



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
CAIO MARQUES LANDEIRO TORRES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO
CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA
BRAZILIENSIS***

SALVADOR

2024

CAIO MARQUES LANDEIRO TORRES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO
CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA
BRAZILIENSIS***

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^a Dr.^a Camila Indiani de
Oliveira

SALVADOR

2024

CAIO MARQUES LANDEIRO TORRES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO
CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA INFECCÃO POR *L. BRAZILIENSIS* IN
VITRO**

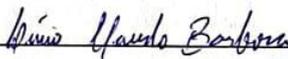
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador, 1 de novembro de 2024.

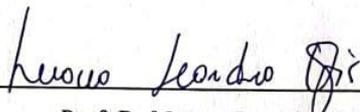
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Camila Indiani de Oliveira
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Lúcio Macedo Barbosa
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof.ª Dr.ª Luana Leandro Gois
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha avó, Luzenita Marques Landeiro, por sempre acreditar no meu potencial e por ser uma fonte constante de inspiração, força e coragem. Sua fé em mim foi um pilar fundamental ao longo de toda a minha jornada, e tenho plena certeza de que, sem o seu apoio, eu não teria conseguido alcançar este patamar.

Agradeço também ao meu avô, Paulo, cuja dedicação ao meu aprendizado desde a infância me proporcionou as bases necessárias para o meu crescimento. Sua orientação e sabedoria sempre foram valiosas para mim. Por fim, quero agradecer à minha mãe, Paula, por sua torcida incansável e por estar sempre ao meu lado, oferecendo amor e amparo. Cada um de vocês teve um papel essencial na minha trajetória, e sou eternamente grato por isso.

Agradeço à Professora Camila Indiani de Oliveira pela sua orientação excepcional ao longo da minha iniciação científica e do meu trabalho de conclusão de curso. Sua dedicação, paciência e expertise foram fundamentais para o meu aprendizado e desenvolvimento. Sou profundamente grato por todo o apoio e incentivo, que foram essenciais para a conclusão desta importante etapa da minha jornada.

Agradeço aos meus colegas do laboratório LPCT da Fiocruz-BA, cuja colaboração foi fundamental para o andamento deste projeto. Em especial, ao Doutor Pedro Brito Borba, que supervisionou o desenvolvimento do trabalho com grande dedicação e atenção. Não posso deixar de mencionar minha dupla na iniciação científica, Maria Vitória Mota. Juntos, superamos desafios e aprendemos muito.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos, que foram fiéis companheiros ao longo de toda a graduação. Vocês tornaram essa jornada muito mais leve e divertida, mesmo nos momentos desafiadores. Um agradecimento especial à minha “Família CGN”, Gabriel Alves e Nathália Lise Pinheiro. Nossos momentos de descontração e risadas ficarão eternamente guardados na memória. Tenho certeza de que teremos muitas histórias e piadas internas para compartilhar no futuro.

Muito obrigado!

*O cérebro é mais vasto que o céu
Pois se os pomos lado a lado –
Aquele o outro contém –
Fácil – e a você também –*

Emily Dickinson

RESUMO

Introdução: As Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Na Leishmaniose Cutânea Localizada, ocorre o surgimento de ferida com bordas elevadas e fundo necrótico. No Brasil, a doença é causada principalmente pela espécie *L. braziliensis*, que estimula no hospedeiro uma forte resposta do tipo TCD4⁺ Th1 que, quando desregulada, colabora com a progressão da lesão. Atualmente, o tratamento das leishmanioses enfrenta desafios, devido a sua alta toxicidade. As VEs são nanopartículas que possuem papel fundamental na comunicação intercelular, transportando moléculas bioativas para a célula alvo. Considerando que a resposta imunológica exagerada está ligada à progressão da doença, propomos avaliar o efeito de Vesículas Extracelulares (VEs), derivadas de Células Tronco Mesenquimais (MSCs), na infecção por *Leishmania*. **Objetivos:** Avaliar o efeito de VEs derivadas de MSCs do cordão umbilical humano em macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e em células HaCat *in vitro*. **Métodos:** Para investigar o efeito destas VEs nos macrófagos infectados com *L. braziliensis*, foram feitos experimentos *in vitro* de taxa de infecção, a partir da porcentagem de células infectadas e do número de amastigotas e a avaliação do perfil das células por imunofenotipagem. Nas células HaCat, o efeito foi avaliado por meio de ensaios de cicatrização e migração. **Resultados:** A exposição de células infectadas por *L. braziliensis* às VEs acarreta na diminuição da carga parasitária e no aumento da expressão de moléculas de superfície características do perfil M2. O estímulo de células HaCat com VEs promoveu a cicatrização no ensaio *Scratch* e a migração das células no sistema Transwell. **Conclusão:** O tratamento com as VEs derivadas de MSCs leva à diminuição na carga parasitária, modulação na produção de mediadores imunes e estimula a cicatrização. Estes resultados demonstram que as VEs possuem potencial de aplicação no tratamento da LCL.

Palavras-chave: células tronco mesenquimais; vesículas extracelulares; leishmaniose cutânea localizada; *L. braziliensis*; tratamento.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxa de infecção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com VEs	19
Figura 2 – Intensidade de fluorescência de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com VEs	21
Figura 3 – Cicatrização do rasgo (Scratch) em monocamada de células HaCat após o estímulo com VEs	22
Figura 4 – Migração de células HaCat no sistema Transwell ao longo do tempo após o estímulo com VEs	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-CD86	Anticorpos contra CD86
Anti-CD206	Anticorpos contra CD206
Anti-IL-10	Anticorpos contra IL-10
Anti-TNF	Anticorpos contra TNF
BMDMs	Macrófagos Derivados da Medula Óssea
BSA	Albumina Sérica Bovina
CBTC	Centro de Biotecnologia e Terapia Celular
CEUA	Comitê de Uso de Animais de Experimentação
cGMP	Boas Práticas de Fabricação atuais
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol, dicloridrato
FBS	Soro Bovino Fetal
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HSR	Hospital São Rafael
hUC-MSC	Células Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical humano
hUC-MSC-VEs	Vesículas Extracelulares derivadas de Células Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical humano
IFN-γ	Interferon gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL-1β	Interleucina – 1 beta
IL-6	Interleucina – 6
IL-10	Interleucina – 10
LbWT	<i>Leishmania braziliensis Wild Type</i>
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MSCs	Células Tronco Mesenquimais
MSCs-VEs	Vesículas Extracelulares derivadas de Células Tronco Mesenquimais

MCH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MΦ	Macrófago
NH₄Cl₂	Cloreto de Amônio
NO	Óxido Nítrico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento beta
Th1	Linfócito T helper 1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
VEs	Vesículas Extracelulares

SUMÁRIO

I. ARTIGO CIENTÍFICO	
1	INTRODUÇÃO..... 12
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 15
2.1	Vesículas extracelulares derivadas de células tronco mesenquimais do cordão umbilical humano..... 15
2.2	Animais 15
2.3	Cultura de fibroblastos L929 15
2.4	Obtenção e cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) 16
2.5	Cultura de parasitos 16
2.6	Carga parasitária 16
2.7	Ensaio de imunofluorescência 16
2.8	Cultura de células HaCat..... 17
2.9	Ensaio de cicatrização <i>Scratch</i> 17
2.10	Ensaio de migração Transwell..... 18
2.11	Análise estatística 18
3	RESULTADOS 19
3.1	O tratamento com hUC-MSC-VEs reduz a carga parasitária de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c (BMDMs) infectados com <i>L. braziliensis</i> , <i>in vitro</i> 19
3.2	O tratamento com hUC-MSC-VEs estimula a polarização do perfil de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c (BMDMs) infectados com <i>L. braziliensis</i> , <i>in vitro</i> 20
3.3	O estímulo com hUC-MSC-VEs promove a cicatrização no ensaio <i>Scratch</i> com células HaCat (queratinócitos humanos), <i>in vitro</i> 22
3.4	O estímulo com hUC-MSC-VEs promove o aumento na migração de células HaCat (queratinócitos humanos) no ensaio Transwell, <i>in vitro</i> 23
4	DISCUSSÃO 24
5	CONCLUSÃO..... 26
6	CONFLITOS DE INTERESSE..... 26
7	FINANCIAMENTO 26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 27	
ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO (CEUA)..... 30	

II. PROPOSTA DE SUBMISSÃO

1.	Revista.....	31
2.	Forma e preparação do manuscrito.....	31
3.	Submissão.....	36

ARTIGO CIENTÍFICO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO NA
INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

CAIO MARQUES LANDEIRO TORRES ¹

Endereço: Rua Alberto Fiúza 273, Imbuí – Salvador – Bahia.

Telefone: (71) 9 9615-7281

E-mail: caiotorres21.1@bahiana.edu.br

CAMILA INDIANI DE OLIVEIRA ²

¹ Acadêmico em Biomedicina pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

² Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (USP) e Doutora em Ciências (Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro) pela Universidade de São Paulo (USP).

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários intracelulares da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*. As Leishmanioses compõem infecções que acometem principalmente populações que vivem em regiões de baixo fator socioeconômico, como o norte da África, o Oriente Médio, a Ásia e parte da América do Sul, com a estimativa de 700 mil a 1 milhão de novos casos todo o ano ¹. O parasita é transmitido através da picada de fêmeas do mosquito do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus*, no Velho Mundo, no momento da hematofagia ². Estas enfermidades se dividem em Leishmaniose Visceral (LV), que acomete órgãos internos e Leishmaniose Tegumentar (LT), que acomete a pele e as mucosas.

A LT possui um espectro amplo de manifestações clínicas que varia de acordo com a espécie da *Leishmania* e a resposta imunológica do hospedeiro. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de notificação compulsória, endêmica a áreas rurais e próximas a florestas. Fora da região amazônica, a LTA é principalmente causada por protozoários da espécie *Leishmania braziliensis* ³. A doença causada por esta espécie se manifesta de três maneiras principais, sendo a mais prevalente a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), que causa o surgimento de ferida com aspecto de úlcera, com bordas elevadas e fundo granuloso no local de inoculação; a Leishmaniose Mucocutânea (LM), que provoca múltiplas ulcerações nas áreas mucosas e a Leishmaniose Disseminada (LD), que provoca feridas sem um padrão distinto, que acometem todo o corpo ⁴.

Após a transmissão, o parasito infecta células do sistema monocítico-fagocitário, sendo a principal delas o macrófago ⁵. A espécie *L. braziliensis* estimula no hospedeiro uma forte resposta do tipo TCD4⁺ T-helper1 (Th1), caracterizada pela presença de citocinas como IFN- γ e TNF- α , que promovem a produção de substâncias microbicidas como espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NO) no interior do macrófago, ocasionando na depuração do parasito ⁵. Apesar disso, a falta de regulação neste tipo de resposta ocasiona uma inflamação progressiva, corroborada pela secreção de IL-1 β e forte atuação de linfócitos TCD8⁺ citotóxicos, que contribuem para a cronicidade da lesão característica da LCL ⁶.

O Glucantime® é um antimonial pentavalente e, atualmente, o fármaco de primeira escolha para tratamento da LCL no Brasil, porém apesar da sua eficácia em combater o protozoário, acarreta uma série de efeitos colaterais, como artromialgias, náuseas e nefrotoxicidade ^{7, 8}. Por ser uma doença que surge a partir do desequilíbrio da resposta

imunológica, estudos revelam efeitos promissores de fármacos imunoreguladores, como o Glyburide e o Tofacitinib no tratamento da LCL^{9,10}. Tendo em vista este cenário, o presente trabalho busca investigar o papel regulatório de moléculas provenientes de células tronco mesenquimais, do inglês *Mesenchymal Stem Cells*, na resposta inflamatória da LCL causada por *L. braziliensis*.

As Células Tronco Mesenquimais (MSCs) são células tronco adultas multipotentes, que podem ser isoladas principalmente da medula óssea, do tecido do cordão umbilical e do tecido adiposo humano. Estas células apresentam baixa imunogenicidade devido à ausência de receptores MHC de classe II e baixa expressão de receptores MHC de classe I e possuem a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, como osteócitos, adipócitos e condrócitos^{11,12}. As MSCs se tornaram um foco de estudo importante na medicina regenerativa devido à sua capacidade de migrar para o sítio da inflamação através de estímulos quimiotáticos e modular a resposta imunológica local, por meio da secreção de citocinas regulatórias como a IL-10 e fatores de crescimento como TGF- β e HGF¹³.

Em particular, MSCs derivadas do cordão umbilical humano (hUC-MSCs) apresentam diferenciais positivos quanto ao seu uso na medicina regenerativa tais como: facilidade para isolamento, disponibilidade do material por maior período e ausência de riscos e restrições éticas no momento da coleta, comparado, por exemplo, com a aquisição de MSCs da medula óssea¹⁴.

A atividade parácrina se dá através do secretoma, um conjunto de elementos secretados tanto de maneira passiva quanto ativa pelas células. O secretoma é composto principalmente por proteínas solúveis, como citocinas e fatores de crescimento e por vesículas extracelulares (VEs)¹⁵. As VEs são nanopartículas de 30 a 1000 nm revestidas por membrana, contendo uma variedade de macromoléculas e secretadas por quase todos os tipos de células, as VEs desempenham um papel importante na comunicação celular a partir da transferência de proteínas, lipídios e material genético para a célula receptora e, também, na relação patógeno-hospedeiro¹⁶. Durante o processo de reparo tecidual, as VEs derivadas de MSCs possuem a capacidade de acelerar a cicatrização e modular a resposta imunológica local através da comunicação com receptores das células residentes do tecido afetado, permitindo que seu conteúdo seja liberado no interior celular¹⁷.

Os estudos envolvendo a aplicação de VEs derivadas de MSCs em enfermidades inflamatórias revelam que estas vesículas possuem a capacidade de provocar a polarização de macrófagos do subtipo M1, que colaboram com o prolongamento do estado inflamatório, para

o subtipo M2, que promovem o reparo tecidual ¹⁸. Este efeito foi relatado em modelos experimentais de úlcera diabética ^{19,20} e de ferida cutânea de espessura total ²¹. Estas vesículas também são capazes de promover a migração e proliferação de células epiteliais, como fibroblastos e queratinócitos, estimulando a reepitelização em modelos experimentais distintos de lesão cutânea ²². Tendo como base o potencial cicatrizante e imunomodulador destas moléculas, este trabalho buscou avaliar o efeito das VEs derivadas de hUC-MSCs em um modelo *in vitro* de infecção de macrófagos murinos por *L. braziliensis*. Paralelamente, investigamos o potencial cicatrizante do tratamento em experimentos *in vitro* com queratinócitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vesículas extracelulares derivadas de células tronco mesenquimais do cordão umbilical humano

As VEs derivadas de células tronco mesenquimais do cordão umbilical humano (hUC-MSCs) foram disponibilizadas pelo Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael (HSR), produzidas sob os padrões atuais de boas práticas de fabricação (cGMP). VEs foram isoladas de hUC-MSCs do tecido do cordão umbilical de um doador único. Toda a etapa de produção e caracterização das hUC-MSCs-VEs foi realizada pelos colaboradores no CBTC-HSR, através da análise de rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão, citometria de nanofluxo e espectrometria de massa. A segurança da aplicação foi garantida após administração endovenosa das VEs em camundongos *naive*. O protocolo completo de produção e caracterização das hUC-MSCs-VEs está descrito em COSTA-FERRO, *et al.* (2024).

2.2 Animais

Camundongos BALB/c, machos, 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).

2.3 Cultura de fibroblastos L929

Fibroblastos L929 foram cultivados em garrafas de 50 e 250 ml contendo meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (FBS – Gibco), 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (RPMI completo). As garrafas foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂ durante 12 dias para a obtenção do sobrenadante como fonte do fator de crescimento específico para a diferenciação de macrófagos (GM-CSF). Após esse período, o sobrenadante foi coletado, filtrado e congelado em freezer.

2.4 Obtenção e cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Após a eutanásia dos animais e retirada da medula óssea femoral, as células totais foram coletadas e cultivadas em placas de Petri com meio preparado com 70% de meio RPMI completo e 30% do sobrenadante da cultura de células L929, fonte de GM-CSF, e mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Após quatro dias, foram acrescentados mais 10 ml do meio (70% RPMI completo e 30% sobrenadante de células L929). As células, já diferenciadas em macrófagos, foram lavadas e removidas com PBS 1X gelado após 7 dias de cultivo, para o uso na experimentação.

2.5 Cultura de parasitos

Os protozoários da espécie *Leishmania braziliensis* (*Lb*) *Wild type* (cepa MHOM/BR/01BA788) (DE MOURA *et al.*, 2005) foram cultivados em garrafas de 50 ml utilizando o meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino inativado (FBS), 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Schneider completo). As garrafas foram mantidas a 26 °C.

2.6 Carga parasitária

Macrófagos murinos (BMDMs) foram semeados na concentração de 2×10^5 células em 250 µl de meio RPMI completo, em placas de 24 poços de fundo chato contendo lamínulas. Os parasitos foram acrescentados na concentração de 2×10^6 células em 250 µl de meio RPMI completo. As placas foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, foram adicionadas 50 µg/ml de hUCMSC-VEs. Os poços controle permaneceram sem tratamento. Após 72 horas de infecção, as lamínulas foram coletadas e coradas com hematoxilina-eosina. A carga a parasitária foi determinada a partir da contagem de amastigotas encontradas em um total de 200 células, em 40 campos aleatórios no microscópio óptico.

2.7 Ensaio de imunofluorescência

Macrófagos murinos (BMDMs) foram semeados na concentração de 3×10^5 células em 250 μ l de meio RPMI completo, em placas de 24 poços de fundo chato contendo lamínulas. Os parasitos foram acrescentados na concentração de 3×10^6 células em 250 μ l de meio RPMI completo. As placas foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, foram adicionadas 50 μ g/ml de hUCMSC-VEs. Os poços controle permaneceram sem tratamento. Após 72 horas da infecção, as lamínulas foram coletadas e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) e lavadas com PBS 1X. Em seguida, foram incubadas com uma solução de NH₄Cl₂ (15 mM) por 10 minutos, novamente lavadas com PBS 1X e incubadas com uma solução pré-bloqueio (2% de Albumina Sérica Bovina [BSA] em glicina 1%) por 20 minutos. As células foram, então, permeabilizadas com saponina por 10 minutos. Após a permeabilização da membrana celular, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS 1% BSA por 15 minutos. Após esse período, as células foram incubadas com os anticorpos primários, diluídos em PBS 1% BSA, por 1 hora à temperatura ambiente. A marcação foi feita com anticorpos primários, tanto para moléculas de superfície (anti-CD86; anti-CD206) como para citocinas (anti-TNF; anti-IL-10) (Invitrogen) de acordo com seus respectivos grupos. Por fim, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1X e montadas utilizando o kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen) para a contagem. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal espectral, modelo TCS SP8 da Leica, e as quantificações digitais de fluorescência foram realizadas com o software Fiji, analisando a fluorescência de aproximadamente 30 células por grupo.

2.8 Cultura de células HaCat

Células HaCat (queratinócitos humanos) foram cultivadas em garrafas de 50 e 250 ml contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (FBS), 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (DMEM completo). As garrafas foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂ até a confluência.

2.9 Ensaio de cicatrização *Scratch*

Para o ensaio de cicatrização (*Scratch*), as células HaCat foram semeadas na microplaca de 96 poços na concentração de 10^5 em 200 μ l de meio DMEM completo e mantidas a 37 °C

em 5% de CO₂, por 96 horas. Após a cobertura dos poços de cultura com as células, o *scratch* foi feito na monocamada com ponteiros de 10 µl. Nos poços designados, foram adicionados 50 µg/ml de hUCMSC-VEs. Os poços controle permaneceram sem tratamento. A área do rasgo (*Scratch*) foi calculada no tempo 0 (antes do tratamento) e após 24h de adição das VEs, por meio do software ImageJ.

2.10 Ensaio de migração Transwell

Para o ensaio de migração foram utilizadas células HaCat, 24h antes do experimento as células foram cultivadas em “starvation” em meio DMEM sem suplementação com FBS, contendo 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (DMEMØ). As células foram semeadas em um sistema de migração Transwell® na concentração de 2×10^5 em 100 µl de meio DMEM sem FBS (DMEMØ). A Transwell® foi sobreposta nos poços da placa de 24 poços contendo 700 µl de meio DMEM, suplementado com 10% de FBS inativado, 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (DMEM completo) a placa foi mantida a 37 °C em 5% de CO₂. O tratamento foi realizado com 50 µg/ml de hUCMSC-VEs nos poços designados. Os poços controle permaneceram sem tratamento. A avaliação da migração das células HaCat foi realizada nos tempos de 0h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Após o tempo estabelecido para cada grupo, as células restantes na câmara superior foram removidas suavemente com um cotonete. As células que migraram através da membrana para a câmara inferior foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) e preparadas com o kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen), para a coloração do núcleo celular. A contagem foi feita no microscópio de fluorescência Olympus BX51.

2.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados considerando os valores de média \pm desvio padrão. O teste Mann Whitney foi utilizado para comparação de dois grupos independentes e Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais grupos independentes. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad (Prism) versão 10.0, considerando um $p \leq 0,05$ significante.

3 RESULTADOS

3.1 O tratamento com hUC-MSC-VEs reduz a carga parasitária de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c (BMDMs) infectados com *L. braziliensis*, *in vitro*.

Para avaliar o efeito das hUC-MSC-VEs sobre a carga parasitária, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* por 24h e, em seguida, foram tratados ou não com 50 $\mu\text{g/ml}$ das VEs. A carga parasitária foi quantificada conforme o número de macrófagos infectados por campo e o número de amastigotas presentes no interior das células.

Na Figura 1A, estão representados os resultados da porcentagem de macrófagos infectados e na Figura 1B, estão representados os números de amastigotas intracelulares. Os resultados mostram que o tratamento com VEs reduziu de maneira significativa a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas no grupo tratado quando comparados ao grupo controle.

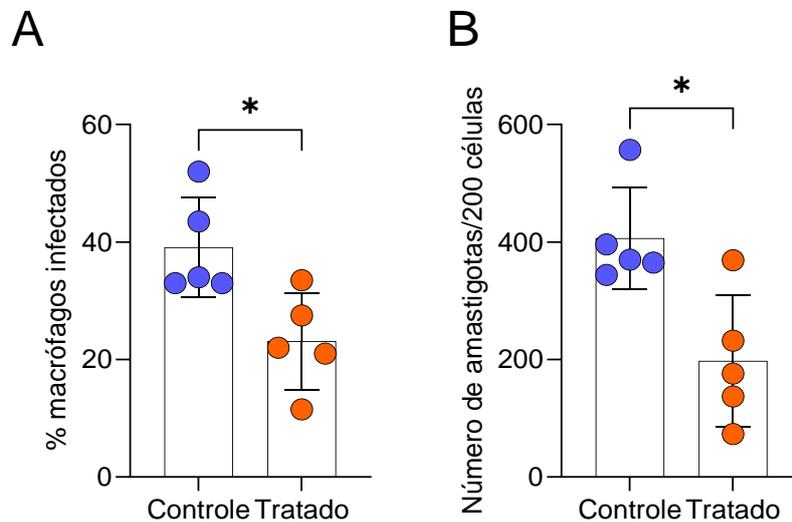


Figura 1 –Taxa de infecção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) infectados com *L. braziliensis* e tratados com VEs. BMDMs foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 10 parasitos para 1 célula. O tratamento foi realizado com 50 $\mu\text{g/ml}$ das VEs após 24 horas da infecção. As lamínulas foram coletadas e a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas intracelulares (B) foram determinados por microscopia óptica, após a contagem de 200 células em 20 campos aleatórios. Os resultados são expressos como médias \pm SEM e realizados em quintuplicata. Teste de Mann Whitney * $p < 0.05$.

3.2 O tratamento com hUC-MSC-VEs estimula a polarização do perfil de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c (BMDMs) infectados com *L. braziliensis*, *in vitro*.

A mudança do perfil dos macrófagos, do subtipo M1, pró-inflamatório, para o subtipo M2, anti-inflamatório é um evento necessário para o início da cicatrização ²⁵. Para avaliar a polarização dos macrófagos (MΦ) resultante do estímulo por hUC-MSC-VEs, separamos o experimento em quatro condições de cultivo: MΦ sozinho, MΦ estimulado com 50 µg/ml das VEs, MΦ infectado com *L. braziliensis* e MΦ infectado com *L. braziliensis* e tratado com 50 µg/ml das VEs.

A análise da intensidade da fluorescência mostrou que o tratamento com VEs estimula a polarização de macrófagos infectados para o perfil M2, devido ao aumento significativo na expressão do marcador de superfície CD206 (Figura 2B), específico para este subtipo, e da secreção da citocina IL-10 (Figura 2A), também característica de macrófagos M2, no grupo MΦ + *Lb* + VEs quando comparado aos demais grupos.

Os nossos resultados também demonstraram que o estímulo com as VEs diminui a secreção de TNF (Figura 2C) quando comparamos os grupos MΦ e MΦ + VEs. Porém, no grupo MΦ + *Lb* + VEs esta expressão aumenta significativamente comparada ao grupo estimulado MΦ + VEs. As VEs também promovem um aumento na expressão do marcador de superfície CD86 (Figura 2D), característico de macrófagos do perfil M1, quando comparamos o grupo infectado e tratado com os demais.

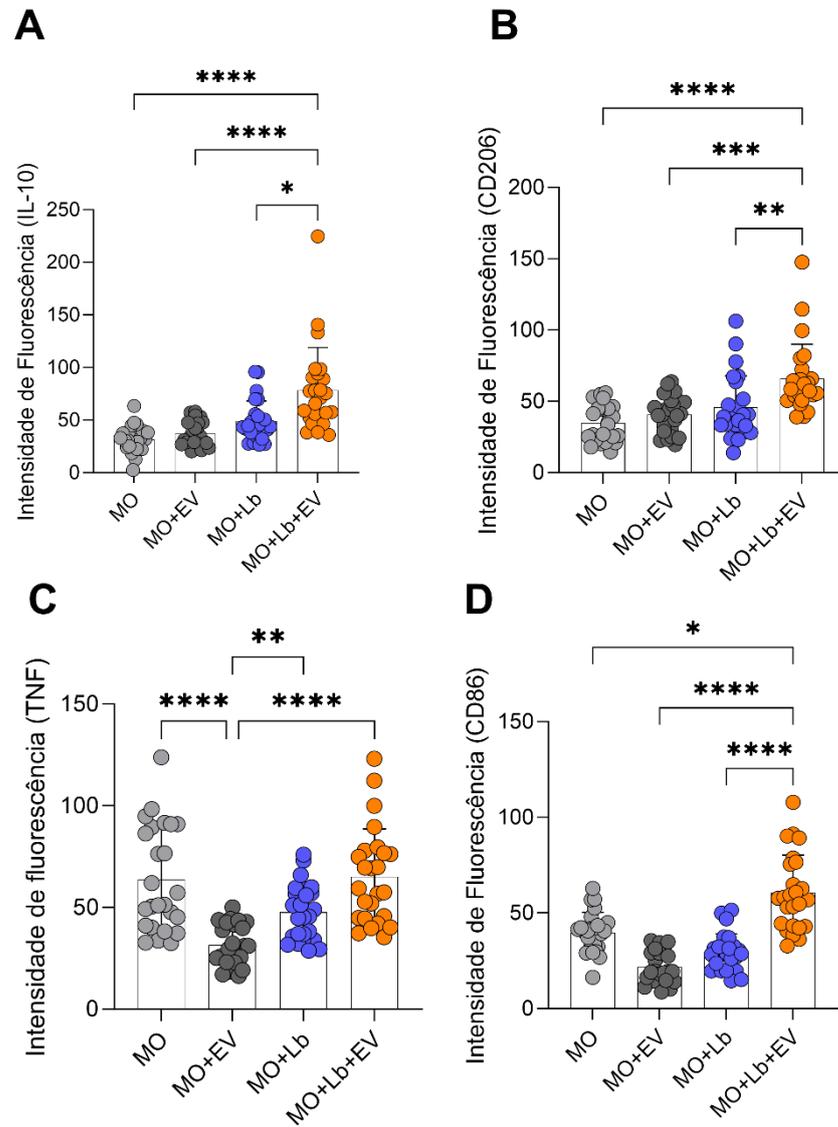


Figura 2 – Intensidade de fluorescência de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) infectados com *L. braziliensis* e tratados com VEs. BMDMs foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 10 parasitos para 1 célula. O tratamento foi realizado com 50 µg/ml das VEs após 24 horas da infecção. As lamínulas foram coletadas e as células foram marcadas com anticorpos contra moléculas expressas na superfície das células, IL-10 (A), CD206 (B), TNF (C) e CD86 (D). Para a contagem, as células foram marcadas com DAPI e a intensidade da fluorescência foi avaliada no microscópio confocal espectral, em cerca de 30 células por grupo. Os resultados são expressos como médias ± SEM. Teste de Kruskal-Wallis * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

3.3 O estímulo com hUC-MSC-VEs promove a cicatrização no ensaio *Scratch* com células HaCat (queratinócitos humanos), *in vitro*.

A capacidade cicatrizante das hUC-MSC-VEs foi avaliada através do ensaio *Scratch*, células HaCat foram plaqueadas e cultivadas e o rasgo (*Scratch*) foi feito para avaliar a migração celular em resposta à presença das VEs. O estímulo foi realizado com 50 $\mu\text{g/ml}$ das vesículas e a área do rasgo foi calculada a partir de imagens retiradas no momento do *Scratch* (Figura 3A), tempo zero, e após 24 horas (Figura 3B). Observamos que, após 24 horas, o tratamento com as VEs reduziu significativamente o tamanho do *Scratch* (Figura 3B), indicando migração celular. As imagens retiradas no microscópio invertido no momento 0 e após 24 horas demonstram estes achados (Figura 3C).

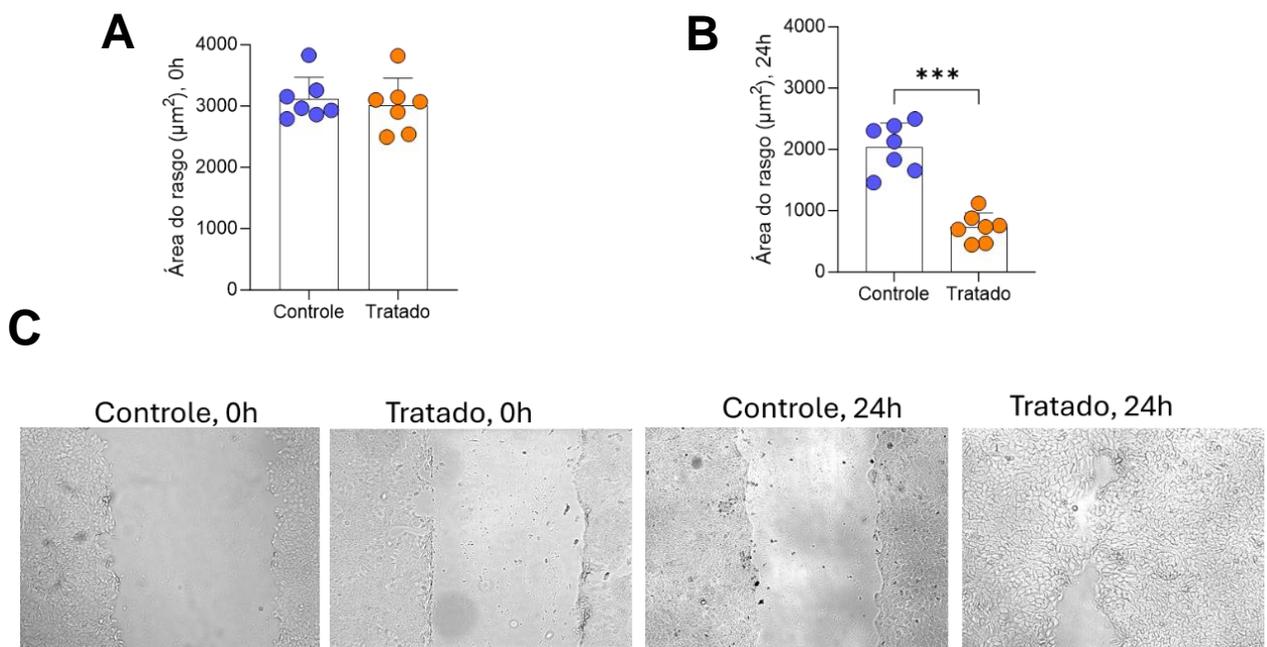


Figura 3 – Cicatrização do rasgo (*Scratch*) em monocamada de células HaCat após o estímulo com VEs. As células foram cultivadas em placa e o rasgo (*Scratch*) foi submetido ao estímulo com hUCMSCs-VEs, na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, por 24h. A área do corte foi determinada no tempo 0 (A), antes do tratamento, e 24h após o tratamento (B). As imagens representativas (C) foram retiradas no microscópio invertido. Os resultados são representativos de dois experimentos, realizados em triplicata e em quadruplicata, respectivamente. Os resultados são expressos como médias \pm SEM. Teste de Mann Whitney *** $p < 0.001$.

3.4 O estímulo com hUC-MSC-VEs promove o aumento na migração de células HaCat (queratinócitos humanos) no ensaio Transwell, *in vitro*.

A migração de queratinócitos (células HaCat) foi avaliada através do ensaio Transwell. As células foram semeadas em um sistema de migração Transwell® em meio DMEM sem SBF e foram estimuladas com hUC-MSC-VEs. O número de células que migraram através do inserto da Transwell® foi calculado após a contagem das células presentes na câmara inferior. A contagem das células revelou que o estímulo das HaCat com as VEs aumentou significativamente o número de células que migraram, este efeito se iniciou no grupo avaliado após 12 horas do estímulo e permaneceu nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 4).

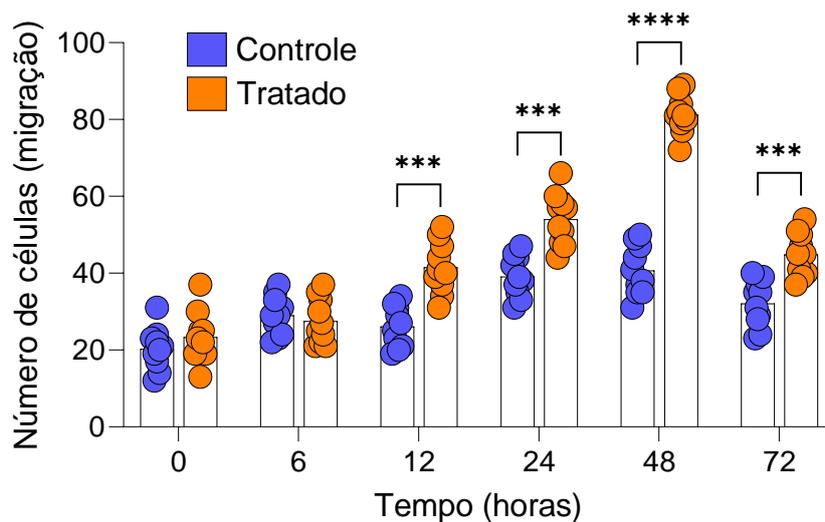


Figura 4 – Migração de células HaCat no sistema Transwell ao longo do tempo após o estímulo com VEs. As células foram semeadas na câmara superior do sistema Transwell, a migração foi avaliada através da contagem das células presentes na câmara inferior em cada tempo estabelecido, após marcação com DAPI, no microscópio de fluorescência Olympus BX51. Os resultados são expressos como médias ± SEM. Teste de Mann Whitney *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

4 DISCUSSÃO

As vesículas extracelulares (VEs) são moléculas secretadas tanto por eucariontes como por alguns procariontes, cujo papel é de transportar biomoléculas ativas entre as células ²⁶. O estudo das VEs como forma de tratamento tem ganhado força no campo de doenças parasitárias causadas por protozoários, principalmente por conta da ausência de vacinas disponíveis para combater estes microrganismos ²⁷. No contexto da Leishmaniose, as VEs secretadas pelo parasito auxiliam no estabelecimento da doença, modulando a secreção de citocinas após a infecção com *L. amazonensis* ²⁸, estimulando a imunossupressão na LV causada por *L. infantum* ²⁹ e auxiliando o transporte de genes que conferem resistência ao tratamento ³⁰. Estes trabalhos demonstram que as VEs atuam como moléculas chave para entender os mecanismos intercelulares responsáveis pela interação do patógeno com o hospedeiro.

Sabemos que, atualmente, o fármaco de escolha para o tratamento da LCL no Brasil enfrenta alguns desafios, como os efeitos colaterais diversos devido à sua alta toxicidade ^{7,8}. Logo, a busca por novas formas de tratamento se tornou indispensável e, neste contexto, exploramos uma alternativa terapêutica a doença através da aplicação de VEs derivadas de MSCs do cordão umbilical humano, em um modelo experimental de infecção por *Leishmania braziliensis*. As MSCs possuem propriedades imunomoduladoras, através da secreção de citocinas e quimiocinas que regulam a resposta inflamatória, estes biomateriais podem ser transferidos para outras células pelas vesículas extracelulares ³¹. A inflamação é um processo necessário para o início da cicatrização, porém, o prolongamento deste estado leva a persistência das lesões, que é o caso da LCL ³³. Portanto, resolvemos investigar o estímulo das hUC-MSC-VEs em uma linhagem de queratinócitos (HaCat) a fim de avaliar o efeito cicatrizante das VEs.

Em nossos resultados, encontramos que o tratamento com hUC-MSC-VEs reduz a carga parasitária de macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis*, ao mesmo tempo que promove a modulação destas células para um perfil reparador, provocando a polarização do subtipo M1 para o M2. Curiosamente, observamos que o tratamento aumentou a expressão de TNF e CD86 quando comparado ao grupo apenas estimulado, sem infecção. Estes achados nos levam a pensar que as VEs tendem a induzir uma resposta reparadora ao mesmo tempo que atuam no controle do parasito.

O conteúdo das VEs aplicadas neste trabalho foi avaliado por COSTA-FERRO *et al.*, (2024). Os autores destacam que, no conteúdo das VEs, estão genes envolvidos em processos

como da cicatrização, angiogênese, manutenção intracelular e regulação da resposta imune, entre diversos outros. Os autores avaliaram os efeitos das VEs em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, no qual o tratamento com as VEs reduziu significativamente os níveis de mediadores inflamatórios como IL-1 β e IL-6 e o dano alveolar.

Atualmente, não existem trabalhos publicados que investigaram a ação de VEs derivadas de MSCs em modelos experimentais de leishmaniose, porém, existem dados da aplicação direta das células. O estudo conduzido por RAMOS *et al.* (2020) avaliou o potencial terapêutico de MSCs derivadas do tecido adiposo e da medula óssea em modelos *in vitro* de co-cultura com macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*. Dentre os achados, estavam que os macrófagos infectados em co-cultura com MSCs derivadas da medula óssea apresentaram um aumento na carga parasitária. Por outro lado, estes autores observaram que na co-cultura de macrófagos infectados com MSCs de ambas as origens houve um aumento simultâneo na secreção de TNF e IL-10, o que nós também observamos. Por se tratarem de fontes diferentes de MSCs, tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical humano, especulamos que isso pode explicar as diferenças encontradas em relação à carga parasitária.

Em nossos achados, demonstramos que as VEs são capazes de promover a cicatrização e a migração em experimentos *in vitro* com as células HaCat. Assim, podemos sugerir que MSCs de diferentes origens possuem efeitos distintos quando inseridas no tratamento de enfermidades^{34, 35} e parece ser o caso de suas aplicações na leishmaniose. Mesmo com o potencial apresentado pelas VEs avaliadas neste trabalho, novos estudos precisam ser conduzidos a fim de avaliar de maneira minuciosa a interação das vesículas com o parasito e no estímulo à produção de citocinas em modelos de infecção, bem como avaliar a produção de ROS e NO na presença destas moléculas, a fim de melhor entender as suas propriedades.

5 CONCLUSÃO

Este estudo investigou o efeito *in vitro* de VEs derivadas de MSCs do cordão umbilical humano em macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e em queratinócitos humanos (células HaCat), visando avaliar seu potencial terapêutico na Leishmaniose Cutânea Localizada. Os resultados mostraram que o tratamento com essas vesículas reduziu a carga parasitária nos macrófagos, promoveu a polarização para o subtipo M2 e estimulou a migração celular, sugerindo uma atividade antiparasitária e cicatrizante promissora para futuras aplicações terapêuticas na LCL.

6 CONFLITOS DE INTERESSE

Não houve conflito de interesse entre os autores em questão para a execução e realização da escrita deste artigo experimental.

7 FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado por recursos do Instituto Gonçalo Moniz (IGM – FIOCRUZ BAHIA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>.
2. TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. 1, p. 750, 26 maio 2017.
3. CARVALHO, M. DE L. R. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 277–285, jul. 2006.
4. SCORZA, B.; CARVALHO, E.; WILSON, M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 18 jun. 2017.
5. LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.
6. NOVAIS, F. O. et al. CD8⁺ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006196, 13 fev. 2017.
7. ESFANDIARPOUR, I. et al. Adverse effects of intralesional meglumine antimoniate and its influence on clinical laboratory parameters in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 10, p. 1221–1225, 20 set. 2012.
8. BEZERRA, G.; BARROS, G.; DE, E. Kidney involvement in leishmaniasis—a review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 434–440, 1 jul. 2014.
9. CARVALHO, A. M. et al. Glyburide, a NLRP3 Inhibitor, Decreases Inflammatory Response and Is a Candidate to Reduce Pathology in Leishmania braziliensis Infection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 1, p. 246-249.e2, 1 jan. 2020.
10. NOVAIS, F. O.; NGUYEN, B. D.; SCOTT, P. Granzyme B Inhibition by Tofacitinib Blocks the Pathology Induced by CD8 T Cells in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 575–585, 1 mar. 2021.
11. WANG, Y. et al. The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. **iScience**, v. 15, p. 66–78, 11 abr. 2019.
12. GIAI VIA, A. et al. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 2,3 154-62. 16 Oct. 2012.

13. HAN, Y. et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 21 mar. 2022.
14. NAGAMURA-INOUE, T. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 195, 2014.
15. MAACHA, S. et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 1–12, 9 mar. 2020.
16. ZENG, Y. et al. Biological Features of Extracellular Vesicles and Challenges. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 24 jun. 2022.
17. HOU, Y. et al. The therapeutic potential of MSC-EVs as a bioactive material for wound healing. **Engineered Regeneration**, v. 2, p. 182–194, 2021.
18. LO SICCO, C. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 3, p. 1018–1028, 31 jan. 2017.
19. TENG, L. et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Accelerate Diabetic Wound Healing via Promoting M2 Macrophage Polarization, Angiogenesis, and Collagen Deposition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10421, 9 set. 2022.
20. TI, D. et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, 19 set. 2015.
21. LIU, Y. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promote murine skin wound healing by neutrophil and macrophage modulations revealed by single-cell RNA sequencing. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 6 mar. 2023.
22. KIM, J. et al. Clinical-Scale Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Therapy for Wound Healing. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 5, p. 4273–4273, 21 fev. 2023.
23. COSTA-FERRO, Z. S. M. et al. GMP-compliant extracellular vesicles derived from umbilical cord mesenchymal stromal cells: manufacturing and pre-clinical evaluation in ARDS treatment. **Cytotherapy**, v. 26, n. 9, p. 1013–1025, 2024.
24. DE MOURA, TR. et al. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 1 set. 2005.
25. FERRANTE, C. J.; LEIBOVICH, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 1, n. 1, p. 10–16, fev. 2012.

26. BUZAS, E. I. The roles of extracellular vesicles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, 4 ago. 2022.
27. DONG, G. et al. Extracellular vesicles and leishmaniasis: Current knowledge and promising avenues for future development. **Molecular Immunology**, v. 135, p. 73–83, jul. 2021.
28. MARINS, F. et al. Extracellular Vesicles Released by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 21 dez. 2018.
29. CARNEIRO, F. M. et al. Extracellular Vesicles from *Leishmania (Leishmania) infantum* Contribute in Stimulating Immune Response and Immunosuppression in Hosts with Visceral Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 12, n. 2, p. 270–270, 27 jan. 2024.
30. DOUANNE, N. et al. *Leishmania* parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles. **Cell Reports**, v. 40, n. 3, 19 jul. 2022.
31. KOU, M. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 7, jul. 2022.
32. RAMOS, T. et al. Combined therapy with adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells and meglumine antimoniate controls lesion development and parasite load in murine cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, 31 ago. 2020.
33. FARIAS AMORIM, C. et al. Localized skin inflammation during cutaneous leishmaniasis drives a chronic, systemic IFN- γ signature. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009321, 1 abr. 2021.
34. PETRENKO, Y. et al. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4290, 9 mar. 2020.
35. COSTELA-RUIZ, V. J. et al. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6356, 1 jan. 2022.

ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO (CEUA)



Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM / FIOCRUZ

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 013-2022

PROJETO: “Avaliação da toxicidade, migração e os efeitos anti-inflamatórios de vesículas extracelulares derivadas células mesenquimais do cordão umbilical humano *in vitro* e *in vivo*”

COORDENADOR: Camila Indiani de Oliveira

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo heterogênico Balb/C 8 semanas	96 (48F+48M)
Camundongos Nude (nu/nu)	48 (24F+24M)
Total	144 (MF)

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IGM) em 15/12/2022 e tem validade até 15/12/2024.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the IGM-FIOCRUZ at 12/15/2022, being valid until 12/15/2024.

SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:

Vigência: 15/12/2022 a 15/12/2024

Relatório Parcial: 15/12/2023.

Relatório Final: 15/12/2024.

Salvador, 15 de dezembro de 2022

Atavares

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

PROPOSTA DE SUBMISSÃO

1. Revista

Cadernos de Saúde Pública

2. Forma e preparação do manuscrito

Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP) publica artigos originais com elevado mérito científico que contribuem com o estudo da saúde pública em geral e disciplinas afins. Desde janeiro de 2016, a revista adota apenas a versão on-line, em sistema de publicação continuada de artigos em periódicos indexados na base SciELO. Recomendamos aos autores a leitura atenta das instruções antes de submeterem seus artigos a CSP.

1. CSP aceita trabalhos para as seguintes seções:

1.1. Perspectivas: análises de temas conjunturais, de interesse imediato, de importância para a Saúde Coletiva (máximo de 2.200 palavras);

1.2. Debate: análise de temas relevantes do campo da Saúde Coletiva, que é acompanhado por comentários críticos assinados por autores a convite das Editoras, seguida de resposta do autor do artigo principal (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações);

1.3. Espaço Temático: seção destinada à publicação de 3 a 4 artigos versando sobre tema comum, relevante para a Saúde Coletiva. Os interessados em submeter trabalhos para essa Seção devem consultar as Editoras;

1.4. Revisão: revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes à Saúde Coletiva, máximo de 8.000 palavras e 5 ilustrações. Toda revisão sistemática deverá ter seu protocolo publicado ou registrado em uma base de registro de revisões sistemáticas como por exemplo o PROSPERO; as revisões sistemáticas deverão ser submetidas em inglês (Editorial 37(4));

1.5. Ensaio: texto original que desenvolve um argumento sobre temática bem delimitada, podendo ter até 8.000 palavras;

1.6. Questões Metodológicas: artigos cujo foco é a discussão, comparação ou avaliação de aspectos metodológicos importantes para o campo, seja na área de desenho de estudos,

análise de dados ou métodos qualitativos (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações); artigos sobre instrumentos de aferição epidemiológicos devem ser submetidos para esta Seção, obedecendo preferencialmente as regras de Comunicação Breve (máximo de 2.200 palavras e 3 ilustrações);

1.7. 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;

1.8. Comunicação Breve: relatando resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados de forma sucinta (máximo de 2.200 palavras e 3 ilustrações);

1.9. Cartas: comentário a artigo publicado em fascículo anterior de CSP (máximo de 1.400 palavras);

1.10. Resenhas: Análise crítica de livro relacionado ao campo temático de CSP, publicado nos últimos dois anos (máximo de 1.400 palavras). As resenhas devem conter título e referências bibliográficas. A resenha contempla uma análise da obra no conjunto de um campo em que a mesma está situada, não se restringe a uma apresentação de seu conteúdo, quando obra única, ou de seus capítulos, quando uma obra organizada. O esforço é contribuir com a análise de limites e contribuições, por isto podem ser necessários acionamentos a autores e cenários políticos para produzir a análise, a crítica e a apresentação da obra. O foco em seus principais conceitos, categorias e análises pode ser um caminho desejável para a contribuição da resenha como uma análise crítica, leia o Editorial 37(10).

Obs: A política editorial de CSP é apresentada por meio dos editoriais. Recomendamos fortemente a leitura dos seguintes textos: Editorial 29(11), Editorial 32(1) e Editorial 32(3).

2. Normas para envio de artigos

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). NÃO recomendamos a publicação em servidor de *preprint* de artigo já aprovado.

3. **Publicação de ensaios clínicos**

3.1. Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem obrigatoriamente ser acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.

3.2. Essa exigência está de acordo com a recomendação do Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME)/Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o Registro de Ensaios Clínicos a serem publicados a partir de orientações da OMS, do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) e do Workshop ICTPR.

3.3. As entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são:

Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR)

ClinicalTrials.gov

International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN)

Netherlands Trial Register (NTR)

UMIN Clinical Trials Registry (UMIN-CTR)

WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP)

4. **Fontes de financiamento**

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. Conflito de interesses

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. Colaboradores

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.

7. Agradecimentos

7.1. Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios de coautoria.

8. Referências

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 ¹). 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. Nomenclatura

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

10. Ética em pesquisas envolvendo seres humanos

10.1. A publicação de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos está condicionada ao cumprimento dos princípios éticos contidos na Declaração de Helsinki (1964, reformulada em 1975, 1983, 1989, 1996, 2000 e 2008), da Associação Médica Mundial.

10.2. Além disso, deve ser observado o atendimento a legislações específicas (quando houver) do país no qual a pesquisa foi realizada, informando protocolo de aprovação em Comitê

de Ética quando pertinente. Essa informação deverá constituir o último parágrafo da seção Métodos do artigo.

10.3. Artigos que apresentem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos deverão conter uma clara afirmação deste cumprimento (tal afirmação deverá constituir o último parágrafo da seção Métodos do artigo).

10.4. CSP é filiado ao COPE (Committee on Publication Ethics) e adota os preceitos de integridade em pesquisa recomendados por esta organização. Informações adicionais sobre integridade em pesquisa leia Editorial 34(1) e Editorial 38(1).

10.5. O Conselho Editorial de CSP se reserva o direito de solicitar informações adicionais sobre os procedimentos éticos executados na pesquisa.

3. Submissão

1. Processo de submissão *online*

1.1. Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos (SAGAS).

1.2. Outras formas de submissão não serão aceitas. As instruções completas para a submissão são apresentadas a seguir. No caso de dúvidas, entre em contato com o suporte sistema SAGAS pelo e-mail: cadernos@fiocruz.br.

1.3. Inicialmente o autor deve entrar no sistema SAGAS. Em seguida, inserir o nome do usuário e senha para ir à área restrita de gerenciamento de artigos. Novos usuários do sistema SAGAS devem realizar o cadastro em “Cadastre-se” na página inicial. Em caso de esquecimento de sua senha, solicite o envio automático da mesma em “Esqueceu sua senha?”.

1.4. Para novos usuários do sistema SAGAS. Após clicar em “Cadastre-se” você será direcionado para o cadastro no sistema SAGAS. Digite seu nome, endereço, e-mail, telefone, instituição.

2. Envio do artigo

2.1. A submissão *online* é feita na área restrita de gerenciamento de artigos. O autor deve acessar a “Central de Autor” e selecionar o *link* “Submeta um novo artigo”.

2.2. A primeira etapa do processo de submissão consiste na verificação às normas de publicação de CSP.

O artigo somente será avaliado pela Secretaria Editorial de CSP se cumprir todas as normas de publicação.

2.3. Na segunda etapa são inseridos os dados referentes ao artigo: título, título resumido, área de concentração, palavras-chave, informações sobre financiamento e conflito de interesses, resumos e agradecimentos, quando necessário. Se desejar, o autor pode sugerir potenciais consultores (nome, e-mail e instituição) que ele julgue capaz de avaliar o artigo.

2.4. O título completo (nos idiomas Português, Inglês e Espanhol) deve ser conciso e informativo, com no máximo 150 caracteres com espaços.

2.5. O título resumido poderá ter máximo de 70 caracteres com espaços.

2.6. As palavras-chave (mínimo de 3 e máximo de 5 no idioma original do artigo) devem constar na base da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS).

2.7. Resumo. Com exceção das contribuições enviadas às seções Resenha, Cartas ou Perspectivas, todos os artigos submetidos deverão ter resumo no idioma original do artigo, podendo ter no máximo 1.700 caracteres com espaço. Visando ampliar o alcance dos artigos publicados, CSP publica os resumos nos idiomas português, inglês e espanhol. No intuito de garantir um padrão de qualidade do trabalho, oferecemos gratuitamente a tradução do resumo para os idiomas a serem publicados.

2.8. Agradecimentos. Possíveis agradecimentos às instituições e/ou pessoas poderão ter no máximo 500 caracteres com espaço.

2.9. Na terceira etapa são incluídos o(s) nome(s) do(s) autor(es) do artigo, respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo, telefone e e-mail, bem como a colaboração de cada um. O autor que cadastrar o artigo automaticamente será incluído como autor de artigo. A ordem dos nomes dos autores deve ser a mesma da publicação.

2.10. Na quarta etapa é feita a transferência do arquivo com o corpo do texto e as referências.

2.11. O arquivo com o texto do artigo deve estar nos formatos DOC ou DOCX (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text) e não deve ultrapassar 1 MB.

2.12. O arquivo com o texto deve conter somente o corpo do artigo e as referências bibliográficas. Os seguintes itens deverão ser inseridos em campos à parte durante o processo de submissão: resumos; nome(s) do(s) autor(es), afiliação ou qualquer outra informação que

identifique o(s) autor(es); agradecimentos e colaborações; ilustrações (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos, quadros e tabelas).

2.13. Equações e Fórmulas. As equações e fórmulas matemáticas devem ser desenvolvidas diretamente nos editores (Math, Equation, Mathtype ou outros que sejam equivalentes). Não serão aceitas equações e fórmulas em forma de imagem.

2.14. Na quinta etapa são transferidos os arquivos das ilustrações do artigo (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos, quadros e tabelas), quando necessário. Cada ilustração deve ser enviada em arquivo separado clicando em “Transferir”.

2.15. Ilustrações. O número de ilustrações deve ser mantido ao mínimo, conforme especificado no item 1 da *Instrução para Autores* (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos, quadros e tabelas).

2.16. Os autores devem obter autorização, por escrito, dos detentores dos direitos de reprodução de ilustrações que já tenham sido publicadas anteriormente.

2.17. Quadros. Destinam-se a apresentar as informações de conteúdo qualitativo, textual do artigo, dispostas em linhas e/ou colunas. Devem ser submetidos em arquivo texto: DOC ou DOCX (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text). Os Quadros devem ser numerados (algarismos arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto, e citadas no corpo do mesmo. Cada dado do Quadro deve ser inserido em uma célula separadamente, ou seja, não incluir mais de uma informação dentro da mesma célula. Os Quadros podem ter até 17cm de largura, com fonte Times New Roman tamanho 9.

2.18. Tabelas. Destinam-se a apresentar as informações quantitativas do artigo. As Tabelas podem ter até 17cm de largura, com fonte Times New Roman tamanho 9. Devem ser submetidas em arquivo de texto: DOC ou DOCX (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text). As Tabelas devem ser numeradas (algarismos arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto e citadas no corpo do mesmo. Cada dado da Tabela deve ser inserido em uma célula separadamente e dividida em linhas e colunas. Ou seja, não incluir mais de uma informação dentro da mesma célula.

2.19. Figuras. Os seguintes tipos de Figuras serão aceitos por CSP: mapas, gráficos, imagens de satélite, fotografias, organogramas e fluxogramas.

2.19.1. As Figuras devem ser numeradas (algarismos arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto, e devem ser citadas no corpo do mesmo.

- Os mapas devem ser submetidos em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).
- Os gráficos devem ser submetidos em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: XLS (Microsoft Excel), ODS (Open Document Spreadsheet), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics). Os gráficos de linhas, dispersão (XY), histograma (Pareto), radar e outros similares, que contenham elementos gráficos (círculo, quadrado, triângulo, losango etc), devem optar por apenas um elemento gráfico, diferenciado somente por cores.
- Os gráficos de linhas, de dispersão (XY), de histograma (Pareto), de radar e outros similares; que contenham elementos gráficos (círculo, quadrado, triângulo, losango etc); devem optar por apenas um elemento gráfico, diferenciado somente por cores.
- As imagens de satélite e fotografias devem ser submetidas nos seguintes tipos de arquivo: TIFF (Tagged Image File Format), BMP (Bitmap), JPEG (Joint Photographic Experts Group) ou PNG (Portable Network Graphic). A resolução mínima deve ser de 300dpi (pontos por polegada), com tamanho mínimo de 17,5cm de largura. O tamanho limite do arquivo deve ser de 10Mb.
- Os organogramas e fluxogramas devem ser submetidos em arquivo de texto ou em formato vetorial, e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: DOC ou DOCX (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), ODT (Open Document Text), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).
- Em separado, os autores devem enviar o arquivo (DOC, DOCX, RTF, ODT, TXT) com todos os textos que compõem as Figuras.

Observações:

- O desenho vetorial é originado com base em descrições geométricas de formas e normalmente é composto por curvas, elipses, polígonos, texto, entre outros elementos, isto é, utilizam vetores matemáticos para sua descrição.
- Mapas e gráficos gerados originalmente em formato de imagem e depois exportados para o formato vetorial não serão aceitos.
- O tamanho máximo para quadros e tabelas deve permitir o enquadramento em página de tamanho A4 (até 17cm de largura), com margens laterais direita e esquerda de 2cm, com fonte de tamanho 9 ou maior.

- As Figuras devem permitir o enquadramento em página de tamanho A4 (até 17cm de largura), com margens laterais direita e esquerda de 2cm.
- O arquivo de cada Figura deve ter o tamanho máximo de 10Mb para ser submetido.

2.20. CSP permite a publicação de até cinco ilustrações (figuras e/ou quadros e/ou tabelas) por artigo. Ultrapassando esse limite os autores deverão arcar com os custos extras. Figuras compostas são contabilizadas separadamente; cada ilustração é considerada uma Figura.

2.21. Material Suplementar: CSP aceita a submissão de material suplementar – textos, figuras, imagens e vídeos – como complemento às informações apresentadas no texto, que será avaliado em conjunto com todo o material submetido. Para a publicação, todo o conteúdo do material suplementar é de responsabilidade dos autores. Não será formatado e nem feita revisão de idioma e/ou tradução.

2.22. Finalização da submissão. Ao concluir o processo de transferência de todos os arquivos, clique em “Finalizar Submissão”.

2.23. Confirmação da submissão. Após a finalização da submissão o autor receberá uma mensagem por e-mail confirmando o recebimento do artigo pelos CSP. Caso não receba o e-mail de confirmação dentro de 24 horas, entre em contato com a Secretaria Editorial de CSP por meio do e-mail: cadernos@fiocruz.br.

3. Acompanhamento do processo de avaliação do artigo

3.1. O autor poderá acompanhar o fluxo editorial do artigo pelo sistema SAGAS. As decisões sobre o artigo serão comunicadas por e-mail e disponibilizadas no sistema SAGAS.

3.2 O contato com a Secretaria Editorial de CSP deverá ser feito através do sistema SAGAS.

4. Envio de novas versões do artigo

4.1. Novas versões do artigo devem ser encaminhadas usando-se a área restrita de gerenciamento de artigos do sistema SAGAS, acessando o artigo e utilizando o *link* “Submeter nova versão”.

5. Prova de prelo

5.1. A prova de prelo será acessada pelo(a) autor(a) de correspondência via sistema. Para visualizar a prova do artigo será necessário o programa Adobe Reader ou similar. Esse programa pode ser instalado gratuitamente pelo site.

5.2. Para acessar a prova de prelo e as declarações, o(a) autor(a) de correspondência deverá acessar o *link* do sistema, utilizando *login* e senha já cadastrados em nosso *site*. Os arquivos estarão disponíveis na aba “Documentos”. Seguindo o passo a passo:

5.2.1. Na aba “Documentos”, baixar o arquivo PDF com o texto e as declarações (Aprovação da Prova de Prelo, Cessão de Direitos Autorais (Publicação Científica) e Termos e Condições);

5.2.2. Encaminhar para cada um dos autores a prova de prelo e a declaração de Cessão de Direitos Autorais (Publicação Científica);

5.2.3. Cada autor(a) deverá verificar a prova de prelo e assinar a declaração Cessão de Direitos Autorais (Publicação Científica);

5.2.4. As declarações assinadas pelos autores deverão ser escaneadas e encaminhadas via sistema, na aba “Autores”, pelo autor de correspondência. O *upload* de cada documento deverá ser feito no espaço referente a cada autor(a);

5.2.5. Informações importantes para o envio de correções na prova:

5.2.5.1. A prova de prelo apresenta numeração de linhas para facilitar a indicação de eventuais correções;

5.2.5.2. Não serão aceitas correções feitas diretamente no arquivo PDF;

5.2.5.3. As correções deverão ser listadas na aba “Conversas”, indicando o número da linha e a correção a ser feita.

5.3. As Declarações assinadas pelos autores e as correções a serem feitas deverão ser encaminhadas via sistema [<http://cadernos.ensp.fiocruz.br/publicar/br/acesso/login>] no prazo de 72 horas.