH-positive individuals exhibited detectable IFN- γ . **Conclusion:** SC individuals exhibited a lower inflammatory response, which may contribute to the absence of disease manifestation. Although a linear correlation between DTH positivity and IFN- γ production was not observed, frequency analysis revealed a significant association between these variables. This indicates that IFN- γ is frequently produced in DTH-positive individuals but can also be produced independently of DTH responses in some cases.

Keywords: 1. Cutaneous leishmaniasis; 2. Subclinical infection; 3. *Leishmania braziliensis*; 4. Immune response; 5. Cytokines; 6. Delayed-type hypersensitivity (DTH)

FIGURA 1. Desenho de estudo de uma coorte de contatos familiares (cf) em uma área endêmica para a *Leishmania braziliensis*, e os estudos imunológicos realizados. Os estudos imunológicos foram realizados em anos 0, 2, 4, e após 13 anos da coorte. O desenvolvimento de leishmaniose cutânea (lc) foi monitorada durante e após a duração do estudo da coorte.

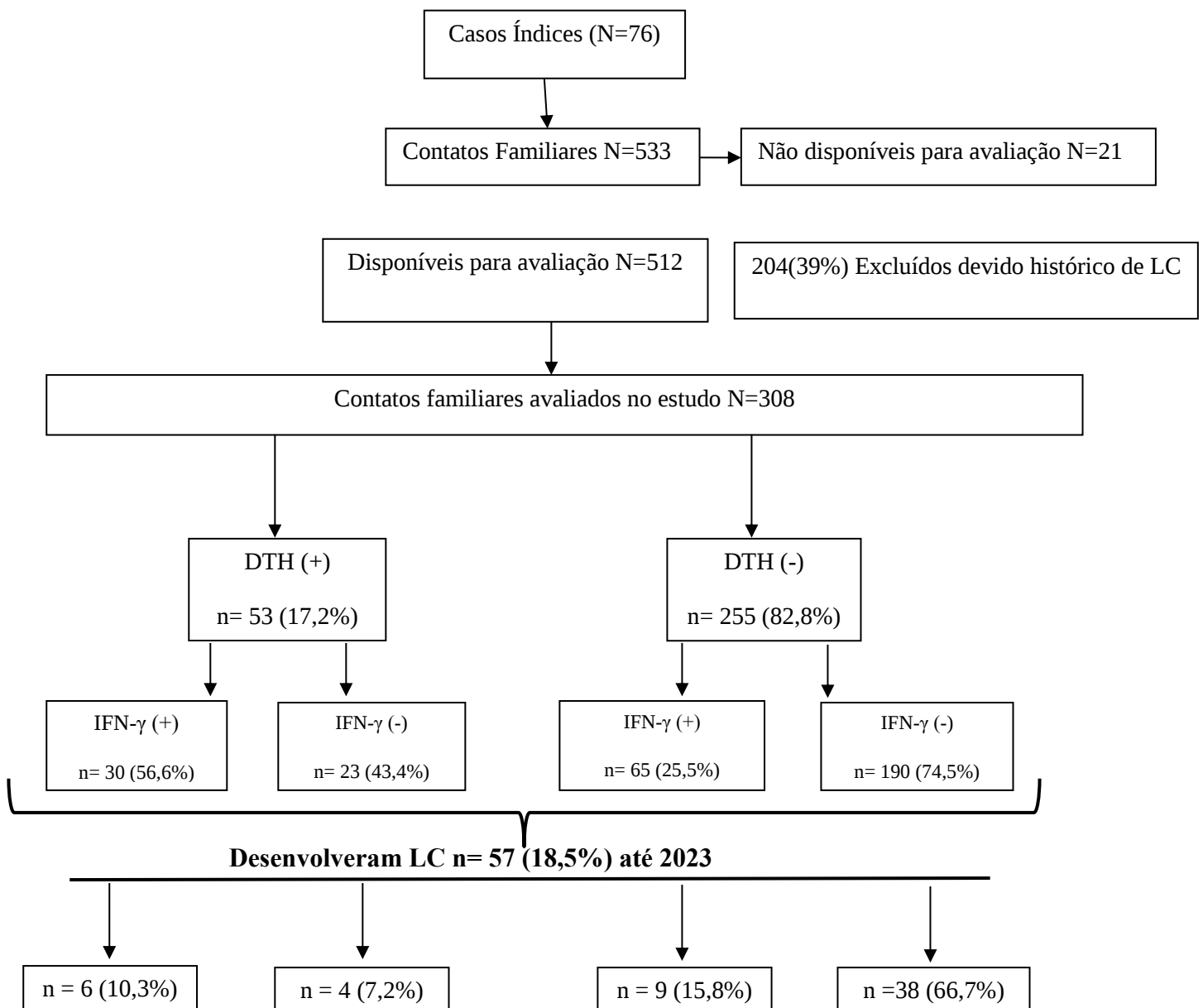


Tabela 1. Distribuição da incidência de Leishmaniose Cutânea de acordo com a resposta imune em indivíduos residentes em uma área endêmica de transmissão de *Leishmania braziliensis*

Grupos	Total de indivíduos SC	Desenvolveram LC	Incidência	RR
DTH (+) & IFN-γ (+)	30	6	20,00%	1,0
DTH (+) & IFN-γ (-)	23	4	17,40%	0,87
DTH (-) & IFN-γ (+)	65	9	13,80%	0,69
DTH (-) & IFN-γ (-)	190	38	20,00%	

TABELA 2. Dados demográficos e clínicos de indivíduos Subclínicos (SC), pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC), Normais Endêmicos (NE) e Controles Sadios (CS)

Variáveis	Subclínico	Leishmaniose cutânea	Normal endêmico	Controle sadio	VALOR DE p
	N=18	N=18	N=15	N=8	
IDADE, média ± DP	39,5 ± 14,6	36,5 ± 13,8	37,4 ± 9,9	39,3 ± 17,6	
SEXO,%					
Masculino	10/18 (55,5%)	14/18 (77,7%)	8/15(53,3%)	2/8(25%)	0,078
Feminino	8/18 (44,5%)	4/18 (22,3%)	7/15(46,7%)	6/8 (75%)	
PCR					
Positivo	-	16/18 (88,9%)	-	-	<0,0001
Negativo	-	2/18 (11,1%)	-	-	
DTH					
Positivo	14/18 (77,7%)	15/18 (83,4%)	0/15 (0 %)	-	< 0,0001
Negativo	4/18 (23,3%)	3/18 (16,6%)	15/15(100%)	-	
Nº DE LESÕES	-	1,9 ± 1,2	-	-	

Abreviaturas: DP, desvio padrão. O teste Mann Whitney foi utilizado para comparar as variáveis contínuas, o teste exato de Fisher para comparar as proporções

VI.2 PRODUÇÃO DE IFN- γ EM CULTURAS DE SANGUE TOTAL E EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO SEM ESTÍMULO E ESTÍMULO COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE *leishmania*:

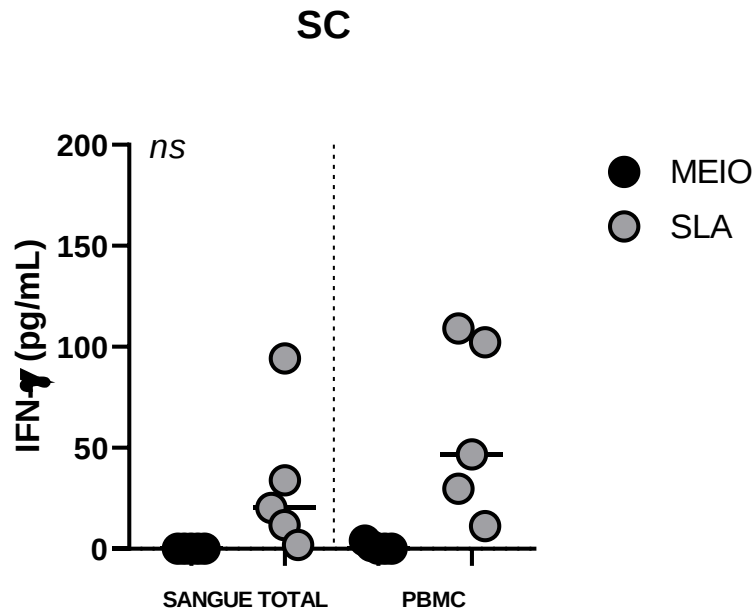


FIGURA 2. Produção de IFN- γ em sangue total e em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) estimuladas ou não com antígeno de *leishmania*. A dosagem da citocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica imunoenzimática (ELISA). Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

VI.4 PRODUÇÕES DE CITOCINAS EM CULTURA DE SANGUE TOTAL ESTIMULADO COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE *Leishmania*.

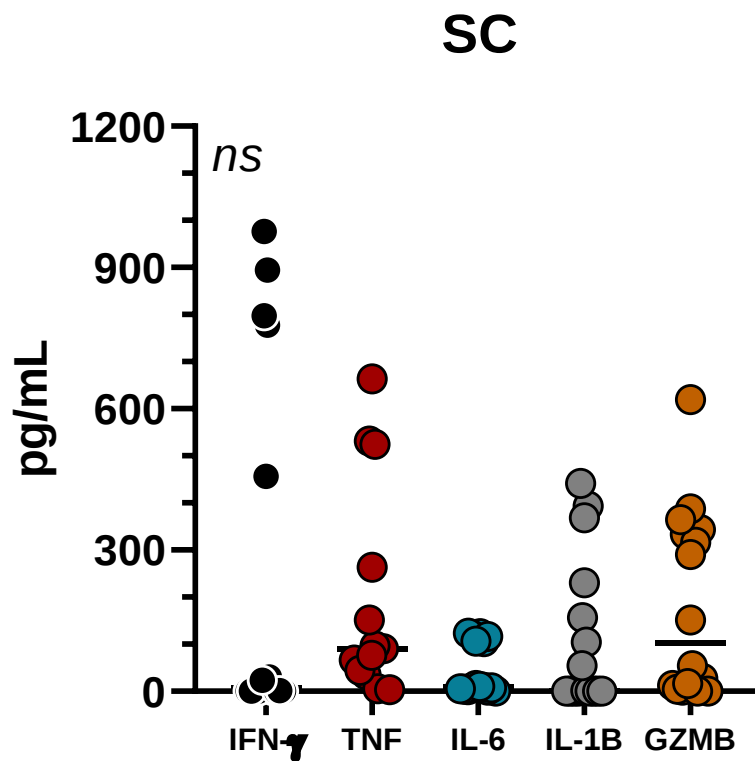


Figura 4. **Produção de citocinas em indivíduos SC.** Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de *Leishmania*. A dosagem das citocinas foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

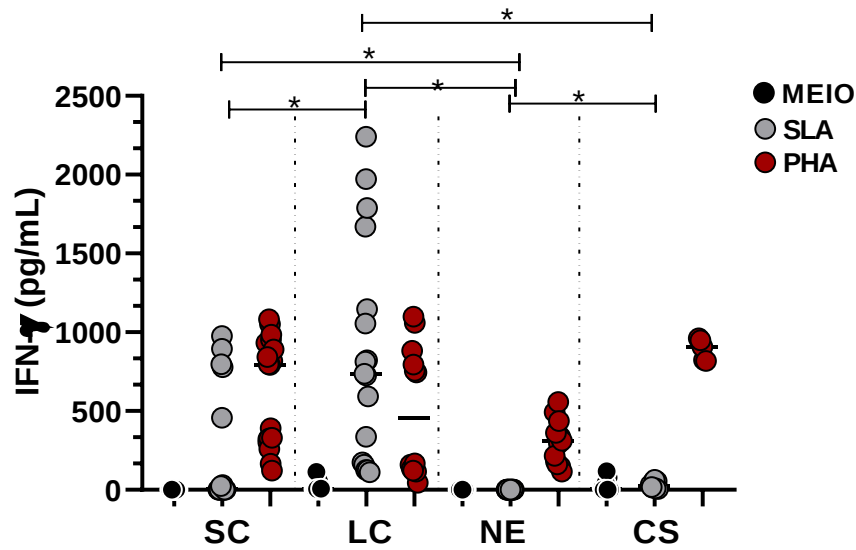


FIGURA 5. Produção de IFN- γ nos diferentes grupos. Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de *Leishmania*. A dosagem da citocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

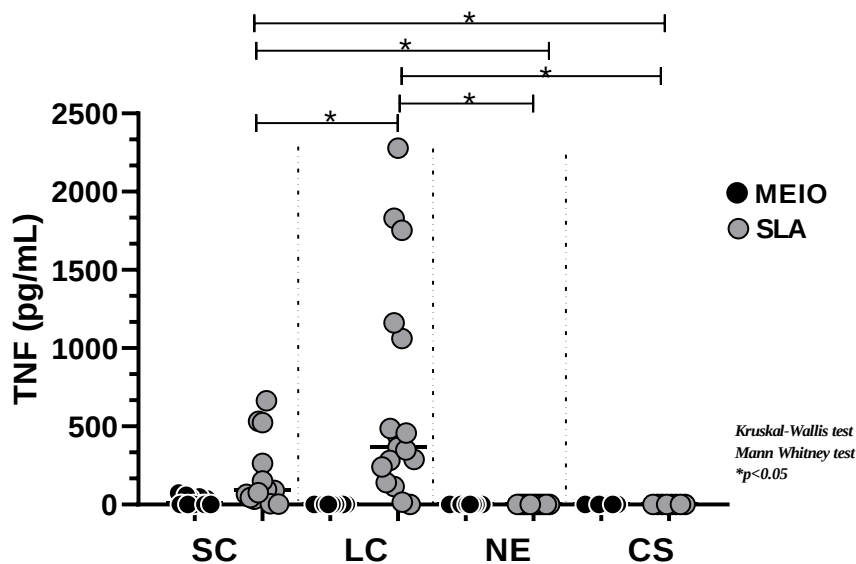


FIGURA 6. Produção de TNF nos diferentes grupos. Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno solúvel de *Leishmania*. A dosagem da citocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

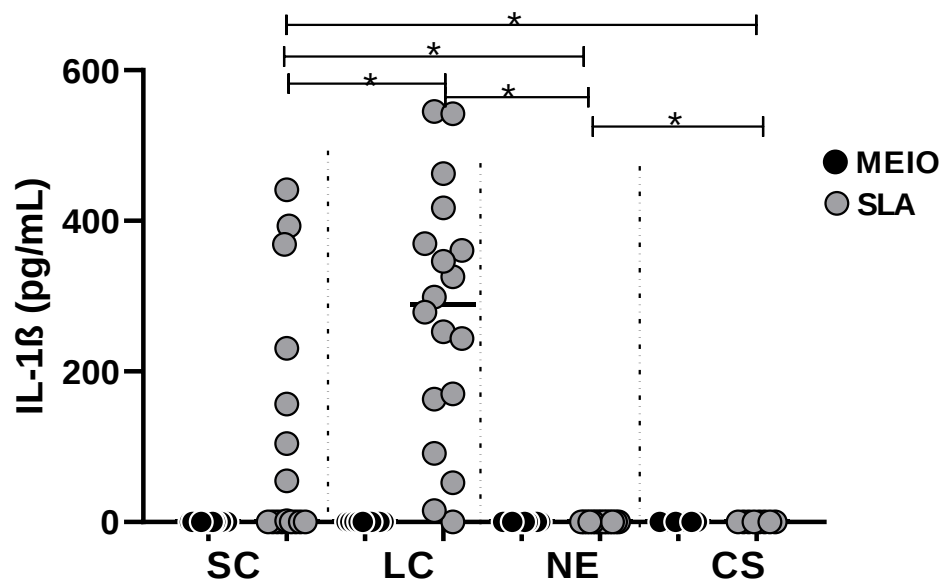


FIGURA 7. Produção de IL-1 β nos diferentes grupos. Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno solúvel de *Leishmania*. A dosagem da citocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

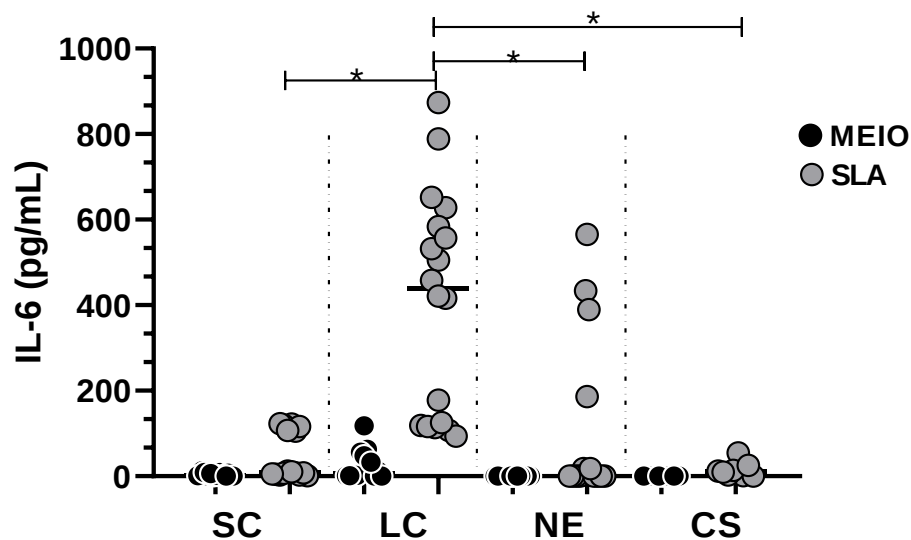


FIGURA 8. Produção de IL-6 nos diferentes grupos. Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de *Leishmania*. A dosagem da citocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

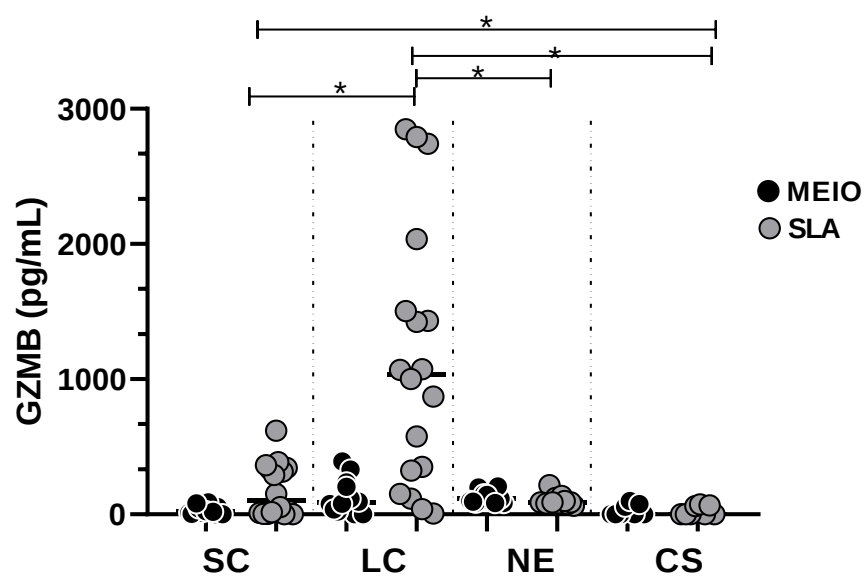


FIGURA 9. Produção de GRANZIMA B nos diferentes grupos. Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de *Leishmania*. A dosagem de Granzima foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

VI.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania*

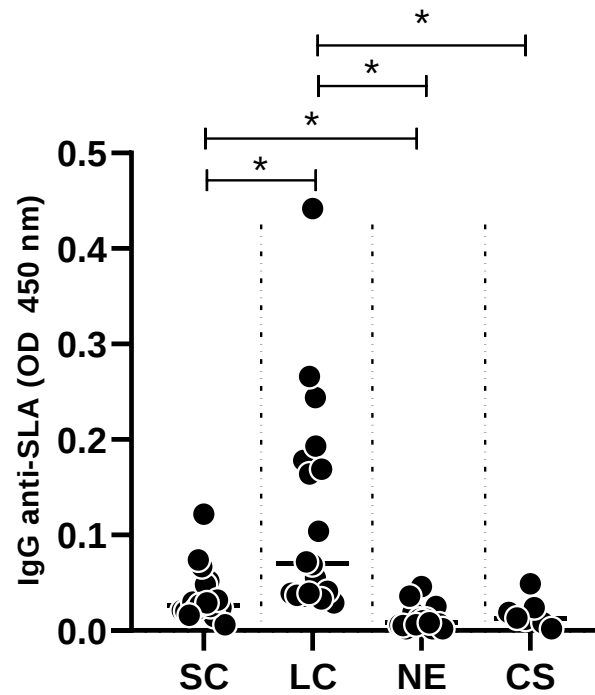
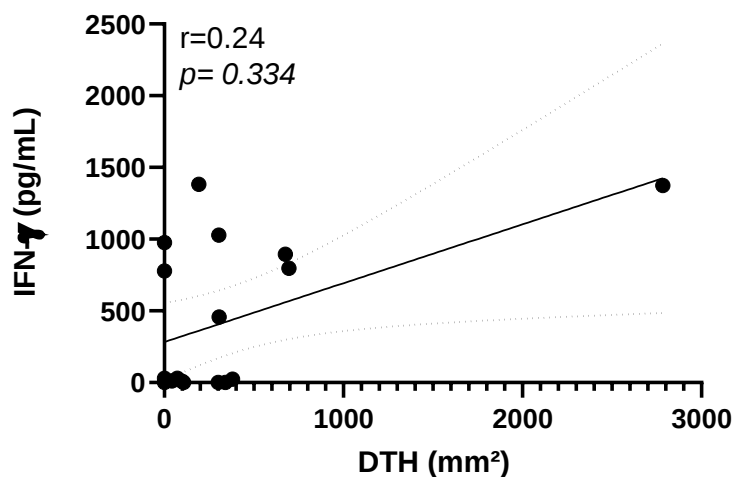


FIGURA 10. Produção de IgG nos diferentes grupos. A dosagem do anticorpo foi realizada utilizando plasma de sangue total através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como * $p < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

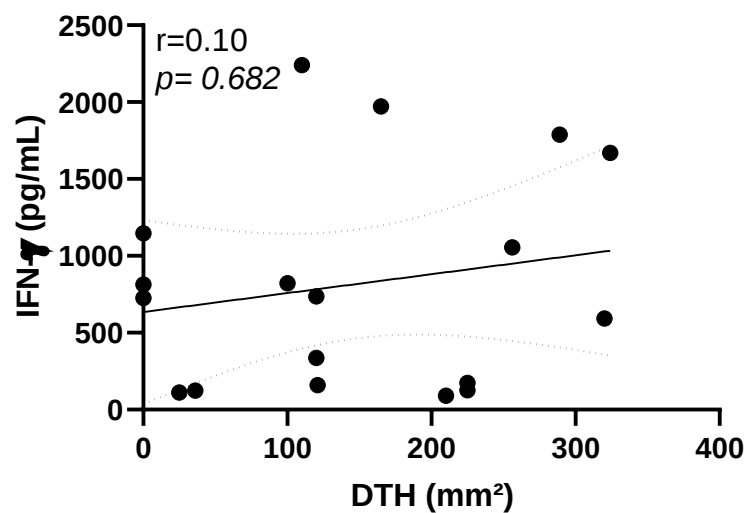
VI.6.1 CORRELAÇÃO ENTRE DTH E PRODUÇÃO DE IFN- γ EM INDIVÍDUOS SUB CLÍNICOS



FREQUÊNCIA	
DTH (+) + IFN- γ (+)	77,80%
DTH (-) + IFN- γ (+)	22,00%

Figura 11: Correlação entre a produção de IFN- γ e DTH em indivíduos subclínicos. Foi utilizada a correlação de Spearman através do programa GraphPad Prism 8.0.1.

VI CORRELAÇÃO ENTRE DTH E IFN- γ EM PACIENTES COM LC



FREQUÊNCIA	
DTH (+) + IFN- γ (+)	83,00%
DTH (+) + IFN- γ (-)	16,6%