



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA VITÓRIA MOTA DA COSTA

**EFEITOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

Salvador

2024

MARIA VITÓRIA MOTA DA COSTA

**EFEITOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Escola Bahiana de  
Medicina e Saúde Pública, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dra. Camila Indiani de  
Oliveira

Salvador

2024

*Dedico o presente trabalho a meu pai e  
minha mãe que fizeram o possível e o  
impossível para que hoje eu possa  
apresentá-lo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica concedida. A minha orientadora, Dra. Camila Indiani que sempre foi uma inspiração, ensinando com paciência e dedicação, obrigada por me orientar nesse mundo da pesquisa científica. Ao meu coorientador Dr. Pedro Brito que esteve sempre perto, ensinando e motivando. Ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael, Dr. Bruno Solano, Dra. Zaquer Ferro e Dra. Juliana Perrone pela colaboração no projeto. Aos colegas e amigos do LPCT-Fiocruz que me acompanharam e ajudaram em diversos momentos. Agradeço principalmente a minha família, que sempre me incentivou a estudar, meu pai João e minha mãe Cláudia, obrigada por todos os sacrifícios e incentivos que fizeram para que hoje, depois de tantos anos, esse trabalho seja apresentado, nada seria possível sem o auxílio de vocês. Agradeço aos amigos e ao meu namorado que sempre me apoiaram e me escutaram, com vocês essa trajetória se tornou mais leve, obrigada por estarem comigo nos momentos que mais precisei.

Artigo científico

**EFEITOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

**EFFECTS OF EXTRACELLULAR VESICLES DERIVED FROM HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS IN LOCALIZED CUTANEOUS LEISHMANIASIS**

Maria Vitória Mota da Costa<sup>1</sup>, Dr. Pedro Brito Borba<sup>2</sup> e Dra. Camila Indiani de Oliveira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

<sup>2</sup>Instituto Gonçalo Moniz – IGM, Fiocruz – BA

Autor correspondente: Camila Indiani de Oliveira, graduada em ciências biológicas e doutora em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) pela Universidade de São Paulo (2000). Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Silveira Martins, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil. Telefone para contato: (71) 99979-7176. E-mail para contato: [cioliveira@bahiana.edu.br](mailto:cioliveira@bahiana.edu.br)

## RESUMO

As leishmanioses, grupo de doenças causadas pelas espécies de *Leishmania*, são consideradas doenças tropicais negligenciadas e dentre suas formas clínicas, a leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a mais comum, que se caracteriza pela presença de uma úlcera com bordas espessas e fundo necrótico. O tratamento atual é feito pela administração intramuscular ou intravenosa de antimoniato de meglumina que apresenta alta toxicidade e muitos efeitos colaterais, assim surge a necessidade de desenvolver melhores terapias. Vesículas extracelulares (EVs) são estruturas liberadas pelas células tronco mesenquimais que possuem características de imunomodulação e reparo tecidual. Neste trabalho, usamos as EVs derivadas de células tronco mesenquimais do cordão umbilical humano para avaliar a capacidade de imunomodulação e cicatrização na LCL causada por *Leishmania braziliensis*. Avaliamos os efeitos através da infecção intradérmica na orelha esquerda e tratamento intravenoso com as hUMSCs-EVs em camundongos BALB/c, medindo a espessura da orelha, avaliando a carga parasitária e realizando ELISA para determinar o perfil de citocinas produzidos 3 semanas após o tratamento. Nós mostramos que o tratamento intravenoso com EVs reduz significativamente o tamanho da lesão em camundongos BALB/c em relação ao grupo controle, que não foi tratado, porém não modula a resposta imunológica e, também, não altera a carga parasitária. Nossos resultados mostram que essa terapia intravenosa com EVs pode melhorar a recuperação tecidual na LCL causada por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; vesículas extracelulares; lesão da pele; tratamento

## ABSTRACT

Leishmaniasis, a group of diseases caused by *Leishmania* species, are considered neglected tropical diseases and among its clinical forms, localized cutaneous leishmaniasis (LCL) is the most common, which is characterized by the presence of an ulcer with thick edges and a necrotic base. Current treatment is done by intramuscular or intravenous administration of meglumine antimoniate, which has high toxicity and many side effects, thus arising the need to develop better therapies. Extracellular vesicles (EVs) are structures released by mesenchymal stem cells that have characteristics of immunomodulation and tissue repair. In this work, we used EVs derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells to evaluate the immunomodulatory and healing capacity in LCL caused by *Leishmania braziliensis*. We evaluated the effects of intradermal infection in the left ear and intravenous treatment with hUMSCs-EVs in BALB/c mice, measuring ear thickness, evaluating parasite load and performing ELISA to determine the cytokine profile produced 3 weeks after treatment. We showed that intravenous treatment with EVs significantly reduces lesion size in BALB/c mice compared to the untreated control group, but does not modulate the immune response and also does not alter the parasite load. Our results show that this intravenous therapy with EVs can improve tissue recovery in LCL caused by *L. braziliensis*.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; extracellular vesicles; skin lesion; treatment

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3. RESULTADOS .....	11
4. DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	16
6. REGRAS PARA SUBMISSÃO.....	19

## 1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania* e são transmitidas vetorialmente pela picada de fêmeas do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. As leishmanioses podem se apresentar de duas formas clínicas em humanos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), sendo que as formas clínicas dependem da espécie de *Leishmania*. Considerada como uma doença tropical negligenciada, a leishmaniose é endêmica em 89 países, incluindo o Brasil<sup>1</sup>, que em 2021 apresentou 15.023 casos de LT<sup>2</sup>. Na LT, a leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a manifestação clínica mais comum e se apresenta sob a forma de uma úlcera com bordas espessas e fundo necrótico. Dentre as espécies causadoras da LCL, a *Leishmania braziliensis* é a que tem maior importância médica no Brasil, sendo a espécie que predominantemente causa essa forma clínica, com distribuição ampla no país<sup>3</sup>.

Para combater o parasita, o sistema imunológico reage com uma resposta do tipo T helper 1 (Th1), que se caracteriza por ser pró-inflamatória, com a produção de citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF. Essa resposta é necessária para que os macrófagos sejam ativados e possam eliminar os parasitas intracelulares<sup>4</sup>. Porém, ela não é suficiente para eliminar todos os parasitas e essa persistência da *Leishmania* contribui para a exacerbação da LCL<sup>5</sup> que com elevados níveis de IFN- $\gamma$  e TNF contribuem para o dano tecidual, surgindo, então, as úlceras características da doença<sup>6</sup>.

O tratamento da leishmaniose enfrenta atualmente vários desafios, seja por sua toxicidade, resistência aos fármacos, efeitos colaterais ou seus altos custos<sup>7</sup>. Na América Latina, o tratamento de primeira escolha da LC envolve o uso de antimoniato de meglumina (Sb<sup>V</sup>), que possui uma janela terapêutica estreita, com alta toxicidade<sup>8</sup>. O tratamento é de difícil administração por ser aplicado via intramuscular ou intravenosa e está associado a uma alta taxa de falha, com aumento da resistência do parasita ao fármaco<sup>9</sup>. As drogas de segunda linha incluem Pentamidina e Anfotericina B (AmB). A AmB é usada como tratamento para leishmaniose desde a década de 1960, apresentando alta eficácia, mas também alta toxicidade, sendo necessária a internação do paciente e, da mesma forma, já há relatos de resistência ao AmB na Índia e na França<sup>8</sup>. A pentamidina é utilizada nas Américas no tratamento da LT, porém esse fármaco não é muito eficaz e está associado a diversos efeitos colaterais graves<sup>10</sup>. Dessa forma, faz-se necessário buscar alternativas que complementem a terapêutica atual.

Como uma resposta inflamatória exacerbada está associada a patogênese da leishmaniose, um tratamento baseado na imunomodulação pode ser benéfico para o paciente<sup>6</sup>. As células tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes adultas que possuem a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares, elas podem ser isoladas de vários tecidos, como o cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, placenta e polpa dentária<sup>11</sup>. As MSCs têm mostrado um grande potencial para a terapia celular, com atividades imunomoduladoras, de reparo tecidual, quimioatração e angiogênese<sup>12</sup>. Estudos recentes indicam que os efeitos terapêuticos observados nas MSCs são mediados por ação parácrina através das vesículas extracelulares (EVs)<sup>13</sup>, estruturas envoltas por membrana liberadas pelas MSCs e cujo interior é composto por citocinas, proteínas, lipídios e miRNAs<sup>14</sup>. Após serem liberadas no espaço extracelular, as EVs influenciam na sinalização celular e podem regular diversos processos, incluindo a resposta imunológica<sup>15</sup>.

As EVs derivadas de células mesenquimais do cordão umbilical humano (hUCMSC-EVs) podem regular a ativação, a proliferação e a diferenciação dos linfócitos B e suprimir a proliferação dos linfócitos T, além de ativarem as células T reguladoras, controlando a inflamação<sup>16</sup>. Em um modelo de fibrose, foi mostrado que as EVs derivadas de hUCMSC reduzem o estado inflamatório ao induzir a polarização dos macrófagos para o tipo M2<sup>17</sup>, que secreta IL-10, arginase e fator de crescimento transformador beta (TGF)- $\beta$ , suprimindo a

resposta inflamatória e induzindo a cicatrização<sup>18</sup>. Além da capacidade de imunomodulação, as EVs derivadas de hUCMSC estão associadas ao reparo tecidual de feridas, acelerando o processo de cicatrização, promovendo a função endotelial e induzindo angiogênese<sup>16</sup>. Dessa forma, as características biológicas das EVs, como a baixa imunogenicidade, alta estabilidade, além da sua capacidade de atravessar as barreiras do organismo fazem com que elas tenham um potencial para aplicações terapêuticas<sup>19</sup>.

Diante do apresentado acima, nossa hipótese é que as EVs derivadas de hUCMSCs modulam a resposta imune, diminuindo a resposta inflamatória e acelerando a recuperação tecidual na LCL causada por *L. braziliensis*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas de idade, foram obtidos do biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM). Todos os animais foram mantidos em condições livres de patógenos e foram utilizados para experimentação de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Uso de Animais de Experimentação (CEUA-IGM/FIOCRUZ, 013/2022).

### 2.2 Vesículas extracelulares derivadas de hUC-MSCs

As EVs derivadas de hUC-MSCs foram isoladas do tecido do cordão umbilical humano de um doador único no Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael (HSR), de acordo com o protocolo descrito em ZAQUER SUZANA MUNHOZ COSTA-FERRO *et al.* (2024)<sup>20</sup>.

### 2.3 Cultura de parasitas

Parasitas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01BA788) (de Moura *et al.*, 2005) e *L. braziliensis* GFP LUC (Sharma *et al.*, 2020) foram cultivadas em meio Schneider (LGC) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (Cripion), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 ml/ml (Todos da Sigma) a 26°C.

### 2.4 Infecção *in vivo*

Foram realizados dois experimentos de infecção de camundongos BALB/C com *L. braziliensis*. No primeiro experimento, utilizamos três grupos, grupo controle infectado e não tratado, grupo tratado com uma dose de hUMSCs-EVS e outro grupo tratado com duas doses, de camundongos, cada grupo com n=6 e no segundo experimento, utilizamos dois grupos, grupo controle infectado e não tratado e o grupo tratado com uma dose de hUMSCs-EVS, cada um com n=8. Esses animais foram inoculados com promastigotas de *L. braziliensis* (10<sup>5</sup> em 10ul de PBS), na derme da orelha esquerda, utilizando seringa de insulina.

### 2.5 Tratamento com EVs

No primeiro experimento, cinco semanas após a infecção, os camundongos (n= 6) foram tratados com EVs, (60 µg/ml em 100 µL) por via intravenosa, uma única vez. Os animais foram acompanhados durante 8 semanas e a lesão foi mensurada com um paquímetro digital, semanalmente. Um segundo grupo de camundongos (n=6) recebeu a segunda dose de EVs na

semana subsequente. Os animais foram acompanhados semanalmente e as lesões foram medidas com um paquímetro digital. Os animais controle (n=6) não receberam nenhum tratamento. No segundo experimento, os animais (n=8) foram tratados com EVs, (60 µg/ml em 100 µL) por via intravenosa, uma única vez. Os animais controle (n=8) não receberam nenhum tratamento. Os animais foram acompanhados por 6 semanas e a lesão foi mensurada com um paquímetro digital, semanalmente.

## 2.6 Avaliação da carga parasitária

Seis semanas após a infecção e 3 semanas após o tratamento com EVs, os animais foram eutanasiados para a determinação da carga parasitária na orelha e linfonodo de drenagem (dLN) por meio do ensaio de diluição limitante. Brevemente, orelha e o dLN foram retirados assepticamente e homogeneizados em meio Schneider 10%. A partir deste homogeneizado inicial foram realizadas oito diluições seriadas de 1:10, as quais foram aplicadas em placas de 96 poços contendo meio Schneider, com três replicadas para cada diluição. As placas foram incubadas a 26°C por uma semana, e o número de parasitas viáveis foi determinado pela máxima diluição na qual foram encontrados.

## 2.7 Avaliação da resposta celular

A resposta imune celular foi analisada no dLN. Os animais foram eutanasiados como descrito acima para a coleta do dLNs. Os dLNs foram macerados para a obtenção de uma suspensão celular. As células foram ressuspendidas e reestimuladas com antígeno solúvel de leishmania (SLA) em meio RPMI 1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 10% de soro bovino fetal inativado e 0.05 M 2-mercaptoetanol. As células foram cultivadas na concentração de  $5 \times 10^6$ /mL, em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado 48h depois para a dosagem de citocinas (IL-10, IL-6, IL-12p70 e TNFα), por meio da técnica de ELISA, utilizando-se kits comerciais.

## 2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism (V.10.0). O teste Mann Whitney foi utilizado para comparação de dois grupos independentes e Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais grupos independentes. Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média e um valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

# 3. RESULTADOS

## 3.1 O tratamento com uma dose de hUMSCs-EVs controla o desenvolvimento da lesão, mas não altera a carga parasitária

Inicialmente avaliamos o efeito de diferentes doses do tratamento com hUMSCs-EVs em camundongos infectados com *L. braziliensis*. Para isso, os animais foram infectados com parasitas por via intradérmica. Cerca de cinco semanas após a infecção, um grupo de animais recebeu uma dose de EVs e outro grupo de animais recebeu duas doses de EVs, separadas por uma semana entre cada dose. Como mostrado na Figura 1A, não observamos diferenças significativas comparando os grupos tratados com uma dose ou com duas doses de EVs, em relação ao grupo controle. Dessa forma, o tratamento com EVs, por via endovenosa não mostrou efeito de dose dependência quanto ao desenvolvimento da lesão. Porém, observamos

que o grupo tratado com uma dose apresentou, sem diferença estatística, uma espessura média de orelha inferior à encontrada no grupo controle e ao grupo tratado com duas doses, como pode ser observado na Figura 1B, que representa um cálculo de cura relativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle. Com mostrado na Figura 1B, o grupo tratado com uma dose de EVs apresentou uma cura relativa de cerca de 50% ao controle que não recebeu tratamento.

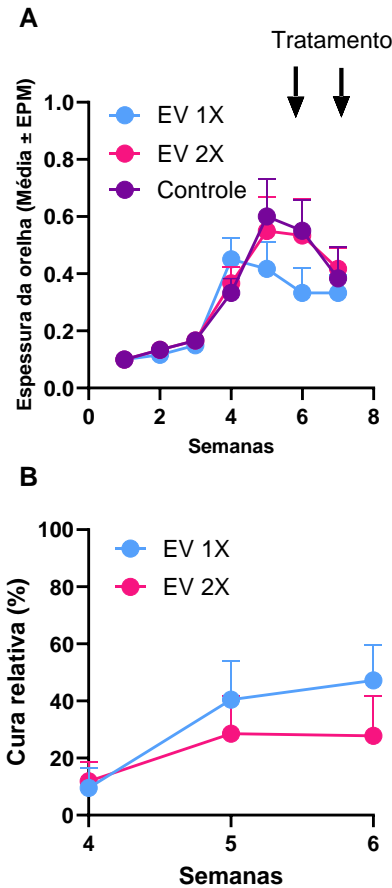


Figura 1: Efeito das hUMSCs-EVs no desenvolvimento da lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com uma ou duas doses de hUMSC-EVs. As lesões foram medidas semanalmente com um paquímetro digital. (A) Medida da lesão. (B) Cura relativa. Os dados mostrados são representativos de um experimento realizado com N = 6 animais. Os valores mostram a média ± erro padrão da média.

O experimento de tratamento (Figura 1A) foi repetido com o intuito de comprovar o efeito do tratamento com uma dose de EVs. Como mostrado na Figura 2A, neste segundo experimento, observamos uma diferença significativa na espessura da orelha dos animais tratados na semana seis em comparação ao grupo controle, três semanas após o tratamento ( $p < 0,05$ ). Além disso foi possível observar que a recuperação tecidual foi significativamente maior no grupo tratado, como mostrado na Figura 2B. A Figura 2B mostra a diferença encontrada entre a semanas do tratamento e a semana dois, considerada a de início do aparecimento da lesão, a fim de avaliar melhor a progressão da lesão. Esses resultados indicam que a terapia com uma dose de hUMSCs-EVs é capaz de modular o desenvolvimento da lesão em animais infectados com *L. braziliensis*.

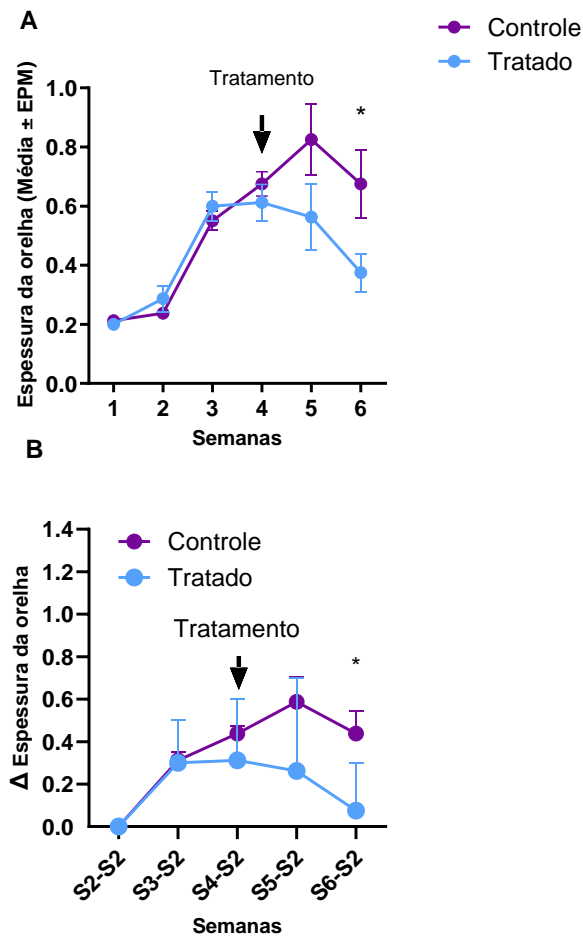


Figura 2: Efeito das hUMSCs-EVs no desenvolvimento da lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com uma dose de hUMSC-EVs. As lesões foram medidas semanalmente com um paquímetro digital. (A) Medida da lesão. (B) Delta da progressão da lesão, cálculo realizado subtraindo a média da espessura da orelha de cada semana com a semana dois, semana que os animais começaram a apresentar lesão tecidual. Os dados mostrados são representativos de um experimento realizado com N = 8 animais. Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ .

Em paralelo, avaliamos a carga parasitária dos animais infectados e tratados com EVs. Assim, na sexta semana após a infecção foi realizada a eutanásia dos camundongos para a retirada da orelha e do linfonodo de drenagem. Os tecidos foram macerados e foi realizado o ensaio de diluição limitante a fim de quantificar os parasitas viáveis. Como mostrado na Figura 3, não encontramos diferenças significativas na carga parasitária, comparando a orelha (Figura 3A) e o linfonodo (Figura 3B). Dessa forma, o tratamento com as EVs modulou o desenvolvimento da lesão, mas não alterou a carga parasitária.

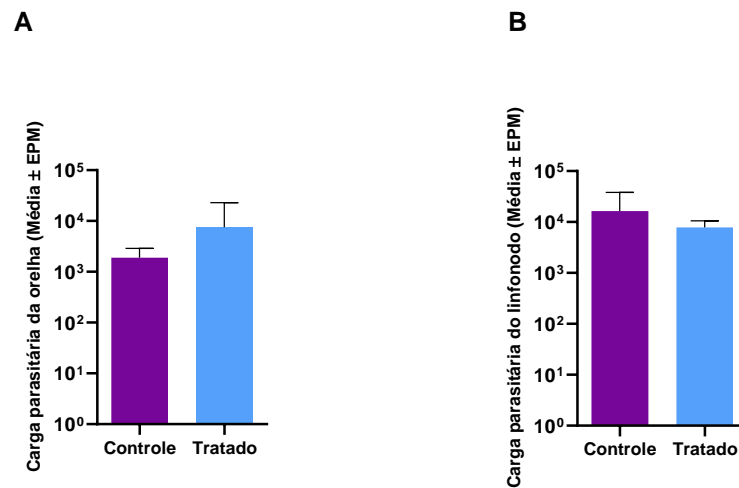


Figura 3: Efeito das hUMSCs-EVs na carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Avaliação da carga parasitária na (A) orelha e (B) linfonodo de drenagem. Os dados mostrados são representativos de um experimento realizado com oito animais. Os valores mostram a média ± erro padrão da média.

### 3.2 Camundongos tratados com hUMSCs-EVs não apresentaram mudança no perfil de citocinas produzidas

Considerando o efeito anti-inflamatório descrito na literatura sobre as hUMSC-EVs, avaliamos a resposta imunológica dos animais tratados. Na sexta semana após a infecção avaliamos a produção de citocinas nos animais tratados, a partir de cultura de células reestimuladas do linfonodo de drenagem. Como mostrado na Figura 4, não observamos diferenças significativas na produção das citocinas avaliadas (A) TNF, (B) IL-12p70, (C) IL-6 e (D) IL-10. Dessa forma, o tratamento intravenoso de hUMSCs-EVs modula o desenvolvimento da lesão, não modifica a carga parasitária e não induz uma modulação na resposta celular.

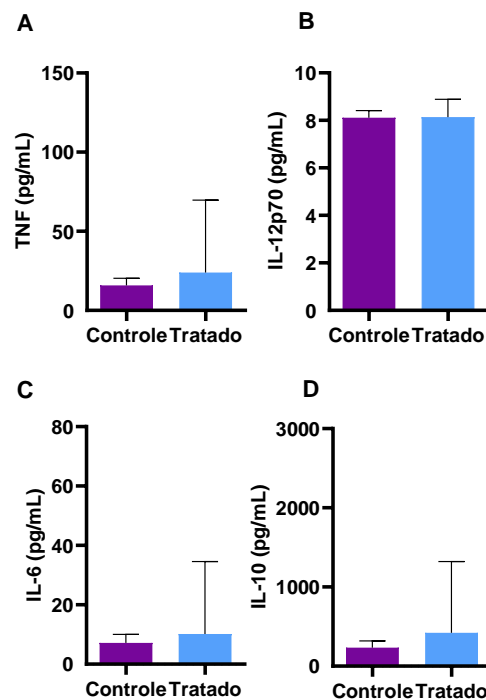


Figura 4: Efeito das hUMSCs-EVs na produção de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Seis semanas após a infecção, os linfonodos foram cultivados na presença de SLA para a determinação da produção de citocinas. As concentrações de (A) TNF, (B) IL-12p70, (C) IL-6 e (D) IL-10 foram determinadas por ELISA. Os dados mostrados são representativos de um experimento realizado com N = 8 animais. Os valores mostram a média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4. DISCUSSÃO

Considerando a patogênese da leishmaniose cutânea localizada, o desenvolvimento de um tratamento que seja capaz de eliminar o parasita, controlar a resposta imunológica e que seja de fácil aplicação será extremamente benéfico para o paciente. As EVs, de modo geral, têm sido avaliadas como tratamento de doenças inflamatórias e de ferimentos na pele, principalmente por conta de sua capacidade de modular a resposta imunológica<sup>14</sup>. As hUMSCs-EVs têm ação imunomoduladora uma vez que foi demonstrado que elas são capazes de reduzir a inflamação em doenças como nefrite lúpica<sup>21</sup>, doença pulmonar obstrutiva crônica<sup>22</sup>, osteoartrite<sup>23</sup> e lúpus<sup>24</sup>. Além da ação imunomoduladora, as EVs apresentam também ação regenerativa, remodelando e promovendo a recuperação da epiderme e da derme, além de promover a angiogênese em modelo de feridas causadas pela diabetes<sup>25</sup>. Dessa forma, como a LCL é uma doença inflamatória associada a uma lesão tecidual investigamos os efeitos das hUMSCs-EVs nessa doença parasitária.

Nesse estudo, mostramos que camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e tratados com hUMSCs-EVs por via intravenosa apresentaram uma recuperação tecidual melhor e com lesões significativamente menores em comparação ao grupo controle. No contexto da LC, não há estudos que utilizem as hUMSCs-EVs como tratamento, porém, nossos dados de progressão de lesão estão de acordo com estudos que utilizaram as células tronco mesenquimais em infecções causadas por outras espécies. No estudo de Navard *et al.* 2020<sup>26</sup>, a aplicação de MSCs obtidas da medula óssea reduziu de forma significativa a lesão causada pela *L. major* e no estudo de Ramos *et al.*, 2020<sup>27</sup>, a administração de MSCs obtidas do tecido adiposo também reduziu de forma significativa o tamanho da lesão causada pela *L. amazonensis* nos

camundongos tratados. No entanto, o tratamento não foi capaz de reduzir a carga parasitária em nenhum dos dois estudos, assim como no nosso. No nosso estudo, o tratamento intravenoso com hUMSCs-EVs não modulou a resposta imunológica, ou seja, não modificou a resposta imune, testada a partir da re-estimulação de células obtidas do linfonodo de animais infectados e tratados. Por outro lado, nos estudos realizados com MSCs obtidas do tecido adiposo, os autores observaram que na infecção por *L. amazonensis*, houve um aumento significativo na produção de IL-10 nos camundongos tratados em relação ao grupo controle<sup>27</sup>. Já na infecção por *L. major*, houve um aumento significativo de IFN- $\gamma$  nos camundongos tratados, enquanto o grupo controle apresentou um aumento de IL-10<sup>28</sup>. Isso pode ser explicado pelas características da infecção de cada espécie nas linhagens de camundongos. Em Ramos *et al.* (2020)<sup>27</sup>, os autores utilizaram camundongos da linhagem C57BL/6, os quais, quando infectados por *L. amazonensis* apresentam uma demora no desenvolvimento da resposta pró-inflamatória. Já os camundongos BALB/c, quando infectados com *L. major* são susceptíveis à infecção e apresentam um perfil de resposta Th2<sup>29</sup>. Assim, no estudo de Zanganeh *et al.*, (2020)<sup>28</sup>, o uso de MSCs foi capaz de modular a resposta para que o animal fosse capaz de eliminar o parasita, reduzindo a produção de IL-10. Possivelmente, a via de administração usada no nosso estudo não favoreceu a distribuição de EVs para o sítio de infecção, não sendo observados os efeitos de imunomodulação como nos artigos supracitados.

Anteriormente, foi demonstrado que as EVs utilizadas, derivadas de MSCs do cordão umbilical, se apresentam, após administração intravenosa, em maior concentração no fígado, baço e pulmões, assim como a análise proteômica demonstrou que em seu conteúdo há proteínas que estão envolvidas em diversos processos patológicos, relacionados com angiogênese, resposta imunológica, reparo de feridas, diferenciação de células e resposta à adesão célula-matriz de citocinas<sup>20</sup>. Assim, especulamos que a falta de imunomodulação que observamos pode ser devido à baixa presença de EVs na orelha dos camundongos, local de infecção. No entanto, embora não tenhamos observado este efeito, vimos um menor tamanho da lesão, indicando o potencial deste tratamento. Dessa forma, com os resultados encontrados, estudamos a possibilidade de um tratamento tópico, agindo diretamente no local da lesão.

## 5. CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos que o tratamento intravenoso com hUMSCs-EVs é eficaz na modulação do desenvolvimento da lesão em camundongos infectados com *L. braziliensis*, mostrando um potencial de tratamento. No entanto, esse tratamento não alterou a carga parasitária nem induziu mudanças significativas no perfil de citocinas produzidas, destacando então a necessidade de investigar vias alternativas de administração. Dessa forma, iniciamos estudos com um novo modelo de aplicação tópico, direcionando as EVs para o sítio da lesão. Os resultados desse estudo poderão contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para a leishmaniose cutânea, proporcionando uma terapia mais eficiente e segura para os pacientes.

## REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde. Vigilância global da leishmaniose: 2019–2020, uma linha de base para o roteiro de 2030 [Internet]. www.who.int. 2021. Disponível a partir de: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>

2. Organização Pan-Americana da Saúde. Relatório Epidemiológico das LEISHMANIOSES na Região das Américas. Disponível online: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56831/PAHOCDEVT220021\\_en\\_g.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56831/PAHOCDEVT220021_en_g.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
3. Linton, Vilas S, Cristina A. Análise comparativa da distribuição geográfica do espectro histopatológico e das espécies de *Leishmania* da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1º de junho de 2012; 87(3):369–74.
4. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Citocinas pró e anti-inflamatórias na leishmaniose cutânea: uma revisão. *Patógenos e Saúde Global* [Internet]. 1º de setembro de 2016 [citado 19 de maio de 2020]; 110(6):247–60. Disponível a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070640/>
5. Carvalho AM, Bacellar O, Carvalho EM. Proteção e patologia na infecção por *Leishmania braziliensis*. *Patógenos*. 2022; 11(4):466. Publicado em 14 de abril de 2022. DOI:10.3390/pathogens11040466
6. Carvalho AM, Novais FO, Paixão CS, et al. A glibenclamida, um inibidor de NLRP3, diminui a resposta inflamatória e é candidata a reduzir a patologia na infecção por *Leishmania braziliensis*. *J Invest Dermatol*. 2020; 140(1):246-249.e2. DOI:10.1016/j.jid.2019.05.025
7. Leishmaniose Tegumentar: Uma Revisão Narrativa Atualizada de 2022 sobre Desenvolvimentos de Diagnóstico e Tratamento. *Am J Clin Dermatol*. 2022; 23(6):823-840. DOI:10.1007/s40257-022-00726-8
8. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, et al. Resistência a medicamentos e falha no tratamento da leishmaniose: um desafio do século 21. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(12):e0006052. Publicado em 14 de dezembro de 2017. DOI:10.1371/journal.pntd.0006052
9. de Vries, H. J. C., & Schallig, H. D. (2022). Leishmaniose Tegumentar: Uma Revisão Narrativa Atualizada de 2022 sobre Desenvolvimentos de Diagnóstico e Tratamento. *Revista americana de dermatologia clínica*, 23(6), 823–840. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>
10. Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniose: prevenção, detecção e tratamento de parasitas. *Química Medicinal Atual* [Internet]. 2012 [citado 2020 ago 21]; 19(10):1443–74. Disponível a partir de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22360481/>
11. Da Silva Meirelles L. As células-tronco mesenquimais residem em praticamente todos os órgãos e tecidos pós-natais. *Jornal de Ciência Celular*. 9 de maio de 2006; 119(11):2204–13.
12. Margiana R, Markov A, Zekiy AO, et al. Aplicação clínica de células-tronco mesenquimais em medicina regenerativa: uma revisão narrativa. *Células-tronco res*. 2022; 13(1):366. Publicado em 28 de julho de 2022. DOI:10.1186/s13287-022-03054-0
13. Baek G, Choi H, Kim Y, Lee H, Choi C. Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais como terapêutica e como plataforma de entrega de medicamentos. *CÉLULAS-TRONCO Medicina Translacional*. 2019 2 de maio;
14. Dabrowska S, Andrzejewska A, Janowski M, Lukomska B. Efeitos imunomoduladores e regenerativos de células-tronco mesenquimais e vesículas

- extracelulares: perspectivas terapêuticas para doenças inflamatórias e degenerativas. *Fronteiras em Imunologia*. 5 de fevereiro de 2021;11.
15. Shao S, Fang H, Li Q, Wang G. Extracellular vesicles in Inflammatory Skin Disorders: from Pathophysiology to Treatment. *Theranostics*. 2020;10(22):9937–55.
  16. Ferreira ADF, Gomes DA. Vesículas extracelulares de células-tronco no reparo da pele. *Bioengenharia (Basileia)*. 2018; 6(1):4. Publicado em 30 de dezembro de 2018. DOI:10.3390/bioengenharia6010004
  17. Li T, Yan Y, Wang B, et al. Os exossomos derivados de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano aliviam a fibrose hepática. *Desenvolvimento de células-tronco*. 2013; 22(6):845-854. DOI:10.1089/scd.2012.0395
  18. Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Polaridade de macrófagos e controle de doenças. *Int J Mol Sci*. 2021; 23(1):144. Publicado em 23 de dezembro de 2021. DOI:10.3390/ijms23010144
  19. Ding JY, Chen MJ, Wu LF, et al. Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais na cicatrização de feridas cutâneas: papéis, oportunidades e desafios. *Mil Med Res*. 2023; 10(1):36. Publicado em 17 de agosto de 2023. DOI:10.1186/S40779-023-00472-W
  20. Costa-Ferro ZSM, Rocha GV, da Silva KN, et al. Vesículas extracelulares compatíveis com GMP derivadas de células estromais mesenquimais do cordão umbilical: fabricação e avaliação pré-clínica no tratamento da SDRA. *Citoterapia*. 2024; 26(9):1013-1025. DOI:10.1016/j.jcyt.2024.04.074
  21. Hou L, Zhu Z, Jiang F, et al. As vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano aliviaram a inflamação pulmonar induzida pela sílica e a fibrose em camundongos por meio do eixo circPWWP2A / miR-223-3p / NLRP3. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2023;251:114537. DOI:10.1016/j.ecoenv.2023.114537
  22. Ridzuan N, Zakaria N, Widera D, et al. As vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano melhoram a inflamação das vias aéreas em um modelo de rato de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). *Células-tronco Res Ther*. 2021; 12(1):54. Publicado em 12 de janeiro de 2021. DOI:10.1186/s13287-020-02088-6
  23. Zhou H, Shen X, Yan C, et al. Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano aliviam a osteoartrite do joelho em camundongos interagindo com METTL3 para reduzir m6A de NLRP3 em macrófagos. *Células-tronco Res Ther*. 2022; 13(1):322. Publicado em 16 de julho de 2022. DOI:10.1186/s13287-022-03005-9
  24. Sun W, Yan S, Yang C, et al. Exossomos derivados de células-tronco mesenquimais melhoram o lúpus induzindo a polarização de macrófagos M2 e a expansão de células T reguladoras em camundongos MRL / lpr. *Immunol Invest*. 2022; 51(6):1785-1803. DOI:10.1080/08820139.2022.2055478
  25. Wei Q, Wang Y, Ma K, et al. Vesículas extracelulares de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano facilitam a cicatrização de feridas diabéticas por meio do aprimoramento da angiogênese mediado por MiR-17-5p. *Células-tronco Rev Rep*. 2022; 18(3):1025-1040. DOI:10.1007/s12015-021-10176-0

26. Navard SH, Rezvan H, Haddad MHF, Ali SA, Nourian A, Eslaminejad MB, et al. Efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais nas lesões de leishmaniose cutânea causadas por *Leishmania major*. *Jornal de Resistência Antimicrobiana Global* [Internet]. 1 dez 2020 [citado 19 fev 2024]; 23:243–50. Disponível a partir de:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716520302368?via%3Dihub>
27. Ramos TD, Silva JD, da Fonseca-Martins AM, et al. A terapia combinada com células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo e antimoniato de meglumina controla o desenvolvimento da lesão e a carga parasitária na leishmaniose cutânea murina causada por *Leishmania amazonensis*. *Células-tronco Res Ther*. 2020; 11(1):374. Publicado em 31 de agosto de 2020. DOI:10.1186/S13287-020-01889-Z
28. Zanganeh E, Soudi S, Zavarán Hosseini A. A injeção intralesional de células-tronco mesenquimais de camundongo reduz a produção de IL-10 e a carga parasitária em camundongos BALB/c infectados por *L. major*. *Célula J*. 2020; 22(Suppl 1):11-18. DOI:10.22074/cellj.2020.6838
29. Netto MB. O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *Gazeta Médica da Bahia*. 2005 Jan 1; 74(1).

## REVISTA CIENTÍFICA: Cadernos de Saúde Pública

Link regras para submissão: [Instrução para autores | Cadernos de Saúde Pública \(fiocruz.br\)](#)

Artigo: resultado de pesquisa de natureza empírica (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações). Dentro dos diversos tipos de estudos empíricos, apresentamos dois exemplos: artigo de pesquisa etiológica na epidemiologia (Editorial 37(5)) e artigo utilizando metodologia qualitativa;

2.1. CSP publica somente artigos inéditos e originais, e que não estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico o artigo será desconsiderado. A submissão simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.

2.2. Não há taxas para submissão e avaliação de artigos.

2.3. Serão aceitas contribuições em Português, Inglês ou Espanhol.

2.4. Notas de rodapé, de fim de página e anexos não serão aceitos.

2.5. A contagem de palavras inclui somente o corpo do texto e as referências bibliográficas, conforme item 2.12 (Passo a Passo).

2.6. Todos os autores dos artigos aceitos para publicação serão automaticamente inseridos no banco de consultores de CSP, se comprometendo, portanto, a ficar à disposição para avaliarem artigos submetidos nos temas referentes ao artigo publicado.

2.7. Serão aceitos artigos depositados em servidor de *preprint*, previamente à submissão a CSP ou durante o processo de avaliação por pares. É necessário que o autor informe o nome do servidor e o DOI atribuído ao artigo por meio de formulário específico

(contatar [cadernos@fiocruz.br](mailto:cadernos@fiocruz.br)). NÃO recomendamos a publicação em servidor de *preprint* de artigo já aprovado.

4.1. Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

4.2. Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

4.3. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

5.1. Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

6.1. Devem ser especificadas quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

6.2. Lembramos que os critérios de autoria devem basear-se nas deliberações do ICMJE, que determina o seguinte: o reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1. Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação final da versão a ser publicada. 4. Ser responsável por todos os aspectos do trabalho na garantia da exatidão e integridade de qualquer parte da obra. Essas quatro condições devem ser integralmente atendidas.

6.3. Todos os autores deverão informar o número de registro do ORCID no cadastro de autoria do artigo. Não serão aceitos autores sem registro.

6.4. Os autores mantêm o direito autoral da obra, concedendo à publicação CSP o direito de primeira publicação, conforme a Licença Creative Commons do tipo atribuição BY (CC-BY).

6.5. Recomendamos a leitura do Editorial 34(11) que aborda as normas e políticas quanto à autoria de artigos científicos em CSP.

8.1. As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (p. ex.: Silva <sup>1</sup>). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos. Não serão aceitas as referências em nota de rodapé ou fim de página

8.2. Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).

8.3. No caso de usar algum software de gerenciamento de referências bibliográficas (p. ex.: EndNote), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.

9.1. Devem ser observadas as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

