



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA**

**REGULAÇÃO DE CITOCINAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA  
POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE**

**ANTONIO MAIA OLSEN DO VALE**

**Brasília - DF**

**2026**

ANTONIO MAIA OLSEN DO VALE

Regulação de citocinas na leishmaniose cutânea localizada por *Leishmania braziliensis*:  
revisão sistemática e meta-análise

Tese apresentada à Universidade de Brasília  
como parte dos requisitos parciais para  
obtenção do título de doutor pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Microbiana.

**Orientadora:**

Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali

BRASÍLIA

2026

## FICHA CATALOGRÁFICA

Vale, A. M. O.

Brasília, 2026.

Número de páginas: 154

Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana,  
Universidade de Brasília, Brasília, DF.

I - Palavras-chave: *leishmaniose cutânea*, *Leishmania braziliensis*, *citocinas*, *quimiocinas*, *meta-análise*

II - Universidade de Brasília. PPG/BioMicro.

III - Regulação de citocinas na leishmaniose cutânea localizada por *Leishmania braziliensis*: revisão sistemática e meta-análise

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali. Apoio da Universidade Federal do Ceará.

**Regulação de citocinas na leishmaniose cutânea localizada por *Leishmania braziliensis*: revisão sistemática e meta-análise**

**ANTONIO MAIA OLSEN DO VALE**

**TESE APROVADA EM: 27 / 01 / 2026**

---

Profa. Dra. Ana Flávia Alves Parente – Universidade de Brasília – UnB  
(Membro interno)

---

Dra. Clarissa Romero Teixeira – FIOCRUZ - CE  
(Membro externo)

---

Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura – Universidade Federal de Sergipe - UFS  
(Membro externo)

---

Profa. Dra. Maria Jânia Teixeira – Universidade Federal do Ceará - UFC  
Membro externo (Suplente)

---

Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali – Universidade de Brasília – UnB  
Membro interno (Orientadora / Presidente)

**BRASÍLIA – DF**

**2026**

## AGRADECIMENTOS

O fazer ciência é um ato coletivo. Embora a elaboração desta tese seja formalmente um trabalho individual, ela só se tornou possível graças à participação direta ou indireta de pessoas e instituições ao longo de todo o processo. Neste espaço, registro meu reconhecimento e agradeço os esforços, colaborações e apoios de todos os envolvidos nesta pesquisa e no percurso do doutorado.

A primeira pessoa a quem agradeço é a professora Cecília Beatriz Fiuza Favali, que propôs a realização do doutorado e me orientou na escolha do programa. Sua orientação, confiança e abertura para novas possibilidades foram determinantes para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à Universidade Federal do Ceará (UFC) por autorizar meu afastamento integral para cursar o doutorado. Estendo esse agradecimento às colegas e aos colegas docentes, bem como às servidoras e aos servidores técnico-administrativos do Departamento, que apoiaram esse afastamento e, em diversos momentos, assumiram atividades adicionais em decorrência dele. Espero retomar, em breve, o trabalho plenamente e poder agradecer-lhes pessoalmente.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana (PPG BioMicro) da Universidade de Brasília (UnB) por ter me acolhido e me oferecido suporte ao longo destes quatro anos. As professoras, os professores e as pessoas gestoras do PPG BioMicro demonstraram, na prática, o compromisso com a diversidade de saberes e de formações prévias na construção do conhecimento científico. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (UnB), em especial pela oportunidade de cursar disciplinas de estatística, métodos de pesquisa, avaliação de tecnologias em saúde e avaliação de técnicas diagnósticas, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

O Laboratório de Imunologia Celular do Instituto de Biologia (LIC/IB) da UnB, coordenado pela professora Cecília Favali, foi o espaço onde encontrei parceiras e parceiros para esta e outras pesquisas. Com vocês, aprendi sobre o trabalho experimental em Biologia Microbiana, com foco em imunologia, as rotinas do trabalho de bancada e a prática cotidiana da pesquisa. Tivemos, ainda, a alegria de produzir e publicar um artigo em conjunto. Contem comigo para continuarmos a colaborar em futuras pesquisas.

Agradeço às professoras Ana Flávia Parente (UnB), Clarissa Teixeira (Fiocruz-CE), Tatiana Rodrigues (UFS) e Maria Jânia Teixeira (UFC), que, juntamente com a professora Cecília Favali, aceitaram compor a banca avaliadora desta tese. Reconheço o tempo investido,

o rigor e o comprometimento exigidos para a realização da leitura, avaliação e discussão desta pesquisa. O convite foi feito em razão da excelência acadêmica e das qualidades pessoais de cada uma; sou profundamente grato por aceitarem integrar esta banca.

A produção de uma meta-análise, pela natureza do método, não se faz de forma solitária. Agradeço a Maria Clara, Glauco de Oliveira, Jhonny Wilson, Virgínia Kagure, Glauco e Livia Mendonça, que participaram das etapas de triagem (screening) e/ou de extração de dados. O trabalho de cada um e de cada uma foi decisivo para a qualidade desta tese.

Meu filho tinha quatro anos quando iniciei o doutorado. Ele sentiu intensamente as minhas viagens mensais para Brasília. O primeiro ano foi o mais difícil, pois, devido às disciplinas presenciais, eu permanecia em torno de seis dias por mês em Fortaleza. Nos anos seguintes, pude dividir melhor o tempo entre Fortaleza e Brasília, mas sei da dimensão da saudade que ele sentia e, muitas vezes, não conseguia expressá-la por causa da idade. Hoje, com oito anos, ele está ao meu lado enquanto escrevo este texto. Acompanha, curioso, o número de linhas e de palavras, porque, para ele, 15 linhas já são muitas. Querido Ian, você esteve e está sempre em meus pensamentos.

Durante minhas estadias em Brasília, minha mãe, Zulena, e meu irmão, Nilton, cuidaram do meu filho com dedicação e carinho. Agradeço imensamente a vocês por isso. Eu não teria conseguido cursar as disciplinas e cumprir as exigências presenciais do doutorado sem o apoio concreto e afetuoso da nossa família.

Os períodos em que estive em Brasília me permitiram reencontrar amigas antigas e fazer novas. Agradeço à Laura e ao Zeca da Mundo Crossfit. Vocês ajudaram muito, não deixando-me ficar fisicamente nem emocionalmente parado devido aos problemas no joelho. Durante estes anos, a Mundo foi um espaço onde conheci novos amigos e cuidei de mim. Agradeço ao Renato e à Raquel Matihara por serem meus “vizinhos” de Águas Claras e ao Carlos Riedel por ser meu “vizinho” de São Luiz. Também sou grato à Erica pelos happy hours e pelas oportunidades.

Por fim, agradeço às amigas e aos amigos, bem como às redes de apoio que me acompanharam, ainda que à distância, ao longo destes anos. As conversas, mensagens, escutas atentas, momentos de descontração e gestos de cuidado foram decisivos para reduzir o cansaço e sustentar o foco necessários para concluir esta tese. Mesmo sem citar nomes individualmente, registro aqui minha gratidão por cada gesto de presença e de apoio.

“A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos”  
(Skinner, 1953, p. 13).

## RESUMO

A leishmaniose cutânea causada pelo protozoário *Leishmania braziliensis* (LC-Lb) é uma doença tropical negligenciada transmitida por um inseto vetor, cuja imunopatogênese depende, entre outros fatores, de uma regulação complexa de citocinas e quimiocinas pró- e anti-inflamatórias em diversos perfis de resposta imunológica (Th1, Th2, Th17 e Treg). Até o presente momento, não há uma síntese de dados experimentais que descreva, com poder estatístico suficiente, a dinâmica destes imunoreguladores após a infecção por *L. braziliensis*. Nesta revisão sistemática com meta-análise, estimamos estatisticamente a magnitude das diferenças nos níveis de citocinas e quimiocinas entre pessoas com LC-Lb e grupos controle, utilizando dados experimentais obtidos in vitro a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). A revisão sistemática seguiu o protocolo PRISMA. 28 experimentos in vitro foram localizados por meio de uma busca padronizada em 13 bases de dados acadêmicas. O risco de viés foi avaliado com o “Pilot risk of bias tool to appraise clinical laboratory studies”. As diferenças de concentração de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-22, CXCL10 e CXCL9 foram meta-analisadas com o modelo de efeitos aleatórios. Todos os estudos apresentaram alto risco de viés. Os resultados dos experimentos apresentaram alta heterogeneidade, decorrente de diferenças no protocolo experimental ou de características clínicas dos pacientes. A síntese do TNF- $\alpha$  mostrou elevação de 601,79 pg/mL (n = 300; p = 0,017) em comparação com pessoas saudáveis. Indicando predomínio do perfil Th1 durante a infecção, mas com elevado risco de viés, devido à presença de perfis imunes mistos ou a infecções não diagnosticadas entre os participantes saudáveis. O mesmo ocorreu para outras citocinas, como o IFN- $\gamma$ . A meta-regressão univariada não apontou regulação significativa do TNF- $\alpha$  ou do IFN- $\gamma$  pela IL-10, mas há uma tendência de associação negativa. Diferenças nos riscos de vieses metodológicos e entre as técnicas analíticas (ELISA vs. citometria de fluxo) geraram resultados experimentais díspares em várias meta-análises, sugerindo que parâmetros experimentais diferentes confundem o entendimento atual da regulação imune na LC-Lb. O TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  e a IL-10 mostraram-se biomarcadores importantes para identificar o perfil imune dominante na LC-Lb. Foram apresentadas propostas para a elaboração de diretrizes destinadas à condução de pesquisas experimentais envolvendo *Leishmania* spp.

**Palavras-chave:** leishmaniose cutânea; *Leishmania braziliensis*; citocinas; quimiocinas; meta-análise.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis caused by the protozoan *Leishmania braziliensis* (LC-Lb) is a neglected tropical disease transmitted by an insect vector, whose immunopathogenesis depends, among other factors, on complex regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in various immune response profiles (Th1, Th2, Th17, and Treg). To date, there is no synthesis of experimental data that describes, with sufficient statistical power, the dynamics of these immunoregulators after infection with *L. braziliensis*. In this systematic review with meta-analysis, we statistically estimated the magnitude of differences in cytokine and chemokine levels between people with CL-Lb and control groups, using experimental data obtained in vitro from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The systematic review followed the PRISMA protocol. Twenty-eight in vitro experiments were located through a standardized search of 13 academic databases. The risk of bias was assessed using the “Pilot risk of bias tool to appraise clinical laboratory studies”. Differences in the concentration of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-22, CXCL10, and CXCL9 were meta-analyzed using the random effects model. All studies presented a high risk of bias. The results of the experiments showed high heterogeneity, due to differences in the experimental protocol or clinical characteristics of the patients. TNF- $\alpha$  synthesis showed an increase of 601.79 pg/mL (n = 300; p = 0.017) compared to healthy individuals. This suggests a predominance of the Th1 profile during infection; however, the results are subject to a high risk of bias due to the presence of mixed immune profiles or undiagnosed infections among healthy participants. The same occurred for other cytokines, such as IFN- $\gamma$ . Univariate meta-regression did not indicate a significant regulation of TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  by IL-10; however, there is a tendency toward a negative association. Differences in methodological bias risks and between analytical techniques (ELISA vs. flow cytometry) generated disparate experimental results in several meta-analyses, suggesting that different experimental parameters confound the current understanding of immune regulation in LC-Lb. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10 have been shown to be important biomarkers for identifying the dominant immune profile in LC-Lb. Proposals have been made for the development of guidelines for conducting experimental research involving *Leishmania spp.*

**Keywords:** cutaneous leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, cytokines, chemokines, meta-analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas da formação da lesão ulcerativa típica da leishmaniose cutânea.....	19
Figura 2 – Ciclo da Leishmania com hospedeiro humano. ....	22
Figura 3 – Atuação das citocinas nos perfis imunes Th1 e Th2 durante a leishmaniose cutânea. .....	30
Figura 4 – Dinâmica da atuação das quimiocinas e seus receptores durante a leishmaniose tegumentar. ....	38
Figura 5 - Meta-regressão univariada entre a diferença entre as médias de TNF- $\alpha$ de pacientes (LC-Lb) e de pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC (A) (n = 8), o tempo de cultura (B) (n = 10) e a concentração do antígeno da <i>L. braziliensis</i> (C) (n = 10).....	74
Figura 6 - Meta-regressão univariada entre a diferença nas médias de TNF- $\alpha$ de pacientes (LC-Lb) depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> e a concentração celular do PBMC (A), o tempo de cultura (B) e a concentração do antígeno da <i>L. braziliensis</i> (C).....	80
Figura 7 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IFN- $\gamma$ de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC (A) (n = 8), o tempo de cultura (B) (n = 9) e a concentração do antígeno da <i>L. braziliensis</i> (C) (n = 9). ....	85
Figura 8 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IL-10 de pacientes (LC-Lb) depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> , utilizando os moderadores: concentração celular do PBMC (A) (n = 8), tempo de cultura (B) (n = 9) e concentração do antígeno (C) (n = 9).....	96
Fluxograma 1 – Fluxograma Prisma da seleção de estudos da revisão sistemática. ....	50
Gráfico 1 - Meta-análise da diferença na concentração de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas entre os grupos de pessoas com LC-Lb, antes do tratamento, após reestimulação, e os grupos de pessoas saudáveis. ....	71
Gráfico 2 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$ de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis (HS) e a concentração média de IL-10 entre os pacientes por estudo (p = 0,15) (n = 7).....	76
Gráfico 3 - Viés de publicação nos estudos sobre a concentração de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb. ....	77
Gráfico 4 - Meta-análise da diferença na concentração de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> . ....	78
Gráfico 5 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$ entre meios estimulados e não estimulados de pacientes (LC-Lb) e a concentração média de IL-10 dos pacientes por estudo (p = 0,2).....	81
Gráfico 6 – Gráfico de funil (Funnel plot) com “trim and fill” para o viés de publicação nos estudos sobre a concentração de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb. ....	82
Gráfico 7 - Meta-análise da diferença na concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea, causada por <i>L. braziliensis</i> , antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis. ....	83
Gráfico 8 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IFN- $\gamma$ de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis (HS) e a concentração média de IL-10 entre os pacientes por estudo (n = 9).....	86
Gráfico 9 - Funnel plot para viés de publicação nos estudos sobre a concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do PBMC de pessoas com leishmaniose cutânea, após reestimulação com <i>L. braziliensis</i> .....	87

Gráfico 10 – Meta-análise da diferença na concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> .....	88
Gráfico 11 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-10 no sobrenadante de PBMC de pessoas com LC-Lb, antes do tratamento e após reestimulação, e de pessoas saudáveis. ....	90
Gráfico 12 - Análise de subgrupos, por risco de viés em “D3: relato de resultados”, da meta-análise da diferença na concentração de IL-10 entre os grupos de pessoas com LC-Lb antes do tratamento e os grupos de pessoas saudáveis. ....	92
Gráfico 13 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IL-10 de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC (A) (n = 10), o tempo de cultura (B) (n = 10) e a concentração do antígeno da <i>L. braziliensis</i> (C) (n = 10).....	93
Gráfico 14 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-10 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas por <i>L. braziliensis</i> (n = 128) e não estimuladas (n = 128), obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.....	94
Gráfico 15 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-17 no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com LC-Lb antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis.....	97
Gráfico 16 - Análise de subgrupos para o risco de viés no “D2: métodos experimentais” da meta-análise da diferença na concentração de IL-17 no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com LC-Lb e de amostras de pessoas saudáveis.....	99
Gráfico 17 - Análise de subgrupos por técnica utilizada para mensurar a concentração de citocinas, na meta-análise da diferença na concentração de IL-17 entre amostras do PBMC obtidas de pessoas com LC-Lb e de pessoas saudáveis.....	100
Gráfico 18 - Gráfico de funil para avaliar o viés de publicação entre estudos sobre IL-17 em casos de LC-Lb entre pacientes e pessoas saudáveis. ....	101
Gráfico 19 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-17 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas por <i>L. braziliensis</i> (n = 51) e não estimuladas (n = 51), obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento. ....	102
Gráfico 20 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-1 $\beta$ no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com LC-Lb antes do tratamento (n = 39) e de pessoas saudáveis (n = 21).....	103
Gráfico 21 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-1 $\beta$ no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas por <i>L. braziliensis</i> e não estimuladas, obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.....	104
Gráfico 22 - Gráfico de funil para avaliar o viés de publicação entre os estudos sobre IL-1 $\beta$ em amostras estimuladas e não estimuladas de pacientes com LC-Lb. ....	106
Gráfico 23 – Meta-análise da diferença na concentração de IL-22 no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea (causada por <i>L. braziliensis</i> ) antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis. ....	107
Gráfico 24 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL10 no sobrenadante de PBMC de pessoas com leishmaniose cutânea causada por <i>L. braziliensis</i> , antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis. ....	108
Gráfico 25 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL10 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas (n = 64) e não estimuladas (n = 64) por <i>L. braziliensis</i> , obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.....	110
Gráfico 26 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL9 no sobrenadante de PBMC de pessoas com leishmaniose cutânea causada por <i>L. braziliensis</i> , antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis. ....	111
Gráfico 27 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL9 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas e não estimuladas por <i>L. braziliensis</i> , obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.....	112

Quadro 1 - Atuação biológica das quimiocinas durante a infecção por <i>L. braziliensis</i> em hospedeiros humanos.....	39
Quadro 2 - Estudos selecionados para extração de dados e meta-análise (n = 28). .....	60
Quadro 3 – Resultados das meta-análises da concentração de citocinas e quimiocinas entre o grupo de pacientes com LC-Lb e os grupos controle (HS: sujeitos saudáveis e NS: meios não estimulados).....	125
Quadro 4 - Instrumento “Risk of bias tool for clinical laboratory studies” (Fox et al., 2024, p. 5) para a avaliação do risco de viés em estudos experimentais.....	153

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Plataformas acadêmicas e referências obtidas com a estratégia de busca. ....	48
Tabela 2 - Grupos de Participantes dos estudos selecionados e dados sociodemográficos. ....	62
Tabela 3 – Avaliação do risco de viés por estudo no Domínio 1: coleta e manuseio das amostras. .....	65
Tabela 4 – Avaliação do risco de viés por estudo no Domínio 2: métodos experimentais. ....	67
Tabela 5 – Resultados do risco de viés por estudo do Domínio 3: relato de resultados.....	69
Tabela 6 - Resultados da metarregressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$ entre pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC, o tempo de cultura e a concentração do antígeno da <i>L. braziliensis</i> utilizado. ....	74
Tabela 7 – Recomendações de tamanhos mínimos de amostras em experimentos comparando concentrações de citocinas em pacientes com LC-Lb e grupos controle (sujeitos saudáveis ou meios não estimulados). ....	114

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>As leishmanioses.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>A leishmaniose cutânea.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Ciclo biológico da Leishmania .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>O início da infecção .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b>O perfil de resposta imune Th1 .....</b>	<b>24</b>
<b>1.6</b>	<b>O perfil de resposta imune Th2 .....</b>	<b>26</b>
<b>1.7</b>	<b>O perfil da resposta imune Th17 .....</b>	<b>27</b>
<b>1.8</b>	<b>Linfócitos T reguladores na leishmaniose cutânea .....</b>	<b>28</b>
<b>1.9</b>	<b>O papel das citocinas e quimiocinas na leishmaniose cutânea.....</b>	<b>29</b>
<b>1.9.1</b>	<b><i>Citocinas que favorecem a resistência e controle na leishmaniose Cutânea.....</i></b>	<b>32</b>
<b>1.9.1.1</b>	<b><i>Fator de necrose tumoral <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>) .....</i></b>	<b>32</b>
<b>1.9.1.2</b>	<b><i>Interferon-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>) .....</i></b>	<b>32</b>
<b>1.9.1.3</b>	<b><i>Interleucina-1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>) .....</i></b>	<b>33</b>
<b>1.9.1.4</b>	<b><i>Interleucina-12 (IL-12) .....</i></b>	<b>33</b>
<b>1.9.1.5</b>	<b><i>Interleucina-17 (IL-17) .....</i></b>	<b>34</b>
<b>1.9.1.6</b>	<b><i>Interleucina-23 (IL-23) .....</i></b>	<b>34</b>
<b>1.9.1.7</b>	<b><i>Interleucina-32 (IL-32) .....</i></b>	<b>35</b>
<b>1.9.1.8</b>	<b><i>Interleucina-22 (IL-22) .....</i></b>	<b>35</b>
<b>1.9.2</b>	<b><i>Citocinas que favorecem a progressão da leishmaniose cutânea.....</i></b>	<b>36</b>
<b>1.9.2.1</b>	<b><i>Interleucina-4 (IL-4) .....</i></b>	<b>36</b>
<b>1.9.2.2</b>	<b><i>Interleucina-10 (IL-10) .....</i></b>	<b>36</b>
<b>1.9.2.3</b>	<b><i>Fator de Crescimento Transformador <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>) .....</i></b>	<b>37</b>
<b>1.9.3</b>	<b><i>Quimiocinas em cenários pró e anti-leishmaniose .....</i></b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>SÍNTESE E CONSISTÊNCIA DOS EXPERIMENTOS SOBRE AS CITOCINAS NA LC-LB .....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenho do estudo.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>CrITÉRIOS de inclusão e exclusão .....</b>	<b>45</b>

3.3	Estratégia de busca e screening .....	46
3.4	Desfecho analisado na meta-análise .....	51
3.5	Variáveis independentes .....	51
3.6	Exclusão de estudos e variáveis na etapa de análise dos dados .....	52
3.7	Análise do risco de viés .....	52
3.8	Extração e tratamento dos dados .....	53
3.9	Softwares utilizados .....	54
3.10	Análise estatística e meta-análise.....	54
3.11	Aspectos éticos .....	59
4	RESULTADOS .....	60
4.1	Avaliação do risco de viés.....	63
4.1.1	<i>Domínio 1: coleta e manuseio de amostras.....</i>	63
4.1.2	<i>Domínio 2: métodos experimentais.....</i>	66
4.1.3	<i>Domínio 3: relato de resultados.....</i>	68
4.2	TNF- $\alpha$ .....	70
4.2.1	<i>TNF-<math>\alpha</math> entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis.....</i>	70
4.2.2	<i>TNF-<math>\alpha</math> em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> 77</i>	77
4.3	IFN- $\gamma$ .....	82
4.3.1	<i>IFN-<math>\gamma</math> entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis .....</i>	82
4.3.2	<i>IFN em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i>....</i>	87
4.4	IL-10.....	89
4.4.1	<i>IL-10 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis.....</i>	89
4.4.2	<i>IL-10 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i>..</i>	93
4.5	IL-17 .....	96
4.5.1	<i>IL-17 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis.....</i>	96
4.5.2	<i>IL-17 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> 101</i>	101
4.6	IL-1 $\beta$ .....	103
4.6.1	<i>IL-1<math>\beta</math> entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis.....</i>	103
4.6.2	<i>IL-1<math>\beta</math> em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com <i>L. braziliensis</i> 104</i>	104
4.7	IL-22 .....	106
4.7.1	<i>IL-22 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis.....</i>	106
4.8	CXCL10 .....	108
4.8.1	<i>CXCL10 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis.....</i>	108

4.8.2	<i>CXCL10 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com L. braziliensis</i> .....	109
4.9	<b>CXCL9</b> .....	111
4.9.1	<i>CXCL9 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis</i> .....	111
4.9.2	<i>CXCL9 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com L. braziliensis</i> .....	112
4.10	<b>Aplicação das sínteses para cálculo amostral</b> .....	113
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	116
5.1	<b>Risco de viés dos estudos: tradição X padronização</b> .....	117
5.2	<b>Diretrizes para a pesquisa experimental com Leishmania</b> .....	122
5.3	<b>Meta-análises</b> .....	124
5.4	<b>A heterogeneidade</b> .....	128
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	131
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	132
	<b>ANEXO A - CHECKLIST DOS ELEMENTOS DE UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SEGUINDO AS ORIENTAÇÕES DO PRISMA STATEMENT 2020.</b> .....	149
	<b>ANEXO B – INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E RISCO DE VIÉS</b> .....	153

# 1 INTRODUÇÃO

Esta tese, intitulada “Regulação de citocinas na leishmaniose cutânea localizada por *Leishmania braziliensis*: revisão sistemática e meta-análise”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília, apresenta o trabalho de pesquisa realizado por meio de uma revisão sistemática, acompanhada de uma meta-análise quantitativa. Foram coletados, avaliados e integrados dados provenientes de estudos *in vitro* disponíveis na literatura acadêmica que analisam a produção de citocinas do sistema imunológico de pacientes com leishmaniose cutânea após reestímulo com *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) ou seus antígenos, comparando-os com dados de grupos-controle (sujeitos saudáveis ou meio não estimulado) em condições experimentais *in vitro*. Com isso, obtivemos uma síntese estatística de todos os achados experimentais disponíveis até o primeiro semestre de 2025, possibilitando discussões críticas e resultados que transcendem os achados de estudos experimentais isolados sobre a infecção por *Leishmania braziliensis* (Lb) na leishmaniose cutânea (LC-Lb).

A meta-análise proposta nesta tese tem relevância para a área, pois permite a síntese quantitativa e sistemática de dados dispersos e heterogêneos, publicados em diferentes estudos, sobre a regulação imune na leishmaniose cutânea por meio de citocinas e quimiocinas. Ao integrar os resultados disponíveis nas publicações acadêmicas, ela oferece uma visão estatisticamente confiável e crítica sobre a validade do que sabemos, com base em pesquisa experimental, sobre os mecanismos imunopatológicos de regulação por citocinas e quimiocinas, especificamente na infecção humana por *L. braziliensis*. Os resultados encontrados superam os estudos experimentais isolados, servem de referência para futuros trabalhos de pesquisa e auxiliam no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a LC-Lb que envolvam citocinas e quimiocinas.

Para tanto, apresentamos aqui um panorama teórico da infecção por *L. braziliensis* na leishmaniose cutânea em humanos, iniciando pela definição, seguindo para a epidemiologia, o ciclo biológico da *Leishmania*, os diferentes perfis da resposta imune (inata, Th1, Th2, Th17, Treg) e finalizando com o papel das principais citocinas. Estes temas são extensos e complexos, de modo que foi preciso fazer um recorte nos aspectos específicos da leishmaniose cutânea em seres humanos, causada por *L. braziliensis*, e relacionados às citocinas e quimiocinas investigadas. Para manter a coerência das explicações imunológicas, apresentamos citocinas e quimiocinas que não foram contempladas em estudos e experimentos da investigação desta tese.

## 1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas (Varikuti et al., 2018) e endêmicas em 99 países (WHO et al., 2025). Esta enfermidade acomete seres humanos e outros mamíferos e resulta da infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (Carvalho, Viana, et al., 2022). A infecção em humanos pode ser causada por mais de vinte espécies distintas de *Leishmania*, geralmente transmitidas por um inseto-vetor (de Araujo et al., 2021). As manifestações clínicas da leishmaniose são influenciadas por diversos fatores inter-relacionados, dentre os quais se destacam a interação entre as diferentes espécies de *Leishmania* que infectam o hospedeiro e a resposta imune deste, além do padrão da infecção, que pode ser localizada ou disseminada (Locksley et al., 1999). O perfil genético tanto do parasito quanto do hospedeiro também desempenha papel crucial, assim como fatores extrínsecos à infecção, como o estado de estresse e as condições nutricionais do indivíduo (Chitnis et al., 2013). Tais aspectos influenciam, conjuntamente, a gravidade, a progressão e a expressão clínica da doença, reforçando a complexidade do quadro patológico da leishmaniose (Locksley et al., 1999).

Dentre as diferentes formas clínicas de infecção, destaca-se a leishmaniose visceral (LV), considerada a segunda parasitose mais letal após a malária, cuja gravidade decorre da disseminação dos parasitos para órgãos como fígado, baço e medula óssea, causando diversas complicações (Costa et al., 2023). A leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) caracteriza-se por acometer as mucosas e pode ocasionar destruição tecidual nas áreas atingidas, devido a uma resposta inflamatória intensa (Amato et al., 2003). Tal condição pode causar danos significativos às mucosas, principalmente nas regiões do nariz e da cavidade oral (Amato et al., 2003). Entretanto, a manifestação clínica mais comum nas leishmanioses é a leishmaniose cutânea (LC) (Bennis et al., 2017).

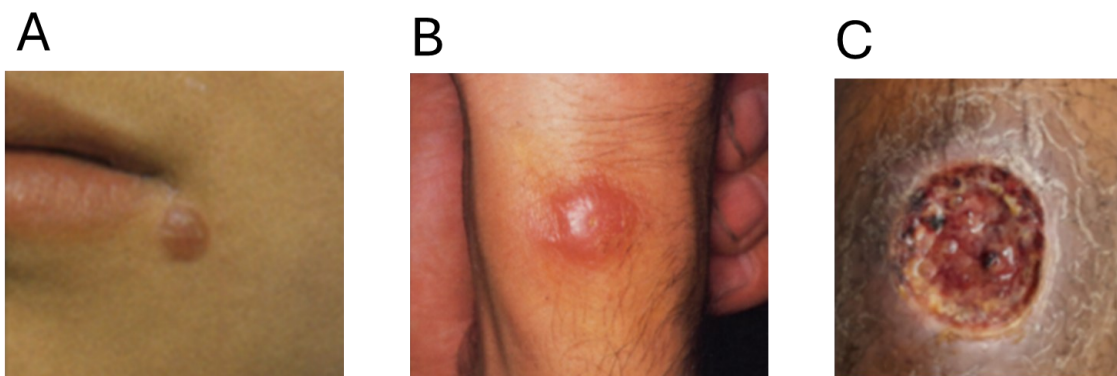
## 1.2 A leishmaniose cutânea

A principal característica da leishmaniose cutânea é o surgimento de lesões cutâneas únicas que, em alguns casos, tornam-se crônicas e podem ocasionar extensa destruição tecidual e desfiguração (Bennis et al., 2017; Carvalho et al., 2024). A leishmaniose cutânea não apenas apresenta desafios clínicos, mas também provoca impactos psicossociais consideráveis, decorrentes das cicatrizes residuais pós-tratamento e do estigma social associado à enfermidade (Bennis et al., 2017). No presente trabalho, adotar-se-á o termo "leishmaniose tegumentar"

(Scorza et al., 2017) para designar, de forma abrangente, todas as manifestações clínicas envolvendo a pele decorrentes da infecção por *Leishmania*.

O principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Gontijo & Carvalho, 2003). Pode se manifestar de diferentes formas, variando de uma única úlcera na pele, frequentemente associada a um aumento de linfonodos (gânglios linfáticos) próximos à lesão cutânea, até formas com várias lesões (Llanos-Cuentas et al., 1984). As lesões ulcerativas localizam-se perto do local de entrada do parasito, onde o flebotomíneo fêmea infectou a pessoa com *Leishmania braziliensis* (Paulo et al., 2002; Volpedo et al., 2021). O aparecimento das lesões na leishmaniose cutânea ocorre após um período de incubação assintomática, cuja duração pode variar de poucos dias a três anos, sendo comumente observada uma janela temporal de 2 a 8 semanas para o desenvolvimento dos primeiros sinais clínicos (Scorza et al., 2017). Elas se formam como um pequeno nódulo avermelhado (Figura 1A), que evolui para um nódulo indolor (Figura 1B), frequentemente ulcera e forma lesões autolimitadas (Figura 1C), sendo esta a forma clássica da lesão (Dowlati, 1996). A pápula ou nódulo inicial apresenta potencial de resolução espontânea, podendo cicatrizar sem evoluir para ulcerações ou para o desenvolvimento de outras manifestações clínicas típicas da leishmaniose cutânea (Dowlati, 1996). As lesões podem ainda ser acometidas por infecções secundárias por bactérias ou por fungos (Volpedo et al., 2021).

Figura 1 – Etapas da formação da lesão ulcerativa típica da leishmaniose cutânea.



Fonte: Adaptado de Dowlati (1996, p. 426) e Carvalho, Bacellar, et al. (2022).

Legenda: A. Pequeno nódulo avermelhado, B. Nódulo indolor, C. Lesão ulcerativa por *Leishmania braziliensis*.

Estima-se que ocorram entre 600.000 e 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) anualmente no mundo (Saidi et al., 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde - WHO et al. (2025), 91 países são endêmicos de leishmaniose cutânea, com 211 mil novos casos reportados em 2024. No Brasil foram reportados 12910 novos casos em 2023 (PAHO, 2024). Especificamente no norte da África, a LC é causada por três espécies principais:

*Leishmania major* (*L. major*), *Leishmania tropica* (*L. tropica*) e *Leishmania infantum* (*L. infantum*) (Saidi et al., 2023). No Novo Mundo, a leishmaniose cutânea está amplamente distribuída na América do Sul e na América Central, sendo causada principalmente por *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*), *Leishmania panamensis* (*L. panamensis*), *Leishmania peruviana* (*L. peruviana*), *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) e *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) (Burza et al., 2018).

Os flebotomíneos envolvidos na transmissão de *L. braziliensis* são *Lutzomyia wellcomei* e *Lu. (Ny.) neivai*, *Lu. (Ny.) whitmani* e *Lutzomyia ovallesi* (Saidi et al., 2023). Apesar de os flebotomíneos serem os principais vetores de transmissão, a infecção também pode ocorrer por transfusão de sangue ou por troca de material biológico (Man et al., 2022).

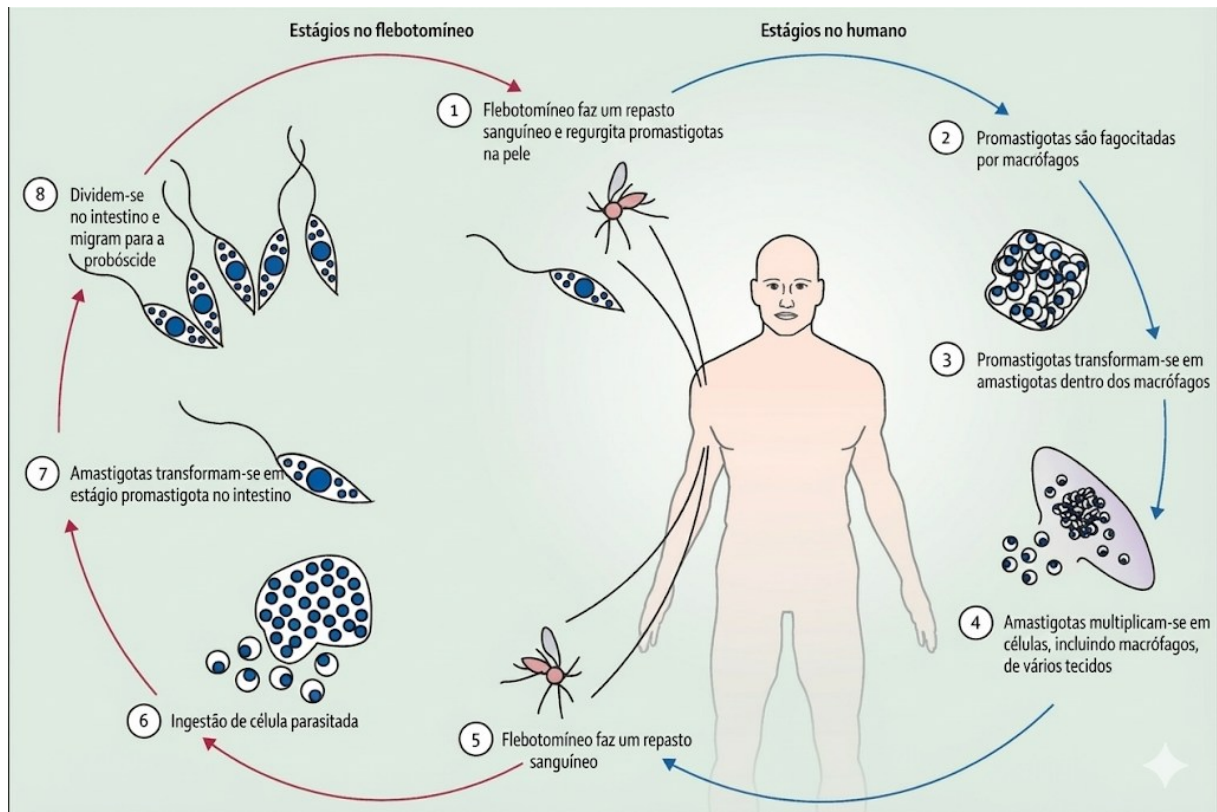
Diferentes genótipos de *L. braziliensis* circulam em distintas regiões geográficas brasileiras; essa diversidade genética pode estar associada a variações na apresentação clínica da doença, incluindo diferenças no tamanho das lesões, no tempo de evolução e na resposta ao tratamento (Turetz et al., 2002). A leishmaniose cutânea constitui a manifestação clínica predominante da infecção por *Leishmania braziliensis*, representando cerca de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar americana registrados na região endêmica de Corte de Pedra (Bahia, Brasil) (Carvalho, Bacellar, et al., 2022). Nesta região da Bahia, cerca de 3% dos indivíduos acometidos por leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (LC-Lb) evoluem para a forma mucocutânea da doença, caracterizada pela destruição das estruturas faciais (Carvalho, Bacellar, et al., 2022). Além disso, aproximadamente 6% desenvolvem a leishmaniose disseminada, com pelo menos 10 lesões distribuídas pelo corpo; enquanto manifestações clínicas atípicas da leishmaniose cutânea são relatadas em cerca de 1% dos casos (Carvalho, Bacellar, et al., 2022).

As lesões ulcerativas na pele podem se recuperar sem tratamento após semanas a meses, mas isso não é comum (J. M. D. Silva et al., 2024; Souza et al., 2012). É necessário o tratamento medicamentoso da LC-Lb para obter a remissão dos sintomas. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha por muitas décadas; apresentam eficácia variável, de 60 a 90%, toxicidade relevante e administração parenteral (Oliveira et al., 2011). Segundo Ponte-Sucre et al. (2017), a anfotericina B e a miltefosina são alternativas terapêuticas, mas também apresentam questões de eficácia, toxicidade e custo. A inexistência de vacinas eficazes, somada à crescente preocupação com o desenvolvimento de resistência aos tratamentos disponíveis, evidencia a necessidade premente de aprofundar o entendimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na regulação imunológica da leishmaniose cutânea (Ponte-Sucre et al., 2017; Scott & Novais, 2016).

### 1.3 Ciclo biológico da *Leishmania*

O processo infeccioso da leishmaniose cutânea frequentemente ocorre em ciclo, que pode se encerrar no hospedeiro humano (Figura 2). Dependendo da espécie de *Leishmania*, o ciclo pode ser zoonótico, com animais domésticos ou selvagens como hospedeiros reservatórios, ou antroponótico, que ocorre quando o inseto flebótomo se alimenta do sangue de um ser humano, que, por sua vez, infecta outro ser humano com a *Leishmania* (Alvar et al., 2012). O ciclo inicia-se quando a fêmea infectada realiza o repasto sanguíneo, que permite o acesso das formas promastigotas flageladas à pele do hospedeiro vertebrado (Kaye & Scott, 2011; Saidi et al., 2023). Esta é a forma infecciosa da *Leishmania*, também chamada de promastigota metacíclica (Sunter & Gull, 2017). As leishmanias na forma promastigota penetram nas células imunes do sistema fagocitário mononuclear, principalmente neutrófilos e macrófagos, onde sofrem transformação para a forma amastigota, que é o estágio replicativo intracelular do parasita (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Sunter & Gull, 2017). As leishmanias na forma amastigota multiplicam-se dentro dos vacúolos fagossômicos de células fagocitárias, utilizando-as como bunkers para escapar do reconhecimento por outras células do sistema imune e promovendo a infecção local (Mattison et al., 1992). Após a replicação, as leishmanias podem eclodir e disseminar-se para outras células fagocitárias e tecidos próximos, o que pode levar a diferentes manifestações clínicas cutâneas ou viscerais (Kaye & Scott, 2011). O processo infeccioso forma um ciclo quando os flebotomíneos se alimentam de um hospedeiro infectado, ingerindo células infectadas por amastigotas, que então se transformam na forma promastigota no trato digestivo do flebotomíneo, fechando o ciclo (Ready, 2013).

Figura 2 – Ciclo da *Leishmania* com hospedeiro humano.



Fonte: Adaptado de Burza et al. (2018).

Legenda: O ciclo biológico da *Leishmania* inicia-se quando o flebotomíneo fêmea, durante o repasto sanguíneo, regurgita promastigotas metacíclicas infectantes na pele do hospedeiro humano (1). Essas formas são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema fagocitário mononuclear (2), onde sofrem diferenciação para a forma amastigota no interior dos vacúolos fagossômicos (3). Os amastigotas multiplicam-se intracelularmente, levando à lise da célula hospedeira e à infecção de novos macrófagos em diferentes regiões teciduais (4). A perpetuação do ciclo ocorre quando um novo flebotomíneo se alimenta do sangue de um indivíduo infectado e ingere macrófagos contendo amastigotas (5-6). No trato digestivo do inseto, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas (7), que se multiplicam e tornam-se infectantes novamente (8), fechando o ciclo de transmissão.

#### 1.4 O início da infecção

A imunidade inata atua nos primeiros momentos da infecção por *Leishmania* (Volpedo et al., 2021). Envolve a ação coordenada de células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, além da produção de citocinas e quimiocinas e da ativação das proteínas do sistema do complemento, que, juntas, promovem o controle inicial da infecção (Dubie & Mohammed, 2020).

Na pele ocorrem as primeiras ações do corpo contra a infecção pelo parasito. Nela encontram-se os queratinócitos, células da pele que atuam como a primeira linha de defesa. Estas células possuem uma grande diversidade de receptores para reconhecer patógenos, tais como os receptores do tipo Toll (TLR), do tipo NOD (NLR) e do tipo RIG-I (RLR) (Lebre et al., 2007). O contato dos queratinócitos com a *Leishmania* ativa as vias de sinalização dos

receptores do tipo Toll (TLRs), o que promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, responsáveis pela ativação da resposta imune mediada por linfócitos T helper do subtipo 1 (Th1) e pelo recrutamento de células do sistema imune (Miller & Modlin, 2007; Passelli et al., 2021). Os queratinócitos são capazes de produzir citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 e IL-10, e podem viabilizar a expressão de quimiocinas, como a CXCL9 e a CXCL10, no local da infecção (Albanesi et al., 2005).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células do sistema imune inato a chegar ao local da infecção, e já foi descrita a possibilidade deles servirem de “cavalos de Tróia” para o acesso da *Leishmania* aos macrófagos, caso sejam infectados (Laskay et al., 2003; Scott & Novais, 2016). Neste cenário, os neutrófilos infectados são induzidos a secretar elevados níveis da quimiocina MIP-1 $\beta$ , responsável pelo recrutamento de monócitos (Dubie & Mohammed, 2020). Posteriormente, esses neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados. Volpedo et al. (2021) relatam que a fagocitose destes neutrófilos apoptóticos infectados por *L. major* dificulta a ativação de macrófagos e células dendríticas, de modo que o neutrófilo infectado facilita o acesso do parasito ao macrófago. Estudos posteriores relatam que, embora tradicionalmente os neutrófilos sejam considerados as primeiras células recrutadas na resposta imunológica à infecção por *Leishmania major*, uma população de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>+</sup> migra inicialmente para os tecidos inflamados (Goncalves et al., 2011). A migração dos Ly6C<sup>+</sup> para os tecidos inflamados é mediada pela sinalização do receptor de quimiocina CCR2 e pela ativação plaquetária (Goncalves et al., 2011). As plaquetas ativadas liberam o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), que promove a rápida secreção da quimiocina CCL2 por leucócitos e células mesenquimais, facilitando, assim, o recrutamento celular ao local da inflamação (Goncalves et al., 2011). Diversos estudos sugerem que esses monócitos podem exercer um papel duplo: por um lado, controlar a multiplicação da *Leishmania major* por meio da liberação rápida de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o processo de fagocitose, conhecido como explosão respiratória (respiratory burst); por outro, colaborar na patogênese ao atuar como reservatório de parasitos, favorecendo sua proliferação e transmissão célula a célula, contribuindo assim para a persistência da *Leishmania* no hospedeiro (Volpedo et al., 2021).

Após a chegada dos neutrófilos, espera-se a de macrófagos, o que depende da atuação das quimiocinas (de Araujo et al., 2021). No contexto da leishmaniose cutânea, os receptores expressos por macrófagos e neutrófilos reconhecem moléculas superficiais do parasito, tais como lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína-63 (gp63) e glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Dubie & Mohammed, 2020). A detecção dessas moléculas induz a ativação celular,

promove a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas coestimuladoras (Dubie & Mohammed, 2020).

Ainda considerando a imunidade inata, os inflamassomas atuam no citoplasma celular na produção de citocinas pró-inflamatórias (Kihel et al., 2021). Os inflamassomas são complexos formados por várias proteínas interconectadas, construídos no citoplasma das células do sistema imune inato quando os receptores de reconhecimento de padrão (PRR) reconhecem sinais de patógenos ou de dano celular (Broz & Dixit, 2016). Estes complexos proteicos atuam na maturação e na secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e a IL-18, além de promoverem a piroptose, que contribui para a defesa contra a *Leishmania* (Broz & Dixit, 2016). A presença de IL-1 $\beta$  atua de forma relevante na magnitude dos sintomas e no agravamento da leishmaniose cutânea. Tanto que, na forma difusa da leishmaniose cutânea, há evidências de que a análise do soro aponta concentrações mais elevadas de IL-1 $\beta$  do que na forma localizada da doença, com redução após a recuperação dos pacientes (Santos et al., 2018). Pirmez et al. (1993); (Santos et al., 2018). Pirmez et al. (1993) realizaram biópsias de pacientes infectados por *L. braziliensis*, nas formas localizadas e mucocutâneas, e observaram elevada expressão de mRNA da IL-1 $\beta$ .

Nas etapas posteriores da infecção, os macrófagos são considerados os principais hospedeiros da *Leishmania* (Scott & Novais, 2016) e a ativação da resposta imune adaptativa celular constituirá um fator essencial para a resolução eficaz da leishmaniose, bem como para a indução de imunidade duradoura contra o patógeno (Volpedo et al., 2021).

## 1.5 O perfil de resposta imune Th1

Uma resposta imune protetora contra a leishmaniose cutânea, inclusive na infecção por *L. braziliensis* (Carneiro et al., 2016), é caracterizada pela ação da resposta imune CD4+ Th1 (Varikuti et al., 2018). A resposta imune Th1 é responsável pela autorrecuperação em pessoas com a forma subclínica da infecção por *L. braziliensis*, bem como pela recuperação, mesmo sem tratamento, de pessoas com a forma clínica da leishmaniose cutânea (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). No caso da polarização da resposta imune Th1 não ser suficiente para interromper a infecção pela *Leishmania braziliensis*, o controle da doença dependerá de uma interação complexa entre diversos tipos celulares, citocinas, quimiocinas e outras moléculas (Carvalho, Bacellar, et al., 2022), incluindo linfócitos CD4+ e CD8+, células natural killer (NK), macrófagos e, em menor frequência, neutrófilos e linfócitos B (Carneiro et al., 2016; Carvalho, Bacellar, et al., 2022). Apesar da função antiparasitária do perfil Th1 ser fundamental

para eliminar a *L. braziliensis*, sua ativação, com intensas respostas inflamatórias, danifica o tecido e leva à formação das lesões típicas da leishmaniose cutânea (Scott & Novais, 2016).

No estágio inicial da infecção por *Leishmania braziliensis*, manifesta-se a pequena lesão papular não ulcerada acompanhada de linfadenopatia satélite proeminente, constituindo a fase denominada leishmaniose cutânea precoce (E-CL) (Paulo et al., 2002). Durante esta fase, ocorre uma produção inicial e moderada de citocinas típicas do perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Costa et al., 2018). Entre duas e quatro semanas depois, as respostas imunes do perfil Th1 são positivamente reguladas, com aumento significativo nos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , concomitante à expressão das quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10, bem como das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6) (Costa et al., 2018).

Após a interação inicial com a *L. braziliensis*, as células apresentadoras de antígeno (APCs) ativam os linfócitos T por contato direto e pela liberação de citocinas, como a interleucina-12 (IL-12), que induz a diferenciação dos linfócitos T auxiliares virgens em linfócitos T helper-1 (Th1), principais produtores de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Células natural killer (NK) constituem outra fonte importante de produção de IFN- $\gamma$ , promovendo a diferenciação dos linfócitos Th1 e contribuindo para a resolução da infecção (Prajeeth et al., 2011). O IFN- $\gamma$  estimula fagócitos, em especial os macrófagos, a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), que são os principais agentes microbicidas contra a *Leishmania* (Varikuti et al., 2018; Volpedo et al., 2021). O óxido nítrico (NO) e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) são as principais moléculas liberadas por macrófagos durante a explosão respiratória (Carneiro et al., 2016). Os amastigotas de *Leishmania braziliensis* apresentam sensibilidade às espécies reativas de oxigênio (ROS), demonstrando maior capacidade de sobrevivência e de replicação em condições em que a produção de ROS está ausente ou reduzida (Novais et al., 2014).

IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  são mediadores críticos na proteção contra as infecções por *Leishmania* (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Especificamente na leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* (LC-Lb), observa-se uma resposta inflamatória promovida por Th1 exagerada, com elevada produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que contribui para o controle parasitário, mas também está associada à gravidade das lesões cutâneas (Carneiro et al., 2016).

Estudos observacionais indicam que, nas fases iniciais da infecção por *Leishmania braziliensis*, há uma prevalência de baixos níveis de IFN- $\gamma$ , concomitante à elevação da IL-10 circulante (Volpedo et al., 2021). Contudo, com a progressão da infecção, há uma inversão desse perfil, caracterizada pela diminuição dos níveis de IL-10 e pelo aumento das concentrações de IFN- $\gamma$ , independentemente da forma clínica manifestada (Oliveira et al.,

2014). Tal equilíbrio entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias parece determinante para a resolução efetiva das lesões cutâneas localizadas. Gaze et al. (2006) sugerem que o aumento simultâneo de IL-10 e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nas células mononucleares do sangue periférico estabelece um mecanismo regulatório que não apenas contribui para o controle do parasita, mas também limita a imunopatologia associada à resposta imune exacerbada.

A permanência do parasito nas células fagocitárias e nas lesões pode favorecer a hipersensibilidade tardia (Delayed-Type Hypersensitivity - DTH) na leishmaniose cutânea (Llanos-Cuentas et al., 1984; Saidi et al., 2023). Especialmente na infecção por *Leishmania braziliensis*, caracteriza-se por uma resposta imunológica celular mediada por linfócitos T, que geralmente ocorre entre 24 e 72 horas após a exposição ao antígeno da *Leishmania* (Llanos-Cuentas et al., 1984). Esta resposta envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que ativam macrófagos para eliminar parasitos intracelulares (Carvalho, Bacellar, et al., 2022). Na infecção por *L. braziliensis*, o teste de hipersensibilidade tardia, comumente realizado como teste cutâneo com antígenos da *Leishmania*, é positivo na maioria dos pacientes que desenvolvem formas clínicas típicas da doença (Guimaraes et al., 2024). A intensidade dessa reação está correlacionada à capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imune Th1 eficaz, associada à cura da lesão cutânea (Guimaraes et al., 2024).

Além disso, indivíduos com resposta DTH positiva, mas sem lesões clínicas evidentes, podem apresentar infecções subclínicas, o que reflete um equilíbrio entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro (Carvalho et al., 2022). A ausência ou diminuição da resposta DTH está associada a formas mais graves da doença, como a leishmaniose difusa, caracterizada pela disseminação do parasita e pela ausência de resposta celular eficaz.

## 1.6 O perfil de resposta imune Th2

Enquanto a resposta Th1 polarizada está associada à resolução da leishmaniose cutânea, uma resposta imune polarizada Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-13 e IL-10, está correlacionada à suscetibilidade e persistência da doença (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Essas citocinas, em conjunto com TGF- $\beta$ , suprimem as respostas imunes protetoras e contribuem para a progressão da doença (Prajeeth et al., 2011). Por outro lado, quando há equilíbrio com os processos do perfil Th1, as respostas Th2 promovem a regulação da resposta inflamatória, reduzindo as sequelas da inflamação e favorecendo a cicatrização das lesões cutâneas (Volpedo et al., 2021).

As citocinas expressas no perfil imune do tipo Th2 são responsáveis pela cicatrização das lesões. A IL-10 pode suprimir os efeitos do IFN- $\gamma$ , que, em níveis elevados, pode causar danos teciduais durante a doença (Rocha et al., 1999). As citocinas interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) promovem a indução da arginase-1 (Arg-1) em macrófagos, uma enzima característica do perfil Th2, que desempenha papel fundamental na reparação tecidual (El Kasmi et al., 2008).

A persistência de baixos níveis de parasitos de *Leishmania* na derme após a resolução das lesões é atribuída à supressão da imunidade adquirida, mediada pela IL-10, por uma subpopulação de células Th1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>, que apresenta produção tanto de IL-10 quanto de IFN- $\gamma$  (Anderson et al., 2008). A existência residual da *Leishmania*, favorecida pelos processos Th2, sustenta a manutenção de linfócitos T de memória específicos para *Leishmania*, essenciais para a imunidade contínua (Peters et al., 2014). Embora a resposta Th1 também promova a geração de linfócitos T de memória, com capacidade protetora mesmo na ausência dos parasitos (Colpitts et al., 2009). O papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na resposta imune secundária permanece discutível, com evidências que apontam sua importância no controle de uma possível reinfecção por *Leishmania*, enquanto outros estudos indicam um papel secundário durante a reinfecção (Scott & Novais, 2016). Portanto, a imunidade na reinfecção é predominantemente mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> na leishmaniose cutânea localizada (Novais et al., 2014; Scott & Novais, 2016).

## 1.7 O perfil da resposta imune Th17

Os linfócitos Th17 constituem um subconjunto específico de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, identificados inicialmente por Harrington et al. (2005). Segundo estes autores, os linfócitos Th17 são gerados em resposta à estimulação por IL-23, em conjunto com outras citocinas, em linfócitos CD4<sup>+</sup> virgens, apresentando um programa de desenvolvimento distinto daquele observado nos linfócitos Th1 e Th2 (Harrington et al., 2005). As células dendríticas (DC) participam da diferenciação dos linfócitos virgens em Th17 via IL-23. Quando as DCs são estimuladas por células apoptóticas infectadas por *Leishmania*, liberam TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 (Morales-Primo et al., 2024; Torchinsky et al., 2009). Essa liberação combinada dessas citocinas induz a secreção de IL-17, promovendo a diferenciação das células Th17 e a resposta imune inflamatória associada (Morales-Primo et al., 2024). A diferenciação da linhagem Th17 é inibida quando as células CD4<sup>+</sup> virgens são expostas a IFN- $\gamma$  e IL-4, citocinas produzidas nas respostas Th1 e Th2, respectivamente, durante a leishmaniose cutânea (Morales-Primo et al.,

2024). Tal inibição sugere mecanismos de regulação cruzada entre esses subconjuntos de linfócitos T e suas respectivas citocinas.

Os linfócitos Th17 também são responsáveis pela produção de IL-21 e IL-22 (Guglani & Khader, 2010). A IL-21 atua na diferenciação, na função e na regulação tanto das células do sistema imune inato quanto do sistema adaptativo (Spolski & Leonard, 2014). A IL-22 atua na regeneração tecidual ao inibir a apoptose das células epiteliais e promover sua proliferação (Dudakov et al., 2015).

A IL-17, produzida principalmente por células Th17, promove a migração e a ativação de neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção por *Leishmania*, facilitando a eliminação dos parasitos nas fases iniciais da doença (Volpedo et al., 2021). Além disso, Gonzalez et al. (2020) sugerem que a atividade dos linfócitos Th17 contribui para o controle da *Leishmania* através da ativação do inflamasoma NLRP3.

Morales-Primo et al. (2024) sintetizam as principais funções dos linfócitos Th17 na leishmaniose em três pontos: (1) participam da quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, através das quimiocinas CXCL8 e da IL-1; (2) ativam células citotóxicas (NK e CD8+) e a secreção de citocinas pró-inflamatórias e (3) regulam por feedback negativo entre a ativação de linfócitos T reguladores (Tregs), por TNF- $\alpha$ , e a inibição dos linfócitos Th17, por IL-10.

Os resultados de diversos estudos descrevem um cenário em que uma resposta descompensada dos linfócitos Th17, durante as fases mais avançadas da leishmaniose, pode provocar o recrutamento de macrófagos e a subsequente polarização destes no fenótipo M2, alinhados ao perfil imune Th2 (Bacellar et al., 2009; Shen et al., 2018). Estes macrófagos recrutados, em conjunto com os neutrófilos, podem ser infectados, piorando a situação do paciente ao prolongar a infecção (Morales-Primo et al., 2024).

## 1.8 Linfócitos T reguladores na leishmaniose cutânea

Os linfócitos T reguladores (Tregs) representam uma subpopulação especializada caracterizada pela expressão dos marcadores CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup>, cuja principal função é modular negativamente a ativação e as funções efetoras de múltiplos tipos celulares do sistema imune, promovendo a manutenção da homeostase imunológica e a tolerância periférica aos autoantígenos, prevenindo respostas autoimunes e danos teciduais (Zhu & Paul, 2008). Durante a leishmaniose cutânea, os linfócitos T reguladores (Tregs) desempenham papel na modulação das respostas imunes, evitando reações prejudiciais, especialmente contra autoantígenos; porém, seu efeito também pode resultar na supressão de respostas imunes benéficas ao

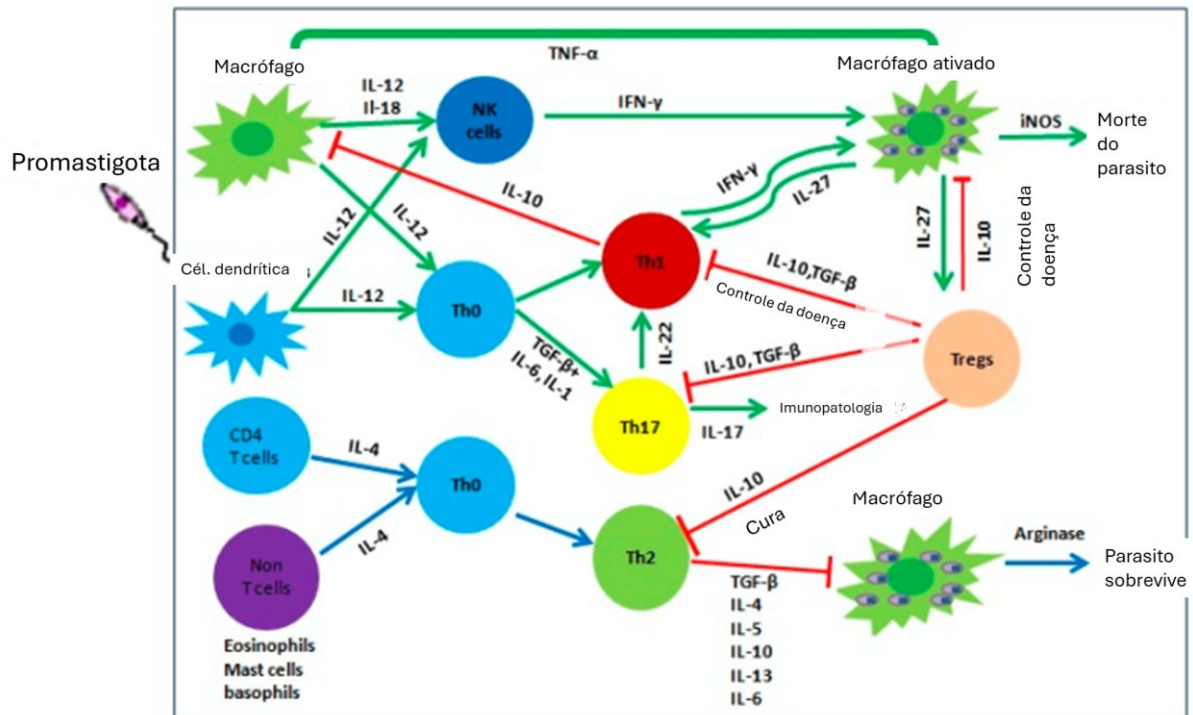
hospedeiro (Dubie & Mohammed, 2020). Essas células secretam citocinas regulatórias, dentre as quais destacam-se o TGF- $\beta$  e a IL-10, que atuam diretamente sobre macrófagos e células dendríticas para atenuar a liberação de mediadores pró-inflamatórios (Santos et al., 2013). A existência de linfócitos T reguladores (Tregs) nos tecidos infectados pode ser uma resposta imune do hospedeiro para manter o equilíbrio no controle da infecção por *Leishmania* e reduzir a inflamação excessiva, o que, paralelamente, favorece a sobrevivência do parasito (Saidi et al., 2023). Tal mecanismo de feedback negativo contribui para o equilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios, sendo determinante para o controle da imunopatologia e para a preservação tecidual no sítio de infecção por *Leishmania* (Morales-Primo et al., 2024; Santos et al., 2013).

Os linfócitos T reguladores podem atuar em paralelo ao contexto Th2, inibindo os linfócitos Th17 por meio da produção de IL-10 (Saidi et al., 2023). Em conjunto com o TGF- $\beta$ , a IL-10 controla expressões elevadas de TNF- $\alpha$  e IL-17, permitindo a regeneração do tecido danificado durante a inflamação (Goncalves de Albuquerque et al., 2019).

## **1.9 O papel das citocinas e quimiocinas na leishmaniose cutânea**

A patogênese da leishmaniose cutânea decorre da interação complexa entre as células do sistema imunológico do hospedeiro e suas respectivas citocinas, e o parasito, determinando o curso clínico da infecção, seja em direção à resolução ou à progressão da doença (Figura 3) (Maspi et al., 2016). Durante a infecção, as citocinas podem ser classificadas como anti-leishmania ou pró-leishmania, dependendo de seus papéis na progressão da leishmaniose (Mirzaei et al., 2021).

Figura 3 – Atuação das citocinas nos perfis imunes Th1 e Th2 durante a leishmaniose cutânea.



Fonte: Adaptado de Maspi et al. (2016).

Legenda: a figura apresenta os caminhos imunológicos das citocinas envolvidas na patogênese da leishmaniose cutânea, que participam da diferenciação dos subconjuntos de linfócitos T CD4+ em fenótipos Th1, Th2, T reg e Th17. A entrada do parasito na forma promastigota estimula as células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas, a produzirem citocinas pró-inflamatórias, entre as quais se destaca a IL-12, que direciona a diferenciação dos linfócitos T virgens (Th0) para o fenótipo Th1, que promove a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). As células Natural Killer (NK) também são estimuladas a produzir IFN- $\gamma$ . Este último ativa os macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO), essencial para a eliminação do parasita. Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, produzidas por linfócitos CD4 e outros tipos celulares (eosinófilos, mastócitos, basófilos), direcionam a diferenciação de Th0 para Th2, suprimindo a atividade microbicida dos macrófagos por meio de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-6, entre outras. A desregulação, com superprodução de citocinas inflamatórias, conduz ao agravamento do dano aos tecidos. Citocinas como o TGF- $\beta$  e o IL-27, secretadas por macrófagos e células dendríticas, promovem a ativação de linfócitos T reguladores (Treg), que produzem IL-10 para suprimir a liberação de mediadores inflamatórios, estabelecendo, assim, a regulação da inflamação e controlando a destruição dos tecidos infectados.

A resposta imune do tipo Th1 (mediada por linfócitos T helper do subtipo 1) cria o cenário antileishmanial, caracterizado por uma resposta pró-inflamatória intensa que inclui o aumento da produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18 e IL-23a, juntamente com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), granzima B e a intensificação da atividade fagocitária; processos necessários para o controle da infecção por *Leishmania* (de Araujo et al., 2021; Mirzaei et al., 2021; Saidi et al., 2023). Por outro lado, a ativação exacerbada do perfil Th1 leva a uma inflamação intensa, promovendo a ativação e o recrutamento contínuos de células imunes no tecido afetado, liberando enzimas, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores tóxicos que, além de combater o patógeno, agridem as células e o tecido humano (Maspi et al., 2016). As lesões na pele da leishmaniose cutânea

são uma das consequências da ativação intensa do perfil Th1 (Martinez-Valencia et al., 2017). Assim, a resposta imune desregulada, embora destinada a eliminar o parasita, pode causar destruição e prejuízo funcional nos tecidos, agravando a forma clínica da leishmaniose cutânea.

O contexto pró-leishmania decorre da resposta imune predominantemente do tipo Th2 (mediada por linfócitos T helper do tipo 2) com função anti-inflamatória (reguladora), marcada pela expressão aumentada das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-10 e do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que contribui para a proliferação intracelular da *Leishmania* e, conseqüentemente, para a progressão patológica da leishmaniose (de Araujo et al., 2021; González et al., 2010). A polarização da resposta imune mediada por linfócitos T, direcionada para um perfil Th1 pró-inflamatório ou Th2 anti-inflamatório, é determinada predominantemente pelas interações e comportamentos dos macrófagos e neutrófilos, bem como pelos perfis específicos de citocinas e quimiocinas que produzem (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

A recuperação das lesões cutâneas na leishmaniose depende do equilíbrio dinâmico entre as diferentes citocinas dos processos Th1 e Th2. As lesões observadas em indivíduos infectados por *Leishmania braziliensis* correlacionam-se com uma inflamação intensa na pele, pois a infecção por esta espécie desencadeia uma resposta imune típica Th1 significativa (Saidi et al., 2023). A geração de mediadores pró-inflamatórios em resposta à infecção por *Leishmania braziliensis* constitui o principal fator responsável pelo dano tecidual clinicamente identificado (Saidi et al., 2023).

A preponderância do perfil de resposta Th1 ou do Th2 direciona o desfecho esperado na leishmaniose. Caso o perfil Th1 seja dominante, ocorrem a eliminação do parasito e a cicatrização das lesões (Stafford et al., 2002). Caso o perfil de resposta imune Th2 seja o mais atuante, o parasito continuará no organismo, que terá melhores condições para evadir as tentativas de controle por parte dos macrófagos, mantendo as lesões (Stafford et al., 2002).

Investigações prévias (de Araujo et al., 2021) evidenciaram que as quimiocinas e seus respectivos receptores desempenham um papel fundamental na regulação da migração e da interação dos linfócitos T com suas células parceiras, processos indispensáveis para o início eficiente das respostas imunes Th1 ou do tipo Th2 na leishmaniose cutânea. O processo de migração de linfócitos T, tanto virgens quanto de memória, para tecidos periféricos é regulado por um complexo sistema de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas, que coordenam o posicionamento celular e facilitam a resposta imune adaptativa no local da infecção por *Leishmania* (Diaz et al., 2013).

## 1.9.1 Citocinas que favorecem a resistência e controle na leishmaniose Cutânea

### 1.9.1.1 Fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é expresso por macrófagos, linfócitos T e outros tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório das lesões na leishmaniose cutânea. Sua produção é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), secretado por linfócitos T ativados (Melby et al., 1994), incluindo os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Dubie & Mohammed, 2020). Essa citocina pró-inflamatória desempenha um papel central na defesa do hospedeiro, ajudando a ativar macrófagos para eliminar parasitos e a estimulá-los a produzir ROS (Melby et al., 1994; Volpedo et al., 2021). No entanto, níveis excessivos e desregulados de TNF- $\alpha$  podem contribuir para a inflamação exacerbada e para a lesão tecidual associada à patogênese da doença (Saidi et al., 2023). Estudos comparativos indicam que a produção de TNF- $\alpha$  é mais elevada em sobrenadantes de biópsias de lesões do que em PBMCs estimulados, sugerindo que a região da lesão apresenta um perfil inflamatório mais intenso do que o do sistema (Bonyek-Silva et al., 2020).

### 1.9.1.2 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

O IFN- $\gamma$  é uma das principais citocinas associadas à eliminação da *Leishmania* e na infecção por *L. braziliensis*, ela é significativamente produzida (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). O IFN- $\gamma$  é secretado principalmente pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no contexto do perfil imune Th1, e é responsável pela ativação dos macrófagos, que, por sua vez, controlarão a infecção por *Leishmania* (Scott & Novais, 2016). A produção de IFN- $\gamma$  também ocorre em células natural killer (NK) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Carvalho, Viana, et al., 2022). Em especial, o IFN- $\gamma$  também participa da ativação dos macrófagos M1, que são pró-inflamatórios e possuem capacidade microbicida para eliminar a *Leishmania* por meio de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Lima et al., 2023; Scott & Novais, 2016).

Apesar da importância do IFN- $\gamma$  no controle da multiplicação parasitária, este também pode contribuir para a patogênese da doença, possivelmente por induzir a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Ribeiro-de-Jesus et al. (1998) reportaram que, em pacientes com leishmaniose cutânea no estágio inicial da infecção (menos de 60 dias), houve redução na produção de IFN- $\gamma$  e aumento na produção de interleucina-10 (IL-10) em comparação com aqueles com duração da doença superior a dois meses. A ativação exacerbada

do TNF- $\alpha$  tem sido associada ao dano tecidual característico da leishmaniose tegumentar, sendo particularmente elevada nas formas cutâneas e mucosas graves da doença (Scott & Novais, 2016).

Segundo Costa et al. (2015), a resposta citolítica (ações de células do sistema imune destruindo células-alvo) mediada pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> desempenha papel determinante nas lesões observadas em pacientes infectados por *Leishmania braziliensis*. A secreção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por essas células ativa os macrófagos, promovendo a eliminação do parasita (Costa et al., 2015). Entretanto, quando predominam características citolíticas, observa-se a persistência de lesões cutâneas agressivas, o que indica uma associação entre o perfil funcional dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a severidade da patologia (Costa et al., 2015). A presença do IFN- $\gamma$  pode ir além da área da lesão; Amorim et al. (2021) relataram que a inflamação cutânea localizada induz uma assinatura sistêmica de genes estimulados por interferon (ISGs) detectável no sangue periférico de pacientes, sugerindo que a ativação por IFN- $\gamma$  também ocorre fora da lesão.

#### 1.9.1.3 Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

A interleucina-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados, mas também por monócitos, células dendríticas e fibroblastos (Costa & Carvalho, 2017). Elevados níveis de IL-1 $\beta$  estão associados a lesões graves na leishmaniose cutânea (Saidi et al., 2023). A IL-1 $\beta$  intermedia processos como a vasodilatação, a ativação do endotélio vascular e o aumento da expressão de moléculas de adesão (Lima et al., 2023; Saidi et al., 2023). Esses eventos potencializam a capacidade dos neutrófilos de promover uma inflamação exacerbada, resultando em dano tecidual significativo (Lima et al., 2023).

#### 1.9.1.4 Interleucina-12 (IL-12)

A célula dendrítica derivada de monócitos constitui uma importante fonte de IL-12 (Scott & Novais, 2016). A IL-12 participa da indução da resposta imunológica do tipos Th1 e Th17 contra espécies do gênero *Leishmania* (Scott & Novais, 2016; Souza et al., 2012). Ela é a principal responsável por estimular a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Volpedo et al., 2021).

Na infecção por *L. major*, a IL-12 atua na diferenciação de células Th1 na leishmaniose cutânea, promovendo a produção de IFN- $\gamma$  (Dhari et al., 2024). Sua ausência leva

a respostas Th2, aumentando a suscetibilidade e resultando em lesões cutâneas progressivas e invasão visceral (Maspi et al., 2016). Nesta condição, Dhari et al. (2024) observaram aumento da IL-12 ( $198,0 \pm 35,2$  pg/mL) entre os pacientes em comparação com os controles.

#### 1.9.1.5 Interleucina-17 (IL-17)

A IL-17 é produzida por linfócitos Th17 (Morales-Primo et al., 2024). Esta citocina tem capacidade de recrutamento de neutrófilos e macrófagos, participando tanto do controle de parasitos intracelulares quanto da promoção do dano tecidual (Lima et al., 2023; Volpedo et al., 2021). Pacientes com leishmaniose cutânea demonstram aumento na produção de IL-17 por células mononucleares periféricas, em comparação a indivíduos saudáveis (Oliveira et al., 2014). Em infecções por *Leishmania braziliensis*, a produção de IL-17 e do TNF- $\alpha$  é regulada negativamente pela IL-10 e pelo TGF- $\beta$ , que, quando ocorre de forma parcimoniosa, contribui para a regulação da inflamação e para a prevenção da destruição tecidual (Oliveira et al., 2014).

A IL-17 interfere em vários processos envolvidos nos macrófagos durante uma infecção. Ela induz a ativação alternativa de macrófagos M2, cuja atuação tem sido associada à forma difusa da leishmaniose cutânea (Shen et al., 2018). Bacellar et al. (2009) identificaram que pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentam produção elevada de IL-17, cuja intensidade está positivamente correlacionada com a magnitude do infiltrado celular nas lesões cutâneas, indicando um papel significativo dessa citocina na resposta imune local. Souza et al. (2012), de forma semelhante, reportaram que a produção aumentada de IL-17 em pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentava associação significativa entre a magnitude do infiltrado celular e os níveis elevados de IL-17.

#### 1.9.1.6 Interleucina-23 (IL-23)

Em conjunto com outras citocinas, participa da ativação de linfócitos T CD4 virgens para que se tornem linfócitos Th17, capazes de produzir IL-17 (Harrington et al., 2005). Estudo com pacientes com leishmaniose cutânea por *L. major* encontrou níveis mais elevados de IL-23 nos sujeitos saudáveis do que nos pacientes (Ghazanfari et al., 2022). Por outro lado, Rodrigues et al. (2023) encontraram níveis elevados em pacientes com leishmaniose difusa e mucocutânea causada por *L. braziliensis*. Os autores de ambos os estudos afirmam que são necessárias mais pesquisas para compreender a participação da IL-23 na leishmaniose.

### 1.9.1.7 Interleucina-32 (IL-32)

A IL-32 é uma citocina produzida por células do sistema imune, mas também pode ser expressa por células não imunes, como as epiteliais e endoteliais (Bai et al., 2015). Ela desempenha duas funções na infecção por *Leishmania*, atuando tanto na proteção contra o parasito quanto na regulação da resposta inflamatória (Mirzaei et al., 2021; Ribeiro-Dias & Oliveira, 2022).

As lesões da leishmaniose cutânea apresentam elevada expressão de IL-32 (Galdino et al., 2014). Essa presença foi relatada como associada à expressão de TNF- $\alpha$ , o que sugere uma função reguladora da IL-32 sobre o TNF- $\alpha$  durante a infecção por *L. braziliensis* (Mirzaei et al., 2021). No entanto, o seu papel como indutor de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-8) e a sua correlação com perfis Th1 e Th17 nas lesões sugerem que, ao promover uma ação inflamatória intensa, ela também contribui indiretamente para a exacerbação da resposta inflamatória e, potencialmente, para a patologia tecidual, que é uma marca da LC por *L. braziliensis*

A introdução de *L. braziliensis*, na forma amastigota, induziu a expressão de mRNA de IL-32 $\gamma$  nos PBMCs de sujeitos saudáveis após 24 h de incubação (Dos Santos et al., 2020; Galdino et al., 2014). Indicando que a IL-32 $g$  é produzida nos primeiros momentos da interação entre as células imunes e o parasito (Ribeiro-Dias & Oliveira, 2022). Na ausência de IL-32 $\gamma$ , o índice de infecção aumenta, o que se deveu a níveis reduzidos de iNOS/NO (óxido nítrico) e de peptídeos antimicrobianos ( $\beta$ -defensina-2 e catelicidina) (Ribeiro-Dias & Oliveira, 2022). Estas espécies reativas de oxigênio (ROS) e os peptídeos antimicrobianos são relatados como capazes de neutralizar a *Leishmania* (Ribeiro-Dias & Oliveira, 2022).

### 1.9.1.8 Interleucina-22 (IL-22)

Na leishmaniose cutânea, a interleucina-22 (IL-22) está associada ao perfil imune do tipo Th17; por isso, a incluímos neste tópico sobre as citocinas que controlam a infecção. Mas essa localização não é inteiramente precisa, pois a IL-22 participa, sim, da resposta imune inflamatória, mas é mais conhecida por seu papel modulador na lesão tecidual. Embora a IL-22 possa atuar, em certos contextos, como uma citocina inflamatória, na literatura sobre leishmaniose cutânea, ela é especialmente importante para a proteção contra danos teciduais e para a promoção da cicatrização, regulando a expressão de queratinas envolvidas na migração e na diferenciação de queratinócitos (Gimblet et al., 2015). A ausência de IL-22 está relacionada

ao agravamento dos sintomas, não por piorar a infecção por meio de um aumento da carga parasitária, mas sim por prejudicar a reparação tecidual (Gimblet et al., 2015; Pitta et al., 2009).

## **1.9.2 Citocinas que favorecem a progressão da leishmaniose cutânea**

### **1.9.2.1 Interleucina-4 (IL-4)**

A IL-4 é a principal citocina expressa pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th2 (Carvalho, Bacellar, et al., 2022). Segundo Manamperi et al. (2017), a maioria das lesões sem recuperação na leishmaniose cutânea apresenta altos níveis de IL-4; o contrário ocorre nas lesões cicatrizadas, que apresentam marcadores do perfil Th1. Na leishmaniose cutânea causada por *L. major*, Dhari et al. (2024) encontraram uma redução no nível de IL-4 dos pacientes (15,5 pg/mL  $\pm$  1,5) em comparação com o nível do grupo controle (46,3 pg/mL  $\pm$  5,7). A IL-4 exerce um papel regulador negativo na resposta imune, ao suprimir a produção de IFN- $\gamma$  e inibir a diferenciação dos linfócitos Th1, modulando, assim, o perfil imunológico durante a resposta à *Leishmania* (Castellano et al., 2009).

A formação de macrófagos M2 é estimulada pela IL-4 (Silva, 2024). Os macrófagos do tipo M2, associados ao perfil Th2, apresentam um fenótipo permissivo que favorece a sobrevivência e a multiplicação de *L. braziliensis* (Mosser & Edwards, 2008).

### **1.9.2.2 Interleucina-10 (IL-10)**

A interleucina-10 pode ser produzida por macrófagos M2, linfócitos Treg, linfócitos B, células dendríticas e outras células do sistema imune (Nylen & Sacks, 2007; Silva, 2024). Ela exerce efeito imunossupressor ao inibir a ativação de macrófagos induzida pelo IFN- $\gamma$  (Castellano et al., 2009). Minimizando as consequências negativas do processo inflamatório ou comprometendo a atividade leishmanicida dessas células, podendo influenciar negativamente o controle da infecção (Volpedo et al., 2021). J. M. D. Silva et al. (2024) relataram que lesões com recuperação lenta apresentaram níveis elevados de IL-10, associados à maior frequência de macrófagos M2. Nascimento et al. (2021) interviram em células de pacientes com LC aumentando a produção de IL-10. Isso implicou na redução de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e na diminuição do dano tecidual, sem comprometimento da capacidade de controle parasitário. Na leishmaniose cutânea causada por *L. major*, Dhari et al. (2024) relataram uma redução não significativa da IL-10 entre os pacientes. Estes achados

sugerem que a produção de IL-10 pode favorecer a persistência parasitária e retardar a cicatrização, ou beneficiar o paciente ao reduzir os danos causados por uma inflamação exacerbada.

### 1.9.2.3 Fator de Crescimento Transformador $\beta$ (TGF- $\beta$ )

O TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica, com múltiplas funções biológicas, atuando no remodelamento tecidual, na deposição da matriz extracelular, na regulação do processo inflamatório e na modulação da proliferação celular durante a cicatrização de feridas (Barik et al., 2025). Ao longo da doença, o TGF- $\beta$  atua na recuperação das lesões, suprime as ações das células Th1 e desativa os macrófagos que controlam a *Leishmania*. O TGF- $\beta$  pode ser produzido principalmente por macrófagos M2 (Silva, 2024) e por linfócitos Treg (Maspi et al., 2016). Macrófagos hospedeiros de *Leishmania* na forma amastigota, por manipulação, também podem produzir TGF- $\beta$ , gerando um microambiente imunossupressor (Barik et al., 2025).

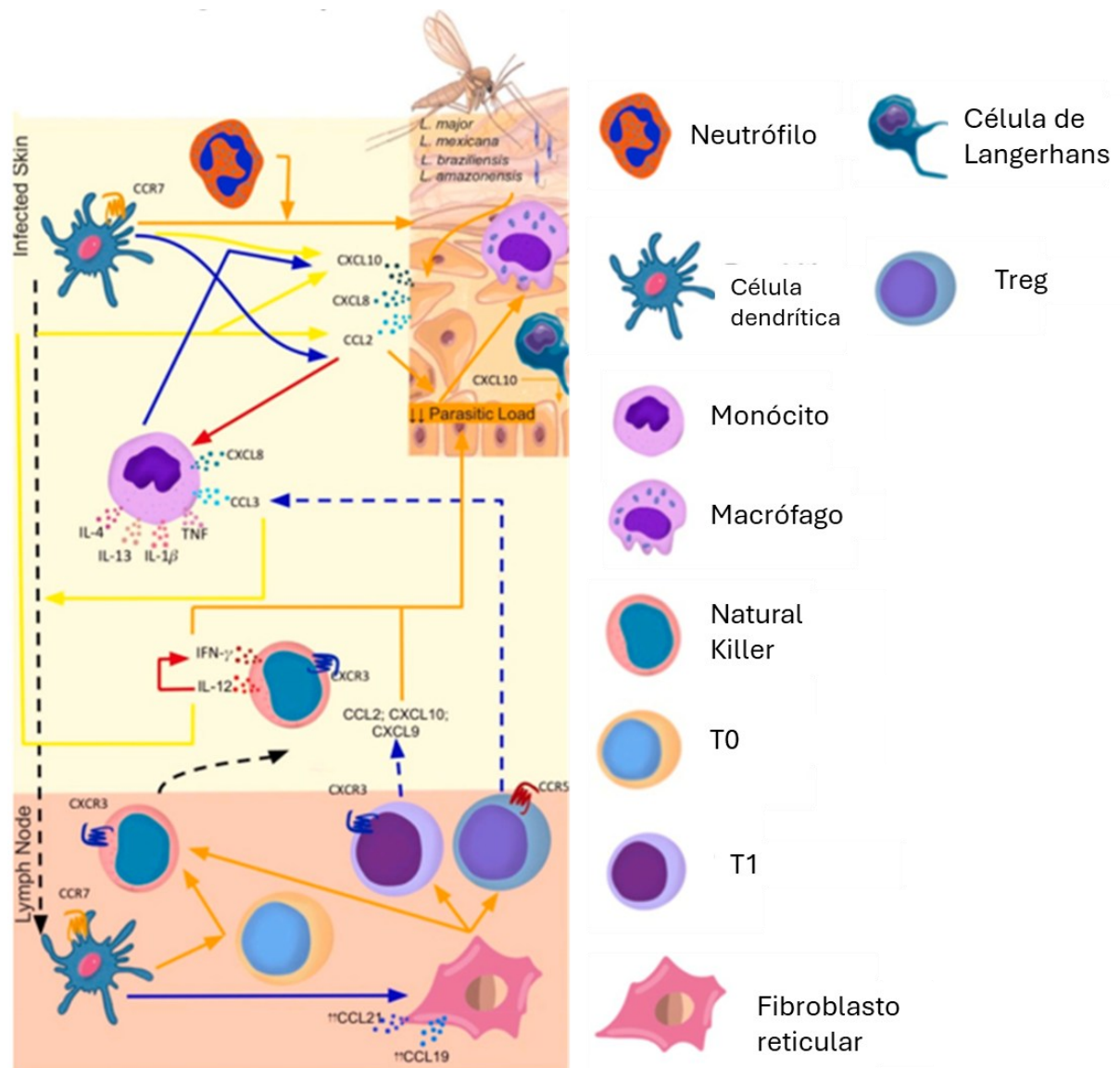
O TGF- $\beta$ , em conjunto com a IL-10, desativa os macrófagos, tornando-os resistentes à ativação mediada pelo IFN- $\gamma$  (Komai et al., 2018). Tal evento regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-12) e reduz a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com atividade leishmanicida. Além disso, promove a polarização dos macrófagos do fenótipo pró-inflamatório M1 para o fenótipo anti-inflamatório M2, o que, embora auxilie na reparação tecidual, diminui a capacidade do hospedeiro de eliminar o parasita (Barik et al., 2025). Na leishmaniose cutânea, o TGF- $\beta$  participa ainda da diferenciação de linfócitos CD4<sup>+</sup> virgens em Th17 (Bettelli et al., 2007; Kleiweiefeld & Hafler, 2013). Segundo Novais et al. (2017), espera-se que, nos locais de infecção por *Leishmania*, haja uma produção aumentada de TGF- $\beta$ .

### 1.9.3 Quimiocinas em cenários pró e anti-leishmaniose

As citocinas atuam simultaneamente nos sistemas Th1 e Th2 (Figura 4), podendo auxiliar ou dificultar a remissão da infecção (Quadro 1). A quimiocina CCL2 recruta macrófagos dérmicos durante a infecção por *Leishmania*, facilitando a eliminação dos parasitos por meio da ativação e da estimulação funcional dessas células (Ritter et al., 1996). Paralelamente, a produção aumentada de quimiocinas, como CXCL9, em conjunto com CCL2, CXCL8 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), promove a migração de monócitos e de

linfócitos Th1, contribuindo significativamente para a resposta inflamatória e para a patologia associada à infecção por *Leishmania braziliensis* (de Araujo et al., 2021).

Figura 4 – Dinâmica da atuação das quimiocinas e seus receptores durante a leishmaniose tegumentar.



Fonte: Adaptado de de Araujo et al. (2021, p. 2). Legenda: A figura sintetiza a atuação das principais quimiocinas na interação das células do sistema imune com o parasito da leishmania, durante a patogênese da leishmaniose tegumentar. A chegada do parasito através da pele induz a produção localizada de quimiocinas, incluindo CCL2, CXCL8 e CXCL10, por macrófagos residentes e queratinócitos, promovendo o recrutamento inicial de neutrófilos e células dendríticas (DC). A quimiocina CCL2 atua na eliminação do parasito ao atrair linfócitos T e células natural killer (NK), estimulando a atividade antileishmaniana mediada por macrófagos. Linfócitos Th1 expressando CXCR3 e produzindo Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) migram ao sítio da infecção em resposta às quimiocinas CXCL9 e CXCL10, atuando na redução do parasito. A regulação positiva do receptor CCR7 conduz a migração das células dendríticas para os linfonodos, enquanto a produção das quimiocinas CCL19 e CCL21 por fibroblastos reticulares favorece o recrutamento adicional de células dendríticas e células de Langerhans. O receptor CCR5 é crucial para o direcionamento dos linfócitos T reguladores CD4+CD25+ para o local infectado, contribuindo para a manutenção da infecção e para a sobrevivência prolongada do parasito.

Quadro 1 - Atuação biológica das quimiocinas durante a infecção por *L. braziliensis* em hospedeiros humanos.

Quimiocinas	Ação imune durante a infecção por <i>Leishmania braziliensis</i>
CCL2	Contribui para a exacerbação da leishmaniose mucocutânea ao promover o recrutamento direto de monócitos ao sítio da infecção, intensificando a resposta inflamatória local e a progressão da doença (Christensen et al., 2019). Mais especificamente, a CCL2 media a ativação dos macrófagos para a liberação de NO, e consequente eliminação da leishmania (Brandonisio et al., 2002).
CCL4, CXCL10	Diretamente associado à intensificação da gravidade clínica da doença e ao dano tecidual observado em pacientes, ao promover o aumento no recrutamento de células imunes envolvidas nas respostas inflamatórias e na patogênese da leishmaniose (Vargas-Inchaustegui et al., 2010).
CCL2, CCL5, CXCL10	O recrutamento e ativação de subpopulações específicas de leucócitos no sítio da infecção para conter e combater a progressão da leishmaniose (Costa-Silva et al., 2014).
CCL3	Produzida por neutrófilos logo após o início da infecção pela <i>Leishmania</i> . Atua no recrutamento de macrófagos e células dendríticas para o local da infecção (Dubie & Mohammed, 2020).
CCL7, CCL17, CCR4	Recrutamento preferencial de linfócitos T reguladores durante a fase tardia da leishmaniose cutânea localizada (LCL), contribuindo para o equilíbrio entre controle da infecção e limitação da inflamação tecidual (Campanelli et al., 2010).
CXCL8	Recrutamento de monócitos e linfócitos T (Giudice et al., 2012).
CXCL9	Observada principalmente no perfil Th1 (Oghumu et al., 2010). Produzida em alta quantidade durante a infecção pela <i>L. braziliensis</i> (Giudice et al., 2012; Muniz et al., 2016).

Fonte: Baseado em de Araujo et al. (2021, p. 4).

Taslimi et al. (2020) encontraram expressões significativas de CCL2, CXCL9 e CXCL10 nas lesões de pacientes crônicos. Costa-Silva et al. (2014), ao avaliar a expressão gênica de citocinas e quimiocinas em pessoas com lesões da leishmaniose cutânea, também observaram elevada expressão de IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-4, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12b, CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10. Estes autores apontam a existência de um perfil misto entre Th1 e Th2 ocorrendo simultaneamente para as quimiocinas (de Araujo et al., 2021).

Vargas-Inchaustegui et al. (2010) relataram que amostras séricas de pacientes acometidos por leishmaniose tegumentar apresentaram níveis elevados das quimiocinas CXCL10 e CCL4 (Diaz et al., 2013). Diaz et al. (2013) relataram que a resposta imune nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea apresenta significativa presença de CXCL10, que possibilita a atração de linfócitos T (perfil Th1) e a migração de células dendríticas para os linfonodos.

Em pacientes com LC, a CXCL10 geralmente é elevada no local da lesão cutânea e no plasma, associada à resposta inflamatória do tipo 1 (Th1) (de Araujo et al., 2021). Essa quimiocina é produzida por macrófagos, células dendríticas e queratinócitos na pele infectada e contribui para a redução da carga parasitária ao ativar a resposta imune (Vargas-Inchaustegui et al., 2010). Valores elevados de CXCL10 também têm sido associados a intensa inflamação e dano tecidual, especialmente em formas mais severas da LC (Volpedo et al., 2021). Por outro lado, indivíduos saudáveis podem apresentar níveis basais de CXCL10 no sangue acima de zero, que, em alguns casos, podem ultrapassar temporariamente os níveis observados em pacientes, especialmente se houver estímulos imunológicos transitórios, como infecções virais ou inflamações não relacionadas, que induzam fortemente a produção dessa quimiocina (de Araujo et al., 2021).

A literatura aponta que as quimiocinas atuam no recrutamento de diferentes tipos celulares para o local da infecção por *Leishmania*. Influenciando diretamente a polarização do perfil imune, o resultado da infecção e a variabilidade do quadro clínico observado entre os indivíduos acometidos.

## 2 SÍNTESE E CONSISTÊNCIA DOS EXPERIMENTOS SOBRE AS CITOCINAS NA LC-Lb

Segundo Thomas Kuhn, um campo científico pode ser considerado estabilizado quando está inserido no que denomina “ciência normal” (Mendonça & Videira, 2007). Esse período é caracterizado pela existência de um paradigma (princípios centrais de um campo científico) compartilhado e reconhecido por uma comunidade científica, o que gera estabilidade e consenso quanto aos fundamentos, métodos, perguntas relevantes e formas legítimas de solução de problemas. Nessa fase da “ciência normal”, os cientistas dirigem seus esforços a aprofundar e refinar o conhecimento já estabelecido, sem questionar os princípios basilares do campo (Kuhn, 1975). Assim, a estabilização ocorre quando há homogeneidade metodológica e regularidade nos achados, permitindo a pesquisa especializada e cumulativa até que anomalias não solucionáveis conduzam a crises e, potencialmente, a uma revolução científica e a uma mudança de paradigma.

Esta tese apresenta a investigação da existência de homogeneidade metodológica e regularidade nos achados da literatura, ao mesmo tempo em que realiza a síntese estatística desses achados por meio da técnica de meta-análise. Realizou-se ainda a avaliação da presença de viés nos métodos e resultados experimentais referentes ao conhecimento atual sobre a regulação, por citocinas e quimiocinas, das células imunes em pacientes acometidos por leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*. Apesar dos avanços significativos na compreensão da imunopatologia da LC causada por *L. braziliensis*, a literatura atual, apresentada no capítulo 1, evidencia indícios de heterogeneidade metodológica substancial que dificultam a interpretação integrada dos achados e a identificação de padrões consistentes.

Sem a integração dos achados experimentais em um modelo explicativo coeso, ficamos sem uma teoria válida para toda a comunidade científica. Os estudos sobre a regulação das células imunes em pacientes com LC, utilizam diferentes tipos de concentrações para amostras biológicas do PBMC e do extrato de lesões, protocolos de estimulação antigênica (antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis* em diferentes quantidades, parasitos inteiros ou lisados em diferentes quantidades, grupos controle com e sem ausência de estimulação), métodos de quantificação de citocinas com protocolos diferentes e definições de grupos comparativos que divergem significativamente quanto à sua constituição a cada estudo experimental. Por exemplo, há estudos que estimulam a cultura do PBMC de pessoas saudáveis com antígeno da *L. braziliensis*, enquanto outros não o fazem; mas ambos têm seus resultados apresentados em artigos de revisão e capítulos de discussão, como se pudessem ser comparados.

Acrescentemos a este cenário diferentes protocolos de seleção e randomização de amostras, em que, ou as amostras foram selecionadas por conveniência, ou não sabemos quase nada sobre quem são os participantes dos estudos ou como foram recrutados. Na revisão prévia da literatura apresentada no capítulo anterior, identificamos vários artigos que não fornecem informações sobre a amostra além do tamanho (n). Como se, por exemplo, a faixa etária dos participantes não fosse um fator importante a ser considerado nas análises imunológicas em seres humanos.

As diferenças entre protocolos experimentais podem dificultar a formação de consenso científico sobre a regulação das células imunes. Por exemplo, Carvalho et al. (2021) mediram IFN- $\gamma$  em pacientes com LST positivo para o antígeno da *Leishmania*. Neste estudo, eles utilizaram o método ELISA para quantificar as citocinas, utilizaram uma concentração do PBMC de  $3 \times 10^6$  células/mL em placa de 24 poços e estimularam com o Antígeno Solúvel da *Leishmania* (SLA) (5  $\mu$ g/mL) por 72 horas. Reis et al. (2009) também mediram IFN- $\gamma$  em pacientes com LC por *L. braziliensis*, mas utilizando no protocolo uma concentração do PBMC de  $2 \times 10^5$  células/mL em placa de 96 e estimularam com 1,25  $\mu$ g/mL de SLA por 120 horas. Podemos comparar estes resultados com protocolos diferentes? É válido dizer que chegaram ao mesmo resultado e, assim, temos consenso na literatura sobre o IFN- $\gamma$ ? Nos capítulos de discussão de vários artigos sobre LC, encontramos comparações de resultados com outros trabalhos que não comentam as diferenças entre os protocolos. Focando apenas nas conclusões dos estudos ao caracterizar a literatura sobre as citocinas na imunopatogênese da LC-Lb. Para saber se os resultados entre estes e outros estudos são comparáveis, é preciso realizar uma avaliação estatística do impacto diferencial de cada protocolo sobre os resultados experimentais. Isso é possível por meio da análise de heterogeneidade, de subgrupos e de metarregressão. Estas são técnicas estatísticas utilizadas em uma meta-análise.

A validade científica dos estudos está diretamente relacionada à adequação do método empregado e à qualidade da análise estatística. Para determinar se a meta-análise aqui realizada permite a obtenção de uma síntese, investigamos se os estudos selecionados apresentam baixo risco de vieses e de uso adequado da análise estatística. Os vieses, como a seleção inadequada de participantes e a falta de padronização nos critérios de inclusão, podem comprometer a validade dos resultados para a interpretação das intervenções terapêuticas na leishmaniose cutânea (Lopez-Carvajal et al., 2018). Vieses podem comprometer significativamente a confiabilidade de estudos experimentais no campo da leishmaniose cutânea, pois introduzem distorções sistemáticas nos resultados e afetam tanto a validade interna quanto a reprodutibilidade dos dados (Lopez-Carvajal et al., 2018). Em pesquisa laboratorial, as principais fontes de viés abrangem três domínios críticos: coleta e manuseio de

amostras (incluindo seleção adequada dos participantes, contemporaneidade das amostras e controle de pareamento), métodos experimentais (abrangendo a correta validação das técnicas, planejamento estatístico apropriado, uso de controles internos/externos e cegamento dos avaliadores), e relato de resultados (clareza na quantificação dos dados, uso de testes estatísticos adequados e transparência no compartilhamento dos dados brutos) (Fox et al., 2024; Lopez-Carvajal et al., 2018).

Finalmente, embora evidências crescentes indiquem que o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, mais do que os níveis absolutos de mediadores individuais, determina o desfecho clínico, não há, até o momento, uma síntese quantitativa sistemática que integre os dados disponíveis para estimar a magnitude e a direção das associações entre perfis de citocinas. Sendo este mais um argumento que reforça a relevância deste estudo. A síntese quantitativa de estudos existentes permitirá alcançar o seguinte objetivo geral:

- Estimar estatisticamente a magnitude das diferenças nos níveis de citocinas e quimiocinas entre pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* e indivíduos saudáveis, utilizando dados experimentais obtidos *in vitro* a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), após reestimulação com o referido parasito ou com o antígeno, conforme reportado na literatura indexada e revisada por pares.

Em concomitância, buscamos atingir os seguintes objetivos específicos:

- Identificar fontes de heterogeneidade entre estudos (protocolo de estimulação, método de quantificação, características da população estudada etc.) que possam explicar resultados díspares na literatura.
- Avaliar a qualidade metodológica e o risco de viés dos estudos disponíveis, identificando limitações que devem ser consideradas na interpretação dos achados e que podem orientar o desenho de estudos futuros;
- Identificar os parâmetros dos protocolos experimentais que podem servir de referência nas discussões sobre padronização.
- Indicar medidas de tendência central (síntese estatística) e de dispersão ( $\tau$ ) das concentrações de citocinas e quimiocinas relatadas na literatura, a fim de calcular o tamanho amostral e garantir um poder estatístico adequado em futuros estudos experimentais ou epidemiológicos.

- Identificar estudos com um perfil “outlier”, capazes de dificultar a compreensão da imunopatogênese da LC-Lb por apresentarem resultados estatisticamente exacerbados.

A presente tese foi desenvolvida com o objetivo de preencher essas lacunas, por meio de uma revisão sistemática abrangente e de uma meta-análise rigorosa da literatura sobre a regulação de citocinas na leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis*, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a imunopatologia dessa importante doença negligenciada e para a produção de novas pesquisas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Desenho do estudo

Esta pesquisa é uma revisão sistemática com meta-análise, conduzida conforme as diretrizes do protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) na sua última edição de 2020 (Page et al., 2021). O protocolo PRISMA é um conjunto de diretrizes que orienta a elaboração e o relato de revisões sistemáticas, incluindo aspectos como critérios de elegibilidade, estratégias de busca, métodos de seleção e extração de dados, avaliação do risco de viés, métodos de síntese dos dados, entre outros (Page et al., 2021). Seguir as orientações do protocolo PRISMA é o que diferencia a revisão sistemática de outros tipos de revisão. O checklist com as exigências do PRISMA foi atendido e descrito no Anexo A. Este método traz transparência e replicabilidade à proposta de levantar a literatura disponível no recorte definido.

O protocolo deste estudo foi publicado na PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews), um banco de dados online de acesso aberto destinado ao registro de protocolos de revisões sistemáticas. O PROSPERO tem como objetivo principal aumentar a transparência, a qualidade e a reprodutibilidade das revisões sistemáticas, evitando a duplicidade de estudos e minimizando o risco de viés na publicação dos resultados (Sideri et al., 2018). O protocolo deste estudo está disponível em: <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/view/CRD420251077414>. Ocorreram modificações na seleção de variáveis secundárias do protocolo desde sua publicação, devido à ausência de relatos adequados nos estudos incluídos. Estas modificações estão dentro das regras do PROSPERO e a lista atual de variáveis está disponível no Apêndice A.

#### 3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Para ser selecionado, o estudo foi aprovado em todos os critérios de inclusão a seguir:

- Foi publicado em uma base indexada de periódicos com publicações revisadas por pares; ou o estudo foi avaliado por uma banca julgadora e está depositado em uma plataforma de teses ou dissertações.
- Avalia a concentração de citocinas ou quimiocinas no sobrenadante de PBMC provenientes de indivíduos com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania*

*braziliensis* ou de pacientes residentes em regiões onde a *L. braziliensis* é a única espécie de leishmania causadora de leishmaniose cutânea.

- O PBMC do grupo de pacientes foi reestimulado *in vitro* exclusivamente com *L. braziliensis* ou com seus antígenos. Isso é necessário porque outros estudos apontaram que antígenos de espécies distintas podem resultar em concentrações significativamente diferentes (Telino et al., 2006).
- Adotou o método experimental, utilizando sujeitos saudáveis (sem reestimulação) como grupo controle ou meio não estimulado como controle negativo.
- As concentrações de citocinas e quimiocinas foram padronizadas no experimento, seguindo as especificações dos fabricantes dos kits, para serem apresentadas em unidades de medida de massa/volume (ex.: pg/mL).

Os artigos que não foram selecionados para este estudo tiveram pelo menos um dos critérios de exclusão a seguir:

- Estudo *in vivo* ou *ex vivo*.
- O estudo não reportou o tipo de *Leishmania* utilizada nesse processo.
- Estudo não publicado em inglês, espanhol ou português.
- Estudo duplicado.
- Tese ou dissertação cujo artigo foi incluído na seleção final de estudos.

### 3.3 Estratégia de busca e screening

A elaboração da estratégia de busca nas bases de dados de artigos e trabalhos acadêmicos (dissertações e teses) seguiu a aplicação da estratégia PICOS (Population, Intervention, Comparison, Outcome e Study) de sistematização (Higgins et al., 2024).

- População/amostra: pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.
- Intervenção: reestimulação *in vitro* do PBMC com *Leishmania braziliensis* ou seus antígenos específicos.
- Comparadores: sujeitos saudáveis ou meio não estimulado.
- Desfechos: concentração de citocinas e quimiocinas.
- Estudo: pesquisas experimentais *in vitro*

Durante a busca nas plataformas de publicações acadêmicas, não foram adotadas restrições quanto ao local, ao período e à língua de publicação. A estratégia de busca desenvolvida para a plataforma PUBMED, com base no modelo PICOS, foi adaptada às demais bases de dados. A seguir, apresentamos o modelo de referência da estratégia de busca nas plataformas:

("leishmaniasis, cutaneous"[MeSH Terms] OR "Cutaneous Leishmaniasis"[All Fields] OR "Cutaneous Leishmaniasis"[All Fields] OR ("leishmaniasis, cutaneous"[MeSH Terms] OR ("leishmaniasis"[All Fields] AND "cutaneous"[All Fields]) OR "Cutaneous Leishmaniasis"[All Fields] OR ("leishmaniasis"[All Fields] AND "cutaneous"[All Fields])) OR ("leishmaniasis, cutaneous"[MeSH Terms] OR ("leishmaniasis"[All Fields] AND "cutaneous"[All Fields]) OR "Cutaneous Leishmaniasis"[All Fields] OR ("leishmaniasis"[All Fields] AND "new"[All Fields] AND "world"[All Fields])) OR "New World Leishmaniasis"[All Fields] OR "leishmaniasis american"[All Fields] OR "American Leishmaniasis"[All Fields] OR "Oriental Sore"[All Fields] OR ("leishmaniasis, cutaneous"[MeSH Terms] OR ("leishmaniasis"[All Fields] AND "cutaneous"[All Fields]) OR "Cutaneous Leishmaniasis"[All Fields] OR ("sore"[All Fields] AND "oriental"[All Fields])) OR "leishmaniasis old world"[All Fields] OR "Old World Leishmaniasis"[All Fields]) AND ("Cytokines"[MeSH Terms] OR ("cytokin"[All Fields] OR "cytokine s"[All Fields] OR "Cytokines"[MeSH Terms] OR "Cytokines"[All Fields] OR "cytokine"[All Fields] OR "cytokinic"[All Fields] OR "cytokins"[All Fields]))

O resultado completo da busca em cada base de dados está disponível publicamente no endereço web <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPEROFILES/c3cc106d417f1c6505dabe5406b6b5b9.pdf> . Na Tabela 1, apresentamos a síntese das consultas com resultados positivos nas plataformas. Foi identificado um total de 12845 referências.

Tabela 1 – Plataformas acadêmicas e referências obtidas com a estratégia de busca.

Plataforma	Data	Referências
Academic Search Premier - ASP (EBSCO)	03/2025	542
American Association for The Advancement of Science (AAAS)	03/2025	24
Biblioteca Virtual em Saúde: BVS (BIREME) - Portal Regional	03/2025	2094
CAPES – Thesis databank	04/2025	14
Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL)	04/2025	39
EMBASE (Elsevier)	04/2025	2297
Google Scholar	04/2025	60
Medline (Pubmed)	03/2025	2006
Ovid	04/2025	126
ScienceDirect (Elsevier)	04/2025	2620
SpringerLink	04/2025	691
Web of Science	04/2025	2304
World Scientific	04/2025	28

Fonte: elaborado pelo autor.

Estas referências foram reunidas em um gerenciador de referências para classificação, atualização e processamento. Todo o processo de seleção foi descrito no Fluxograma 1, conhecido como “PRISMA Flowchart”. Inicialmente, elas passaram por revisão do software e do autor da tese para remover registros duplicados e aqueles que não eram publicações originais de pesquisas acadêmicas com dados primários (cartas ao editor, capítulos de livros, revisões etc.). Após esta preparação do banco, os estudos foram triados em duas etapas, denominadas “screening primário” e “screening secundário”, considerando os critérios de inclusão e exclusão. Nelas, dois voluntários, estudantes de pós-graduação ou doutores, avaliaram, de forma independente e sem comunicação, os registros localizados. Classificando-os em “aceito”, “rejeitado” ou “talvez”. Este processo foi conduzido na plataforma web Rayyan (Ouzzani et al., 2016). Em caso de dúvidas no julgamento, os avaliadores levaram o estudo à professora orientadora desta tese para avaliação. Durante o screening primário, os dois avaliadores julgaram o título e o resumo das obras. No screening secundário foi avaliado o trabalho na íntegra. Os estudos que atenderam a todos os critérios de inclusão e não se enquadraram em nenhum critério de exclusão foram selecionados para a etapa de análise dos dados.

A etapa seguinte é chamada de "forward snowball". Consiste na identificação dos artigos que citaram a amostra de estudos selecionados após a avaliação na íntegra, seguida de uma nova rodada de primeiro e segundo screening desses documentos adicionais (Greenhalgh

& Peacock, 2005). Essa técnica é amplamente utilizada para atualizar buscas bibliográficas e reduzir a probabilidade de exclusão de artigos relevantes na pesquisa inicial. O intuito do "forward snowball" é garantir uma cobertura mais abrangente da literatura pertinente ao tema de investigação, aprimorando a exaustividade da revisão (Wohlin, 2014). Entretanto, no presente estudo, essa estratégia não resultou na inclusão de artigos adicionais para análise. O que pode indicar que a busca original foi bastante abrangente.

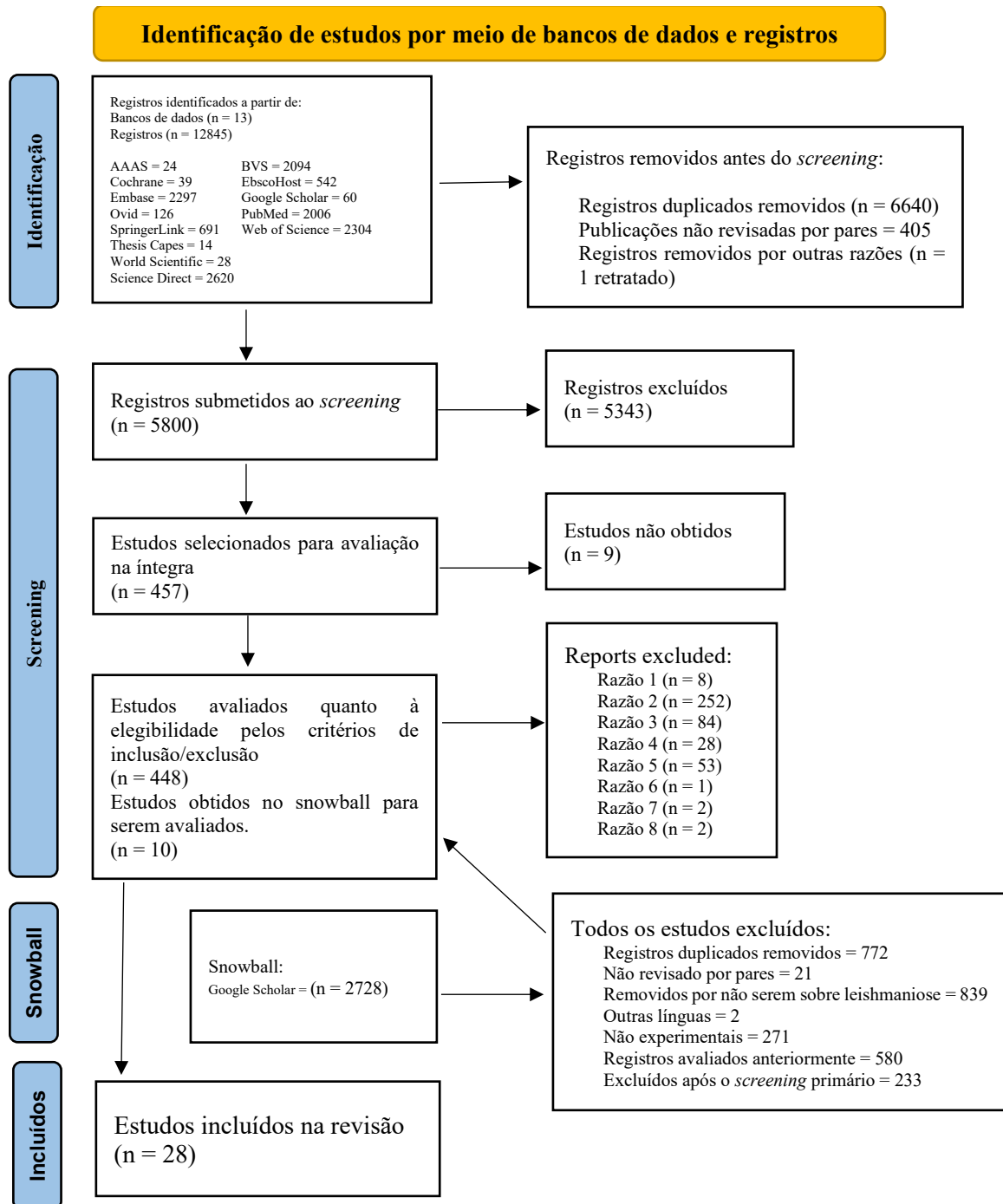
A restrição a três idiomas, bem como a exclusão de estudos não submetidos à revisão por pares, representam limitações pertinentes aos processos de busca e de screening desta tese. A restrição por idioma considerou que a endemicidade da LC-Lb está restrita aos países latino-americanos; por isso, incluíram-se os trabalhos em português e em espanhol. A inclusão de trabalhos publicados em língua inglesa se deu por sua relevância como língua predominante nas publicações científicas. A exclusão de estudos não submetidos à revisão por pares ou revisão por uma banca examinadora (pre-prints, resumos em eventos locais, capítulos de livro, cartas ao editor etc.) foi uma decisão metodológica deliberada, fundamentada em três categorias:

(1) Garantia de qualidade metodológica: O processo de revisão por pares identifica, antes da publicação, vieses e falhas analíticas. Estudos laboratoriais *in vitro* sobre citocinas em PBMC de pacientes com LC-Lb (*Leishmania braziliensis*) apresentam elevada complexidade técnica (cultura celular, reestimulação antigênica, quantificação por ELISA ou citometria), em que erros não facilmente detectáveis comprometem os resultados.

(b) Redução dos vieses de publicação e seleção: preprints tendem a relatar mais frequentemente achados preliminares positivos e a não apresentar os resultados com o devido detalhe.

(c) Valorização da literatura reconhecida pela academia: estudos peer-reviewed constituem o conhecimento consolidado, refletindo consenso metodológico após escrutínio coletivo. Preprints, embora valiosos para a ciência emergente, não passaram por este crivo e podem divergir de suas versões finais publicadas.

Fluxograma 1 – Fluxograma Prisma da seleção de estudos da revisão sistemática.



Fonte: adaptado de Page et al. (2021).

Razão 1 = Não é uma pesquisa revisada por pares.

Razão 2 = Não utilizou *L. braziliensis* na reestimulação.

Razão 3 = PBMC não veio de paciente com LC-Lb.

Razão 4 = Não apresenta dados estatísticos (ex.: média, desvio padrão, n) das citocinas.

Razão 5 = Não apresenta grupo controle sem reestimulação.

Razão 6 = Utiliza os mesmos dados de outro estudo.

Razão 7 = Duplicado

Razão 8 = Estudos sem pares no tipo de células utilizadas. Removidos na etapa de análise de dados.

### 3.4 Desfecho analisado na meta-análise

O principal resultado desta revisão sistemática e meta-análise é a síntese estatística da produção de citocinas e quimiocinas. Isso incluiu a recuperação, dos estudos selecionados, das concentrações de citocinas e quimiocinas produzidas por células humanas no sobrenadante do PBMC dos grupos experimentais (pacientes antes do tratamento) e dos grupos controle (pessoas saudáveis e meio não estimulado). A produção de citocinas e quimiocinas foi definida com base nos valores de concentração reportados em pg/mL ou ng/mL. Estes valores foram obtidos por meio de ensaios imunológicos, como ELISA e citometria de fluxo. As medições foram realizadas após a reestimulação/infecção, conforme relatado nos estudos incluídos, com tempos de cultura variando de algumas horas a vários dias após a introdução do antígeno/parasito. Recuperamos os valores de concentração de todas as citocinas e quimiocinas relatadas nos estudos, dentro dos critérios de inclusão e seleção, para os grupos experimental e controle. Encontramos valores nos estudos incluídos para as seguintes citocinas e quimiocinas:

1. **Citocinas:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-12, IL-2, IL-17, IL-22, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ .
2. **Quimiocinas:** CCL2, CXCL10 e CXCL9

Durante a extração de dados dos artigos, nenhuma citocina ou quimiocina que apresentasse dados comparativos entre o grupo estimulado e o grupo não estimulado (pessoas saudáveis e meio não estimulado) foi excluída. Ou seja, todas as citocinas e quimiocinas que tinham dados em pelo menos dois estudos, dentro dos critérios, foram selecionadas para meta-análise. Para IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-2, TGF- $\beta$  e CCL2, não foi possível realizar uma meta-análise, pois apenas um estudo selecionado disponibilizava os dados necessários.

### 3.5 Variáveis independentes

As variáveis independentes foram os parâmetros experimentais utilizados nos protocolos e as características dos participantes dos estudos. Esses dados foram utilizados para avaliar a possibilidade de comparar estatisticamente os resultados entre os diferentes estudos, por meio das técnicas de análise de subgrupos e de metarregressão.

Foram extraídas dos estudos informações sobre variáveis independentes que caracterizavam os participantes das amostras, como idade e gênero. Na etapa de análise de dados, observou-se que a maioria dos estudos não utilizou amostras compostas por todos os

participantes em seus experimentos, o que resultou em descrições sociodemográficas que não correspondiam aos participantes avaliados experimentalmente. Dessa forma, não foi possível investigar estatisticamente a influência de variáveis como faixa etária e gênero nas meta-análises das concentrações de citocinas e quimiocinas.

### **3.6 Exclusão de estudos e variáveis na etapa de análise dos dados**

Apesar de atenderem aos critérios de inclusão, os artigos “Giudice, 2012, Macrophages ...” e “Lopes, 2018, Susceptibility ...” utilizaram macrófagos e cocultura de macrófagos com linfócitos, respectivamente, diferenciando-se de todos os demais 28 artigos que utilizaram os sobrenadantes do PBMC. Estes dois artigos não tiveram pares, de modo que não é possível realizar a síntese estatística da meta-análise com base neles (Giudice et al., 2012; Lopes et al., 2018).

### **3.7 Análise do risco de viés**

As pesquisas selecionadas para a extração de dados foram avaliadas quanto ao risco de viés. O instrumento utilizado para realizar esta avaliação foi o “Pilot risk of bias tool to appraise clinical laboratory studies” (Fox et al., 2024), desenvolvido por meio de uma abordagem baseada em consenso envolvendo um painel consultivo de especialistas organizado pelo Cochrane Infectious Diseases Group (Cochrane, 2025), mantido pela Cochrane e pela Liverpool School of Tropical Medicine. O instrumento apresenta uma lista de questionamentos, organizada em três domínios, que identificam os principais elementos que podem constituir fontes de viés em estudos experimentais. Suas questões estão disponíveis no Anexo B (Quadro 4). Os domínios são:

- Domínio 1 (D1): Coleta e manuseio de amostras - aborda questões sobre como as amostras foram obtidas e gerenciadas. Avalia potenciais problemas quanto à identificação dos participantes, à aquisição da amostra e à minimização do viés entre características dos grupos de estudo.
- Domínio 2 (D2): Métodos experimentais - avalia as técnicas experimentais empregadas nos estudos. Busca avaliar a adequação das técnicas empregadas para mensurar os desfechos e verificar se o viés foi minimizado ao longo dos experimentos.
- Domínio 3 (D3): Relato de resultados - investiga a forma como os resultados do estudo são apresentados e analisados. Avalia se os resultados são adequadamente

quantificados, analisados e reportados, e se foram influenciados por perdas de dados e omissões.

Segundo os desenvolvedores (Fox et al., 2024), o avaliador deve indicar em cada pergunta do instrumento se a pesquisa apresentou adequadamente o que foi perguntado (com a resposta “sim”), se a pesquisa indicou que não fez o que foi perguntado (com a resposta “não”) ou se a pesquisa não informou nada que pudesse responder à questão (com a resposta “não informou”). Respostas “sim” indicam menor risco de viés, enquanto as respostas “não” ou “não informou” indicam o contrário. As respostas às perguntas de cada domínio são contadas, gerando uma avaliação do risco de viés para o domínio, que pode, assim, ser classificado como “baixo risco de viés” (nenhum “não”), “algumas preocupações com vieses” (apenas um “não”) ou “alto risco de viés” (dois ou mais “não”) (obs.: “não informou” conta como “não”). O risco geral de viés do componente experimental de um estudo é classificado com base no resultado do domínio de maior risco. Por exemplo, caso o resultado de maior risco em um dos três domínios seja “algumas preocupações com vieses”, o estudo é considerado apresentar “algumas preocupações com vieses” (Anexo B). A ferramenta foi aplicada aos resultados e aos procedimentos experimentais de todos os 28 estudos selecionados.

### **3.8 Extração e tratamento dos dados**

Assim como o processo de seleção dos artigos, a extração de dados dos trabalhos acadêmicos foi realizada por avaliadores independentes. Sendo seguida da avaliação de eventuais divergências. Quase todos os artigos selecionados não reportaram textualmente os valores das medidas de tendência central (média, mediana etc.) e das medidas de desvio (desvio padrão, intervalo interquartilico etc.) da concentração de citocinas e quimiocinas, nem o tamanho das amostras utilizadas nos experimentos. A maioria não indicou, em seus gráficos, a medida de tendência central em conjunto com a medida de desvio. Quando ocorreram essas ausências de reporte (missing results), os dados foram computados a partir dos gráficos em formato de imagem. Utilizamos a ferramenta online WebPlotDigitizer (Rohatgi, 2011). Esta ferramenta converte cada ponto marcado na imagem do gráfico pelo usuário em um valor correspondente à escala do gráfico. Quando os gráficos eram de distribuição de pontos (scatter plot), foi preciso extrair da imagem os resultados de cada indivíduo para, em seguida, calcular a média e do desvio padrão, não apresentados pelos artigos.

Durante as etapas de screening secundário e extração de dados, tentamos contato com os autores correspondentes por e-mail quando algum dos dados buscados nos artigos selecionados não foi reportado (missing data/reports). Não obtivemos retorno das solicitações enviadas.

Os dados sobre a concentração das culturas do PBMC foram convertidos para a unidade de medida “células/mL” quando apropriado. Para tanto, consideramos que o volume padrão de cada poço nas placas de 96 poços foi 0,2 mL por poço, e nas placas de 24 poços foi 1 mL por poço. Em seguida utilizamos a fórmula abaixo para converter:

$$\text{células/mL} = \frac{\text{células por poço}}{\text{volume do poço (mL)}}$$

Exemplo:  $2 \times 10^5$  células por poço (placa 96, 200  $\mu\text{L}$  = 0,2 mL/poço)

$$\frac{2 \times 10^5}{0,2} = 1 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

Os dados reportados em ng/mL foram convertidos para pg/mL. Valores como mediana, intervalo interquartilico e erro padrão foram convertidos para média e desvio padrão. A mediana foi adotada como média, os intervalos interquartilicos de 25% (Q1) e 75% (Q3) foram convertidos utilizando a fórmula no Excel “=IMABS(Q3-Q1)/1,35” e o erro padrão (EP) foi transformado em desvio padrão com a fórmula no Excel “=EP\*(n^0,5)”(Higgins et al., 2024). A estatística da meta-análise para variáveis contínuas adota fórmulas que requerem a média, o desvio padrão e o tamanho de cada grupo (n). Por isso foi preciso converter. Este procedimento é padrão em estudos de meta-análise.

### 3.9 Softwares utilizados

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel 365 (Microsoft, 2025). A análise estatística foi realizada no software livre JASP 0.95.4 (Team, 2025), que utiliza a linguagem de programação R para os cálculos. As referências das obras durante o processo de screening foram gerenciadas no software Endnote 2025 (Clarivate, 2025).

### 3.10 Análise estatística e meta-análise

A principal meta da análise estatística foi gerar uma síntese dos valores das concentrações de citocinas no sobrenadante de culturas do PBMC infectadas com o antígeno da *L. braziliensis*. Em seguida, foram realizados os procedimentos de análise de subgrupos, metarregressão, análise do viés de publicação e análise de risco de vieses. Inicialmente, foram aplicados procedimentos estatísticos descritivos para caracterizar os artigos selecionados. O nível de significância foi de 95%, com exceção do cálculo de existência de heterogeneidade entre os estudos (será descrito mais à frente).

O cálculo do tamanho de efeito e de seu erro padrão, medidas necessárias para realizar meta-análises no JASP, para grupos com participantes distintos (ex.: sujeitos saudáveis X pacientes com leishmaniose cutânea antes do tratamento), utilizou a configuração para grupos independentes, com medidas quantitativas e diferença entre médias como desfecho. Para grupos compostos pelos mesmos participantes (ex.: amostras de pacientes com LC-Lb antes do tratamento com estimulação X amostras sem estimulação) utilizou-se a configuração para medidas repetidas, quantitativas e mudança entre médias (“MC: Mean Change”) como desfecho.

O modelo estatístico utilizado nas meta-análises foi o “modelo de efeitos aleatórios”. Este modelo parte do pressuposto de que os desfechos a serem encontrados nos estudos naturalmente não são os mesmos entre si (Santos & Cunha, 2013), admitindo que a variação entre os resultados é esperada. Este modelo atribui pesos distintos a cada estudo na síntese final, de acordo com as variâncias intra- e interestudos. De forma simplificada, quanto menor a variância, maior será a participação do estudo na síntese estatística.

A síntese estatística das concentrações de citocinas entre os estudos foi reportada em “pg/mL”, incluindo o intervalo de confiança para indicar a precisão da estimativa da síntese estatística (medida de tendência central) na amostra e o intervalo de predição para indicar as amplitudes esperadas da dispersão da estimativa da síntese estatística na população (medida de dispersão). Em uma meta-análise, o intervalo de predição é a estimativa do modo como o tamanho do efeito varia na população de que as amostras foram extraídas (Borenstein et al., 2021). O intervalo de predição só tem precisão confiável em meta-análises com 10 ou mais estudos. Nas situações com menos de 10 estudos, deixamos de apresentar o intervalo de predição.

Inevitavelmente, os diferentes estudos apresentam variações entre si. Estas variações são chamadas de heterogeneidade (Higgins et al., 2024). Caso os estudos sejam muito heterogêneos, pode não ser possível considerar válida a síntese estatística obtida na meta-análise (Pereira & Galvão, 2014). Toda meta-análise precisa calcular, apresentar e discutir a

heterogeneidade dos resultados. Existem estratégias para lidar com heterogeneidades elevadas, não no sentido de ignorá-las, mas sim de compreendê-las. A heterogeneidade elevada em uma meta-análise não indica falha do estudo ou resultado negativo da pesquisa (Santos et al., 2022). Ao contrário, pode ser uma fonte importante de informações. A presença de alta heterogeneidade revela variação significativa nos efeitos estimados entre os estudos incluídos, sugerindo que fatores clínicos, metodológicos ou contextuais influenciam os resultados agregados, assim como é possível que o fenômeno estudado naturalmente se apresente de maneiras discrepantes para os pesquisadores (Pereira & Galvão, 2014; Santos et al., 2022). O método para estimar a heterogeneidade entre os estudos na meta-análise foca na avaliação da variância ( $\tau^2$  — “tau-squared”) e da medida de dispersão ( $\tau$  — “tau”), que são estimativas da dispersão da população real. A medida  $\tau$  equivale ao desvio padrão na estatística descritiva em estudos individuais. Para encontrar  $\tau$ , utilizou-se uma combinação do método de Sidik-Jonkman (método menos sensível à presença de estudos com valores extremos) e do teste de efeito fixo de Hartung-Knapp (opção “knha” no JASP). A combinação entre os dois é chamada de abordagem Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman (HKSJ) (Rover et al., 2015). Essa abordagem é recomendada para meta-análises com populações pequenas ou com alta variabilidade entre estudos (Rover et al., 2015), situação observada nos estudos selecionados para esta pesquisa.

A existência de heterogeneidade foi testada com o qui-quadrado de Cochran (Santos et al., 2018), adotando-se, entre os estudos de meta-análise, a convenção de nível de significância de  $p < 0,10$ . A hipótese nula ( $H_0$ ) deste teste de significância afirma a ausência de heterogeneidade entre os estudos. A observação visual da sobreposição entre os intervalos de confiança dos resultados de cada estudo também foi realizada para avaliar a presença de heterogeneidade (Higgins et al., 2024). Esta visualização é realizada observando as retas de intervalo de confiança dos estudos nos gráficos de floresta (forest plot) de cada meta-análise (ex.: Gráfico 1). A heterogeneidade é comum, pois os estudos são dificilmente muito semelhantes em uma meta-análise, de modo que o próximo passo foi avaliar o quanto são heterogêneos e até que ponto se aceitam as diferenças. A quantificação da inconsistência (proporção da variância nos desfechos observados atribuída à variância nos desfechos verdadeiros, em vez do erro amostral) é dada pelo teste estatístico  $I^2$  (Higgins et al., 2024). Essa medida indica quanto da diferença entre os estudos é causada por fatores reais que variaram entre eles, e não pelos tamanhos diferentes das amostras. Para facilitar a interpretação da inconsistência, adotaremos a classificação proposta por Higgins et al. (2003):  $I^2$  de até 25% indica um valor “baixo”, de 25% a 50% indica um valor “moderado” e acima de 75% indica um valor “alto”. Estas faixas não determinam uma conclusão sobre a inconsistência (Borenstein

et al., 2021), que deve sempre ser feita considerando as características dos estudos e dos eventos investigados. Encontrando uma  $I^2$  acima de 75%, considerou-se que a síntese estatística dos resultados talvez não seja válida. Nos casos em que isso aconteceu, escolhemos uma dentre as seguintes opções baseadas em Higgins et al. (2024) e Santos and Cunha (2013):

- Verificar novamente se há algum erro nos dados e na planilha.
- Não aceitar a síntese estatística da meta-análise.
- Explorar fatores potenciais que explicam a heterogeneidade. Por meio de uma análise de subgrupos (separando os estudos por variáveis qualitativas) ou de metarregressão (que se assemelha às técnicas de regressão comumente utilizadas na estatística). Serão detalhados em seguida.
- Considerar a heterogeneidade alta como resultado adequado e esperado. Caso a divergência nos dados de concentração de citocinas entre os grupos seja extremamente diversa, consideramos apropriada a síntese estatística mesmo quando a heterogeneidade na meta-análise for  $\geq 75\%$ . Nesse caso, faremos os devidos alertas sobre a questão.
- Realizar uma análise de sensibilidade, testando o que ocorre com a retirada de estudos com base em características que possam explicar a heterogeneidade. Tais como: tempo de cultura do PBMC muito curto ou muito longo, tamanho da amostra, vieses específicos, falta de reporte adequado da reestimulação, uso de um kit pouco utilizado em outras pesquisas etc. Esta análise de sensibilidade é importante porque é um dos principais indicadores de que o resultado é seguro (Santos et al., 2022), ou seja, que o resultado realmente se apresenta de maneiras muito distintas entre as pessoas. Neste caso, considerando as outras estratégias para tratar as discrepâncias, a heterogeneidade não seria um problema, e sim algo esperado.
- Excluir estudos da análise. Excluir um estudo de uma meta-análise por ser muito diferente não é recomendável, pois isso aumenta o risco de viés de seleção. Mas, se houver razões de exclusão, como o artigo ter sido removido da revista, o estudo apresentar falhas óbvias na metodologia, ser duplicado de outro, etc., o estudo poderá ser removido desta pesquisa, mesmo tendo chegado à etapa de análise dos dados.

A meta-análise tem a capacidade de detectar estudos experimentais 'outliers', ou seja, aqueles cujo efeito difere significativamente dos demais. Trazendo distorções à área de estudo, com resultados exacerbados. Essa identificação ocorre por meio da análise da sensibilidade, com métricas dos resíduos padronizados e das influências (ex.: DFFITS, Cook's

distance), que identificam estudos que contribuem desproporcionalmente para a variabilidade global. Uma vez identificado o estudo potencial outlier, realizamos a simulação de sua exclusão para avaliar o impacto na significância da síntese estatística e na heterogeneidade. Reconhecer esses estudos é crucial, pois podem sinalizar peculiaridades metodológicas, populações singulares ou mesmo erros potenciais, orientando decisões sobre a inclusão ou a exclusão nos cálculos finais e influenciando a interpretação e a validade das conclusões meta-analíticas (Borenstein et al., 2021; Higgins et al., 2024).

A análise de subgrupos em meta-análise foi utilizada para avaliar os resultados dos estudos agrupados por características comuns. Consiste em dividir os estudos incluídos em grupos menores com base em características qualitativas específicas (Santos et al., 2022). Tais como: tipo de técnica utilizada para medir a concentração da citocina, país em que os participantes foram infectados, graus de viés etc. Após a separação em subgrupos, realizamos a análise com um teste de heterogeneidade dos resultados entre os subgrupos (Higgins et al., 2024). Também calculamos o  $I^2$  para avaliar as inconsistências entre os subgrupos e a síntese estatística (Higgins et al., 2024). Quando não houve heterogeneidade considerável nos resultados no subgrupo, pudemos considerar o reagrupamento relevante. O objetivo da análise de subgrupo nesta pesquisa foi identificar se certas características dos protocolos e o risco de viés são responsáveis por diferenças nas concentrações de citocinas entre os estudos.

A meta-regressão testou a associação entre variáveis e a concentração de citocinas. Este procedimento gera o coeficiente de regressão, que descreve como a variável de desfecho (ex.: diferença entre as médias das concentrações de citocinas de cada grupo) muda com um aumento unitário na variável explicativa (ex.: tempo de cultura com o antígeno) (Higgins et al., 2024). A significância estatística do coeficiente de regressão foi testada, resultando em um valor de p. A meta-regressão não é recomendada quando há menos de 10 estudos em uma meta-análise (Higgins et al., 2024).

O viés de publicação é um fator externo ao estudo que pode estar interferindo na heterogeneidade e na estimativa do intervalo de predição da distribuição real da concentração de citocinas em pessoas com leishmaniose cutânea. Para Pereira e Galvão (2014), este viés ocorre quando os periódicos publicam mais estudos com certas características em detrimento de outras, o que distorce a compreensão do que ocorre na população. Por exemplo, seria quando uma área de pesquisa apresentasse a tendência de publicar com maior frequência estudos com resultados positivos (Borenstein et al., 2021). Assim, introduzindo um viés na revisão sistemática, devido à falta de publicação de estudos com resultados inconclusivos ou negativos. A ocorrência deste viés foi avaliada por meio do teste de Egger e da avaliação visual do gráfico

de funil (funnel plot) (Borenstein et al., 2021; Santos & Cunha, 2013). A hipótese nula do teste de Egger é a de que não há viés de publicação. Manter esta hipótese nula significa que os resultados dos estudos são distribuídos simetricamente, sem favorecimentos nas publicações por conta dos resultados. Ressaltamos que o teste de Egger e outros testes semelhantes perdem poder estatístico quando o número de estudos é inferior a 10. Em caso de ocorrência do viés de seleção, utilizou-se a análise estatística “trim and fill”, que indica quantos estudos, com seus efeitos, são necessários para estabelecer simetria no gráfico de funil (Borenstein et al., 2021).

### 3.11 Aspectos éticos

Mesmo não trabalhando com dados primários obtidos de seres vivos, os aspectos éticos são fundamentais para o desenvolvimento e condução de uma revisão sistemática com meta-análise. Neste contexto, alguns tópicos éticos merecem destaque:

Nesta tese a Inteligência Artificial (IA) em plataformas digitais foi utilizada para:

- Corrigir erros gramaticais de escrita.
- Localizar artigos acadêmicos por relevância, fator de impacto e tema.
- Gerar alertas sobre novas publicações na literatura sobre o tema.
- Tradução de textos (com revisão humana).
- Tradução de textos em imagens (com revisão humana).
- Localizar informações nos artigos.

Todos os softwares utilizados para a elaboração da tese e o tratamento dos dados são livres (gratuitos), adquiridos com recursos próprios ou com verbas de projeto de pesquisa desenvolvidos pelo Laboratório de Imunologia Celular (Instituto de Biologia/Universidade de Brasília) via Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

Com a finalidade de dar transparência aos resultados, disponibilizamos a planilha de dados no link: [Planilha de extração de dados - Vale 2026.xlsx](#). Informações descritivas sobre as variáveis estão disponíveis nos apêndices.

Este trabalho não recebeu financiamento por meio de bolsas. O autor é docente da Universidade Federal do Ceará e está afastado integralmente para participar do curso de doutorado do PPG em Biologia Microbiana da UnB. O autor declara não ter conflitos de interesse.

## 4 RESULTADOS

Os vinte e oito artigos selecionados para a extração de dados foram publicados entre 2001 e 2023, sendo a maioria deles produzidos no Brasil (92,86%), seguido da Venezuela (3,57%) e do Peru (3,57%) (Quadro 2). Faz sentido que a maioria dos estudos tenha sido conduzida por grupos de pesquisa brasileiros, uma vez que a *L. braziliensis* tem o Brasil como país de maior endemicidade (Almeida et al., 2021). Essa distribuição geográfica alinha-se a revisões epidemiológicas que identificam o Brasil como epicentro da LC-Lb, em contraste com as prevalências observadas em outros países (Silva et al., 2024).

Considerando os desenhos metodológicos, os estudos podem ser divididos em dois grupos: um adotou apenas o método experimental (78,57%) e o outro utilizou procedimentos experimentais em estudos epidemiológicos (21,43%). Nenhum dos estudos reportou a forma como a amostra foi selecionada; por isso, não sabemos se as amostras foram randomizadas ou não. A falta de distinção entre amostras aleatórias e não aleatórias impediu a análise de subgrupos para esta variável, além de aumentar o risco de viés de seleção nos resultados.

Quadro 2 - Estudos selecionados para extração de dados e meta-análise (n = 28).

Estudo	Título	Publicação	País
(Rodrigues, 2011)	A influência do sistema de sinalização Notch e das citocinas inflamatórias IL-17 e IL-18 na resposta ao tratamento da leishmaniose tegumentar americana	Fundação Oswaldo Cruz	Brasil
(Nascimento et al., 2022)	Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ Agonist, Downregulates the Inflammatory Response in Cutaneous Leishmaniasis Patients Without Interfering in <i>Leishmania braziliensis</i> Killing by Monocytes	Front Cell Infect Microbiol	Brasil
(Bacellar et al., 2009)	Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis	J Infect Dis	Brasil
(Best et al., 2018)	IFN- $\gamma$ Response Is Associated to Time Exposure Among Asymptomatic Immune Responders That Visited American Tegumentary Leishmaniasis Endemic Areas in Peru	Front Cell Infect Microbiol	Peru
(Campos et al., 2014)	Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous Leishmaniasis.	PLoS Negl Trop Dis	Brasil
(Carneiro et al., 2021)	Blockade of TLR2 and TLR4 Attenuates Inflammatory Response and Parasite Load in Cutaneous Leishmaniasis	Front Immunol	Brasil
(Carvalho et al., 2013)	Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis	BMC Infect Dis	Brasil
(Carvalho et al., 2020)	Glyburide, a NLRP3 Inhibitor, Decreases Inflammatory Response and Is a Candidate to Reduce Pathology in <i>Leishmania braziliensis</i> Infection	J Invest Dermatol	Brasil
(Carvalho, Viana, et al., 2022)	Immune Response to LinB13, a <i>Lutzomyia Intermedia</i> Salivary Protein Correlates With Disease Severity in Tegumentary Leishmaniasis	Clin Infect Dis	Brasil
(Castellano et al., 2009)	Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production	Hum Immunol	Brasil
(Costa et al., 2018)	Early Cutaneous Leishmaniasis Patients Infected With <i>Leishmania braziliensis</i> Express Increased Inflammatory Responses After Antimony Therapy	J Infect Dis	Brasil

Estudo	Título	Publicação	País
(Covre et al., 2018)	Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis	Front Immunol	Brasil
(Da-Cruz et al., 2010)	T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions	J Invest Dermatol	Brasil
(de Oliveira et al., 2023)	Central and Effector Memory Human CD4+ and CD8+ T Cells during Cutaneous Leishmaniasis and after In Vitro Stimulation with Leishmania (Viannia) braziliensis Epitopes	Vaccines (Basel)	Brasil
(Garcia de Moura et al., 2021)	PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis	Front Immunol	Brasil
(Goncalves de Albuquerque et al., 2019)	Study of association of the rs2275913 IL-17A single nucleotide polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania braziliensis</i>	Cytokine	Brasil
(Guimaraes et al., 2015)	A Potential Role for Mononuclear Phagocytes in Cutaneous Ulcer Development in Human Immunodeficiency Virus- <i>Leishmania braziliensis</i> Coinfection	Am J Trop Med Hyg	Brasil
(Muniz et al., 2016)	Immunologic Markers of Protection in Leishmania (Viannia) braziliensis Infection: A 5-Year Cohort Study	J Infect Dis	Brasil
(Passos et al., 2015)	Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in <i>Leishmania braziliensis</i> infections	J Infect Dis	Brasil
(Quixabeira et al., 2019)	Alterations in monocyte subsets and cytokine production after TLR activation in American Cutaneous Leishmaniasis	Parasite Immunol	Brasil
(Reis et al., 2009)	Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment	J Clin Lab Anal	Brasil
(Santos et al., 2018)	IL-1 $\beta$ Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis	J Invest Dermatol	Brasil
(González et al., 2010)	Regulatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) in American cutaneous leishmaniasis patients	Boletin De Malariologia Y Salud Ambiental	Venezuela
(Souza et al., 2012)	American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy	Scand J Immunol	Brasil
(Souza et al., 2013)	Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals	Microb Pathog	Brasil
(Matta et al., 2009)	<i>Leishmania</i> (Viannia) <i>guyanensis</i> induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland	Am J Trop Med Hyg	Brasil
(Novoa et al., 2011)	IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in <i>L. braziliensis</i> Infection	Parasite Immunol	Brasil
(Toledo et al., 2001)	Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: Immunological aspects before and after treatment	Mem Inst Oswaldo Cruz	Brasil

Fonte: elaborado pelo autor.

A contagem do número de participantes entre os grupos dos estudos ocasionalmente apresenta sobreposições (Tabela 2). Nos estudos de coorte, por exemplo, sujeitos saudáveis podem ter se tornado pacientes. Poucos estudos efetivamente relataram a concentração de citocinas de todos os participantes mencionados nos capítulos de metodologia. Quando isso ocorreu, nenhuma das pesquisas apresentou explicações. A média do tempo de evolução da doença até a pessoa chegar ao tratamento foi de 9,11 semanas (desvio padrão = 2,04; n = 4). A idade e o gênero dos participantes foram relatados em menos da metade dos estudos.

Tabela 2 - Grupos de Participantes dos estudos selecionados e dados sociodemográficos.

Grupo	Número de participantes reportados nas metodologias dos estudos	Idade (média das médias e desvio padrão)	Sexo
Pacientes com LC-Lb antes do tratamento	$\bar{x} = 23,39$ Total = 655 [28]	32,68 $\pm$ 9,08 [13]	Mas. 214 [13] Fem. 159 [13]
Pessoas saudáveis	$\bar{x} = 20,04$ Total = 481 [24]	31,54 $\pm$ 5,81 [9]	Mas. 134 [8] Fem. 142 [8]

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: [] = número de estudos que relataram a informação,  $\bar{x}$  = média, LC-Lb = pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

A concentração de células ajustadas do PBMC utilizada nas culturas dos estudos variou de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL ( $\bar{x} = 2,06 \times 10^6$  células/mL;  $dp = \pm 1,12 \times 10^6$  células/mL;  $n = 25$ ). A primeira concentração foi a mais usada (11/25), seguida logo pela concentração “ $3 \times 10^6$  células/mL” (10/25). O antígeno da *Leishmania braziliensis* foi geralmente utilizado na forma solúvel em 26 estudos (92,86%). A estimulação com o parasito inteiro foi realizada em dois estudos (7,14%). O tempo de cultura com o parasito/antígeno para estimulação mais usado foi de 72 horas ( $\bar{x} = 80,57$  horas;  $dp = \pm 32,14$  horas), variando de 24 a 144 horas, dependendo da citocina medida. A concentração do antígeno da *L. braziliensis* utilizada na cultura variou de 1,25  $\mu\text{g/mL}$  a 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo 5  $\mu\text{g/mL}$  o valor mais utilizado ( $\bar{x} = 11,3$   $\mu\text{g/mL}$  /  $dp = \pm 15,51$   $\mu\text{g/mL}$  /  $n = 23$ ). Entre os estudos que reportaram os antígenos em parasitos/mL, o valor mais usado foi  $1 \times 10^7$  parasitos/mL ( $\bar{x} = 3,4 \times 10^7$  parasitos/mL /  $dp = \pm 5,7 \times 10^7$  parasitos/mL /  $n = 3$ ). Os estudos que usaram o parasito inteiro reportaram em parasitos/mL; estes utilizaram uma quantidade de  $5 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^9$  ( $n = 2$ ).

A técnica mais utilizada para medir a concentração de citocinas foi o método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Vinte e três estudos (82,14%,  $n = 28$ ) utilizaram apenas esta técnica. O ELISA sanduíche foi a versão mais reportada. Nele, um anticorpo imobilizado na base de um poço garante a captura do antígeno, confirmando a identidade imunológica da substância investigada, seguido de um anticorpo secundário conjugado a uma enzima, que facilita a detecção e a amplificação do sinal para reconhecimento (Leng et al., 2008). Para a detecção de citocinas, os kits da R&D Systems (marca da Bio-technie) foram os mais utilizados. Outros fabricantes de kits para ELISA utilizados foram: eBioscience, Pharmigen, Mabtech e BD Bioscience. O sistema Cytometric Bead Array (CBA), fabricado pela BD Biosciences, foi utilizado em 5 estudos que empregaram citometria de fluxo. Esta técnica utiliza microesferas (beads) com diferentes intensidades de fluorescência, revestidas

com anticorpos específicos para cada citocina-alvo. Após a mistura das microesferas com a amostra biológica, as citocinas presentes ligam-se aos anticorpos das microesferas; em seguida, adiciona-se um anticorpo de detecção, formando o “sanduíche” de detecção (Leng et al., 2008). Este “sanduíche” passa pelo citômetro de fluxo, que discrimina cada população de esferas e quantifica simultaneamente o sinal fluorescente de cada citocina (Wronska et al., 2022). Para calcular a concentração em pg/ml a partir da fluorescência, um padrão de citocina conhecido é comparado a uma amostra de concentração conhecida, o que permite a construção de uma curva padrão de fluorescência  $\times$  concentração (Richens et al., 2010). O resultado obtido em fluorescência (Mediana da Intensidade de Fluorescência, MFI) é comparado à curva padrão elaborada pelos pesquisadores, utilizando um software que converte os valores de fluorescência em valores exatos de concentração de cada citocina no volume testado (Richens et al., 2010; Wronska et al., 2022).

#### **4.1 Avaliação do risco de viés**

Vieses são processos ou erros sistemáticos que introduzem distorções nos resultados de uma pesquisa (Galdas, 2017). Estes podem se originar em todas as etapas de desenvolvimento da pesquisa (Gerhard, 2008). A existência desse tipo de erro pode comprometer a confiabilidade e a consistência dos achados entre estudos distintos. De forma a ser mais um fator que pode explicar a alta heterogeneidade nos resultados das pesquisas. O cuidado para evitar o viés não foi explicitamente relatado nas pesquisas, nem nos capítulos de metodologia. Quando estes surgiram, foram descritos como parte inerente do processo de coleta e análise das amostras. Segundo os critérios do “Pilot risk of bias tool to appraise clinical laboratory studies” (Fox et al., 2024), todos os estudos aprovados para a extração de dados apresentaram “alto risco de viés” como resultado geral (Quadro 4). Isso impossibilitou a análise por subgrupos desta variável nas meta-análises, pois não era possível separar os estudos em subgrupos.

##### **4.1.1 Domínio 1: coleta e manuseio de amostras**

Foi avaliado se as pesquisas (n = 28) relataram a avaliação clínica e laboratorial necessária para o diagnóstico da leishmaniose cutânea nos pacientes. Também era preciso que os participantes saudáveis fossem avaliados como tais, de modo a poderem efetivamente ingressar no grupo controle de pessoas saudáveis (healthy subjects – HS). 96,43% dos estudos

relatarem o uso de estratégias diagnósticas adequadas para um diagnóstico confiável, enquanto apenas 1 estudo (3,57%) omitiu essa informação. Entre os métodos para chegar ao diagnóstico foram principalmente reportados:

- Avaliação do estado clínico: entrevista sobre sintomas e observação da pele do paciente. Para a leishmaniose cutânea precoce (ECL), geralmente foi definido como critério diagnóstico a presença de lesão papular não ulcerada, com aumento regional dos linfonodos e menos de 30 dias (Costa et al., 2018). Para a leishmaniose cutânea clássica, frequentemente foi definida como uma úlcera bem limitada por 30 a 75 dias (Costa et al., 2018).
- Teste de PCR: o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar DNA de *Leishmania braziliensis* (Garcia de Moura et al., 2021). Principalmente em amostras de lesões biopsiadas (Carvalho, Viana, et al., 2022).
- Teste cutâneo de Montenegro: verifica a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio. Utiliza a inoculação subcutânea de uma pequena dose do antígeno da leishmaniose cutânea para observar a resposta após alguns dias (Castellano et al., 2009).

Apenas 3 estudos de 28 relataram o cálculo estatístico para identificar o tamanho adequado da amostra, capaz de sustentar o poder estatístico das análises. 89,3% não apresentaram essa informação.

Quanto à contemporaneidade das amostras coletadas, 82,14% não informaram se usaram amostras coletadas em um intervalo de tempo delimitado e próximo entre si. Estes estudos não informaram o período nem a data da coleta. 14,29% indicaram quando ocorreu a coleta, mas o período não foi contemporâneo, com uma dispersão temporal significativa de pelo menos 6 meses entre as coletas. Alguns estudos tinham amostras congeladas com intervalos de anos entre as coletas. Apenas um estudo relatou que a coleta foi realizada temporalmente próxima, indicando datas em um período inferior a 6 meses.

O pareamento entre o grupo experimental e o grupo controle é fundamental para reduzir interferências nos resultados decorrentes de variáveis como gênero, faixa etária etc. A principal estratégia utilizada para lidar com este risco foi a comparação das amostras estimuladas com *Leishmania braziliensis* com as amostras não estimuladas dos mesmos pacientes (amostras pareadas). Outra estratégia, menos utilizada, foi parear, por gênero ou faixa etária, com o grupo de sujeitos saudáveis. 85,71% relataram o uso de pareamento; 14,29% não informaram o uso de nenhuma estratégia de pareamento.

Seguir o mesmo protocolo na coleta e preparação das amostras até o ponto em que são introduzidas as variáveis experimentais reduz o risco de que um tratamento diferente comprometa a confiabilidade dos achados. Todos os estudos (100%) garantiram a preparação e a coleta iguais entre os grupos comparados.

A categoria de coleta e manuseio de amostras apresentou o seguinte risco de viés geral do domínio: 89,29% dos 28 estudos foram classificados como “alto risco de viés” e apenas 10,71% como “algum risco”. Nenhum estudo se mostrou com baixo risco de viés neste domínio. A Tabela 3 apresenta os resultados de cada estudo neste domínio.

Tabela 3 – Avaliação do risco de viés por estudo no Domínio 1: coleta e manuseio das amostras.

Estudo	Os pacientes foram avaliados clinicamente para garantir que cumprem os critérios de inclusão?	Foram realizados cálculos estatísticos para determinar um tamanho de amostra adequado?	As amostras são contemporâneas ?	Os pacientes foram pareados com base em características não investigacionais que podem introduzir confundidores?	As amostras de ambos os grupos foram coletadas e preparadas da mesma forma?	Risco de viés geral do Domínio 1
(Rodrigues, 2011)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Nascimento et al., 2022)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Bacellar et al., 2009)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Best et al., 2018)	sim	não informou	sim	não informou	sim	alto
(Campos et al., 2014)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Carneiro et al., 2021)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Carvalho et al., 2013)	sim	não informou	no	sim	sim	alto
(Carvalho et al., 2020)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Carvalho, Viana, et al., 2022)	sim	não informou	no	sim	sim	alto
(Castellano et al., 2009)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Costa et al., 2018)	sim	sim	no	sim	sim	algum
(Covre et al., 2018)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Da-Cruz et al., 2010)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(de Oliveira et al., 2023)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Garcia de Moura et al., 2021)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Goncalves de Albuquerque et al., 2019)	sim	sim	não informou	sim	sim	algum
(Guimaraes et al., 2015)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Muniz et al., 2016)	sim	não informou	no	sim	sim	alto
(Passos et al., 2015)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Quixabeira et al., 2019)	não informou	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Reis et al., 2009)	sim	não informou	não informou	não informou	sim	alto
(Santos et al., 2018)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(González et al., 2010)	sim	não informou	não informou	não informou	sim	alto

Estudo	Os pacientes foram avaliados clinicamente para garantir que cumprem os critérios de inclusão?	Foram realizados cálculos estatísticos para determinar um tamanho de amostra adequado?	As amostras são contemporâneas ?	Os pacientes foram pareados com base em características não investigacionais que podem introduzir confundidores?	As amostras de ambos os grupos foram coletadas e preparadas da mesma forma?	Risco de viés geral do Domínio 1
(Souza et al., 2012)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Souza et al., 2013)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Matta et al., 2009)	sim	não informou	não informou	não informou	sim	alto
(Novoa et al., 2011)	sim	não informou	não informou	sim	sim	alto
(Toledo et al., 2001)	sim	sim	não informou	sim	sim	algum

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: “sim” = reportou afirmativamente; “não” = reporte de que não foi realizado; “não informou” = a pesquisa não reportou; “baixo” = baixo risco de viés; “algum” = algum risco de viés; “alto” = alto risco de viés.

#### 4.1.2 Domínio 2: métodos experimentais

Nesta categoria avaliaram-se os métodos empregados para mensurar as concentrações de citocinas e quimiocinas nos experimentos. Considerando se são adequados e se houve controle eficaz para reduzir possíveis vieses. Os 28 estudos foram avaliados, e a Tabela 4, ao final deste tópico, apresenta os resultados de cada um. Todos utilizaram uma metodologia para realizar os experimentos que era validada por outras pesquisas ou era consistente com os resultados dos seus problemas de pesquisa.

67,86% dos estudos calcularam o intervalo da faixa considerada normal de concentração de citocinas para amostras não infectadas de sujeitos saudáveis. Esta “faixa normal” abrange os valores esperados para 95% dos resultados de concentração de citocinas no grupo de sujeitos saudáveis (Fox et al., 2024). 32,14% dos estudos não relataram, conjuntamente, os valores de tendência central e de desvio da concentração das citocinas em sujeitos saudáveis. Com base nos valores da faixa normal, é possível que o estudo identifique até que ponto a infecção por *L. braziliensis* distingue as amostras experimentais das amostras de controle do ponto de vista clínico. Nos estudos que utilizaram apenas meio não estimulado, consideramos positivo, para menor risco de viés (“sim”), o cálculo dos valores de tendência central e desvio para o meio não estimulado.

Quase todos os estudos (92,86%) planejaram métodos estatísticos adequados para comparação entre grupos; 7,14% não relataram esse planejamento. Nenhum estudo informou se os avaliadores estavam cegos quanto à origem das amostras durante as análises. O uso de controles internos e externos, com amostras não estimuladas e controles negativos/positivos, foi realizado por 39,29% dos estudos.

Considerando estes resultados, o risco geral do “Domínio 2: métodos experimentais” foi de 75% com “alto” risco de viés e 25% com “algum” risco. Nenhum estudo apresentou “baixo” risco de viés neste domínio.

Tabela 4 – Avaliação do risco de viés por estudo no Domínio 2: métodos experimentais.

Estudo	É usada uma metodologia validada? Se não, a metodologia está bem descrita?	Um intervalo normal foi calculado?	Métodos estatísticos foram planejados para comparar os valores dos grupos experimentais com os controles?	As pessoas que avaliam os dados estão cegas para a origem das amostras?	É usado um controle interno e externo?	Risco de viés
(Rodrigues, 2011)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Nascimento et al., 2022)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Bacellar et al., 2009)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Best et al., 2018)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Campos et al., 2014)	sim	Não	sim	não informou	não informou	alto
(Carneiro et al., 2021)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Carvalho et al., 2013)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Carvalho et al., 2020)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Carvalho, Viana, et al., 2022)	sim	Não	sim	não informou	não informou	alto
(Castellano et al., 2009)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(Costa et al., 2018)	sim	Não	sim	não informou	não informou	alto
(Covre et al., 2018)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(Da-Cruz et al., 2010)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(de Oliveira et al., 2023)	sim	Não	sim	não informou	não informou	alto
(Garcia de Moura et al., 2021)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Goncalves de Albuquerque et al., 2019)	sim	Não	sim	não informou	sim	alto
(Guimaraes et al., 2015)	sim	Sim	não	não informou	não informou	alto
(Muniz et al., 2016)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Passos et al., 2015)	sim	Sim	sim	não informou	sim	alto
(Quixabeira et al., 2019)	sim	Não	sim	não informou	sim	alto
(Reis et al., 2009)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(Santos et al., 2018)	sim	Não	não	não informou	não informou	alto
(González et al., 2010)	sim	Sim	sim	não informou	não informou	alto
(Souza et al., 2012)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(Souza et al., 2013)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(Matta et al., 2009)	sim	Sim	sim	não informou	sim	algum
(Novoa et al., 2011)	sim	Não	sim	não informou	não informou	alto
(Toledo et al., 2001)	sim	Não	sim	não informou	sim	alto

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: “sim” = reportou afirmativamente; “não” = reportou que não foi realizado; “não informou” = a pesquisa não reportou; “baixo” = baixo risco de viés; “algum” = algum risco de viés; “alto” = alto risco de viés.

#### **4.1.3 Domínio 3: relato de resultados**

O Domínio 3 da ferramenta proposta por Fox et al. (2024) refere-se à avaliação da análise e apresentação dos resultados laboratoriais. Considerando a qualidade da estatística apresentada, o acesso transparente aos dados e a forma de quantificação dos resultados. A maioria dos vinte e oito estudos (71,43%) apresenta resultados quantificados adequadamente, com pelo menos uma medida de tendência central (média, mediana etc.) e de desvio (desvio padrão, intervalo interquartil etc.), indicando boas práticas de apresentação estatística dos dados laboratoriais. Contudo, aproximadamente 28,57% ainda falham nesse requisito, o que pode refletir limitações metodológicas, como amostras pequenas ou ausência de validação estatística dos resultados.

Todos os dados, ou quase todos, indicados como variáveis do estudo na metodologia, foram apresentados nos textos. Com 85,71% dos estudos que cumpriram este critério. Mas esse cuidado não foi observado no reporte do tamanho das amostras, descrito nas metodologias, nem no tamanho das amostras utilizadas nos experimentos. A maioria dos estudos utilizou, nos experimentos, uma quantidade menor de amostras de participantes do que a reportada na metodologia, sem justificar tal redução.

Em todos os estudos, foram utilizados testes estatísticos adequados para as comparações entre grupos, sugerindo domínio dos pesquisadores do campo no uso de testes estatísticos para comparação de resultados entre grupos. Os testes mais reportados para isso foram os não paramétricos, seguidos pelos de correlação, para avaliar a associação entre variáveis. Poucos utilizaram testes de regressão, o que mostra que este é o ponto a ser desenvolvido pelos pesquisadores. Devido à falta de testes de regressão, não foi apontado como as variáveis sociodemográficas dos participantes podem ter contribuído para os valores obtidos da concentração das citocinas. Os estudos frequentemente reportavam dados como gênero, idade, número e tamanho das lesões; mas quase todos não realizaram testes estatísticos para avaliar se estas variáveis independentes participam da constituição dos desfechos. Os estudos que fizerem isso de forma clara se diferenciarão positivamente em termos de qualidade analítica e de poder explicativo do fenômeno.

A transparência dos dados ainda não é rotina nas pesquisas na área: apenas 7,14% dos trabalhos disponibilizaram seus dados em repositórios públicos acessíveis. Tais como o ImmPort ou o FlowRepository, que aceitam dados de citometria e de outras técnicas. A maioria

(92,86%) não oferece informações sobre isso ou declara não disponibilizar os dados em repositórios, o que impossibilita qualquer reavaliação externa destes resultados. Uma prática comum foi indicar o autor como responsável por fornecer informações sobre o artigo. Quando contactamos estes autores para solicitar informações e dados complementares, o e-mail informado estava desativado ou não obtivemos resposta. O contato com o autor do artigo por e-mail não constitui uma forma pública de transparência e de acesso aos dados.

A classificação final do “Domínio 3: relato de resultados” indica que 53,57% dos estudos apresentam “algum” risco de viés, geralmente devido à ausência de dados públicos ou à falta de clareza metodológica. 39,29% dos estudos apresentam “alto” risco de viés, o que indica problemas estruturais relevantes na análise e na documentação. Apenas 7,14% são considerados de “baixo” risco de viés, formando um grupo de maior rigor metodológico e transparência (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados do risco de viés por estudo do Domínio 3: relato de resultados.

Estudo	Os resultados são quantificados e com análise apropriada?	Todos os dados estão disponíveis, ou quase todos?	Testes estatísticos apropriados são usados para testar diferenças entre os grupos?	Os dados estão disponíveis em um repositório e acessíveis para outras pessoas?	Risco de viés
(Rodrigues, 2011)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Nascimento et al., 2022)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Bacellar et al., 2009)	sim	não	sim	não informou	alto
(Best et al., 2018)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Campos et al., 2014)	não	sim	sim	não informou	alto
(Carneiro et al., 2021)	sim	sim	sim	sim	baixo
(Carvalho et al., 2013)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Carvalho et al., 2020)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Carvalho, Viana, et al., 2022)	não	sim	sim	não informou	alto
(Castellano et al., 2009)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Costa et al., 2018)	não	sim	sim	não informou	alto
(Covre et al., 2018)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Da-Cruz et al., 2010)	sim	sim	sim	não informou	algum
(de Oliveira et al., 2023)	não	sim	sim	não	alto
(Garcia de Moura et al., 2021)	sim	sim	sim	sim	baixo
(Goncalves de Albuquerque et al., 2019)	não	sim	sim	não informou	alto
(Guimaraes et al., 2015)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Muniz et al., 2016)	sim	não	sim	não informou	alto
(Passos et al., 2015)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Quixabeira et al., 2019)	não	sim	sim	não informou	alto
(Reis et al., 2009)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Santos et al., 2018)	não	sim	sim	não informou	alto
(González et al., 2010)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Souza et al., 2012)	sim	sim	sim	não informou	algum

Estudo	Os resultados são quantificados e com análise apropriada?	Todos os dados estão disponíveis, ou quase todos?	Testes estatísticos apropriados são usados para testar diferenças entre os grupos?	Os dados estão disponíveis em um repositório e acessíveis para outras pessoas?	Risco de viés
(Souza et al., 2013)	sim	sim	sim	não informou	algum
(Matta et al., 2009)	sim	não	sim	não informou	alto
(Novoa et al., 2011)	não	não	sim	não informou	alto
(Toledo et al., 2001)	sim	não	sim	não informou	alto

Fonte: elaborado pelo autor.

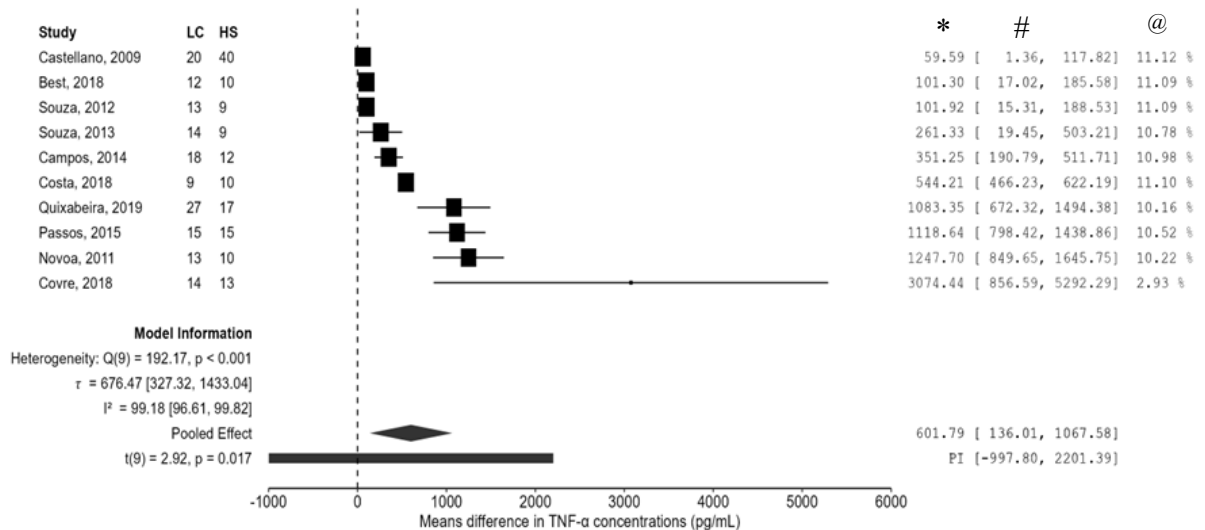
Legenda: “sim” = reportou que realizou, “não” = reporte de que não foi realizado, “não informou” = a pesquisa não reportou, “baixo” = baixo risco de viés, “algum” = algum risco de viés, “alto” = alto risco de viés.

As próximas seções apresentam os resultados das meta-análises das citocinas e quimiocinas, por pares de grupos (experimental x controle), com pelo menos dois estudos relatando os experimentos. Uma tabela com os resultados qualitativos das meta-análises está disponível na seção 5.3 (Quadro 3) do quinto capítulo. Estes resultados foram discutidos no próprio tópico, quando surgiram questões específicas relacionadas à meta-análise. Ao final de cada tópico das meta-análises, apresentamos uma avaliação dos resultados. O capítulo 5 discutirá questões decorrentes da revisão sistemática e de todas as meta-análises.

## 4.2 TNF- $\alpha$

### 4.2.1 *TNF- $\alpha$ entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis*

Gráfico 1 - Meta-análise da diferença na concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas entre os grupos de pessoas com LC-Lb, antes do tratamento, após reestimulação, e os grupos de pessoas saudáveis.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect),  $Q$  =  $Q$  de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

Dez estudos incluídos na meta-análise forneceram dados sobre a concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea por *Leishmania braziliensis* (LC-Lb) antes do tratamento ( $n = 155$ ) e de indivíduos saudáveis ( $n = 145$ ) (Gráfico 1). A síntese estatística, utilizando o modelo de efeitos aleatórios com a abordagem Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman, revelou aumento significativo na concentração de TNF- $\alpha$  nos pacientes em comparação aos controles (síntese estatística da diferença de médias = 601,79 pg/mL;  $\tau = 676,47$ ;  $p = 0,017$ ; IC 95% [136,01; 1067,58]), confirmando a ativação de vias pró-inflamatórias Th1 específicas à infecção. A elevação consistente e unidirecional nos níveis de TNF- $\alpha$  observada nos estudos individuais, corroborada pela síntese estatística da meta-análise, reforça o papel central dessa citocina na imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis*.

Este achado é congruente com o quadro imunológico relatado em infecções por outras espécies de *Leishmania*, nas quais o TNF- $\alpha$  contribui para o recrutamento de monócitos e para a ativação de macrófagos, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio essenciais para a eliminação do parasita (Carvalho, Bacellar, et al., 2022; de Araujo

et al., 2021; Hussein & Ali, 2022). Amostras de soro de pacientes com leishmaniose cutânea, causada por *Leishmania guyanensis*, no estado do Amazonas (Brasil) apresentaram concentrações de TNF- $\alpha$  significativamente maiores do que as amostras de pessoas saudáveis (de Mesquita et al., 2022). No Iraque, em um estudo de caso-controle, o nível médio de TNF- $\alpha$  no soro não estimulado de pacientes com LC causada por espécies locais (o estudo não especifica quais) foi de  $55,81 \pm 39,64$  pg/ml, em comparação com  $7,51 \pm 3,61$  pg/ml nos controles saudáveis (Eman Salman et al., 2023). Em conjunto com o resultado significativo desta meta-análise, os estudos de Eman Salman et al. (2023) e de outros (Hussein & Ali, 2022) indicam que, com ou sem reestimulação, se espera uma concentração de TNF- $\alpha$  significativamente superior nos pacientes com LC do que em pessoas não infectadas. Assim, o TNF- $\alpha$  configura-se como biomarcador relevante para a identificação e o acompanhamento da resposta inflamatória associada à LC causada por *L. braziliensis*, de forma semelhante ao que ocorre na LC causada por *L. major* e *L. guyanensis* (de Mesquita et al., 2022; Nateghi Rostami et al., 2016).

Apesar da unanimidade dos achados e da diferença significativa entre pessoas saudáveis e pacientes, a magnitude da produção do TNF- $\alpha$  variou significativamente. Indicando que outros fatores podem estar interferindo na produção e regulação do TNF- $\alpha$ , seja para regular negativamente, aproximando a concentração nos pacientes da encontrada nos sujeitos saudáveis; ou seja, para facilitar uma expressiva resposta inflamatória com potencial de aumentar a lesão nos tecidos (Scott & Novais, 2016). A magnitude variável do TNF- $\alpha$  nos estudos confirma que ele pode assumir papéis distintos na LC-Lb, com níveis moderados (ex.: “Castellano, 2009” e “Best, 2018”) favorecendo o controle parasitário por meio da ativação dos macrófagos, enquanto concentrações elevadas (ex.: “Novoa, 2011” e “Covre, 2018”) promovem dano tecidual e progressão para formas agravadas (Carvalho, Bacellar, et al., 2022).

O intervalo de predição foi de -997,8 pg/mL a 2201,39 pg/mL. Este valor indica a dispersão esperada da diferença do TNF- $\alpha$  entre pacientes e pessoas saudáveis. Os valores negativos indicam que a concentração de TNF- $\alpha$  entre pessoas saudáveis pode ser maior do que entre pacientes. Isso é biologicamente possível em certas condições. Por exemplo, caso existam pessoas consideradas saudáveis que estejam lidando com uma infecção não identificada, enquanto os pacientes apresentam polarização no perfil Th2. O perfil imune predominante dos pacientes não foi classificado nos estudos, de modo que não pudemos realizar uma análise de subgrupos entre os perfis Th1 e Th2, o que constitui uma limitação para esta afirmação.

Não foi encontrada assimetria nas diferenças de média; o valor da assimetria (skewness) foi de 1,90 ( $< 1,96$ ). Ou seja, não é preciso transformar os dados para aproximá-los de uma distribuição normal para realizar os cálculos da meta-análise.

A heterogeneidade foi alta e significativa (Q de Cochran  $p < 0,001$ ;  $I^2 = 99,18\%$ ). Este valor, em porcentagem, é o quanto da diferença entre os estudos não pode ser atribuído às diferenças nos tamanhos das amostras. A avaliação visual no Gráfico 1 indica que os intervalos de confiança não se sobrepõem com regularidade, o que reforça a afirmação de heterogeneidade entre os estudos. As diferenças na concentração de TNF- $\alpha$  entre os estudos variaram de 59,59 pg/mL a 3074,44 pg/mL, o que evidencia uma dispersão relevante dos resultados. Tal variabilidade fortalece a possibilidade de diferentes fatores regularem os resultados da produção de TNF- $\alpha$  nos experimentos. Estes fatores podem vir dos protocolos de pesquisa (técnica de amostragem, concentração celular, tempo de cultura, dose antigênica etc.) e dos participantes (infecções não identificadas, carga parasitária, polarização Th1/Th2, comorbidades subclínicas etc.), conforme relatado em revisões sobre perfis imunes mistos na leishmaniose (Saidi et al., 2023; Volpedo et al., 2021).

O estudo de “Covre, 2018” foi o mais discrepante, devido às concentrações do TNF- $\alpha$  e à variedade interna acima das observadas nos demais estudos, mesmo entre pessoas saudáveis. Ele é um estudo outlier. A comparação visual no Gráfico 1 do seu intervalo de confiança com os dos demais estudos confirma isso. Retirar este estudo introduziria um viés de seleção e não reduziria de forma relevante a inconsistência ( $I^2$ ); testamos isso e confirmamos a ineficácia.

A análise de subgrupos mostrou que separar os estudos por graus de vieses não afetou significativamente a heterogeneidade. Outras variáveis qualitativas não puderam ser avaliadas devido ao tamanho insuficiente dos estudos nos subgrupos. Utilizamos a meta-regressão univariada, com um preditor quantitativo contínuo analisado por vez, como forma de lidar com a limitação do número de estudos. A regressão multivariada seria a ideal, mas exigiria pelo menos 10 estudos para cada moderador. Ressaltamos que a regressão univariada não considera a associação entre os moderadores na determinação do desfecho. A concentração de células na cultura do PBMC, o tempo de cultura e a concentração do antígeno de *L. braziliensis* utilizada não apresentaram associação com as diferenças na concentração de TNF- $\alpha$  (Tabela 6). Apesar da ausência de significância estatística, a avaliação visual da elevação da curva da relação entre a concentração do antígeno e o aumento da diferença do TNF- $\alpha$  sugere que a realização de mais estudos individuais sobre esta relação pode ser relevante (Figura 5C);

inclusive, com valores de concentração do antígeno acima do usual (5 µg/mL). A distribuição dos estudos ao longo das retas na Figura 5 reforça a hipótese de heterogeneidade significativa.

Tabela 6 - Resultados da metarregressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$  entre pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC, o tempo de cultura e a concentração do antígeno da *L. braziliensis* utilizado.

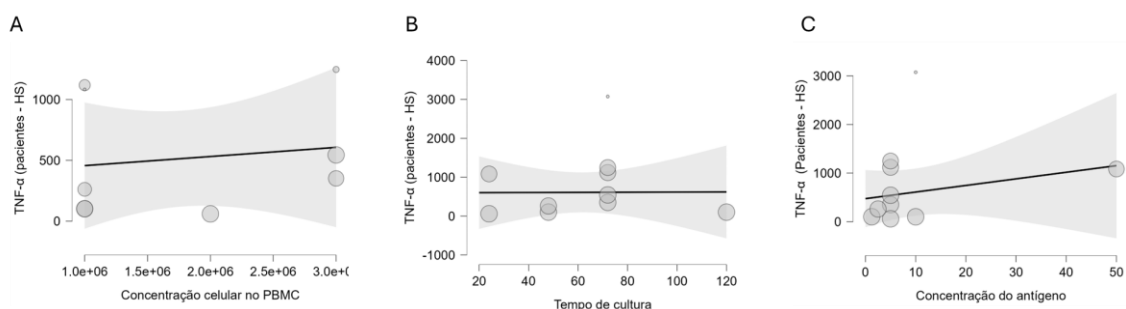
Moderador	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC 95%	t	gl	p
Concentração de células no PBMC	Intercepto *	381,23	365,34	-482,67; 1245,13	1,04	7	0,33
	Coefficiente	$7,51 \times 10^{-5}$	$1,82 \times 10^{-4}$	$-3,56 \times 10^{-4}$ ; $5,06 \times 10^{-4}$	0,41	7	0,69
Tempo de cultura do PBMC com o antígeno/parasito	Intercepto *	597,49	544,56	-658,28; 1853,26	1,1	8	0,30
	Coefficiente	0,19	8,03	-18,34; 18,72	0,02	8	0,98
Concentração do antígeno utilizado na cultura	Intercepto *	473,83	255,04	-114,29; 1061,96	1,86	8	0,10
	Coefficiente	13,57	15,17	-21,40; 48,55	0,90	8	0,40

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: \* apresentado em pg/mL. IC = intervalo de confiança. t = valor do teste t. gl = grau de liberdade.

Notas: Utilizou-se o ajuste de Knapp-Hartung. Intercepto indica o valor do TNF- $\alpha$  caso o moderador fosse nulo. O coeficiente indica se a associação é positiva ou negativa, e, a cada aumento de uma unidade de TNF- $\alpha$ , teríamos uma mudança no moderador, de acordo com o seu valor. A meta-regressão para a concentração do PBMC teve menos de 10 estudos (n = 8), portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

Figura 5 - Meta-regressão univariada entre a diferença entre as médias de TNF- $\alpha$  de pacientes (LC-Lb) e de pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC (A) (n = 8), o tempo de cultura (B) (n = 10) e a concentração do antígeno da *L. braziliensis* (C) (n = 10).



Fonte: elaborado pelo autor.

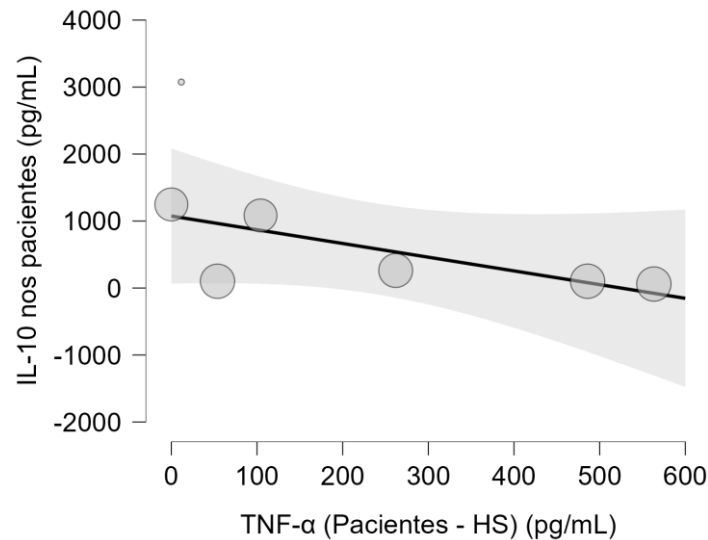
Notas: Cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza é o intervalo de confiança da reta da metarregressão. Concentração celular do PBMC reportada em células/mL, tempo de cultura para mensuração do TNF- $\alpha$  reportado em horas e concentração do antígeno da Lb reportada em µg/mL. As três metarregressões não foram estatisticamente significativas para os coeficientes ( $p > 0,05$ ). A meta-regressão para a concentração do PBMC teve menos de 10 estudos (n = 8), portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

A metarregressão para avaliar o impacto destas características do protocolo experimental nas variações entre estudos (heterogeneidade) indicou que as diferenças nas

concentrações de células utilizadas nos experimentos (intercepto 12,48;  $p < 0,01$  / coeficiente  $-1,67 \times 10^{-7}$ ;  $p = 0,8$ ), nos tempos de cultura (intercepto 12,29;  $p < 0,01$  / coeficiente  $3,29 \times 10^{-3}$ ;  $p = 0,89$ ) e nas diferentes concentrações do antígenos (intercepto 11,97;  $p < 0,01$  / coeficiente 0,05;  $p = 0,67$ ) não explicam a heterogeneidade observada. Em resumo, os interceptos significativos indicam a presença de heterogeneidade geral, enquanto os coeficientes não significativos indicam que esses moderadores não são responsáveis por essa heterogeneidade. Ela decorre de outros fatores não modelados nesta regressão.

A metarregressão univariada, realizada para investigar a regulação da produção de TNF- $\alpha$  pela IL-10, não demonstrou associação estatisticamente significativa entre essas citocinas (coeficiente = -2,05;  $n = 7$ ;  $p = 0,15$ ), embora o intercepto confirme a presença de um processo inflamatório basal elevado nos pacientes com LC-Lb (intercepto = 1074,44 pg/mL;  $p = 0,04$ ). A avaliação visual da reta de regressão (Gráfico 2) sugere uma tendência negativa, com declínio na concentração de TNF- $\alpha$  nos estudos que registraram os maiores níveis de IL-10, compatível com o papel imunorregulador da IL-10 na supressão de respostas pró-inflamatórias Th1 durante a infecção por *L. braziliensis* (González et al., 2010; Novoa et al., 2011). Tais achados, no entanto, carecem de poder estatístico adequado devido ao número limitado de estudos, o que recomenda a realização de pelo menos três investigações adicionais, com protocolos padronizados, para validar essa interação regulatória entre a IL-10 e o TNF- $\alpha$  em pacientes e pessoas saudáveis.

Gráfico 2 - Metarregressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$  de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis (HS) e a concentração média de IL-10 entre os pacientes por estudo ( $p = 0,15$ ) ( $n = 7$ ).



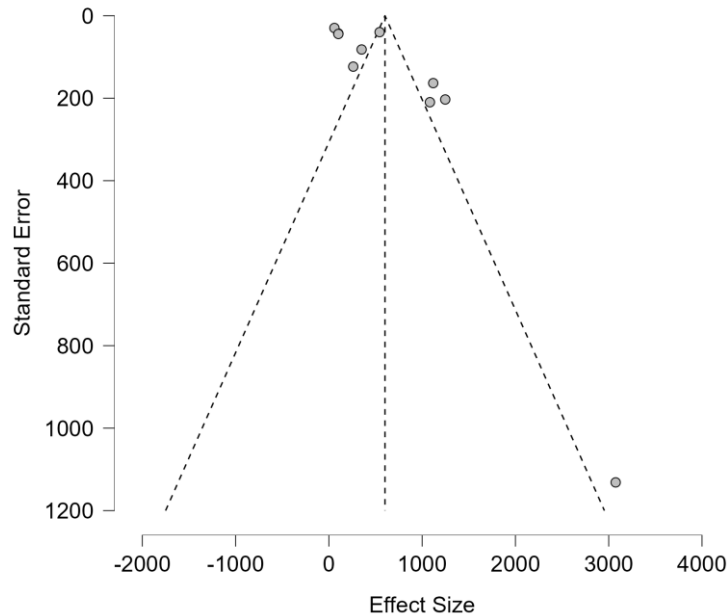
Fonte: elaborado pelo autor. Cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza é o intervalo de confiança da reta da metarregressão.

Legenda: HS = pessoas saudáveis.

Nota: Esta meta-regressão tem menos de 10 estudos ( $n = 7$ ), portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

O viés de publicação não foi confirmado pelo teste de Egger ( $p = 0,05$ ). A avaliação visual do “funnel plot” indica que, em sua maioria, os estudos estão fora da área de H1 (hipótese de viés de publicação) (Gráfico 3). Com isso, não podemos afirmar que haja viés de publicação entre os estudos.

Gráfico 3 - Viés de publicação nos estudos sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb.



Fonte: elaborado pelo autor.

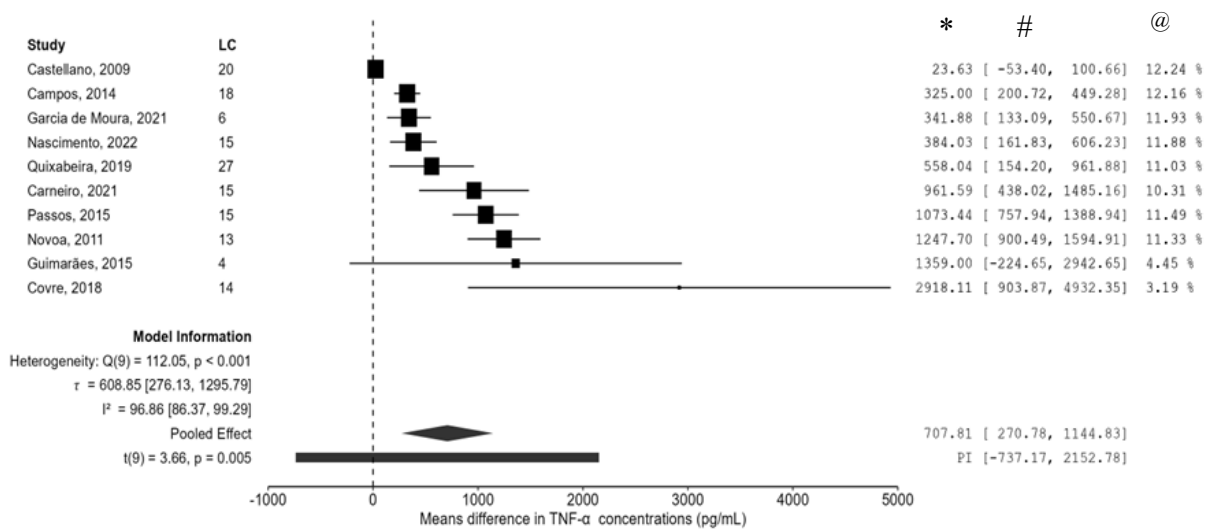
Legenda: Os círculos preenchidos representam os estudos (n = 10).

Notas: A área dentro do funil delimita os estudos que se enquadram na hipótese alternativa (H1) de que há viés de publicação. As amostras dos pacientes foram reestimuladas com o antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

A faixa do intervalo de predição pode ser considerada representativa das possíveis diferenças na concentração de TNF- $\alpha$  entre pacientes e indivíduos saudáveis na população. A síntese estatística dos estudos foi significativa, mas pressupõe homogeneidade entre eles. Como isso não ocorreu, recomenda-se que a síntese estatística seja interpretada como um indicativo preliminar, devendo ser complementada por estudos que adotem protocolos semelhantes, reduzindo a heterogeneidade.

#### 4.2.2 TNF- $\alpha$ em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*

Gráfico 4 - Meta-análise da diferença na concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect),  $Q$  =  $Q$  de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Dez estudos foram incluídos nesta meta-análise. Eles forneceram dados sobre a concentração do TNF- $\alpha$  no sobrenadante de culturas do PBMC de pacientes com LC-Lb antes do tratamento ( $n = 147$ ), em comparação com meios não estimulados ( $n = 147$ ) (Gráfico 4). Todos os estudos individuais demonstraram aumento unidirecional da concentração de TNF- $\alpha$  após reestimulação com o antígeno/parasito, com síntese estatisticamente significativa utilizando o modelo de efeitos aleatórios (diferença média = 645,74 pg/mL;  $p = 0,005$ ; IC 95% [270,78, 1144,83]), confirmando a ativação pró-inflamatória característica da infecção (Carvalho, Bacellar, et al., 2022; de Araujo et al., 2021). O intervalo de predição amplo (-737,17 a 2152,78 pg/mL) apresenta o cálculo estatístico da variabilidade populacional esperada desta resposta imunológica, permitindo estimativas mais confiáveis do que as fundamentadas em estudos individuais isolados (Borenstein et al., 2021). Não foi encontrada assimetria relevante entre as diferenças de médias, de forma que não é preciso transformar a distribuição para torná-la normal; o valor da assimetria (skewness) foi de 1,64 ( $< 1,96$ ).

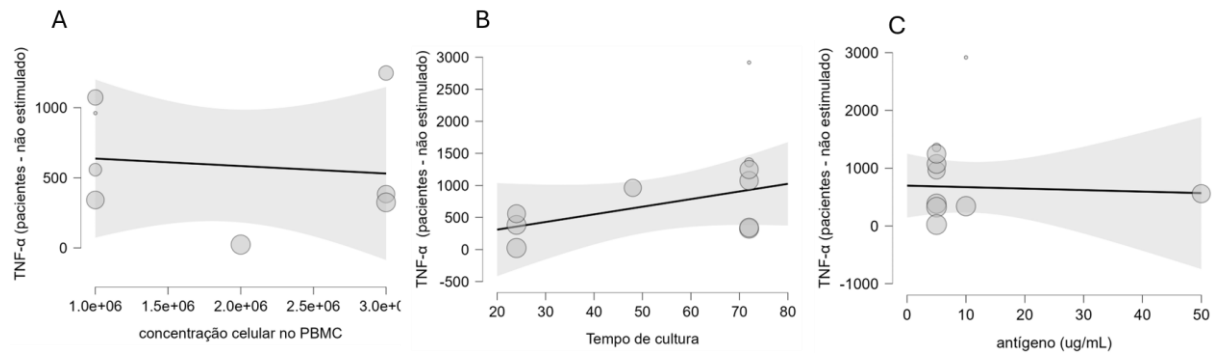
A heterogeneidade entre os estudos foi confirmada pelo teste  $Q$  de Cochran ( $p < 0,001$ ), com inconsistência elevada ( $I^2 = 96,86\%$ ), indicando que a variabilidade observada transcende o esperado pelo erro amostral e pode ser consequência de diferenças metodológicas ou biológicas substanciais entre os estudos (Higgins et al., 2003). A avaliação visual do Gráfico 4 revela sobreposição irregular dos intervalos de confiança, com dois estudos apresentando

faixas que admitem concentrações menores de TNF- $\alpha$  nos meios estimulados, em comparação aos não estimulados, reforçando a presença de heterogeneidade na resposta imunológica à *L. braziliensis*. O que confirma o descrito na literatura para o TNF- $\alpha$  (Castellano et al., 2009). A análise de sensibilidade, testando a remoção de estudos discrepantes, não identificou alterações significativas na heterogeneidade residual, sugerindo que a variabilidade é intrínseca ao fenômeno estudado e não depende de outliers isolados, o que justifica manter todos os estudos na síntese estatística. Não foram identificados outliers.

Foram conduzidas análises de subgrupos de caráter exploratório para investigar potenciais fontes de heterogeneidade na produção de TNF- $\alpha$ . Contudo, estas análises apresentam poder estatístico limitado devido ao número reduzido de estudos por subgrupo ( $n < 10$ ), conforme recomendado pela literatura metodológica (Higgins et al., 2024). Não foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos categorizados por risco de viés no Domínio 2 ("Métodos Experimentais": alto vs. algum risco;  $p = 0,68$ ) nem no Domínio 3 ("Relato de Resultados";  $p = 0,83$ ), indicando que variações na qualidade metodológica não explicam de forma substancial a heterogeneidade observada. Outras variáveis qualitativas não puderam ser avaliadas devido à insuficiência numérica de estudos nos subgrupos ou resultaram em achados não significativos, reforçando a necessidade de investigações futuras com maior número de estudos padronizados para elucidar moderadores clínicos e dos protocolos experimentais.

Em virtude da quantidade restrita de estudos incluídos ( $n = 10$ ), a realização de metarregressão multivariada não foi viável, sendo realizadas apenas análises univariadas. As variáveis dos protocolos experimentais testadas foram a concentração celular do PBMC (intercepto = 689,8 pg/mL,  $p = 0,12$ ; coeficiente =  $-5,33 \times 10^{-5}$ ,  $p = 0,77$ ;  $n = 7$ ), o tempo de cultura (intercepto = 77,2 pg/mL,  $p = 0,88$ ; coeficiente = 11,9 pg/mL/dia,  $p = 0,17$ ;  $n = 9$ ) e a concentração do antígeno/parasito de *L. braziliensis* (intercepto = 697,26 pg/mL,  $p = 0,02$ ; coeficiente =  $-2,58$  pg/mL/ $\mu$ g,  $p = 0,86$ ;  $n = 9$ ). Todas não apresentaram associações estatisticamente significativas com as diferenças de TNF- $\alpha$  entre os meios estimulados e não estimulados (Figura 6). A avaliação visual das retas de regressão indica ausência de tendências significativas. Com inclinação positiva sugestiva para o tempo de cultura (Figura 6B), indicando a possibilidade de obter diferenças máximas nas concentrações do TNF- $\alpha$  entre os grupos estimulados e não estimulados na LC-Lb, após 72 h de tempo de cultura. Os interceptos positivos e significativos confirmam a resposta inflamatória, independentemente das diferenças entre os protocolos adotados nos estudos.

Figura 6 - Meta-regressão univariada entre a diferença nas médias de TNF- $\alpha$  de pacientes (LC-Lb) depois e antes da estimulação com *L. braziliensis* e a concentração celular do PBMC (A), o tempo de cultura (B) e a concentração do antígeno da *L. braziliensis* (C).



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza corresponde ao intervalo de confiança da reta da metarregressão.

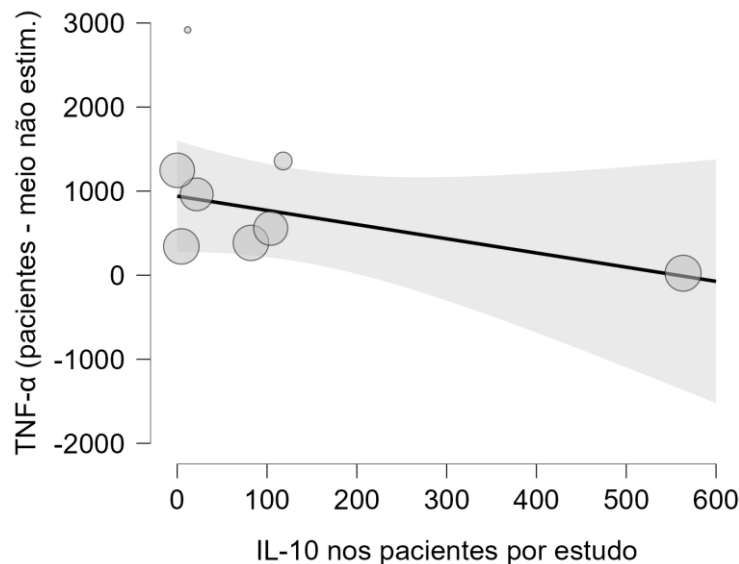
Notas: Concentração do antígeno da Lb em  $\mu\text{g/mL}$ . Concentração do TNF- $\alpha$  em  $\text{pg/mL}$ . Os coeficientes das retas de regressão não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ). Estas meta-regressões têm menos de 10 estudos em cada uma; portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

A metarregressão univariada, para avaliar a associação entre as características dos protocolos experimentais e a heterogeneidade, concluiu que há heterogeneidade geral, mas sem a participação dessas variáveis. A concentração de células na cultura do PBMC (intercepto 11,24;  $n = 7$ ;  $p < 0,01$  / coeficiente  $4,66 \times 10^{-7}$ ;  $n = 7$ ;  $p = 0,59$ ), o tempo de cultura (intercepto 10,25;  $n = 9$ ;  $p = 0,01$  / coeficiente 0,03;  $n = 9$ ;  $p = 0,35$ ) e a concentração do antígeno de *L. braziliensis* utilizado na cultura ( $p = 0,9$ ) não apresentaram associação com as diferenças na concentração de TNF- $\alpha$  entre os meios.

A metarregressão univariada avaliando a influência da concentração média de IL-10 sobre as diferenças de TNF- $\alpha$  não alcançou significância estatística (intercepto = 940,28  $\text{pg/mL}$ ;  $n = 8$ ;  $p = 0,10$ ; coeficiente =  $-1,69 \text{ pg/mL}$  por unidade de IL-10;  $p = 0,20$ ), indicando que, na ausência de IL-10, a síntese estatística da resposta pró-inflamatória de TNF- $\alpha$  seria aproximadamente 940  $\text{pg/mL}$  superior nos pacientes com LC-Lb (Gráfico 5 - Metarregressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$  entre meios estimulados e não estimulados de pacientes (LC-Lb) e a concentração média de IL-10 dos pacientes por estudo ( $p = 0,2$ ). Gráfico 5). O coeficiente negativo sugere que a função regulatória da IL-10 sobre o TNF- $\alpha$  não é significativa, com cada unidade de aumento na IL-10 associada a uma redução de 1,69  $\text{pg/mL}$  na diferença TNF- $\alpha$  estimulada versus basal. Mesmo não sendo significativo, este

resultado é compatível com o papel anti-inflamatório da IL-10 no controle do perfil Th1 durante a infecção por *L. braziliensis* (Nascimento et al., 2022). Contudo, a análise com apenas oito estudos limita a possibilidade de conclusões seguras, posicionando estes achados como indicativos exploratórios.

Gráfico 5 - Metarregressão univariada entre a diferença das médias de TNF- $\alpha$  entre meios estimulados e não estimulados de pacientes (LC-Lb) e a concentração média de IL-10 dos pacientes por estudo ( $p = 0,2$ ).



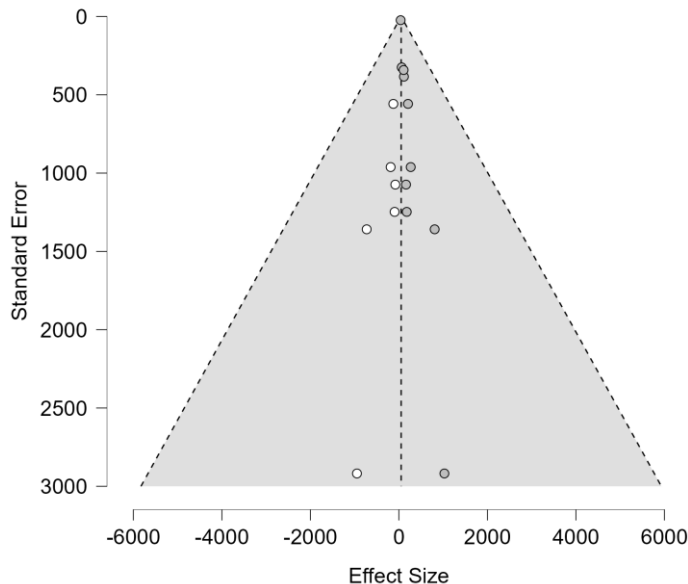
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: cada círculo representa um estudo ( $n = 8$ ). O tamanho do círculo indica o peso do estudo na estimativa. A área cinza é o intervalo de confiança da reta da metarregressão.

Notas: As concentrações estão em pg/mL. Esta meta-regressão tem menos de 10 estudos em cada uma; portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

O viés de publicação foi confirmado pelo teste de Egger ( $p < 0,01$ ). Ou seja, há uma possibilidade considerável de que estudos com concentrações mais altas nas amostras não estimuladas não estejam sendo publicados. A técnica de Trim and Fill (parâmetro L0) indica que a inclusão de seis estudos, com resultados em que a concentração de TNF- $\alpha$  seria menor no meio estimulado, removeria o viés de publicação (Gráfico 6). Caso estes estudos existissem exatamente como indicado pelo “trim and fill”, a síntese estatística seria de 51,1 pg/mL, e não de 645,74 pg/mL.

Gráfico 6 – Gráfico de funil (Funnel plot) com “trim and fill” para o viés de publicação nos estudos sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Os círculos preenchidos correspondem aos estudos publicados ( $n = 10$ ). A área dentro do funil delimita quais estudos se enquadram na hipótese alternativa (H1) de que há viés de publicação. Os círculos vazados são as sugestões indicadas na técnica “trim and fill” para remover o viés de publicação.

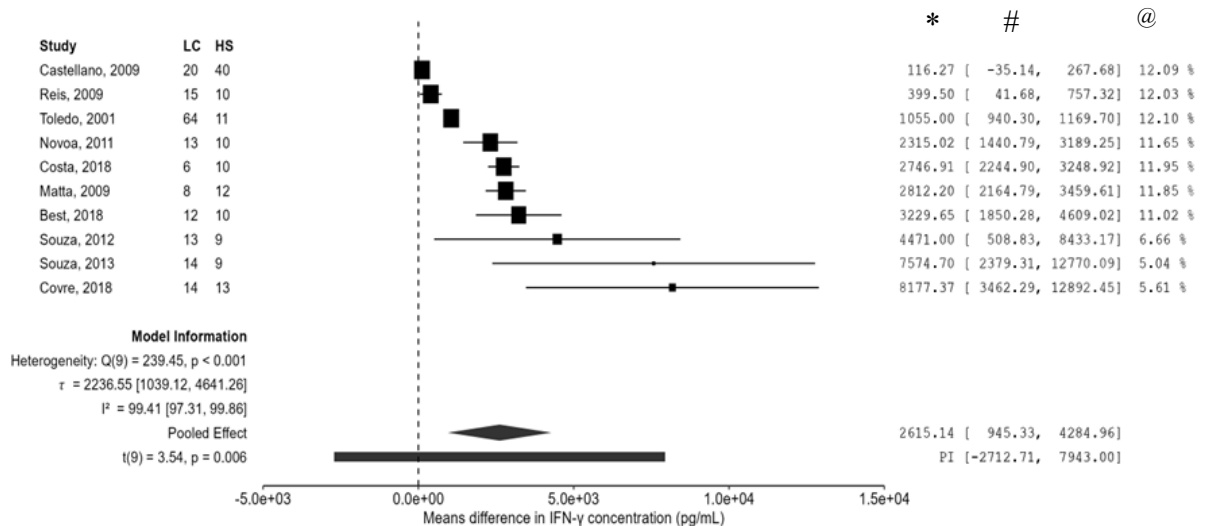
Notas: As amostras dos pacientes nos estudos foram reestimuladas com *L. braziliensis*.

Recomendamos que a síntese estatística e o intervalo de predição sejam aceitos apenas como indícios da diferença da concentração de TNF- $\alpha$  entre os meios estimulados e não estimulados de pacientes com LC-Lb. Apesar de sua significância estatística, os estudos em que se baseiam mostraram-se muito diferentes entre si, de modo que talvez não seja possível obter uma síntese que represente estes trabalhos. Além disso, o viés de publicação identificado reduz a confiança na literatura em revelar o que ocorre na população.

### 4.3 IFN- $\gamma$

#### 4.3.1 IFN- $\gamma$ entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis

Gráfico 7 - Meta-análise da diferença na concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea, causada por *L. braziliensis*, antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect),  $Q$  =  $Q$  de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

Dez estudos incluídos na meta-análise forneceram dados sobre a concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de culturas de PBMC de pacientes com LB-Lb antes do tratamento, após estimulação com antígeno/parasito ( $n = 150$ ), em comparação com indivíduos saudáveis sem estimulação ( $n = 134$ ) (Gráfico 7). Todos os efeitos individuais demonstraram elevação unidirecional do IFN- $\gamma$ , com diferenças nas médias variando substancialmente (acima de 70 vezes, de 116,27 a 8177,37 pg/mL). A síntese estatística foi significativa pelo modelo de efeitos aleatórios (diferença média = 2.615,14 pg/mL;  $p = 0,006$ ; IC 95% [945,33, 4284,96]). A diferença significativa entre pacientes e pessoas saudáveis confirma o IFN- $\gamma$  como um marcador inflamatório relevante para identificar a infecção na LC-Lb (D'Oliveira et al., 2002).

O intervalo de predição amplo (-2712,71 a 7943 pg/mL) reflete a variabilidade populacional nas concentrações do IFN- $\gamma$ , admitindo cenários clinicamente plausíveis em que concentrações superiores ocorrem em indivíduos "saudáveis" expostos assintomaticamente (ex.: infecções subclínicas) ou em pacientes com polarização Th2/Th17 dominante, em vez de Th1 (Reis et al., 2009). Tal amplitude é congruente com estudos epidemiológicos em áreas endêmicas que identificaram indivíduos saudáveis com IFN- $\gamma$  detectável devido à exposição

prévia assintomática e pacientes com LC-Lb com perfis imunes mistos associados à progressão crônica (Cabrera González et al., 2010; Souza et al., 2013). Também inclui as concentrações esperadas para casos de autocura, em que a produção de IFN- $\gamma$  varia de 500 a 2900 pg/mL (Carvalho et al., 1995).

O aumento significativo de IFN- $\gamma$  entre os pacientes com LC também foi observado em estudos de outros países, nos quais a *L. braziliensis* não é o agente infeccioso (Farooq Ramzi et al., 2024). O que fortalece a elevada presença do IFN- $\gamma$  como marcador inflamatório da LC causada por diferentes tipos de *Leishmania*.

A ampla dispersão das diferenças individuais (>70 vezes) indica heterogeneidade clínica substancial, congruente com perfis Th1 em gradações diversas na LC-Lb, confirmando que o perfil Th1 é um espectro e não um diagnóstico binário. Estas diferenças na concentração do IFN- $\gamma$  podem estar correlacionadas a diferentes estágios e progressões da leishmaniose cutânea, como relatado por D'Oliveira et al. (2002).

Não foi encontrada assimetria entre as diferenças de médias; o valor da assimetria foi 0,85 (< 1,96). Assim, não foi preciso transformar os achados dos estudos em uma distribuição simétrica.

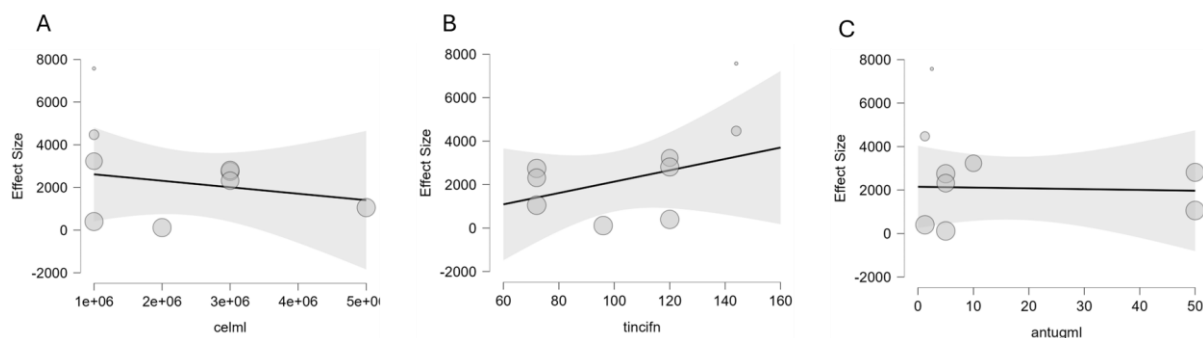
A heterogeneidade entre os estudos foi confirmada pelo teste Q de Cochran ( $p < 0,001$ ), com inconsistência elevada ( $I^2 = 99,41\%$ ), indicando que praticamente toda a variabilidade observada não se deve à diferença do tamanho das amostras, sendo maior a chance de refletir diferenças clínicas, metodológicas e biológicas que intervêm na resposta de IFN- $\gamma$  à *L. braziliensis*. A avaliação visual do Gráfico 7 evidencia sobreposição irregular dos intervalos de confiança, reforçando a presença de heterogeneidade estatística e clínica. Tal magnitude de inconsistência justifica o modelo de efeitos aleatórios adotado e interpretações cautelosas da síntese, priorizando o intervalo de predição como estimativa populacional mais realista (Borenstein et al., 2021).

A análise de subgrupos para “D2: métodos experimentais” não foi estatisticamente significativa para a diferença entre subgrupos ( $p = 0,47$ ), não reduziu a inconsistência e apresentou sínteses estatísticas não significativas. “D1: coleta e manuseio de amostras” ( $p = 0,41$ ) e “D3: relato de resultados” ( $p = 0,3$ ) também não mostraram diferenças entre os grupos. Outras variáveis qualitativas, como país, tipo de estimulação, técnica utilizada e kit de citometria/ELISA, não puderam ser avaliadas devido ao tamanho insuficiente dos estudos entre os subgrupos ou não apresentaram alterações estatisticamente significativas na heterogeneidade. A análise de sensibilidade indicou que a remoção de qualquer dos estudos

com maior dispersão não levaria a uma redução significativa da heterogeneidade. Portanto, nenhum destes estudos se configura como um outlier.

A análise de meta-regressão multivariada também não pode ser realizada por conta do número de estudos ser de apenas 10. Apesar de não ter poder estatístico razoável e de ser suscetível a variáveis confundidoras, realizamos a análise univariada com a finalidade de obter indícios. A concentração do PBMC em células/mL ( $p = 0,54$ ), o tempo de cultura para mensurar o IFN- $\gamma$  ( $p = 0,29$ ) e a concentração do antígeno utilizado ( $p = 0,91$ ) não se mostraram significativos na determinação da síntese e do intervalo de predição (Figura 7). A avaliação visual das retas de regressão sugere a necessidade de estudos sobre a participação do tempo de cultura do PBMC com o antígeno na determinação da concentração do IFN- $\gamma$  (Figura 7B). A metarregressão unilinear também não indicou que estas variáveis contribuíram de forma significativa para a heterogeneidade ( $p = 0,42$ ;  $p = 0,3$  e  $p = 0,53$ ).

Figura 7 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IFN- $\gamma$  de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC (A) ( $n = 8$ ), o tempo de cultura (B) ( $n = 9$ ) e a concentração do antígeno da *L. braziliensis* (C) ( $n = 9$ ).



Fonte: elaborado pelo autor.

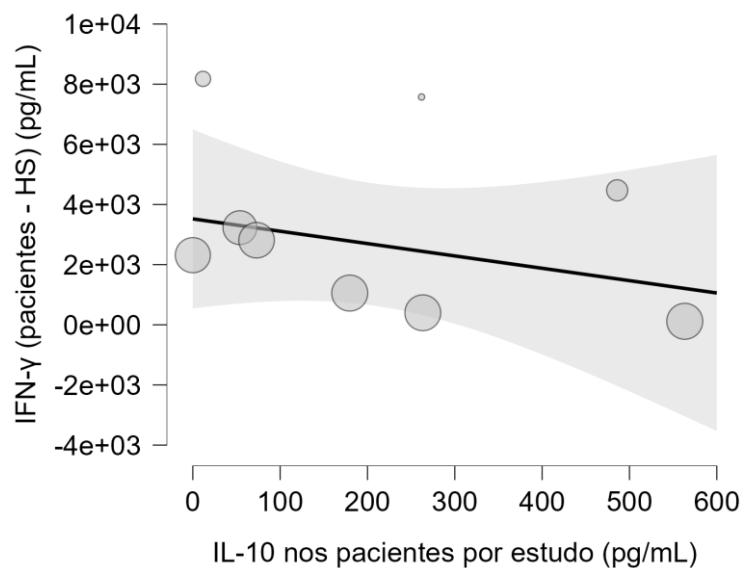
Legenda: Cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza corresponde ao intervalo de confiança da reta da metarregressão. “celml” = concentração de células/mL do PBMC, “tincifn” = tempo de cultura para a mensuração do TNF- $\alpha$ , “antugml” = concentração do antígeno da Lb em  $\mu\text{g/mL}$ .

Notas: Os coeficientes das retas de regressão não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ). Estas metarregressões têm menos de 10 estudos em cada uma; portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

Realizamos a metarregressão para avaliar a possível associação entre a IL-10 dos pacientes e a modulação da diferença do IFN- $\gamma$  entre eles e pessoas saudáveis (Gráfico 8). O modelo indicou um intercepto significativo (3521,61;  $n = 9$ ;  $p = 0,03$ ), o que significa que, caso a concentração de IL-10 fosse zero na reta de regressão, a diferença da concentração do IFN- $\gamma$  entre pacientes e pessoas saudáveis seria, em média, 3521,61  $\text{pg/mL}$ , valor maior do que o da síntese meta-analítica (2615,14  $\text{pg/mL}$ ). Esta diferença reforça os achados da literatura sobre a

função reguladora negativa da IL-10 sobre o IFN- $\gamma$  (da Silva et al., 2022; Novoa et al., 2011). Em resumo, o intercepto nesta metarregressão é a concentração adicional de IFN- $\gamma$  dos pacientes, não explicada pela concentração de IL-10. O coeficiente de inclinação para a IL-10 foi negativo, mas não foi significativo (-4,11; n = 9; p = 0,39). Esse coeficiente indica que, para cada unidade de aumento na média de IL-10 nos estudos, a síntese da meta-análise reduziria em 4,11 unidades, caso a associação fosse significativa. Esta metarregressão sugere apenas uma tendência inversa fraca entre a IL-10 e a concentração mais elevada de IFN- $\gamma$  entre os pacientes. Porém, há necessidade de mais estudos para obter um poder estatístico razoável.

Gráfico 8 - Metarregressão univariada entre a diferença das médias de IFN- $\gamma$  de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis (HS) e a concentração média de IL-10 entre os pacientes por estudo (n = 9).



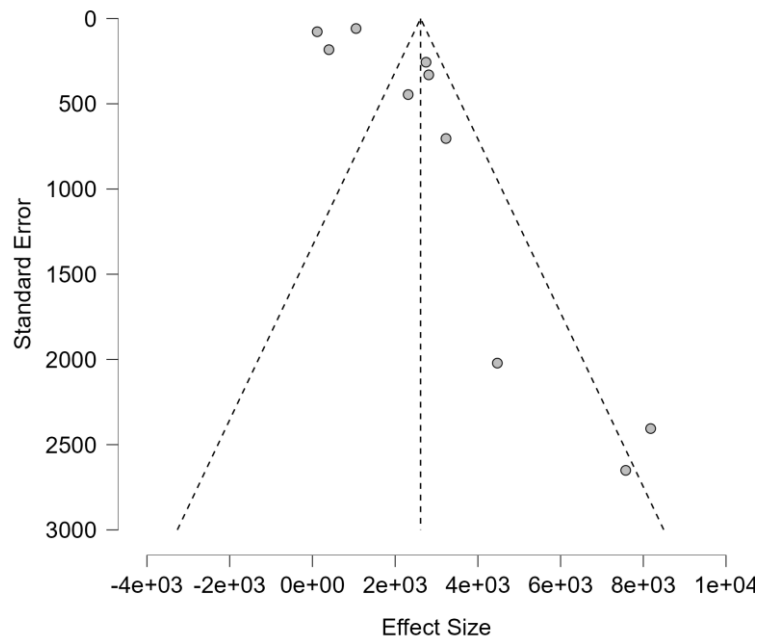
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza é o intervalo de confiança da reta da metarregressão.

Nota: Esta meta-regressão tem menos de 10 estudos; portanto, seu resultado carece de precisão estatística e deve ser visto apenas como um indício a ser revisado por futuros estudos.

O teste de Egger não identificou viés de publicação ( $p = 0,1$ ). A avaliação visual do funnel plot indicou uma tendência de assimetria, mas sem confirmação definitiva (Gráfico 9). Consideramos não ser necessário aplicar a técnica de “trim and fill”.

Gráfico 9 - Funnel plot para viés de publicação nos estudos sobre a concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do PBMC de pessoas com leishmaniose cutânea, após reestimulação com *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor.

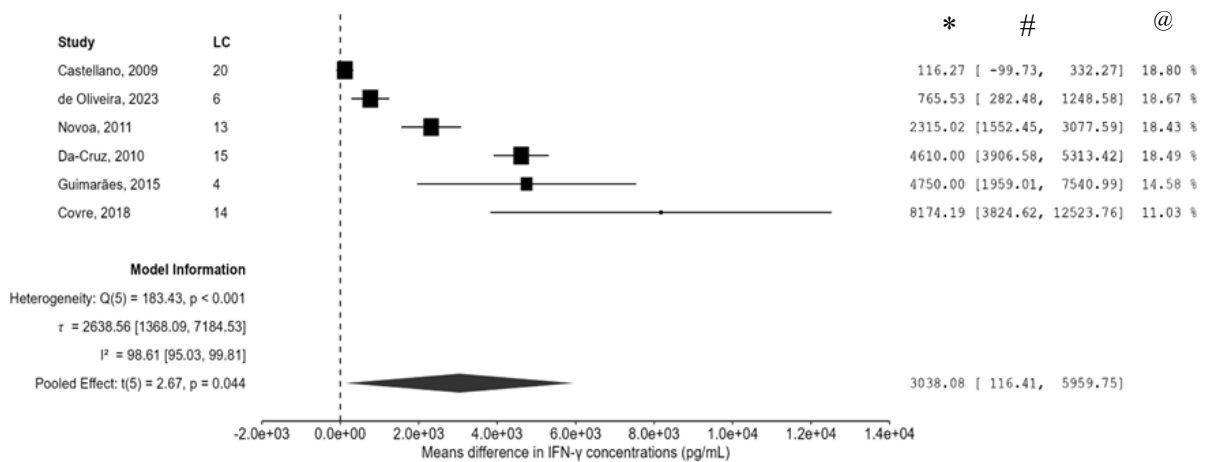
Legenda: Os círculos preenchidos representam os estudos (n = 10).

Notas: a área dentro do funil delimita os estudos que se enquadram na hipótese alternativa (H1) de que há viés de publicação.

Como não foi configurado viés de publicação e houve significância estatística nos resultados das concentrações, concluímos que o intervalo de predição representa a faixa de variação da diferença de concentração de IFN- $\gamma$  entre pacientes com LC-Lb e indivíduos saudáveis na população. A síntese estatística obtida pode ser aceita apenas como indício dos resultados dos estudos, devido à alta heterogeneidade.

#### 4.3.2 IFN em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*

Gráfico 10 – Meta-análise da diferença na concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do PBMC de pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos, I<sup>2</sup> = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Seis estudos incluídos na meta-análise forneceram dados sobre a concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de culturas de PBMC de pacientes com LC-Lb antes do tratamento (n = 72) em comparação com meios não estimulados (n = 72) (Gráfico 10). Todos demonstraram elevação pós-estimulação com o antígeno/parasito, exceto Castellano et al. (2009), cujo intervalo de confiança permitiu um resultado inverso. A meta-análise resultou em uma síntese estatisticamente significativa pelo modelo de efeitos aleatórios (diferença média = 3038,08 pg/mL; p = 0,044; IC 95% [116,41, 5959,75]), confirmando a ativação Th1 robusta específica à infecção (Gráfico 10). O intervalo de predição foi omitido devido à baixa precisão em meta-análises com menos de 10 estudos, conforme as diretrizes metodológicas. Não foi encontrada assimetria nas diferenças de média; o valor da assimetria (skewness) foi 0,56 (< 1,96).

A heterogeneidade foi confirmada (Q de Cochran p < 0,001), com inconsistência (I<sup>2</sup>) de 98,61%. A avaliação visual na figura XX indica que nem todos os intervalos de confiança das diferenças de média entre os estudos se sobrepõem com regularidade. Assim, o teste Q de Cochran, o valor de I<sup>2</sup> e a avaliação visual dos intervalos de confiança indicam alta heterogeneidade. A análise de sensibilidade apontou que todos os estudos contribuíram de forma semelhante para a heterogeneidade, de modo que remover algum deles, com resultados mais dispersos ou diferentes dos demais, não reduziria a heterogeneidade.

Os estudos apresentaram alto risco de viés no domínio “D1: coleta e manuseio de amostras”, o que impediu classificá-los em subgrupos. A análise de subgrupos para “D2:

métodos experimentais” não foi estatisticamente significativa para a diferença entre subgrupos ( $p = 0,51$ ), não reduziu a inconsistência, de forma a alterar a classificação da meta-análise como de alta heterogeneidade, e apresentou sínteses estatísticas não significativas ( $p > 0,05$ ). Para o “D3: relato de resultados”, não foi encontrada diferença entre os grupos ( $p = 0,16$ ). Outras variáveis qualitativas, como país, design do estudo, tipo de estimulação, técnica utilizada e kit de citometria/ELISA, não puderam ser avaliadas devido a apresentarem as mesmas classificações, não formando subgrupos, ou por não serem estatisticamente significativas. Estes resultados devem ser considerados apenas indícios, pois a análise de subgrupos com menos de 10 estudos por grupo apresenta baixo poder estatístico.

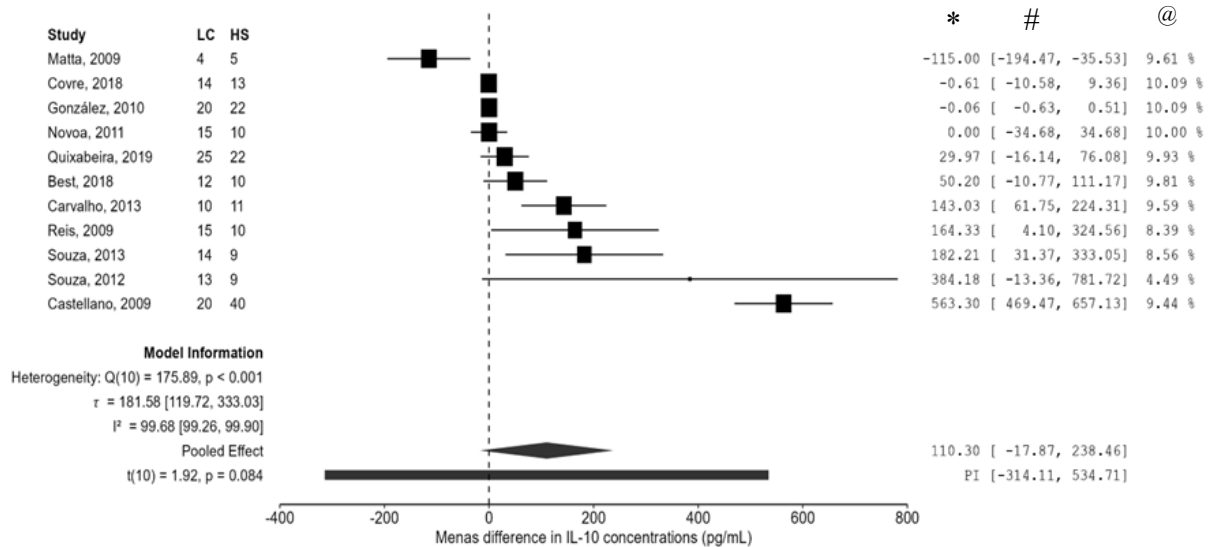
A análise de meta-regressão e o teste de Egger também não puderam ser realizados por conta do número de estudos ser inferior a 10. A observação visual do funnel plot não identificou assimetrias significativas, indicando a ausência de viés de publicação.

Considerando que a síntese estatística foi significativa, mas não foi possível lidar com a heterogeneidade, recomendamos que esta síntese não seja utilizada. Pode ser utilizada apenas como um valor a ser questionado em estudos futuros. Isso ocorreu principalmente devido ao número insuficiente de estudos disponíveis na literatura sobre o IFN- $\gamma$  em meios de cultura estimulados e não estimulados de pacientes com LC-Lb.

#### **4.4 IL-10**

##### ***4.4.1 IL-10 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis***

Gráfico 11 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-10 no sobrenadante de PBMC de pessoas com LC-Lb, antes do tratamento e após reestimulação, e de pessoas saudáveis.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística, ◆ = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

Os onze estudos selecionados revelam diferenças na direção do efeito da concentração de IL-10 entre pacientes com LC-Lb antes do tratamento ( $n = 162$ ) e sujeitos saudáveis ( $n = 161$ ), com variações na média da diferença de -115 a 563,3 pg/mL. Três estudos indicam ausência prática de diferença entre os grupos, enquanto sete apresentam intervalos de confiança que admitem concentrações mais elevadas de IL-10 em indivíduos saudáveis em comparação aos pacientes com LC-Lb. Tal variabilidade reflete a existência de diferentes polarizações imunes (Th1/Th2/Th17) observadas na LC-Lb, na qual a IL-10 atua como regulador negativo, suprimindo respostas pró-inflamatórias (Maspi et al., 2016). Não foi encontrada significância estatística na síntese estatística (110,3 pg/mL,  $p = 0,084$ ; intervalo de predição: -314,11 a 534,71 pg/mL) (Gráfico 11), o que indica que os grupos de pacientes e de pessoas saudáveis não diferem com frequência quanto à expressão da IL-10. Estudos confirmam IL-10 elevada em lesões ativas, suprimindo respostas leishmanicidas, mas ausente em infecções subclínicas ou resolvidas (da Silva et al., 2022; González et al., 2010), o que se alinha à ausência de diferença sistemática observada entre os estudos nesta meta-análise.

Com a LC causada por *L. major* e *L. tropica*, o resultado foi diferente. Alaa Hussein (2020) obteve resultados de IL-10 com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de aumento nos níveis

séricos dos pacientes quando comparados aos sujeitos saudáveis (226,90 pg/mL e 46,77 pg/mL, respectivamente).

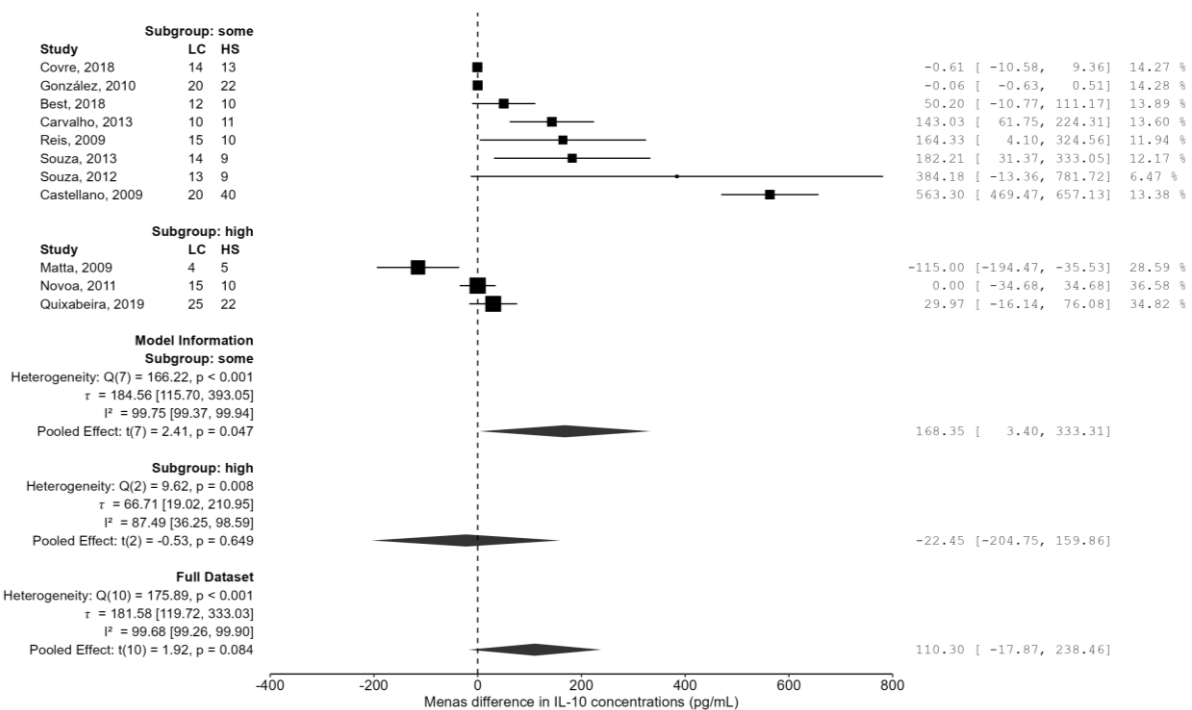
Foi identificada heterogeneidade ( $p < 0,001$ ) no teste Q de Cochran, com 99,68% de inconsistência. Este alto valor deve ter ocorrido por conta das diferenças entre os grupos nos estudos variarem significativamente, inclusive na direção do efeito. Isso pode ter ocorrido devido do perfil imune dominante na amostra selecionada para o estudo. Enquanto o estudo de (Matta et al., 2009) acabou utilizando pessoas saudáveis que apresentaram concentrações de IL-10 superiores aos pacientes, o estudo de (Castellano et al., 2009) fez o oposto. Estes e outros estudos, caso sejam avaliados isoladamente, não capturam o espectro completo das gradações clínicas da IL-10 na LC-Lb, o que cria o risco de interpretações limitadas a uma polaridade imune e justifica a relevância da análise integrativa da meta-análise. O intervalo de predição (-314,11 a 534,71 pg/mL) para a IL-10 abrange todo o espectro de formas clínicas na LC-Lb, superando as limitações amostrais de estudos individuais ao incorporar a variabilidade entre e dentro deles, permitindo previsões com maior poder explicativo para novas coortes.

A distribuição das médias entre os grupos não apresenta assimetria (skewness = 1,27). Assim, a transformação logarítmica para normalizar a distribuição não é necessária. A análise diagnóstica para avaliação do impacto individual dos estudos (utilizando as métricas: resíduo padronizado, DFFITS e Cook's distance) no resultado da meta-análise indica que o estudo "Castellano, 2009" foi relevante para a alta heterogeneidade. Caso este estudo fosse removido, teríamos uma redução da medida de dispersão ( $\tau$ ) de 181,58 pg/mL para 103,39 pg/mL e do teste Q de Cochran (para heterogeneidade) de 175,89 para 37,43. "Castellano, 2009" é o estudo com a maior diferença entre as médias (563,3 pg/mL). Por apresentar resultados extremos e por ser o que mais impacta a heterogeneidade, consideramos este estudo um outlier. Decidimos não o remover da análise para evitar o viés de seleção.

As análises de subgrupos para país, design metodológico do estudo, domínio de viés "D2: métodos experimentais", tipo de estimulação (antígeno x parasito) e técnica utilizada na medição da concentração (ELISA x citometria), entre outros, não se mostraram significativas ou possíveis. Devido ao baixo número de estudos ou à ausência de subgrupos. Os subgrupos criados com base nas entradas da variável de risco de viés "D3: relato de resultados" mostraram-se estatisticamente diferentes ( $p = 0,02$ ) (Gráfico 12). O subgrupo com "algum" risco de viés apresentou uma síntese estatisticamente significativa ( $p = 0,047$ ), indicando diferença expressiva entre pacientes e sujeitos saudáveis quanto à IL-10. Os estudos que apresentaram alto risco de viés no domínio "D3: relato de resultados" não mostraram diferenças significativas ( $p = 0,649$ ). Em ambos, a heterogeneidade continuou elevada. Como há menos de 10 estudos

por subgrupo, devemos ressaltar o baixo poder estatístico desses achados, que devem ser entendidos apenas como indícios.

Gráfico 12 - Análise de subgrupos, por risco de viés em “D3: relato de resultados”, da meta-análise da diferença na concentração de IL-10 entre os grupos de pessoas com LC-Lb antes do tratamento e os grupos de pessoas saudáveis.

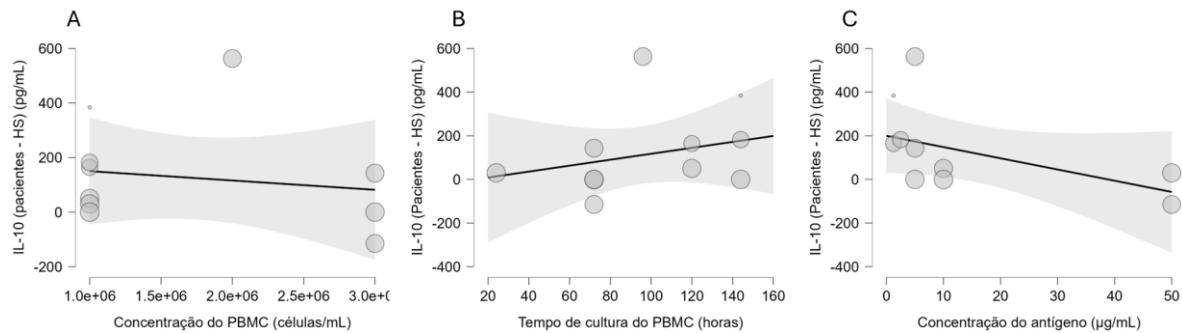


Fonte: elaborada pelo autor.

Notas: para cada estudo (Study) foram indicados o número de participantes com LC-Lb (LC) antes do tratamento, o número de participantes saudáveis (HS), a diferença da média entre os grupos, o intervalo de confiança e o peso do estudo na síntese estatística. As células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito de *L. braziliensis*.

As metarregressões univariadas para concentração celular do PBMC (coeficiente = 183,82; n = 10; p = 0,65), tempo de cultura do PBMC com o antígeno (coeficiente 1,37 ; n = 10; p = 0,41) e concentração do antígeno utilizado (coeficiente -5,14; n = 10; p = 0,13) não se mostraram significativas para uma associação com a diferença de médias da concentração da IL-10 entre pacientes e pessoas saudáveis (Gráfico 13). Contudo, a avaliação visual das retas de metarregressão sugere a necessidade de investigar a associação positiva entre o tempo de cultura do PBMC e uma maior concentração de IL-10 entre os pacientes (Gráfico 13B), bem como uma associação negativa entre a concentração do antígeno utilizado e uma regulação negativa da IL-10 entre os pacientes (Gráfico 13C). A metarregressão univariada para avaliar a associação destas variáveis com a heterogeneidade não foi estatisticamente significativa (p = 0,4, p = 0,92 e p = 0,96).

Gráfico 13 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IL-10 de pacientes (LC-Lb) e pessoas saudáveis e a concentração celular do PBMC (A) (n = 10), o tempo de cultura (B) (n = 10) e a concentração do antígeno da *L. braziliensis* (C) (n = 10).



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza é o intervalo de confiança da reta da meta-regressão.

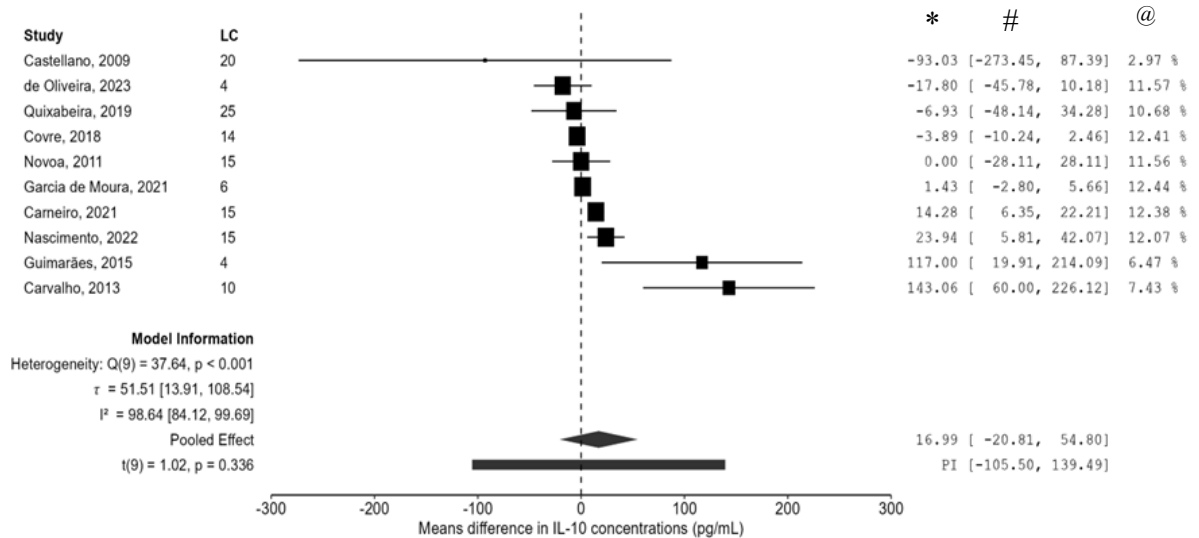
Notas: Antígeno da Lb em  $\mu\text{g/mL}$ . Os coeficientes das retas de meta-regressão não foram significativos ( $p > 0,05$ ).

O teste de Egger não indicou viés de publicação ( $p = 0,11$ ). A avaliação visual do funnel plot confirma esta afirmação.

A heterogeneidade foi alta. Por isso, não recomendamos a aceitação da síntese estatística, uma vez que os estudos são diferentes demais entre si para que se possa considerar uma síntese que os represente. Ela pode ser considerada apenas um indício para futuras investigações. Por outro lado, não foi identificado viés de publicação, o que indica uma boa diversidade de estudos que representam a literatura. Recomendamos o intervalo de predição desta meta-análise como uma boa representação do comportamento da IL-10 tanto na população de pacientes com LC-Lb quanto em pessoas saudáveis. Este intervalo de predição, com valores maiores e menores da IL-10 nos pacientes, é biologicamente coerente, pois isso pode ocorrer devido à diferença na polarização dos perfis Th1 e Th2.

#### 4.4.2 IL-10 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*

Gráfico 14 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-10 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas por *L. braziliensis* (n = 128) e não estimuladas (n = 128), obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística, ◆ = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos, I<sup>2</sup> = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Seis dos dez estudos apresentaram intervalos de confiança compatíveis com uma possível redução das concentrações de IL-10 após a reestimulação in vitro com antígenos da *Leishmania braziliensis*, mas todos relataram aumento dessa citocina sob a mesma condição experimental. A síntese estatística desses dez estudos resultou em uma diferença média de 16,99 pg/mL, sem significância estatística (p = 0,336), indicando que a síntese estatística não aponta para uma direção específica de alteração de IL-10 (Gráfico 14). A ausência de significância estatística nesta meta-análise não pode ser interpretada como ausência de resultado válido, pois evidencia a compatibilidade dos dados com diferentes cenários imunológicos da infecção, incluindo tanto aumento quanto redução de IL-10 em função do perfil imune dominante. O intervalo de predição da meta-análise abrange uma faixa mais inclusiva e, assim, mais representativa dos casos na população, variando de -105,50 a 139,49 pg/mL. Este intervalo de predição abrange diferentes concentrações de IL-10, o que representa diferentes cenários de polarização imune. Não foi encontrada assimetria na distribuição das diferenças entre os grupos (skewness = 0,68).

A heterogeneidade significativa (Q de Cochran, p < 0,001; I<sup>2</sup> = 98,64%) no forest plot (Gráfico 14) revela polarizações imunológicas variadas em pacientes com leishmaniose

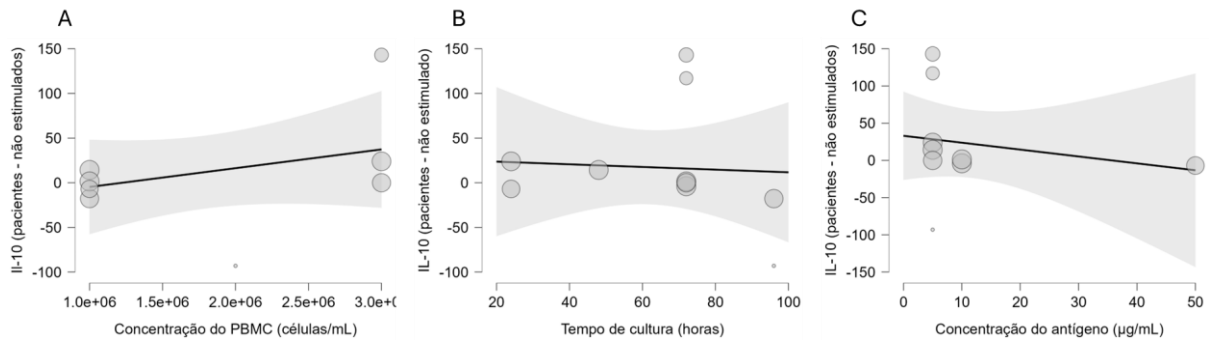
cutânea causada por *Leishmania braziliensis*, incluindo perfis mistos Th1/Th2/Th17 que refletem diferentes desfechos clínicos, cargas parasitárias e o recrutamento de Tregs. Essa inconsistência nos achados dos estudos não compromete a validade da meta-análise; pelo contrário, ela quantifica a diversidade biológica da resposta imune, na qual a IL-10 pode ser positivamente regulada ou não. A heterogeneidade alta ( $I^2 > 95\%$ ) nesta meta-análise indica que a variabilidade biológica na expressão de IL-10 entre a população acometida pela LC-Lb é estatisticamente significativa. Este achado supera as limitações de estudos isolados com amostras restritas a subgrupos (e.g., Th2 dominante em lesões crônicas vs. Th1 em precoces).

A análise de sensibilidade para avaliar a heterogeneidade identificou que o estudo de “Carvalho, 2013” foi significativamente responsável por ela, diferenciando-se dos demais. Sua remoção reduziria a medida de dispersão ( $\tau$ ) de 51,51 para 35,05 pg/mL. Isso ocorreu por apresentar resultados de concentração de IL-10 acima de todos os demais, com apenas 10 pessoas. O estudo “Carvalho, 2013” é um outlier. Assim como nas análises anteriores, não iremos remover este estudo da meta-análise.

O grupo de estudos que utilizou citometria, e não ELISA, não apresentou heterogeneidade ( $p = 0,172$ ). Com uma aceitável inconsistência moderada (47,41%). A síntese estatística dos estudos que utilizaram citometria ( $n = 2$ ,  $p = 0,835$ ) não foi significativa. Isso indica que os grupos dos 2 estudos que utilizaram citometria apresentam resultados semelhantes, o que não ocorreu nos estudos que utilizaram ELISA. Estes resultados não podem ser generalizados, pois baseiam-se em apenas dois estudos nesse cálculo. Servem apenas como sugestão para mais investigações.

Como temos 10 estudos disponíveis na literatura, foi possível realizar a regressão univariada. Para a análise multivariada, seria recomendável ter pelo menos 10 estudos para cada moderador. A concentração de células (células/mL) no PBMC (coeficiente  $2,1 \times 10^5$ ;  $n = 8$ ;  $p = 0,27$ ), tempo (horas) de cultura do PBMC (coeficiente -0,15;  $n = 9$ ;  $p = 0,85$ ) e a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do antígeno na cultura (coeficiente -0,93;  $n = 9$ ;  $p = 0,51$ ) não se mostraram associados a uma maior diferença entre as médias das amostras estimuladas e não estimuladas (Figura 8). Assim como ocorreu na meta-análise da IL-10 entre pacientes e pessoas saudáveis, a avaliação da reta de regressão para pacientes depois e antes da estimulação, sugere a necessidade de mais estudos para avaliar uma possível associação negativa entre a concentração do antígeno utilizado e a concentração de IL-10 no meio estimulado (Figura 8C). A análise de metarregressão univariada da heterogeneidade também mostrou que estes moderadores não estão associados a ela ( $p = 0,1$ ;  $p = 0,36$  e  $p = 0,1$ ).

Figura 8 - Meta-regressão univariada entre a diferença das médias de IL-10 de pacientes (LC-Lb) depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*, utilizando os moderadores: concentração celular do PBMC (A) (n = 8), tempo de cultura (B) (n = 9) e concentração do antígeno (C) (n = 9).



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: cada círculo representa um estudo. O tamanho do círculo indica o peso do estudo na síntese estatística da meta-análise. A área cinza é o intervalo de confiança da reta da metarregressão.

Notas: A concentração de IL-10 nos meios estimulados e não estimulados dos pacientes com LC-Lb está reportada em pg/mL. Os coeficientes das retas não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Estas meta-regressões têm menos de 10 estudos em cada uma; portanto, seus resultados carecem de precisão estatística e devem ser vistos apenas como indícios a serem revisados por futuros estudos.

O teste de Egger indicou que não há viés de publicação entre os estudos ( $p = 0,32$ ).

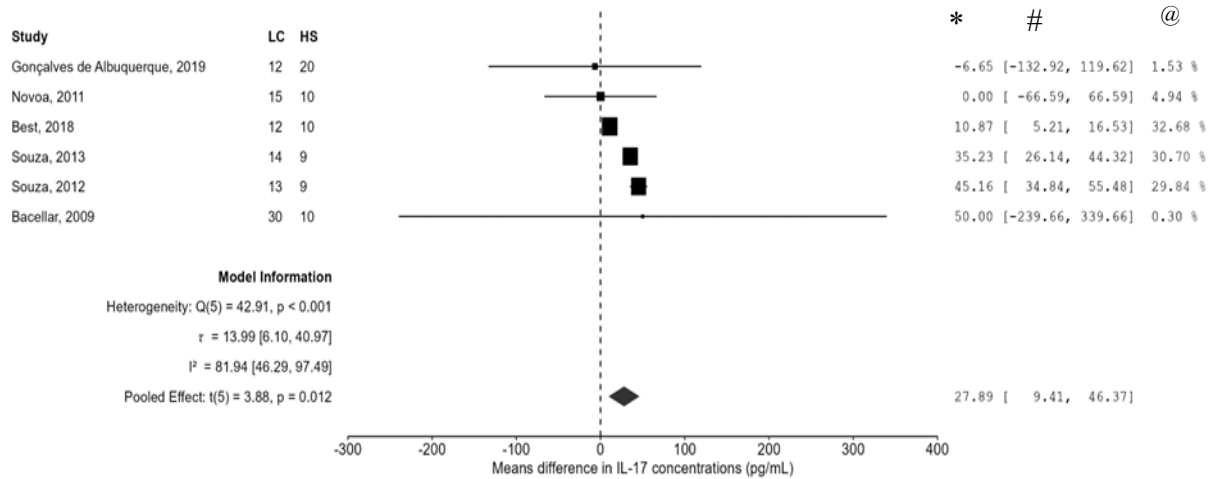
A avaliação visual do funnel plot indica que não há viés de publicação, com o mesmo número de estudos dentro e fora do funil para a hipótese alternativa (H1).

A heterogeneidade alta indica que não seria adequado sintetizar os achados dos estudos em uma síntese; por isso, não recomendamos o uso da síntese estatística. Servindo apenas como indício a ser investigado em estudos futuros. Recomendamos que o intervalo de predição seja adotado como indicativo da amplitude na expressão dos níveis de IL-10, admitindo valores tanto elevados quanto reduzidos em diferentes indivíduos infectados por *L. braziliensis*. O intervalo de predição não representa um valor único, mas sim uma faixa que contempla a variabilidade esperada dos níveis de IL-10 entre diferentes pacientes, permitindo maior aplicabilidade clínica e biológica dos resultados.

## 4.5 IL-17

### 4.5.1 IL-17 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis

Gráfico 15 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-17 no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com LC-Lb antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect),  $Q$  =  $Q$  de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

Seis estudos apresentaram dados sobre a concentração de IL-17 em pacientes ( $n = 96$ ) antes do tratamento e em pessoas saudáveis ( $n = 68$ ) (Gráfico 15). Em três deles, os intervalos de confiança (IC) indicaram a possibilidade da concentração de IL-17 ser menor no grupo de pacientes. Segundo Oliveira et al. (2014), o esperado seria um aumento de sua concentração entre os pacientes após a reestimulação com o antígeno/parasito de *L. braziliensis*. Mas a IL-10 e o TGF- $\beta$  podem regular negativamente a produção de IL-17, de modo que uma ativação do perfil Th2 poderia explicar essa queda. Possivelmente, nos estudos com menor concentração entre pacientes, vários deles estivessem com o perfil misto de resposta imune Th1/Th2 ativo, promovendo a regulação negativa da IL-17 (Oliveira et al., 2014). Nos outros três, os intervalos de confiança indicaram maior concentração de IL-17 nos pacientes antes do tratamento.

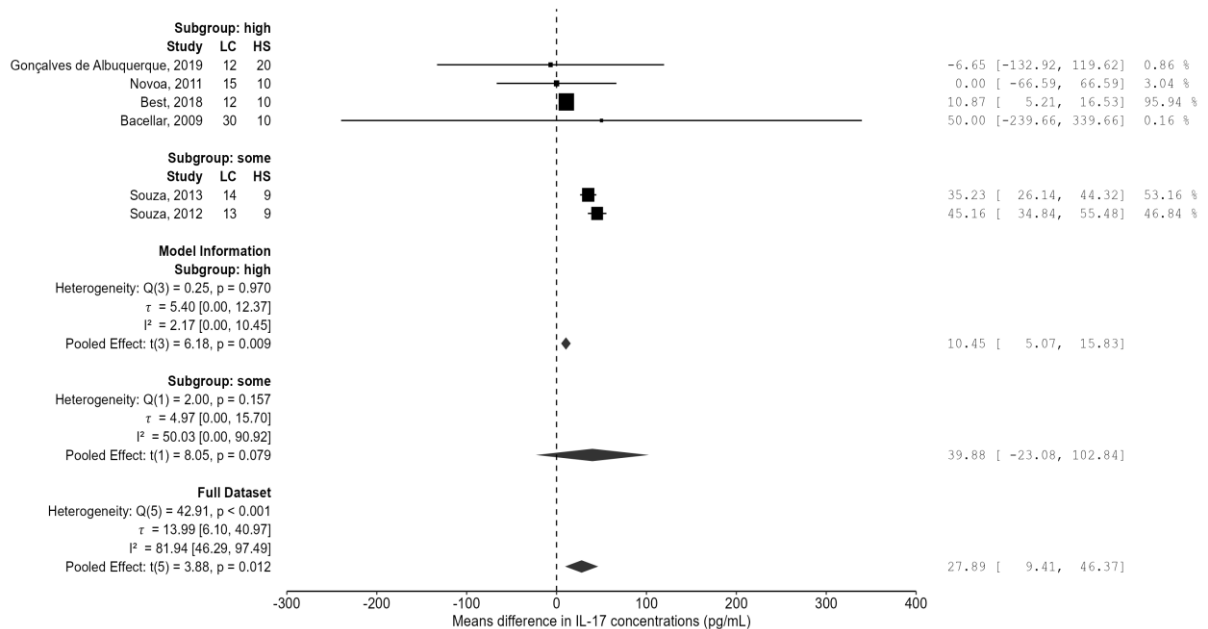
A síntese estatística da diferença de concentração de IL-17 entre os grupos foi significativa, com valor de 27,89 pg/mL ( $\tau = 13,99 \mu\text{g/mL}$ ,  $p = 0,012$ ) (Gráfico 15). Ou seja, rejeita-se a hipótese nula de que a diferença entre as concentrações seja zero. Este resultado é semelhante ao encontrado por Katara et al. (2013), que investigaram a concentração de IL-17 na LC causada por *L. tropica* e identificaram que a concentração média no soro foi significativamente superior nos controles ( $48,14 \pm 4,76 \text{ pg/mL}$ ) em comparação com a

observada em sujeitos saudáveis ( $5,69 \pm 1,32$  pg/mL). (de Mesquita et al., 2022) relataram que a concentração de IL-17 no soro de pacientes com leishmaniose cutânea por *L. guyanensis* é significativamente maior do que a observada em controles. Assim, a concentração elevada de IL-17 é um indício de infecção por *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. guyanensis*.

Não foi possível considerar apropriado apresentar o intervalo de predição nem realizar a metarregressão, pois o número de estudos foi inferior a 10. Não foi encontrada assimetria nas diferenças de média; o valor da assimetria (skewness) foi de -0,06.

A heterogeneidade foi confirmada ( $p < 0,001$ ), com inconsistência ( $I^2$ ) alta de 81,94%. A IL-17 é produzida pelos linfócitos Th17 e atua para intensificar a inflamação após a infecção. Dependendo do grau de polarização da resposta imune entre os perfis Th1 e Th2 em cada grupo, é naturalmente possível obter resultados tão díspares. A avaliação do impacto individual dos estudos sobre o resultado da heterogeneidade da meta-análise indica que os estudos “Best, 2018” e “Souza, 2012” tiveram um alto impacto na heterogeneidade elevada. Caso cada um destes estudos fosse removido, teríamos uma redução da medida de dispersão ( $\tau$ ) de 13,99 pg/mL para 13,13 pg/mL e 11,24 pg/mL, respectivamente. Observando o forest plot (Gráfico 15) e os ICs, não é possível afirmar que estes dois estudos sejam outliers, pois não apresentam resultados extremos em relação aos demais. O estudo “Best, 2018” foi o que mais influenciou a heterogeneidade entre os dois. Sua remoção reduziria a inconsistência de alta para moderada (64,58%) e tornaria a síntese estatística significativa, com valor de 36,49 pg/mL (IC 95% [18,75, 54,22]) ( $p = 0,005$ ). Decidimos não remover nenhum dos dois estudos para evitar o viés de seleção e preservar o poder estatístico da meta-análise.

Gráfico 16 - Análise de subgrupos para o risco de viés no “D2: métodos experimentais” da meta-análise da diferença na concentração de IL-17 no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com LC-Lb e de amostras de pessoas saudáveis.

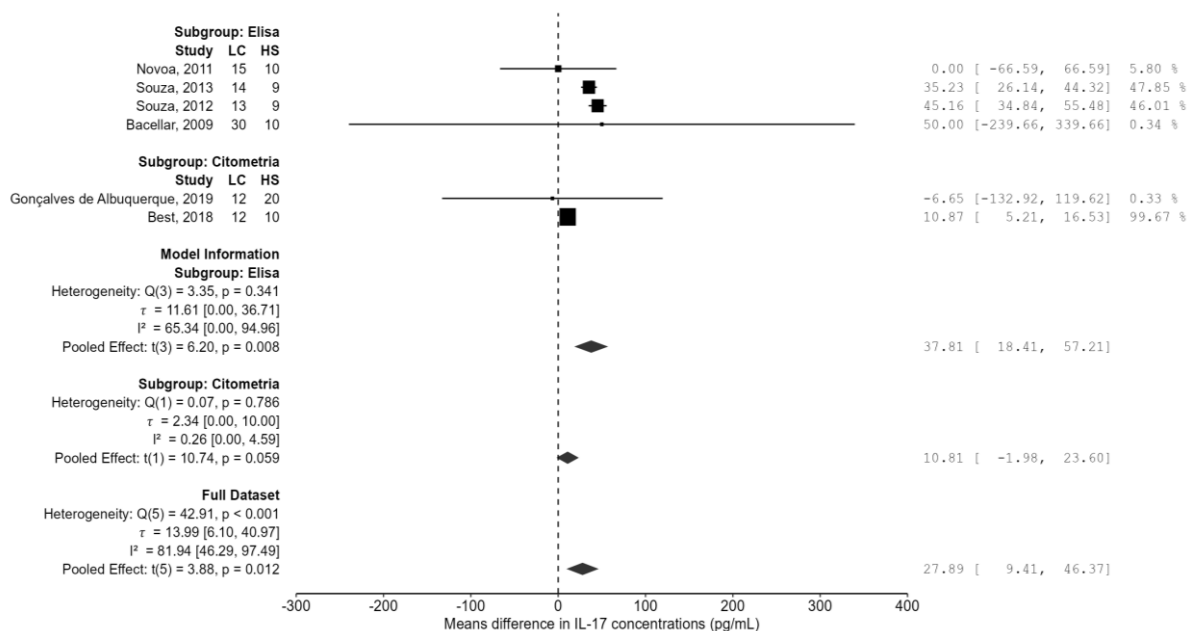


Fonte: elaborada pelo autor.

Notas: para cada estudo (Study) foram indicados o número de participantes no grupo de pacientes antes do tratamento (LC bf treat), o número de participantes no grupo de sujeitos saudáveis (HS), a diferença da média entre os grupos (pg/mL), o intervalo de confiança e o peso do estudo no cálculo da síntese estatística. As células das amostras de pessoas saudáveis não foram estimuladas com o antígeno/parasito da *L. braziliensis*, as dos pacientes antes do tratamento foram.

A análise de subgrupos do domínio “D2: métodos experimentais” mostrou que a separação por grau de risco (Gráfico 16) resultou em menor heterogeneidade entre os estudos de cada subgrupo. O mesmo ocorreu no domínio “D3: relato de resultados” do subgrupo com “alto” risco de viés. O baixo poder estatístico, devido do número de estudos ser inferior a 10, é uma limitação importante deste achado, especialmente por haver agrupamentos com apenas dois estudos. De modo que estes resultados devem ser entendidos apenas como indícios de que os estudos apresentam resultados semelhantes quando possuem viés semelhante. As outras variáveis para a análise de subgrupos não tiveram estudos suficientes em classificações distintas para formar subgrupos, ou não deram resultados significativos.

Gráfico 17 - Análise de subgrupos por técnica utilizada para mensurar a concentração de citocinas, na meta-análise da diferença na concentração de IL-17 entre amostras do PBMC obtidas de pessoas com LC-Lb e de pessoas saudáveis.



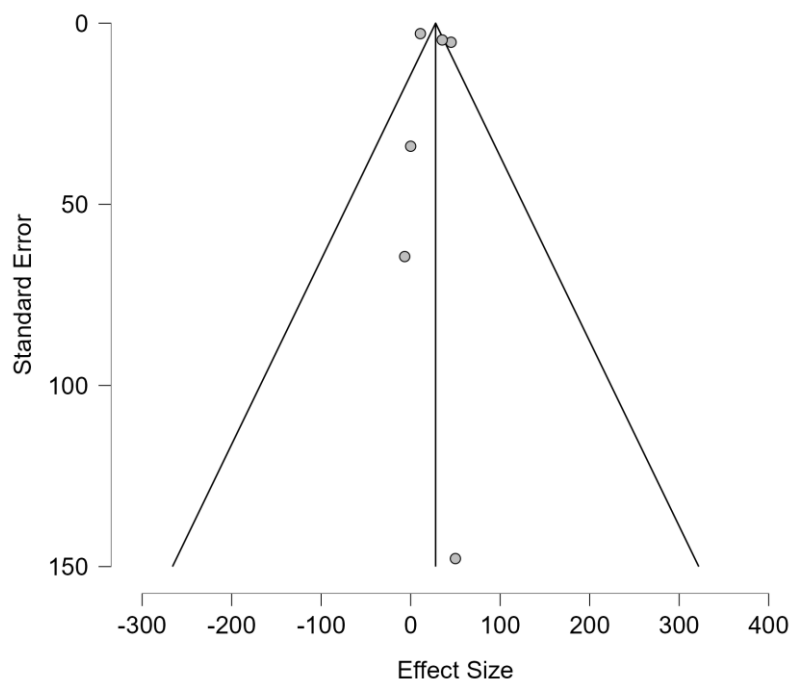
Fonte: elaborada pelo autor.

Notas: Para cada estudo (Study) foram indicados o número de participantes no grupo de pacientes antes do tratamento (LC bf treat), o número de participantes no grupo de sujeitos saudáveis (HS), a diferença da média entre os grupos (pg/mL), o intervalo de confiança e o peso do estudo no cálculo da síntese estatística. As células das amostras de pessoas saudáveis não foram estimuladas com o antígeno/parasito da *L. braziliensis*, as dos pacientes antes do tratamento foram.

A análise de subgrupos, diferenciando os estudos que usaram ELISA dos que utilizaram citometria de fluxo, mostrou-se relevante ( $p < 0,01$ ). A separação em dois subgrupos tornou ambos menos heterogêneos e mais consistentes (Gráfico 17). Com sínteses estatísticas e intervalos de confiança distintos. Os estudos que usaram citometria apresentaram inconsistência quase nula (0,26%) e os que usaram ELISA, inconsistência moderada (65,34%). Este resultado é um indício, com baixo poder estatístico, de que a escolha da técnica de mensuração da IL-17 influencia o resultado de um estudo. A citometria de fluxo, neste achado, mostrou-se uma técnica mais precisa e consistente para quantificar a IL-17. Este achado tem limitações, pois os estudos são poucos e, por isso, não foi possível analisar mais subgrupos nem realizar a metarregressão, permanecendo a possibilidade de que outras variáveis de risco ou dos protocolos de pesquisa sejam significativas para determinar a dinâmica da IL-17 na LC-Lb.

O teste de Egger não indicou viés de publicação ( $p = 0,71$ ). O baixo número de estudos torna este resultado pouco confiável. A avaliação visual do funnel plot (Gráfico 18) indica que não há assimetria, pois os estudos estão tanto no interior quanto no exterior do funnel plot, ao longo da linha central do síntese estatística.

Gráfico 18 - Gráfico de funil para avaliar o viés de publicação entre estudos sobre IL-17 em casos de LC-Lb entre pacientes e pessoas saudáveis.

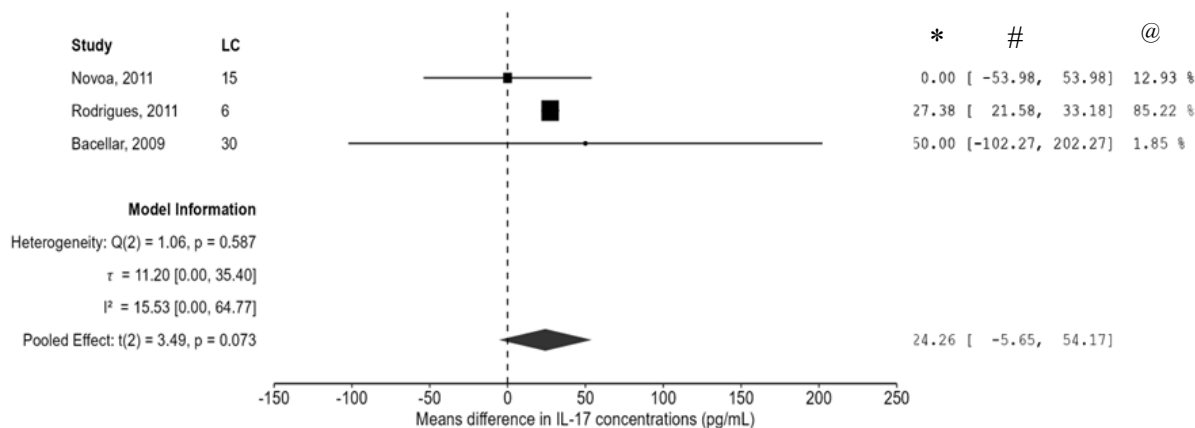


Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar da síntese estatística ser significativa, observou-se alta heterogeneidade entre os estudos incluídos, de modo que são tão diferentes entre si que não podemos representá-los por uma síntese. A heterogeneidade foi explicada pelos vieses experimentais e pelo tipo de técnica empregada para avaliar a concentração de IL-17. Portanto, não recomendamos o uso da síntese estatística desta meta-análise como representativa da IL-17 na resposta imunológica associada à LC-Lb. Recomendamos o uso como índice da síntese estatística dos resultados obtidos em estudos que utilizaram a citometria de fluxo. Mas destaca-se a necessidade de estudos experimentais adicionais para alcançar um poder estatístico confiável.

#### 4.5.2 *IL-17 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis**

Gráfico 19 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-17 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas por *L. braziliensis* (n = 51) e não estimuladas (n = 51), obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect),  $Q$  =  $Q$  de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Os intervalos de confiança dos três estudos permitiram considerar tanto um aumento quanto uma redução da IL-17 após a estimulação com o antígeno da *L. braziliensis* (Gráfico 19). Ou mesmo não ocorrer qualquer alteração na concentração desta citocina após a estimulação. A síntese estatística de 24,26 pg/mL (IC 95%: [-5,65, 54,17]) não foi significativa ( $p = 0,073$ ), indicando que não há diferença entre os meios estimulados e não estimulados com a *L. braziliensis*. Não apresentamos o intervalo de predição, a metarregressão, a análise de subgrupos, a análise de sensibilidade, a avaliação visual do funnel plot e o teste de Egger para viés de publicação, devido ao número de estudos ser de apenas três. A distribuição da diferença de médias não apresentou assimetria (skewness = -0,28). A heterogeneidade entre os estudos foi descartada pelo teste  $Q$  de Cochran ( $p = 0,587$ ). A inconsistência foi baixa ( $I^2 = 15,53\%$ ). A avaliação da síntese estatística, em conjunto com a heterogeneidade, indica que não há diferença detectável entre os grupos estimulados e não estimulados. Mas o baixo poder estatístico, com apenas três estudos, impede conclusões definitivas quanto à ausência de efeito após a estimulação.

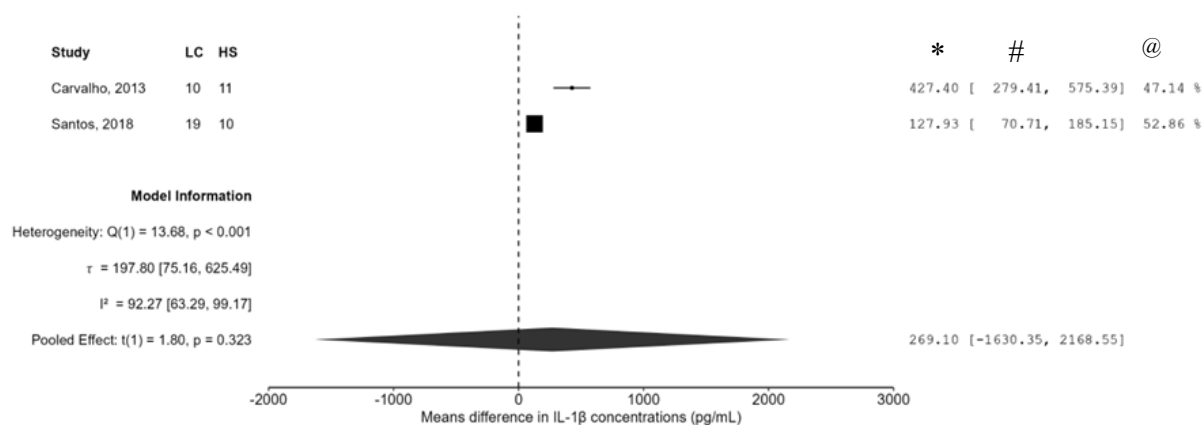
A baixa heterogeneidade permite que a síntese estatística encontrada seja considerada relevante para representar, com cautela, as formas pelas quais a IL-17 pode se apresentar após a estimulação com *L. braziliensis*. A falta de significância estatística não torna este resultado inválido; um  $p$ -valor maior que 0,05 indica que não há diferenças significativas

entre os grupos após a estimulação. A limitação deste achado é o baixo número de estudos disponíveis.

## 4.6 IL-1 $\beta$

### 4.6.1 IL-1 $\beta$ entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis

Gráfico 20 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com LC-Lb antes do tratamento (n = 39) e de pessoas saudáveis (n = 21).



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau^2$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

A direção do efeito, observada em ambos os estudos, indicou que a IL-1 $\beta$  é maior no grupo de pacientes com LC-Lb. Sugerindo que a concentração de IL-1 $\beta$  aumenta após a infecção. A síntese estatística não foi significativa ( $p = 0,323$ ), com uma diferença maior (269,1 pg/mL) na concentração de IL-1 $\beta$  entre os pacientes (Gráfico 20). O baixo número de estudos indica que o p-valor tem baixo poder explicativo, de modo que há apenas concordância na direção do efeito pró-inflamatório entre os estudos, o que deve ser considerado. Esta direção do efeito em relação à IL-1 $\beta$  também foi observada no soro de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. guyanensis* (LC-Lg) (de Mesquita et al., 2022). Sugerindo que o aumento da produção de IL-1 $\beta$  é uma consequência comum a ambos os tipos de *Leishmania*.

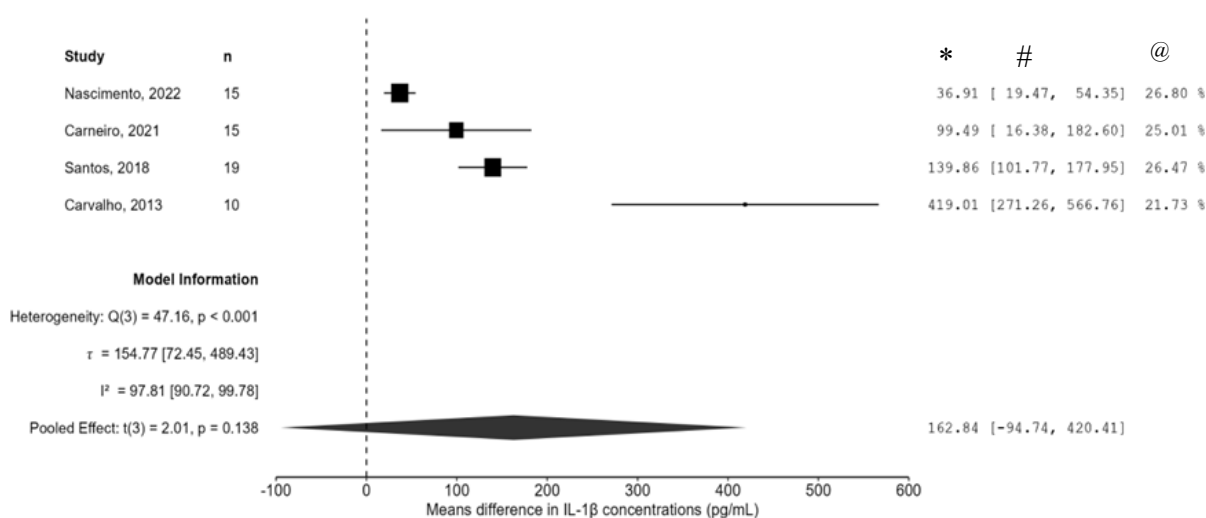
Por se tratar de apenas dois estudos, não apresentamos o intervalo de predição e não foi possível realizar a análise de subgrupos, a metarregressão nem verificar a existência de

assimetria nas diferenças de média. O teste de Q de Cochran confirma a heterogeneidade entre os estudos ( $p < 0,001$ ). A inconsistência entre eles foi de 92,27%. Indicando que ambos apresentam resultados distintos. A avaliação de viés de publicação também não foi conclusiva. Com apenas dois estudos, não foi possível aplicar o teste de Egger. A avaliação visual com o funnel plot não é confiável neste caso.

Concluimos que a síntese estatística apresentada não é confiável e não deve ser utilizada. Fica caracterizada a necessidade de mais estudos para que seja possível avaliar, com segurança estatística, a participação da IL-1 $\beta$  na imunopatogênese da LC-Lb. Podemos afirmar que, até o momento, os dois estudos com estes grupos indicam que a concentração de IL-1 $\beta$  é maior entre os pacientes, embora sem segurança estatística.

#### 4.6.2 IL-1 $\beta$ em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*

Gráfico 21 - Meta-análise da diferença na concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas por *L. braziliensis* e não estimuladas, obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau^2$  = variabilidade entre os estudos, I<sup>2</sup> = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Os quatro estudos apontaram que, após a estimulação com o antígeno/parasito de *L. braziliensis*, observa-se aumento na concentração de IL-1 $\beta$  (Gráfico 21). O aumento reportado variou de 36,91 pg/mL a 419,01 pg/mL, o que indica uma discrepância de mais de 10 vezes entre os estudos. A síntese estatística da diferença entre as concentrações não foi

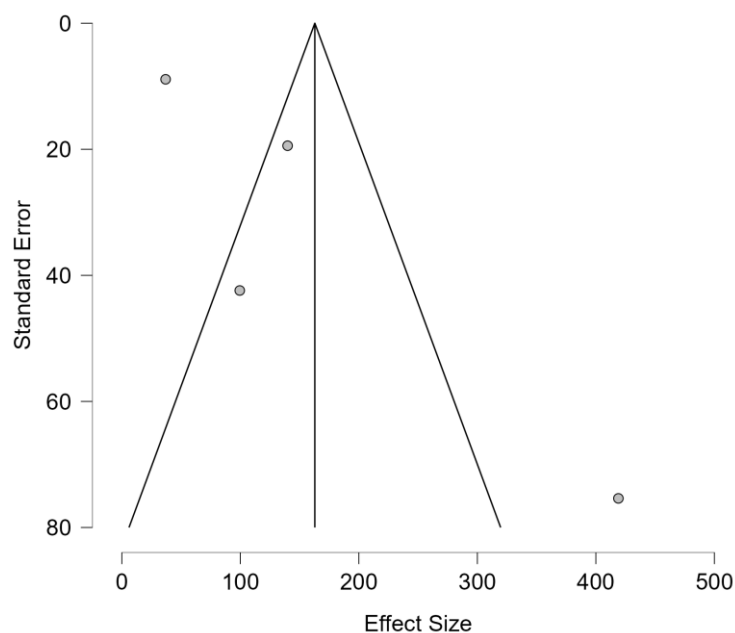
significativa (162,84 pg/mL,  $p = 0,138$ ). O intervalo de confiança incluiu a possibilidade de a concentração de IL-1 $\beta$  diminuir após a estimulação da amostra, o que poderia ocorrer caso houvesse uma regulação negativa por outras citocinas. Mas não acreditamos que seja o caso aqui, pois, nos estudos individuais, observamos apenas aumentos. Portanto, este intervalo de confiança com valores negativos provavelmente resulta do pequeno número de estudos, das amostras pequenas e da alta heterogeneidade. O teste Q de Cochran ( $p < 0,001$ ) e a inconsistência de 97,81% indicam alta heterogeneidade. O que não pode ser visto como necessariamente um problema, pois diferenças na concentração da IL-1 $\beta$  podem ocorrer naturalmente, a depender do perfil da resposta imune dominante. Não houve assimetria nas diferenças de média (skewness = 1,62). Por serem menos de 10 estudos, não apresentamos o intervalo de predição nem a metarregressão.

A heterogeneidade observada foi significativa ( $p < 0,001$ ). A inconsistência foi alta (97,81%). Não foi possível realizar a análise de subgrupos, pois vários dos subgrupos a serem avaliados tinham apenas um estudo (o mínimo é de dois) ou a variável não apresentou subgrupos. O estudo que mais influenciou este resultado foi “Carvalho, 2013”. A avaliação visual do forest plot (Gráfico 21) evidencia sua discrepância em relação aos demais, com um intervalo de confiança que inicia bem depois do ponto em que terminam os dos demais estudos. Isso permite que o consideremos um estudo outlier. Caso fosse removido, o valor de  $\tau$  (medida semelhante ao desvio padrão) cairia de 154,77 pg/mL para 48,93 pg/mL. Contudo, a heterogeneidade permaneceria elevada e a síntese estatística não seria estatisticamente significativa. Com isso, não traria benefícios ao remover o estudo “Carvalho, 2013” e aumentaria o risco de viés de seleção.

Não foi possível realizar a análise de subgrupos; as variáveis não tinham estudos suficientes nas categorias para formar subgrupos. Por não ser possível aplicar alguma estratégia para lidar com a heterogeneidade e as incertezas decorrentes do baixo número de estudos, avaliamos que a síntese estatística obtida não deve ser considerada válida.

O teste de Egger indica que não se pode afirmar a presença de viés de publicação nos quatro estudos incluídos nesta meta-análise ( $p = 0,16$ ). Mas é importante ressaltar que, com menos de 10 estudos, o teste de Egger não apresenta precisão. Tanto que na avaliação visual do funnel plot (Gráfico 22), é nítida a maior concentração de estudos à esquerda da síntese estatística. O que provavelmente ocorreu por conta do estudo “Carvalho, 2013”, representado pelo círculo mais à direita.

Gráfico 22 - Gráfico de funil para avaliar o viés de publicação entre os estudos sobre IL-1 $\beta$  em amostras estimuladas e não estimuladas de pacientes com LC-Lb.



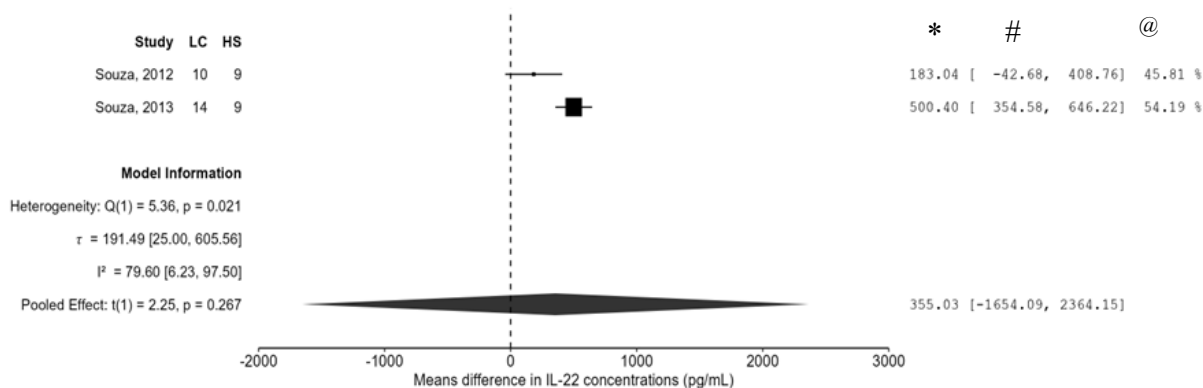
Fonte: elaborado pelo autor.

Os intervalos de confiança dos quatro estudos identificados apontam aumento da IL-1 $\beta$  após estimulação com o antígeno/parasito da Lb, mas o baixo número de participantes e de estudos levou a uma síntese estatística de baixo poder estatístico e a intervalos de confiança que admitem resultados muito diferentes dos estudos originais. Não ocorreram condições ou resultados que pudessem apontar variáveis formadoras de subgrupos como responsáveis por aumentar ou diminuir as discrepâncias entre os estudos. Concluimos que apenas a direção do efeito apontada pelos quatro estudos pode ser utilizada como indício da forma como a concentração de IL-1 $\beta$  se apresenta nas amostras de pacientes ao serem estimuladas.

## 4.7 IL-22

### 4.7.1 IL-22 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis

Gráfico 23 – Meta-análise da diferença na concentração de IL-22 no sobrenadante do PBMC de amostras obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea (causada por *L. braziliensis*) antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis.



Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística, ◆ = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade), τ = variabilidade entre os estudos, I<sup>2</sup> = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

Dois estudos foram identificados na literatura para avaliar a IL-22 em pacientes com LC-Lb e em pessoas saudáveis. As médias das diferenças entre os dois estudos indicam um aumento da concentração de IL-22 entre os pacientes, mas o intervalo de confiança do estudo “Souza, 2012” admite valores mais elevados entre as pessoas saudáveis. A síntese estatística (355,03 pg/mL) revela um aumento nos níveis de IL-22 entre os pacientes, enquanto o intervalo de confiança sugere que valores mais elevados também podem ser observados em indivíduos saudáveis (Gráfico 23). O p-valor da síntese estatística (p = 0,267) indica que não há diferença significativa entre a IL-22 de pacientes e pessoas saudáveis. O teste Q de Cochran indica heterogeneidade (p = 0,021) e uma inconsistência alta de 79,6%.

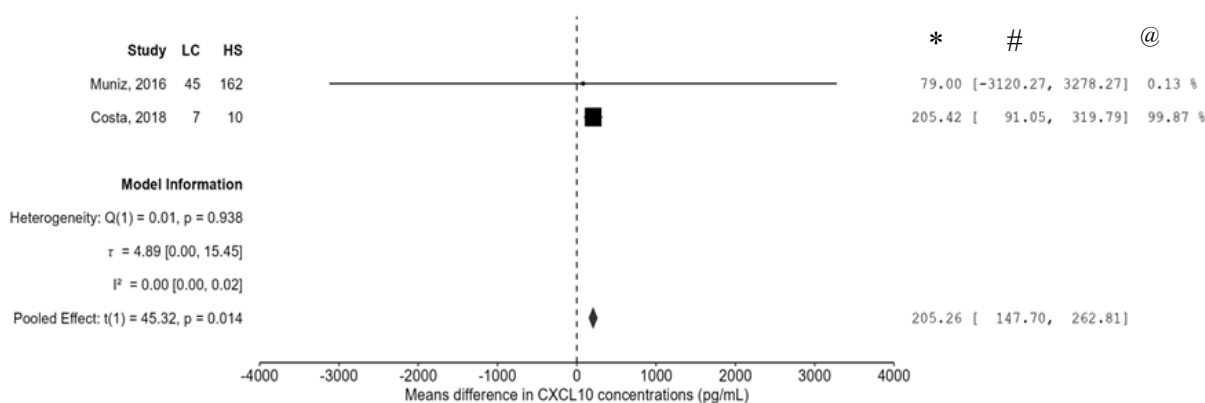
Não apresentamos o intervalo de predição, a metarregressão, a análise de subgrupos, a análise de sensibilidade, a avaliação visual do funnel plot e o teste de Egger para viés de publicação, devido ao número de estudos ser de apenas dois.

Uma vez que a heterogeneidade alta dificulta a representatividade da síntese estatística, recomendamos que o resultado desta meta-análise não seja utilizado. Reportamos, ainda, que os estudos existentes apresentam achados distintos, de modo que não é possível estabelecer um modelo unificado para o que ocorre com a IL-22. Qualquer tentativa de apresentar uma teoria geral sobre esta citocina na LC-Lb está sendo precipitada.

## 4.8 CXCL10

### 4.8.1 CXCL10 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis

Gráfico 24 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL10 no sobrenadante de PBMC de pessoas com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

Os dois estudos apontaram que os pacientes com LC, após a estimulação com *L. braziliensis*, apresentam concentração maior de CXCL10 do que os sujeitos saudáveis. “Muniz, 2016” apresentou um intervalo de confiança divergente, pois considerou possível que o grupo de sujeitos saudáveis (n = 172) apresentasse concentração de CXCL10 superior à observada em pacientes com LC-Lb (n = 52) (Gráfico 24). A literatura aponta que pessoas com infecções assintomáticas podem apresentar níveis mais elevados de CXCL10 do que pessoas com LC-Lb, mas isso depende de circunstâncias específicas e evidencia uma falha na estratégia de seleção dos participantes nas pesquisas.

A síntese estatística (205,26 pg/mL) foi significativa (p = 0,014). Com isso, podemos rejeitar a hipótese nula de que não há diferença na concentração de CXCL10 entre os grupos. Mas este resultado tem baixo poder estatístico. O intervalo de confiança da síntese estatística não admitiu valores negativos, o que nos leva a considerar que este resultado pode estar distorcido devido à forma como a meta-análise de efeitos aleatórios calcula a síntese.

Observando o forest plot (Gráfico 24), vemos que o estudo “Muniz, 2016” contribuiu apenas com 0,10% do resultado da síntese, devido do seu intervalo de confiança ser muito amplo.

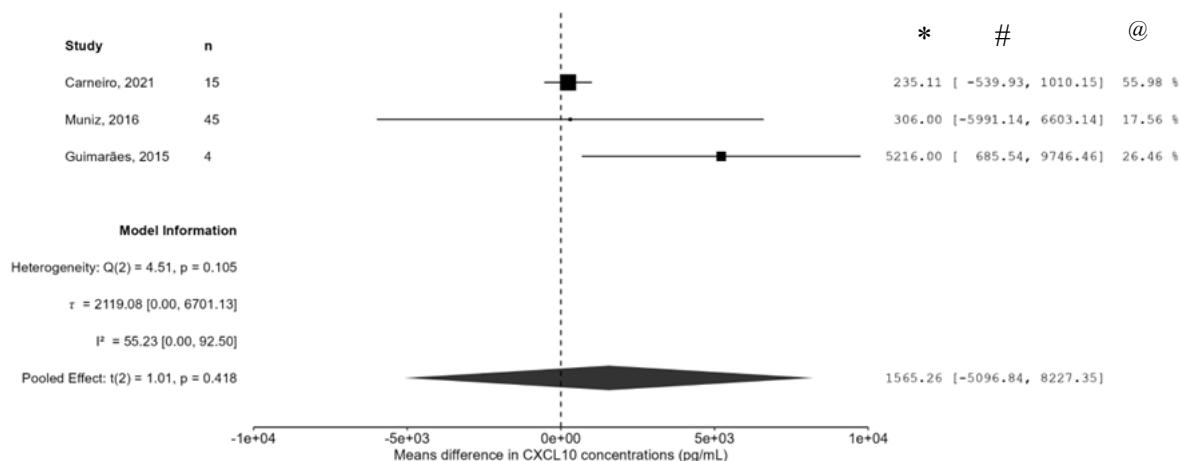
Vargas-Inchaustegui et al. (2010) mostraram que a infecção por *L. braziliensis* induziu, de forma seletiva, a transcrição de CXCL10. Ademais, demonstrou-se que, no âmbito das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), os parasitos infectaram preferencialmente os monócitos, regulando positivamente a produção de CXCL10. Isso está de acordo com o resultado de “Costa, 2018”, mas diverge do que foi relatado por “Muniz, 2016”. Com o surgimento de mais estudos, é possível avaliar se o estudo “Muniz, 2016” é um *outlier* ou não, uma vez que seus resultados divergem do que é descrito na literatura sobre a concentração de CXCL10 entre pacientes, além de apresentar resultados extremos tanto em pacientes quanto em pessoas saudáveis, sem distinção.

A heterogeneidade entre os estudos não foi significativa ( $p < 0,938$ ) e a inconsistência foi nula (0%). Os dois estudos têm seus intervalos de confiança em sobreposição, por isso, a heterogeneidade foi baixa. Por conta do número reduzido de estudos, não foi possível calcular o intervalo de predição, realizar metarregressão, aplicar o teste de Egger e análise de subgrupos. A análise visual do funnel plot também não é recomendada em estudos com poucos participantes.

A ausência de heterogeneidade permite o uso da síntese estatística, que indica um aumento da concentração de CXCL10. Mas, como um dos estudos apresentou um intervalo de confiança muito disperso, sua participação foi quase nula. Recomendamos que a síntese desta meta-análise não seja utilizada. A diferença entre os dados experimentais dos estudos disponíveis indica que, até o momento, não é possível elaborar uma teoria concisa sobre as concentrações de CXCL10 entre pacientes com LC-Lb e pessoas saudáveis.

#### **4.8.2 CXCL10 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis***

Gráfico 25 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL10 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas (n = 64) e não estimuladas (n = 64) por *L. braziliensis*, obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística,  $\blacklozenge$  = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Os três estudos apresentaram diferenças entre as médias, indicando um aumento da concentração de CXCL10 após a estimulação com o antígeno/parasito da *L. braziliensis* (Gráfico 25). Mas em dois deles o intervalo de confiança incluiu valores negativos, indicando a possibilidade de redução da CXCL10 nestas amostras após a estimulação. O que é biologicamente possível caso ocorra regulação negativa, como comentado anteriormente. A síntese estatística foi de 1565,26 pg/mL ( $\tau = 2119,08$ ), mas não foi significativa ( $p = 0,418$ ). Não podemos descartar a hipótese nula de que não há diferenças significativas na concentração da CXCL10 após a estimulação com *L. braziliensis*. A assimetria da distribuição foi de 1,73, o que é aceitável ( $< 1,96$ ), não sendo necessário transformar os dados para uma distribuição simétrica. Devido ao baixo número de estudos, não apresentamos o intervalo de predição, também não realizamos a metarregressão e a análise de subgrupos. O teste de Q de Cochran não indicou heterogeneidade entre os estudos ( $p = 0,105$ ). A inconsistência foi moderada (55,23%). O teste de Egger para identificar viés de publicação indicou a ausência deste viés ( $p = 0,52$ ).

O fato desta meta-análise não apresentar significância estatística ( $p < 0,05$ ) não implica que os resultados careçam de relevância biológica (Altman & Bland, 1995). A heterogeneidade moderada observada nos dados e ausência de viés de publicação sugerem que

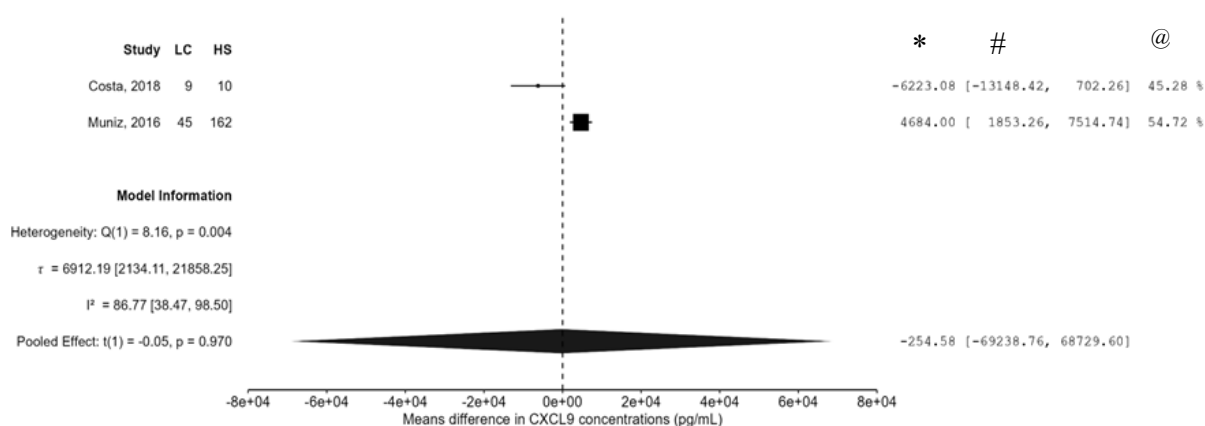
é plausível considerar os resultados para discutir a regulação da CXCL10. Esse achado corrobora evidências prévias na literatura, que apontam para um aumento geral da concentração de CXCL10 durante a infecção por *Leishmania braziliensis*, porém reconhece a possibilidade de redução desta quimiocina por mecanismos de regulação negativa e outros processos biológicos que modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, mesmo no contexto de infecção ativa (de Araujo et al., 2021).

Consideramos que esta síntese dos estudos da CXCL10 é biologicamente válida como indício e representa os reportes da literatura, pois admite tanto a elevação quanto a regulação negativa da concentração da citocina, o que pode indicar a adoção de estratégias de controle da resposta inflamatória entre os pacientes nos estudos, a fim de evitar dano tecidual excessivo (Vargas-Inchaustegui et al., 2010). Esta afirmação apresenta limitações, pois o baixo número de estudos identificados aumenta a incerteza estatística da síntese e reduz significativamente o poder estatístico do teste de Egger para detectar o viés de publicação. Fica evidenciada a necessidade de mais estudos.

## 4.9 CXCL9

### 4.9.1 CXCL9 entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis

Gráfico 26 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL9 no sobrenadante de PBMC de pessoas com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, antes do tratamento e após reestimulação, em comparação com grupos de pessoas saudáveis.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, HS = número de participantes saudáveis, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de

confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística, ◆ = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.  
Notas: as células das amostras do grupo de pessoas saudáveis não foram estimuladas pelo antígeno/parasito da *L. braziliensis*.

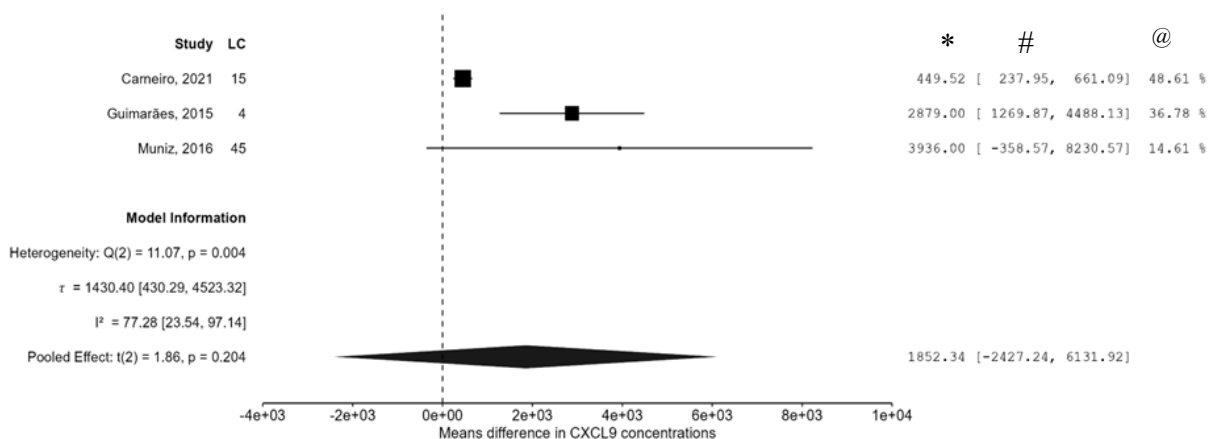
Dois estudos da literatura apresentaram dados experimentais no recorte desta metanálise (Gráfico 26). Eles reportaram resultados opostos, sem sobreposição, nos intervalos de confiança. O estudo “Costa, 2018” apresentou um intervalo de confiança que admite concentração maior de CXCL9 nos pacientes. A síntese estatística indica um valor menor da CXCL9 (-254,58 pg/mL) na concentração da CXCL9 entre pacientes (n = 54) em comparação com sujeitos saudáveis (n = 172). Este resultado não foi significativo (p = 0,97) para indicar diferenças entre os grupos. Estes resultados carecem de poder estatístico.

A oposição dos resultados também foi identificada pelo teste Q de Cochran (p = 0,004), o que não permite tratá-los como semelhantes. A inconsistência é de 86,77%. O pequeno número de estudos impediu a realização de vários procedimentos para lidar com a heterogeneidade e com o viés de publicação. Não foi possível calcular o intervalo de predição, realizar a metarregressão nem a análise de subgrupos.

A síntese obtida para esta meta-análise não deve ser utilizada. Até o momento, não é possível defender uma teoria que sintetize a literatura sobre a concentração de CXCL9 entre pacientes com LC-Lb e pessoas saudáveis. Fica evidente a necessidade de mais estudos, uma vez que a conclusão varia radicalmente a depender do estudo escolhido.

#### 4.9.2 CXCL9 em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*

Gráfico 27 – Meta-análise da diferença na concentração de CXCL9 no sobrenadante do PBMC de amostras estimuladas e não estimuladas por *L. braziliensis*, obtidas de pessoas com leishmaniose cutânea antes do tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Notas: Legenda: PI = intervalo de predição, Study = referência do estudo, LC = número de participantes com LC-Lb antes do tratamento, \* = diferença da média entre os grupos, # = intervalo de confiança, @ = peso do estudo na síntese estatística, ◆ = síntese estatística (pooled effect), Q = Q de Cochran (teste de heterogeneidade),  $\tau$  = variabilidade entre os estudos,  $I^2$  = inconsistência.

Notas: Os pacientes não estavam em tratamento.

Os três estudos reportaram diferenças entre as médias, indicando um aumento da concentração de CXCL9 após a estimulação com o antígeno/parasito de *L. braziliensis* (Gráfico 27). Mas o estudo “Muniz, 2016” admitiu, no intervalo de confiança, a redução da concentração de CXCL9 após a estimulação. A síntese estatística (1852,34 pg/mL) não foi significativa ( $p = 0,204$ ), ou seja, não é possível rejeitar a hipótese de que não há diferenças entre os grupos. Não encontramos assimetria nas diferenças de média (skewness = -1,08).

O teste Q de Cochran para heterogeneidade foi significativo ( $p < 0,01$ ), com 77,28% de inconsistência. Isso significa que 77,28% das diferenças nos resultados entre os estudos são reais e não decorrem da diferença de tamanho amostral. A análise de sensibilidade indicou que o estudo “Muniz, 2016” contribuiu de forma expressiva para o aumento da dispersão dos resultados. Caso fosse removido, a medida de dispersão ( $\tau$ ) baixaria de 1430,4 para 227,42; porém, a heterogeneidade alta continuaria ( $p < 0,01$ ;  $I^2 = 87,18\%$ ). Assim, não retiramos “Muniz, 2016” do estudo. A avaliação visual do forest plot (Gráfico 27) indica que este estudo apresenta uma dispersão interna superior à dos demais, com intervalos de confiança que ultrapassam os dos demais em ambos os lados. Classificamos “Muniz, 2016” como outlier.

Devido ao pequeno número de estudos, não foi possível realizar a análise de subgrupos nem a metarregressão. Também não foi possível realizar o teste de Egger para viés de publicação, nem a análise do funnel plot.

Não recomendamos o uso da síntese estatística calculada devido à alta heterogeneidade e do baixo poder estatístico. Reportamos, como indicativo, que todos os estudos apresentaram concentração média de CXCL9 maior entre os pacientes após a estimulação com *L. braziliensis*.

#### 4.10 Aplicação das sínteses para cálculo amostral

As sínteses meta-analíticas fornecem estimativas de efeito (diferença média,  $\tau$ , intervalos de predição) que podem ser utilizadas para realizar cálculos de tamanho amostral com poder estatístico adequado (80-95%), superando o uso de estudos isolados como referências. Fizemos simulações sobre os tamanhos de amostra adequados para os estudos experimentais, visando identificar diferenças nas concentrações de citocinas entre pacientes e

grupos-controle (pessoas saudáveis ou meios não estimulados), considerando a síntese dos achados da literatura disponível (Tabela 7). Adotamos como parâmetros apenas os valores das meta-análises com pelo menos três estudos, para evitar resultados distorcidos. Supomos distribuições não paramétricas, bicaudais, nível de significância de 5% para rejeitar a hipótese nula e comparação entre médias de um grupo experimental e de um grupo controle com igual número de participantes. Os cálculos foram realizados no software G\*Power 3.1.9.7 (Faul et al., 2007).

Tabela 7 – Recomendações de tamanhos mínimos de amostras em experimentos comparando concentrações de citocinas em pacientes com LC-Lb e grupos controle (sujeitos saudáveis ou meios não estimulados).

<b>Citocina</b>	<b>Relação entre os grupos</b>	<b>d de Cohen</b>	<b>Tamanho da amostra para 80% de poder estatístico</b>	<b>Tamanho da amostra para 95% de poder estatístico</b>
TNF- $\alpha$	Pacientes vs. Pessoas saudáveis Amostras independentes	0,8896	22 em cada grupo. 44 no total	36 em cada grupo. 72 no total.
TNF- $\alpha$	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	1,1625	7 pacientes, com 7 amostras estimuladas e 7 não estimuladas.	11 pacientes, com 11 amostras estimuladas e 11 não estimuladas.
IFN- $\gamma$	Pacientes vs. Pessoas saudáveis Amostras independentes	1,1692	14 em cada grupo. 28 no total.	21 em cada grupo. 42 no total.
IFN- $\gamma$	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	1,1514	9 pacientes, com 9 amostras estimuladas e 9 não estimuladas.	13 pacientes, com 13 amostras estimuladas e 13 não estimuladas.
IL-10	Pacientes vs. Pessoas saudáveis Amostras independentes	0,6074	46 em cada grupo. 92 no total.	75 em cada grupo. 150 no total.
IL-10	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	0,3298	78 pacientes, com 78 amostras estimuladas e 78 não estimuladas.	128 pacientes, com 128 amostras estimuladas e 128 não estimuladas.
IL-17	Pacientes vs. Pessoas saudáveis Amostras independentes	1,9935	6 em cada grupo. 12 no total.	9 em cada grupo. 18 no total.
IL-17	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	2,1660	5 pacientes, com 5 amostras estimuladas e 5 não estimuladas.	6 pacientes, com 6 amostras estimuladas e 6 não estimuladas.
IL-1 $\beta$	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	1,0521	10 pacientes, com 10 amostras estimuladas e 10 não estimuladas.	15 pacientes, com 15 amostras estimuladas e 15 não estimuladas.
CXCL10	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	0,7386	18 pacientes, com 18 amostras estimuladas e 18 não estimuladas.	28 pacientes, com 28 amostras estimuladas e 28 não estimuladas.
CXCL9	Pacientes vs. Meios não estimulados Amostras dependentes	1,2949	8 pacientes, com 8 amostras estimuladas e 8 não estimuladas.	11 pacientes, com 11 amostras estimuladas e 11 não estimuladas.

Fonte: elaborado pelo autor.

Notas: todos os pacientes apresentam LC-Lb. Os grupos-controle não receberam estimulação com antígenos/parasitos de *L. braziliensis*. Resultados para o poder estatístico de comparação de médias com o teste de Wilcoxon (não paramétrico). “d de Cohen” é uma medida de tamanho do efeito necessária para calcular o tamanho da amostra.

O tamanho de amostra recomendado não depende apenas do mínimo necessário para obter poder estatístico. O estudo deve considerar também a possibilidade de perda de participantes, de amostras laboratoriais, de falhas na cultura etc., acrescentando entre 20% e 30% de participantes além do mínimo. Também é necessário estabelecer o quantitativo mínimo necessário para viabilizar as análises estatísticas necessárias à adequada resposta ao problema de pesquisa. Por exemplo, caso o objetivo da pesquisa seja verificar a existência de associação positiva ou negativa entre a concentração de IL-10 e a idade dos participantes na determinação do desfecho clínico, pode ser preciso realizar uma regressão multivariada; este procedimento requer um tamanho de amostra com pelo menos 10 amostras equilibradas em cada moderador.

## 5 DISCUSSÃO

Esta tese apresenta a primeira meta-análise sobre o perfil de citocinas e quimiocinas na LC-Lb em seres humanos, considerando estudos publicados até a primeira metade de 2025. Não foram identificadas meta-análises com escopo idêntico que permitissem a comparação direta dos resultados. Pesquisas com meta-análise não são algo novo no estudo da leishmaniose cutânea. Meta-análises prévias focaram em estudos sobre a eficácia terapêutica (Cabral et al., 2021; Sridharan & Sivaramakrishnan, 2021), a epidemiologia (Foroutan et al., 2017) e os aspectos genéticos da leishmaniose cutânea (Lera-Nonose et al., 2021). Em animais não humanos, por exemplo, Ratzlaff et al. (2023) realizaram uma meta-análise dos métodos diagnósticos e das espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil, abrangendo 229 espécies de mamíferos, com diagnósticos de 2001 a 2021, totalizando 124 estudos. Eles identificaram que a presença de *L. braziliensis* em cavalos não era apenas uma anomalia aleatória em alguns estudos, o que indica a necessidade de mais pesquisas para caracterizar os cavalos como reservatórios importantes do protozoário. Entre seres humanos, Yektaeian et al. (2025) sintetizaram os achados de 44 estudos (2276 participantes) publicados em quatro bases de dados sobre a prevalência do vírus de RNA da *Leishmania*. Eles identificaram que a prevalência combinada do tipo 1 do vírus é de 33% em *L. braziliensis*.

Os estudos mais próximos deste, sobre citocinas na leishmaniose, foram realizados no campo da genética. da Silva et al. (2022) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise para investigar se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) da IL-10 interferem na progressão da leishmaniose. Este estudo sintetizou os achados de cinco estudos anteriores, provenientes de três bases de dados. A conclusão foi de que os SNPs da IL-10 não apresentaram associação significativa com a progressão da leishmaniose. Ainda sobre os SNPs e perfis genéticos, Lera-Nonose et al. (2021) produziram uma revisão sistemática com meta-análise para sintetizar os estudos sobre polimorfismos em genes do sistema imune e suas associações com a leishmaniose tegumentar. Eles meta-analisaram 13 artigos e confirmaram a associação significativa de quatro polimorfismos dos genes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  com a suscetibilidade à leishmaniose cutânea. Considerando as infecções por *Leishmania* em geral, Rezaei et al. (2024) conduziram uma meta-análise para obter informações transcricionais significativas sobre como as células do sistema imune respondem à infecção por *Leishmania*. Para tanto, combinaram diversos bancos de dados de estudos transcriptômicos e aplicaram uma análise com métodos mistos, incluindo meta-análise, algoritmos de seleção de características e análise de redes de coexpressão (técnica da bioinformática para identificar conjuntos de genes que funcionam

juntos). Eles identificam diversos genes associados a CXCL8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  como potenciais alvos terapêuticos para a leishmaniose.

A malária, assim como a leishmaniose, é causada por um protozoário. Segundo Kotepui et al. (2022), a malária tem como agente infeccioso o *Plasmodium spp.*, que também é transmitido por um inseto vetor. Estes autores reportam que, enquanto, na infecção por *L. braziliensis*, o TGF- $\beta$  agrava o quadro clínico, na malária, esta citocina reduz os sintomas. De forma semelhante aos nossos achados, eles relatam que os estudos sobre o papel do TGF- $\beta$  na malária apresentam número reduzido de participantes, o que resulta em aumento do erro estatístico. Eles utilizaram a meta-análise para consolidar os dados e identificar com segurança a diferença nos níveis de TGF- $\beta$  entre pacientes com malária e controles saudáveis. Ou seja, o que fizemos com várias citocinas na infecção por *L. braziliensis*, eles o fizeram com o TGF- $\beta$  na malária. Ao final, meta-analisaram 13 estudos, divididos em grupos com base na gravidade do quadro. Resultando em sínteses meta-analíticas com menos de 10 estudos. O resultado foi que os níveis de TGF- $\beta$  foram significativamente menores em pacientes com malária do que em controles saudáveis, sugerindo que a identificação de níveis baixos de TGF- $\beta$  pode servir como marcador de malária. Em nossa meta-análise, localizamos dois artigos (González et al., 2010; Rodrigues, 2011) com dados sobre TGF- $\beta$ , mas, como cada um adotou um grupo controle diferente do outro, não foi possível realizar a síntese dos dois. Para a LC-Lb, não temos estudos suficientes para avaliar, por meio de uma meta-análise, a concentração entre os grupos de pacientes e controles, o que resulta em menor poder estatístico.

## 5.1 Risco de viés dos estudos: tradição X padronização

A maioria dos estudos não relatou suas limitações metodológicas nem os riscos de viés, deixando ao leitor a tarefa de identificar problemas no processo de pesquisa que possam ter interferido nos resultados. Além disso, todos apresentaram alto risco de viés em pelo menos um domínio. O que reduz a confiança na capacidade deles de representar o papel das citocinas na imunopatogênese da LC-Lb. Um caso emblemático deste problema é a falta de reporte das razões de perda das amostras. Quem trabalha com experimentos de bancada sabe que perdas de amostras provavelmente vão ocorrer. Por vários motivos, que não necessariamente decorrem de negligência do pesquisador ou de falha na pesquisa. Uma geladeira pode apresentar defeito ou uma pipeta pode estar contaminada. A perda ocorre, e seu reporte não deveria ser entendido como um fracasso ou incompetência. Pelo contrário, o reporte da perda demonstra zelo e transparência, além de reduzir a chance do estudo ser classificado como de alto risco de viés.

Quando a perda de amostras não é explicada ou mesmo apenas informada, aumenta-se o risco de viés no estudo. Com frequência, os artigos selecionados atribuíram aos leitores a responsabilidade de identificar eventuais perdas ao analisar o número de medições de concentração de citocinas nos gráficos, levando-os a constatar, por conta própria, que as amostras examinadas não correspondem à quantidade de participantes informada na metodologia. Os casos em que este viés de seleção por omissão da perda ocorreu de forma mais emblemática foram nas publicações em que grupos de pessoas saudáveis (HS) que tiveram amostras de sangue coletadas para a pesquisa simplesmente não tiveram seus resultados apresentados no artigo. Estas pessoas, que aceitaram participar da pesquisa, “desapareceram” após o relato de sua existência na metodologia, e o estudo foi publicado comparando apenas amostras estimuladas com as não estimuladas. Quando um grupo inteiro de participantes não tem seus dados nem análises reportadas, é preciso levantar questões. Por que os autores não explicaram isso? Como os revisores da revista e o editor não notaram ou questionaram?

Durante o processo de screening e extração de dados, foi comum encontrar estudos que não apresentavam dados sobre os grupos amostrais além do número de participantes. Em alguns casos nem essa informação era reportada. Seria como se questões como faixa etária, condição socioeconômica ou gênero não fossem importantes para compreender a dinâmica das citocinas no sistema imune após infecção por *L. braziliensis*. Quando estes dados apareciam no artigo, raramente foram analisados em uma comparação entre grupos ou regressão, ficando apenas como uma ilustração sobre quem eram os participantes. Além disso, nenhum dos estudos indicou se a seleção dos participantes foi aleatória, o que aumenta o risco de viés de seleção.

A compreensão dos vieses presentes em estudos sobre o papel das citocinas na dinâmica imunológica da LC-Lb requer uma investigação qualitativa aprofundada acerca da formação acadêmica em métodos de pesquisa e da elaboração de publicações científicas. A investigação qualitativa permite analisar os processos de tomada de decisão dos pesquisadores e identificar fatores subjetivos que influenciam a condução dos estudos e a elaboração das publicações. Embora os laboratórios de pesquisa experimental nas universidades sejam reconhecidos por seu rigor e perfeccionismo, verificou-se que, nos artigos analisados, as práticas de bancada e o reporte não seguem necessariamente a padronização recomendada por manuais ou protocolos estabelecidos em consensos internacionais, o que é recorrente nas áreas de pesquisa em saúde. Em vez disso, muitos procedimentos são adotados com base na tradição transmitida por pesquisadores experientes ou em conformidade com métodos descritos em trabalhos anteriores.

Foi recorrente a omissão da apresentação textual dos dados estatísticos de média e desvio padrão das concentrações de citocinas nos artigos selecionados. O que significa que não se trata de uma prática isolada ou de um simples esquecimento de reporte dos dados estatísticos, mas sim de uma transmissão social do comportamento. O que aqui chamamos de tradição. Essa forma de reportar os achados experimentais transfere ao leitor a responsabilidade de extrair as informações diretamente dos gráficos apresentados. Seguindo a tradição, é possível que o pesquisador use nove amostras no experimento, apenas porque outro estudo usou o mesmo número e teve seus dados publicados. Este autor aprendeu isso com outros autores cujos estudos foram publicados; ele seguiu o modelo que foi bem-sucedido na comunidade científica. A tradição funciona assim: por transmissão social, mantida por modelos de sucesso, ou por coerção em caso de desobediência. A tradição se materializa nos cadernos com os protocolos dos experimentos, nos quais cada laboratório de pesquisa adota sua própria versão dos protocolos experimentais, sem acordos interinstitucionais, o que pode levar a resultados que induzem ao erro se forem comparados com resultados publicados por outros grupos.

Pela falta de padronização neste campo de pesquisa, também enfrentamos limitações na análise estatística dos dados apresentados neste trabalho. Se a equipe de pesquisa não tiver alguém versado em estatística para estudos em biologia ou saúde, há risco de uma análise insuficiente, baseada apenas na tradição e em modelos de outros artigos. Quase dois terços dos estudos selecionados calcularam o intervalo normal e quase todos planejaram métodos estatísticos adequados, mas estes cuidados com o método ainda são insuficientes se comparados aos padrões propostos pelo artigo de Fox et al. (2024), cujo objetivo é justamente orientar estudos experimentais para reduzir viés por meio de critérios explícitos e relatórios padronizados. A predominância de "alto risco de viés" no "Domínio 2: métodos experimentais" reflete a necessidade de maior transparência e detalhamento metodológico nas publicações com dados de bancada brasileiros. Uma demonstração do problema foi que quase 90% dos estudos selecionados não calcularam ou não reportaram o tamanho de amostra necessário para que os testes utilizados tivessem poder estatístico para gerar resultados confiáveis, o que indica que o cálculo do tamanho de amostra necessário para ter poder estatístico explicativo não faz parte das tradições da maioria dos grupos de pesquisa. Isso é grave, pois significa que não temos como afirmar que os resultados da análise estatística dos estudos são matematicamente seguros, o que implica que o que sabemos sobre o papel das citocinas na dinâmica imunológica da infecção por *L. braziliensis* está sujeito a insegurança estatística. Com os resultados deste estudo, pudemos combinar os resultados de diversos experimentos e reduzir a incerteza estatística quanto a algumas citocinas relevantes na LC-Lb.

A falta de padronização na área também pode explicar a ausência de avaliações cegas das amostras, algo comum em pesquisas da área da saúde que envolvem análises de amostras. Essa foi uma lacuna importante identificada nos estudos, o que eleva o risco de viés decorrente da impessoalidade dos resultados. Assim como algumas ausências de controles internos/externos para balizar a validade dos resultados do ELISA e da citometria quanto à concentração das citocinas. A falta de cegamento e de controles internos e externos suscita questionamentos quanto à imparcialidade dos resultados laboratoriais. Por exemplo, quando o pesquisador responsável pela leitura dos poços de ELISA sabe previamente a qual grupo experimental pertence cada amostra, pode haver influência inconsciente na seleção de amostras de soro, na escolha de curvas padrão ou na interpretação de resultados fora do esperado. Ensaios laboratoriais cegos, em que as amostras são codificadas antes das análises, são reconhecidamente mais confiáveis do ponto de vista metodológico e da validade interna. O manual da Cochrane, que padroniza revisões sistemáticas (Higgins et al., 2019), aponta que a ausência de cegamento de avaliadores e operadores configura um potencial viés de desempenho e de detecção, pois o conhecimento prévio da alocação experimental pode alterar o comportamento dos avaliadores ou o manejo das amostras.

Do mesmo modo, a ausência de controles internos e externos limita a interpretação da validade das medições por ELISA e por citometria. Em dosagens imunológicas, é recomendado que cada placa contenha controles internos (amostras com concentrações conhecidas de citocinas) e que os resultados sejam comparados com controles externos padronizados, como materiais de referência certificados ou lotes calibrados. A presença simultânea desses controles permite identificar desvios técnicos ou variações entre ensaios, que podem ocorrer quando as amostras são processadas em diferentes intervalos de tempo, equipamentos ou laboratórios. Por exemplo, nas análises de IL-10 e IFN- $\gamma$  por ELISA em culturas do PBMC, a ausência de curva padrão validada para o lote de anticorpos utilizado, associada à inexistência de controle positivo (por exemplo, células estimuladas com LPS ou PHA), compromete a comparabilidade dos resultados entre estudos. O mesmo se aplica à citometria de fluxo, na qual é necessária a utilização de controles de compensação e de viabilidade celular para garantir que a leitura da fluorescência reflita, de fato, a presença das citocinas de interesse.

De acordo com o instrumento “Risk of Bias Tool for Clinical Laboratory Studies” (Fox et al., 2024), a ausência de tais padrões técnicos e de mecanismos de cegamento implica alto risco de viés nos domínios “métodos experimentais” e “reporte dos resultados”. Isso reforça a necessidade de que futuras pesquisas na área adotem planos de controle de qualidade,

amostras codificadas e análises cegas, a fim de aprimorar a confiança e a reprodutibilidade dos achados.

Os resultados do “Domínio 3: Relato de resultados” mostraram ausência de transparência ou falha no compartilhamento de dados laboratoriais em 26 dos 28 estudos. Considerando o que foi avaliado antes, temos então duas implicações: (1) As pesquisas sobre imunorregulação na leishmaniose cutânea humana por *Leishmania braziliensis* apresentam base experimental sólida ao se utilizar de técnicas experimentais validadas, mas (2) têm uma limitação na sua validação e replicação pela comunidade científica, em decorrência da falta de acessibilidade dos dados brutos disponibilizados em repositórios públicos, como o FlowRepository. A falta de publicidade dos dados impossibilita a verificação independente dos resultados por terceiros. Nos nossos achados, poucos autores disponibilizam os valores tabulados de leitura por poço ou os parâmetros utilizados no ajuste da curva-padrão. Essa falta de detalhamento reduz a reprodutibilidade dos experimentos por outros grupos de pesquisa e impede comparações interlaboratoriais. Até mesmo a comparação de resultados com estudos semelhantes, que é comum nos capítulos de discussão de qualquer artigo, fica prejudicada se os estudos não estiverem com parâmetros comparáveis, o que pode ser feito caso se tenha acesso aos dados e aos protocolos de pesquisa adotados.

De acordo com o “Domínio 3: Relato de resultados” da ferramenta de julgamento de risco de viés para estudos laboratoriais (Fox et al., 2024), a apresentação adequada de resultados requer que: (a) todos os dados estejam quantificados por meio de testes estatísticos apropriados; (b) dados ausentes sejam justificados; e (c) os conjuntos de dados estejam disponíveis em repositórios acessíveis. Tais critérios alinham-se aos princípios FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable) (Wilkinson et al., 2016), adotados em práticas de ciência aberta (Open Science) e defendidos em plataformas de registro prévio, como o Prospero. A disponibilidade pública dos resultados é um elemento que deveria ser descrito nos tópicos sobre a ética da pesquisa nos capítulos de metodologia dos artigos da área de imunologia da infecção em humanos da *L. braziliensis*, pois é moralmente adequado apresentar à sociedade a possibilidade de acesso ao que ela financiou, quando a pesquisa teve verba pública para ser realizada. Portanto, recomenda-se que os estudos futuros de imunologia experimental para a LC-Lb incorporem políticas explícitas de compartilhamento de dados e de padronização de protocolos, conforme os modelos já adotados em outras áreas do conhecimento.

A construção de um protocolo de procedimentos para adotar no desenvolvimento das etapas das pesquisas, por pesquisadores especialistas em imunologia da infecção por *L. braziliensis*, com validação em pesquisa própria, é o caminho que esta comunidade científica

poderia adotar para reduzir os riscos de viés, de limitações estatísticas e de divergências entre resultados de pesquisas semelhantes. Uma segunda proposta, de menor impacto, para lidar com a situação de alto risco de viés é promover a diversidade de formação nos grupos de pesquisa, incluindo diferentes pesquisadores versados em estatística, protocolos padronizados de pesquisa, técnicas de análise laboratorial, divulgação e relato científico. O campo de estudo da imunologia da leishmaniose cutânea tem muito a ganhar caso melhore o reporte metodológico, seguindo, por exemplo, recomendações de “reporting guidelines” elaboradas por pesquisadores deste campo, como ocorre na área de pesquisa sobre acurácia diagnóstica com o instrumento STARD (Standards for Reporting Diagnostic Accuracy Studies) (Cohen et al., 2016).

Os vieses não controlados nos artigos selecionados podem ter introduzido um viés de seleção indireto nos resultados da meta-análise aqui apresentada. O viés de seleção ocorre quando os estudos incluídos não representam adequadamente a população de interesse ou quando há diferenças sistemáticas entre os estudos incluídos e os excluídos (Fox et al., 2024). Procuramos mitigar este problema desde o planejamento desta pesquisa, por meio de uma busca ampla em diversas bases de dados, o que resultou em mais de doze mil artigos como ponto de partida, a fim de aumentar a probabilidade de incluir estudos de diferentes centros de pesquisa, com perspectivas e tradições distintas. Assim seria possível fazer uma análise de subgrupos, comparando os estudos com mais vieses e os com menos vieses.

Os estudos selecionados também apresentaram pontos positivos quanto ao controle do risco de viés. Isso indica que é possível controlar o viés e estabelecer uma padronização do cuidado e dos procedimentos. O cumprimento dos critérios diagnósticos mínimos de inclusão clínica dos participantes dos estudos e o pareamento por amostra não estimulada evidenciam preocupação com o controle de variáveis confundidoras. A maioria dos capítulos de metodologia dos artigos descreve os métodos empregados, de modo a permitir a compreensão do processo realizado. Isso é relevante porque auxilia na reprodutibilidade dos achados e proporciona transparência ao estudo. Os procedimentos experimentais para a mensuração de citocinas, por ELISA e citometria, foram os corretos e amplamente validados na literatura para essa finalidade.

## **5.2 Diretrizes para a pesquisa experimental com *Leishmania***

Os achados deste trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de um documento futuro com orientações de padronização para pesquisas experimentais sobre a resposta imune na relação entre a *Leishmania* e o hospedeiro. O processo para elaborar este tipo

de diretriz já foi descrito por diversos outros trabalhos (Arakawa & Bader, 2022; Gagnier et al., 2013; van Zuuren et al., 2022). Inicialmente uma revisão sistemática, com ou sem meta-análise, é proposta para identificar como a produção científica vem sendo realizada; identificando elementos essenciais, consensos, divergências, demandas por inovação e elementos que precisam ser aprimorados etc. Em seguida, um painel de especialistas debate estes elementos e propõe orientações. Estas orientações precisam ser testadas em pesquisas, para em seguida ocorrer uma nova rodada de discussões. O processo termina quando um consenso é obtido entre o grupo de especialistas e o documento com as orientações e checklist é publicado. Um prazo para atualizar as orientações pode ser acordado.

A revisão sistemática aqui apresentada reúne elementos que podem subsidiar a formulação de diretrizes para a investigação experimental da infecção por *Leishmania braziliensis*, as quais poderão, em um estágio subsequente, ser aplicadas a estudos envolvendo outras espécies de *Leishmania* na leishmaniose cutânea. A primeira sugestão é a adoção do checklist de controle de viés “Pilot risk of bias tool to appraise clinical laboratory studies” (Fox et al., 2024), ou equivalente, como rotina em qualquer pesquisa experimental sobre leishmaniose cutânea. Seu uso pode ocorrer desde o planejamento da pesquisa, com aplicação relatada na seção de Métodos do artigo publicado. O checklist, indicando onde o leitor pode localizar o seguimento das orientações, pode ser apresentado em um quadro ou disponibilizado como material suplementar do artigo. Diversos checklists de controle de viés e guidelines metodológicos podem ser encontrados em bases de artigos acadêmicos e plataformas digitais como a Equator (Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research) (Network, 2026). Os guidelines vão orientar sobre o detalhamento do desenho experimental, a randomização das amostras ou participantes, cegamento dos avaliadores quanto o grupo ao qual a amostra pertence, cálculo do tamanho amostral para obter confiança nos resultados estatísticos, formas adequadas para o relato de dados etc. Em seguida, recomenda-se discutir se os protocolos experimentais devem seguir os procedimentos adotados pela maioria dos estudos disponíveis, o que facilitaria comparações diretas, ou se devem ser padronizados para maximizar a sensibilidade na distinção entre grupos controle e experimentais, priorizando parâmetros que promovam as maiores concentrações de citocinas nos grupos experimentais, independentemente da prática majoritária.

Os valores específicos para adoção em protocolos, que correspondem aos mais utilizados para quantificar concentrações de citocinas, podem ser consultados no início do capítulo de Resultados. Nas meta-análises, identificam-se os elementos metodológicos que favorecem maior homogeneidade entre os achados dos estudos, enquanto as meta-regressões

revelam indícios de características protocolares que promovem as maiores concentrações de citocinas nos grupos experimentais. Por exemplo, caso a proposta seja utilizar um protocolo de preparação e análise da amostra seguindo o que a maioria dos trabalhos utiliza, deve-se adotar: concentração do PBMC em  $1 \times 10^6$  células/mL, antígeno solúvel da *Leishmania* na concentração de 5 µg/mL, tempo de cultura de 72h e análise da amostra com ELISA. Por outro lado, caso a escolha seja pela maior concentração da citocina após a infecção com a *Leishmania*, avaliando a concentração da IL-10 com amostras de pacientes estimuladas e não estimuladas, deve-se adotar: citometria de fluxo como técnica de análise (pode levar a uma maior homogeneidade com outros estudos), concentração do PBMC em  $3 \times 10^6$  células/mL e 5 µg/mL do antígeno solúvel da *Leishmania*. Ou seja, protocolos experimentais distintos podem ser necessários para diferentes citocinas e objetivos de pesquisa.

### 5.3 Meta-análises

A imunopatogênese da LC-Lb decorre de uma rede dinâmica de interações entre células imunes inatas e adaptativas, citocinas pró- e anti-inflamatórias, quimiocinas e fatores parasito-hospedeiro-vetor, determinando um espectro clínico que vai de resolução espontânea a formas disseminadas/mucosas (Toledo et al., 2001; Volpedo et al., 2021). A elucidação desse sistema requer estudos experimentais com poder estatístico adequado e rigor metodológico, porém identificamos que a literatura indexada dispõe de uma quantidade insuficiente de investigações replicáveis para sínteses meta-analíticas com bom poder explicativo na maioria das citocinas, exceto TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 ( $\geq 10$  estudos), enquanto outras apresentam menos de 10 estudos com dados comparativos de pacientes versus controles. Essa escassez compromete afirmações causais sobre os perfis das citocinas por estágio clínico da doença, sujeitas a erro do tipo II (falso negativo) devido à subpotência (Fox et al., 2024; Higgins et al., 2024). As sínteses quantitativas aqui obtidas superam essa limitação ao quantificar a variabilidade populacional por meio de intervalos de predição amplos, oferecendo estimativas mais realistas do que as médias pontuais de estudos isolados, especialmente sob elevada heterogeneidade clínica entre os achados dos estudos ( $I^2 > 95\%$ ) (Borenstein et al., 2021). Apresentamos, no Quadro 3, os resultados das meta-análises. Continuamos a discussão após o quadro.

Quadro 3 – Resultados das meta-análises da concentração de citocinas e quimiocinas entre o grupo de pacientes com LC-Lb e os grupos controle (HS: sujeitos saudáveis e NS: meios não estimulados).

Citocina e grupos	Estudos, participantes ou amostras analisadas	Inconsistência e Heterogeneidade	Outliers	Análise de subgrupos	Meta-regressão univariada	Viés de publicação	Síntese estatística	Intervalo de predição
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>								
Pacientes x HS	10 estudos com 300 participantes	Alta e significativa	“Covre, 2018”	Sem distinção entre os subgrupos	Sem distinção entre os moderados e o desfecho. Necessita de mais estudos para a concentração do antígeno e da IL-10.	Ausente	Significativa. *Usar apenas como indício.	*Adotar como representativo para a população
Pacientes x NS	10 estudos com 294 amostras analisadas	Alta e significativa	Ausentes	Sem distinção entre os subgrupos	Sem distinção entre os moderadores e o desfecho. Necessita de mais estudos sobre o tempo de cultura do PBMC e a regulação por IL-10.	Significativo. É possível que estudos com concentrações mais altas nas amostras NS não estejam sendo divulgados.	Significativa. *Usar apenas como indício.	*Usar apenas como indício.
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>								
Pacientes x HS	10 estudos com 284 participantes	Alta e significativa	Ausentes	Sem distinção entre os subgrupos	Sem distinção entre os moderadores e o desfecho. Necessita de mais estudos sobre o tempo de cultura do PBMC e a regulação por IL-10.	Ausente	Significativa. *Usar apenas como indício.	*Adotar como representativo para a população
Pacientes x NS	6 estudos com 144 amostras analisadas	Alta e significativa	Ausentes	Sem distinção entre os subgrupos	--	--	Significativa. *Usar apenas como indício.	--
<b>IL-10</b>								
Pacientes x HS	11 estudos com 323 participantes	Alta e significativa	“Castellano, 2009”	Subgrupos de D3 apresentam sínteses diferentes	Sem distinção entre os moderadores e o desfecho. Necessita de mais estudos sobre o tempo de cultura do PBMC e a concentração do antígeno na cultura.	Ausente	Não significativa. *Usar apenas como indício.	*Adotar como representativo para a população
Pacientes x NS	10 estudos com 256 amostras analisadas	Alta e significativa	“Carvalho, 2013”	Subgrupos da técnica de medição são distintos	Sem distinção entre os moderadores e o desfecho. Necessita de mais estudos sobre a concentração do antígeno na cultura.	Ausente	Não significativa. *Usar apenas como indício.	*Adotar como representativo para a população
<b>IL-17</b>								
Pacientes x HS	6 estudos com 164 participantes	Alta e significativa	Ausentes	Subgrupos de técnica de medição, D2 e D3 apresentam sínteses diferentes	--	Ausente	Significativa. *Utilizar as dos subgrupos como indícios	--

Citocina e grupos	Estudos, participantes ou amostras analisadas	Inconsistência e Heterogeneidade	Outliers	Análise de subgrupos	Meta-regressão univariada	Viés de publicação	Síntese estatística	Intervalo de predição
Pacientes x NS	3 estudos com 102 amostras analisadas	Não significativa. Baixa heterogeneidade	Ausentes	--	--	--	Não significativa. *Adotar como representativa dos estudos com cautela	--
<b>IL-1<math>\beta</math></b>								
Pacientes x HS	2 estudos com 50 participantes	Alta e significativa	--	--	--	--	Não significativa. *Não recomendamos o uso.	--
Pacientes x NS	4 estudos com 118 amostras analisadas	Alta e significativa	“Carvalho, 2013”	--	--	Ausente	Não significativa. *Apenas a direção do efeito pode ser utilizada como indício.	--
<b>IL-22</b>								
Pacientes x HS	2 estudos com 42 participantes	Alta e significativa	--	--	--	--	Não significativo. *Não recomendamos o uso da síntese	--
<b>CXCL10</b>								
Pacientes x HS	2 estudos com 224 participantes	Nula e não significativa	Ausentes	--	--	--	Significativa. *Não recomendamos o uso da síntese	--
Pacientes x NS	3 estudos com 128 amostras analisadas	Moderada e não significativa	Ausentes	--	--	Ausente	Não significativa. *Adotar como representativa dos estudos com cautela	--
<b>CXCL9</b>								
Pacientes x HS	2 estudos com 226 participantes	Alta e significativa	--	--	--	--	Não significativa. *Não recomendamos o uso da síntese	--

Citocina e grupos	Estudos, participantes ou amostras analisadas	Inconsistência e Heterogeneidade	Outliers	Análise de subgrupos	Meta-regressão univariada	Viés de publicação	Síntese estatística	Intervalo de predição
Pacientes x NS	3 estudos com 128 amostras analisadas	Alta e significativa	“Muniz, 2016”	--	--	--	Não significativa. *Apenas a direção do efeito pode ser utilizada como indício.	--

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: IC = intervalo de confiança, \* = Recomendação, -- = não foi possível realizar devido ao baixo número de estudos, D2 = “D2: métodos experimentais”, D3 = domínio “D3: relato de resultados” da escala de viés em estudos experimentais.

Notas: Todos os estudos apresentaram alto risco de viés.

Para que os estudos sobre a dinâmica das citocinas e quimiocinas possam se consolidar cientificamente em um estado de ciência normal, é preciso valorizar a realização de estudos de replicação com protocolos padronizados, ou pelo menos semelhantes, e maior rigor metodológico no controle de vieses. Para explicar de forma mais clara, é importante incluir pelo menos 20 estudos para cada perfil imune, com as principais citocinas. Isso permitiria metarregressões multivariadas, validação de biomarcadores compostos (IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-10), quantificação da regulação entre citocinas e identificação de subgrupos prognósticos por meio da concentração das citocinas (Kip et al., 2015).

O que sabemos sobre a regulação imune por citocinas na LC-Lb decorre destes estudos, mas a existência de vários estudos *outliers* torna mais difícil a tarefa de apresentar uma teoria consolidada para esta patologia. Estudos com perfil de outliers apresentam efeitos que diferem significativamente dos demais, potencialmente distorcendo a compreensão da imunopatogênese da leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*, devido a resultados mais exacerbados. Somente por meio da análise comparativa realizada numa meta-análise, na qual se empregam métricas estatísticas de diagnóstico, incluindo resíduos padronizados, DFFITS e distância de Cook, é possível identificar os estudos que distorcem o que sabemos. “Covre et al., 2018” destacou-se por apresentar variância interna elevada em ambos os grupos (pacientes e controles), possivelmente decorrente de populações com comorbidades subclínicas ou de protocolos com viés, o que resultou em resultados exacerbados que amplificaram a percepção de hiperprodução Th1 na LC-Lb. Da mesma forma, “Castellano et al., 2009” apresentou influência significativa na meta-análise de IL-10, com diferenças extremas (563 pg/mL) que, se isoladas, sugeririam polarizações imunes atípicas, dificultando o conhecimento do equilíbrio pró- e anti-inflamatório típico.

#### **5.4 A heterogeneidade**

A alta heterogeneidade observada nas meta-análises não implica a presença de estudos com valores irrealistas ou de contradições entre si, mas reflete a captura de aspectos complementares da diversidade biológica na expressão de citocinas da LC-Lb, resultante da interação entre características individuais dos pacientes e/ou variações experimentais. Cada estudo contribuiu para a identificação do espectro da expressão das citocinas. A perspectiva adotada neste estudo reconhece a heterogeneidade como fonte informativa, conforme recomendado pela literatura sobre fenômenos biológicos (Higgins et al., 2024).

A persistência da heterogeneidade entre os achados dos estudos, após análise de subgrupos, análise de sensibilidade e metarregressão univariada, sugere uma origem predominantemente clínica para a variação do TNF- $\alpha$  e do IFN- $\gamma$ . Outros estudos apontaram que perfis Th1 com diferentes magnitudes, carga parasitária variável, polarização mista Th1/Th2/Th17 e fatores genéticos na interação parasito-hospedeiro, em vez de características metodológicas dos estudos, são possíveis fontes da heterogeneidade para a expressão destas citocinas entre os indivíduos (Amorim et al., 2021; Bettelli et al., 2007; Cabrera González et al., 2010; Costa-Silva et al., 2014; Dos Santos et al., 2020). Nossos achados não descartam as declarações desses estudos e acrescentam a possibilidade de que estes fatores biológicos também expliquem a diversidade entre estudos. Duas questões precisam ser consideradas para validar esta questão com segurança. Primeiro, temos o problema dos vieses: como todos os estudos apresentam alto risco de vieses, não temos como comparar os resultados de estudos de melhor qualidade metodológica com os de qualidade reduzida. Segundo, o número de estudos não foi suficiente entre as categorias comparadas para permitir a obtenção de conclusões com bom poder estatístico.

Contrastando com o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$ , onde predominou heterogeneidade clínica, análises para IL-10 e IL-17 revelaram influência significativa de fatores metodológicos sobre a variabilidade entre estudos, apesar do baixo poder estatístico devido ao baixo número de estudos, diferenças graduais em vieses (Domínios D2/D3) e técnicas analíticas (ELISA vs. citometria de fluxo) geraram resultados díspares, sugerindo que parâmetros experimentais confundem o entendimento atual da regulação imune na LC-Lb. Para lidar com esta situação, recomendamos que os estudos futuros (1) realizem mensuração cruzada ELISA/citometria das citocinas e quimiocinas; (2) adotem de estimulação PBMC seguindo parâmetros mais prevalentes na literatura (facilitando a síntese estatística e metarregressão); (3) reporte das curvas calibração, adotando como padrão a unidade de massa (pg/mL) no lugar do reporte em unidades de fluorescência (MFI); e (4) diálogos multicêntricos para avaliação dos protocolos antes do início da pesquisa, o que pode ser feito através da publicação do protocolo de pesquisa em plataformas digitais acadêmicas voltadas para isso. (Continua nas próximas páginas)

A diversidade de resultados entre os estudos (heterogeneidade) pode resultar de duas possibilidades. A primeira é que o fenômeno realmente se apresenta de forma variada em cada ocorrência, sendo a heterogeneidade uma característica natural entre os experimentos com citocinas na LC-Lb. A segunda é que esta diversidade está relacionada a fatores problemáticos dos estudos, como amostras pequenas, vieses e resultados anômalos. Os resultados apontaram a ocorrência de ambas as possibilidades. A citocina IFN- $\gamma$  (“pacientes x sujeitos saudáveis”)

exemplifica a primeira possibilidade, com intervalo de predição coerente com o biologicamente esperado pela literatura; apesar de heterogeneidades extremas ( $I^2=99,41\%$ ), não apresentou estudos outliers nem diferenças entre estudos introduzidas por vieses, sugerindo variabilidade biológica genuína. Por outro lado, a IL-10 ilustra a segunda possibilidade, com sínteses não significativas (110,3 pg/mL,  $p=0,084$  entre pacientes antes do tratamento e pessoas saudáveis; 16,99 pg/mL,  $p=0,336$  em pessoas com LC-Lb depois e antes da estimulação com *L. braziliensis*) e  $I^2 > 98\%$ , associadas a riscos de viés que induziram diferenças entre os resultados dos estudos (ex.: D3 para IL-10,  $p=0,02$ ), amostras muito pequenas por grupo (ex: um dos grupos teve apenas 4 pacientes estudados) e outliers como Castellano (2009) e Carvalho (2013), cujas exclusões reduzem substancialmente a dispersão dos dados; confirmam que as limitações metodológicas podem contribuir para inconsistências entre os dados experimentais.

## 6 CONCLUSÃO

Esta tese apresentou a síntese estatística dos experimentos disponíveis nas principais bases de dados acadêmicas sobre a expressão de citocinas e quimiocinas em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LC-Lb, por meio de uma revisão sistemática e de meta-análises de 28 estudos *in vitro*, conforme o protocolo PRISMA. Os resultados confirmam o predomínio do perfil imune Th1, com elevações significativas de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em comparação com controles saudáveis, embora tenham ocorrido elevada heterogeneidade ( $I^2 > 95\%$ ) e risco de viés experimental elevado em todos os estudos. A meta-análise, conduzida sob modelo de efeitos aleatórios, revelou diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e CXCL10 no sobrenadante de culturas de PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea por LC-Lb e de grupos controle (indivíduos saudáveis ou meios não estimulados), evidenciando predomínio de ativação pró-inflamatória. Para as outras citocinas e quimiocinas investigadas, foram encontrados perfis imunes mistos, poucos estudos experimentais ou interferência de vieses metodológicos. Tais achados atendem ao objetivo geral de estimar as magnitudes das diferenças imunológicas, superando o poder estatístico de estudos isolados.

Os objetivos específicos foram atingidos por meio da identificação de fontes de heterogeneidade em múltiplas sínteses, incluindo variações nos protocolos experimentais, tais como discrepâncias nos resultados entre subgrupos que empregaram ELISA versus citometria de fluxo e gradientes de risco de viés nos domínios metodológicos (D2 e D3). Para os demais objetivos, foram identificados parâmetros experimentais para a obtenção das concentrações almejadas das principais citocinas e estimativas dos tamanhos amostrais mínimos. A detecção de estudos outliers esclareceu resultados exagerados, como a hiperprodução de TNF- $\alpha$  em “Covre et al., 2018”, que podem mascarar o espectro típico da resposta imune na LC-Lb, em que perfis mistos predominam, com intervalos de predição amplos (ex.: TNF- $\alpha$ : -997 a 2.201 pg/mL).

Sugerem-se investigações complementares: (1) meta-análises integrativas comparando respostas *in vitro* de PBMCs versus amostras *ex vivo* de lesões, para elucidar discrepâncias entre respostas sistêmicas e locais; (2) estudos multicêntricos incorporando espécies de leishmanias coendêmicas no Brasil, com estratificação por perfil clínico (localizada vs. disseminada/mucocutânea). Tais abordagens potencializariam sínteses mais robustas, fundamentando imunoterapias direcionadas.

## REFERÊNCIAS

- Alaa Hussein, O. (2020). Some Cytokines Levels (IL-6 and IL-10) in Sera Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Nassiriya Province. *University of Thi-Qar Journal of Science*, 7(2), 4–6. <https://doi.org/10.32792/utq/utjsc/v7i2.698>
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L., & Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3), 329–334. <https://doi.org/10.2174/1568010054022033>
- Almeida, A. P., Paulo, P. F. M., Pereira Junior, A. M., Gujanwski, C. A., Ferreira, V., Costa, G. D. S., Rodrigues, M. M. S., Ferreira, R. G. M., & Medeiros, J. F. (2021). Occurrence of Leishmania infection in the immediate geographic region of Ji-Parana, Rondonia State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 54, e02122021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0212-2021>
- Altman, D. G., & Bland, J. M. (1995). Absence of evidence is not evidence of absence. *BMJ*, 311(7003), 485. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.7003.485>
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & Team, W. H. O. L. C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Amato, V. S., de Andrade, H. F., & Duarte, M. I. S. (2003). Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Tropica*, 85(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00260-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00260-7)
- Amorim, C. F., Novais, F. O., Nguyen, B. T., Nascimento, M. T., Lago, J., Lago, A. S., Carvalho, L. P., Beiting, D. P., & Scott, P. (2021). Localized skin inflammation during cutaneous leishmaniasis drives a chronic, systemic IFN-gamma signature. *PLoS Negl Trop Dis*, 15(4), e0009321. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009321>
- Anderson, C. F., Lira, R., Kamhawi, S., Belkaid, Y., Wynn, T. A., & Sacks, D. (2008). IL-10 and TGF-beta control the establishment of persistent and transmissible infections produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 180(6), 4090–4097. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4090>
- Arakawa, N., & Bader, L. R. (2022). Consensus development methods: Considerations for national and global frameworks and policy development. *Res Social Adm Pharm*, 18(1), 2222–2229. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2021.06.024>
- Bacellar, O., Faria, D., Nascimento, M., Cardoso, T. M., Gollob, K. J., Dutra, W. O., Scott, P., & Carvalho, E. M. (2009). Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 200(1), 75–78. <https://doi.org/10.1086/599380>
- Bai, X., Shang, S., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R. J., Ovrutsky, A. R., Matsuda, J. L., Takeda, K., Chan, M. M., Dakhama, A., Kinney, W. H., Trostel, J., Bai, A., Honda, J. R., Achcar, R., Hartney, J., Joosten, L. A., Kim, S. H., Orme, I., Dinarello, C. A.,...Chan, E. D. (2015). Human IL-32 expression protects mice against a hypervirulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(16), 5111–5116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424302112>

- Barik, S., Goswami, S., Nanda, P. K., Sarkar, A., Saha, B., Sarkar, A., & Bhattacharjee, S. (2025). TGF-beta plays dual roles in immunity and pathogenesis in leishmaniasis. *Cytokine*, *187*, 156865. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2025.156865>
- Bennis, I., Belaid, L., De Brouwere, V., Filali, H., Sahibi, H., & Boelaert, M. (2017). "The mosquitoes that destroy your face". Social impact of Cutaneous Leishmaniasis in South-eastern Morocco, A qualitative study. *PLoS One*, *12*(12), e0189906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189906>
- Best, I., Privat-Maldonado, A., Cruz, M., Zimic, M., Bras-Goncalves, R., Lemesre, J. L., & Arevalo, J. (2018). IFN-gamma Response Is Associated to Time Exposure Among Asymptomatic Immune Responders That Visited American Tegumentary Leishmaniasis Endemic Areas in Peru. *Front Cell Infect Microbiol*, *8*, 289. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00289>
- Bettelli, E., Korn, T., & Kuchroo, V. K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, *19*(6), 652–657. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.020>
- Bonyek-Silva, I., Nunes, S., Santos, R. L., Lima, F. R., Lago, A., Silva, J., Carvalho, L. P., Arruda, S. M., Serezani, H. C., Carvalho, E. M., Brodskyn, C. I., & Tavares, N. M. (2020). Unbalanced production of LTB(4)/PGE(2) driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect*, *9*(1), 1275–1286. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773744>
- Borenstein, M., Hedges, L. V., Higgins, J. P. T., & Rothstein, H. R. (2021). *Introduction to Meta-Analysis* (2nd ed.). Wiley.
- Brandonisio, O., Panaro, M. A., Fumarola, I., Sisto, M., Leogrande, D., Acquafredda, A., Spinelli, R., & Mitolo, V. (2002). Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clinical and Experimental Medicine*, *2*(3), 125–129. <https://doi.org/10.1007/s102380200017>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, *16*(7), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, *392*(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31204-2)
- Cabrera González, M., Terán-Ángel, G., Rodríguez, O., Puccio, F., Zerpa, O., & Convit, J. (2010). Citocinas reguladoras (IL-10 y TGF-B) en pacientes con leishmaniasis cutánea Americana. *Bol. malariol. salud ambient*, *50*(2), 243–250.
- Campanelli, A. P., Brodskyn, C. I., Boaventura, V., Silva, C., Roselino, A. M., Costa, J., Saldanha, A. C., de Freitas, L. A., de Oliveira, C. I., Barral-Netto, M., Silva, J. S., & Barral, A. (2010). Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol*, *71*(12), 1220–1227. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.09.002>
- Campos, T. M., Passos, S. T., Novais, F. O., Beiting, D. P., Costa, R. S., Queiroz, A., Mosser, D., Scott, P., Carvalho, E. M., & Carvalho, L. P. (2014). Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of

- human cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(11), e3282. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003282>
- Carneiro, P. P., Conceicao, J., Macedo, M., Magalhaes, V., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2016). The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One*, 11(2), e0148084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148084>
- Carneiro, P. P., Dorea, A. S., Oliveira, W. N., Guimaraes, L. H., Brodskyn, C., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2021). Blockade of TLR2 and TLR4 Attenuates Inflammatory Response and Parasite Load in Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol*, 12, 706510. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706510>
- Carvalho, A. M., Bacellar, O., & Carvalho, E. M. (2022). Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. *Pathogens*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens11040466>
- Carvalho, A. M., Costa, R. S., Lago, A., Bacellar, O., Beiting, D. P., Scott, P., Carvalho, L. P., & Carvalho, E. M. (2024). In Situ versus Systemic Immune Response in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. *Pathogens*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens13030199>
- Carvalho, A. M., Guimaraes, L. H., Costa, R., Saldanha, M. G., Prates, I., Carvalho, L. P., Arruda, S., & Carvalho, E. M. (2021). Impaired Th1 Response Is Associated With Therapeutic Failure in Patients With Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis*, 223(3), 527–535. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa374>
- Carvalho, A. M., Magalhaes, A., Carvalho, L. P., Bacellar, O., Scott, P., & Carvalho, E. M. (2013). Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis*, 13, 529. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-529>
- Carvalho, A. M., Novais, F. O., Paixao, C. S., de Oliveira, C. I., Machado, P. R. L., Carvalho, L. P., Scott, P., & Carvalho, E. M. (2020). Glyburide, a NLRP3 Inhibitor, Decreases Inflammatory Response and Is a Candidate to Reduce Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. *J Invest Dermatol*, 140(1), 246–249 e242. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.05.025>
- Carvalho, A. M., Viana, S. M., Andrade, B. B., Oliveira, F., Valenzuela, J. G., Carvalho, E. M., & de Oliveira, C. I. (2022). Immune Response to LinB13, a *Lutzomyia Intermedia* Salivary Protein Correlates With Disease Severity in Tegumentary Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 75(10), 1754–1762. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac258>
- Carvalho, E. M., Correia Filho, D., Bacellar, O., Almeida, R. P., Lessa, H., & Rocha, H. (1995). Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 53(3), 273–277. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.273>
- Castellano, L. R., Filho, D. C., Argiro, L., Dessen, H., Prata, A., Dessen, A., & Rodrigues, V. (2009). Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol*, 70(6), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.007>

- Chitnis, C. E., McCall, L.-I., Zhang, W.-W., & Matlashewski, G. (2013). Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003053>
- Christensen, S. M., Belew, A. T., El-Sayed, N. M., Tafuri, W. L., Silveira, F. T., & Mosser, D. M. (2019). Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(3), e0007152. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007152>
- Clarivate. (2025). *Endnote 2025*. In <https://endnote.com/>
- Cochrane. (2025). *Cochrane Infectious Diseases Group*. Liverpool School of Tropical Medicine <https://www.lstmed.ac.uk/research/collaborations/cochrane-infectious-diseases-group>
- Cohen, J. F., Korevaar, D. A., Altman, D. G., Bruns, D. E., Gatsonis, C. A., Hooft, L., Irwig, L., Levine, D., Reitsma, J. B., de Vet, H. C., & Bossuyt, P. M. (2016). STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open*, 6(11), e012799. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012799>
- Colpitts, S. L., Dalton, N. M., & Scott, P. (2009). IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62Lhigh central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania* major infection. *J Immunol*, 182(9), 5702–5711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803450>
- Costa-Silva, M. F., Gomes, L. I., Martins-Filho, O. A., Rodrigues-Silva, R., Freire Jde, M., Quaresma, P. F., Pascoal-Xavier, M. A., Mendes, T. A., Serakides, R., Zauli, D. A., Campi-Azevedo, A. C., Melo, M. N., Gontijo, C. M., Peruhype-Magalhaes, V., & Teixeira-Carvalho, A. (2014). Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Mol Immunol*, 57(2), 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.08.008>
- Costa, C. H. N., Chang, K. P., Costa, D. L., & Cunha, F. V. M. (2023). From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969>
- Costa, D. L., Cardoso, T. M., Queiroz, A., Milanezi, C. M., Bacellar, O., Carvalho, E. M., & Silva, J. S. (2015). Tr-1-Like CD4+CD25-CD127-/lowFOXP3- Cells Are the Main Source of Interleukin 10 in Patients With Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 211(5), 708–718. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu406>
- Costa, R. S., Carvalho, L. P., Campos, T. M., Magalhaes, A. S., Passos, S. T., Schriefer, A., Silva, J. A., Lago, E., Paixao, C. S., Machado, P., Scott, P., & Carvalho, E. M. (2018). Early Cutaneous Leishmaniasis Patients Infected With *Leishmania braziliensis* Express Increased Inflammatory Responses After Antimony Therapy. *J Infect Dis*, 217(5), 840–850. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix627>
- Costa, R. S. S., & Carvalho, L. P. D. (2017). ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA RECENTE POR *L. braziliensis*. *Ciências Da Saúde (28001010072p3)*.

- Covre, L. P., Martins, R. F., Devine, O. P., Chambers, E. S., Vukmanovic-Stejic, M., Silva, J. A., Dietze, R., Rodrigues, R. R., de Matos Guedes, H. L., Falqueto, A., Akbar, A. N., & Gomes, D. C. O. (2018). Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol*, *9*, 3001. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03001>
- D'Oliveira, A., Jr., Machado, P., Bacellar, O., Cheng, L. H., Almeida, R. P., & Carvalho, E. M. (2002). Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*, *35*(1), 7–10. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000100002>
- Da-Cruz, A. M., Oliveira-Neto, M. P., Bertho, A. L., Mendes-Aguiar, C. O., & Coutinho, S. G. (2010). T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J Invest Dermatol*, *130*(5), 1329–1336. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.428>
- da Silva, R. R., Vasconcelos, F. S. F., Tavares, D. D. S., & Dos Santos, P. L. (2022). Association between interleukin 10 (IL-10) polymorphisms and leishmaniasis progression: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, *12*(1), 11136. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15377-2>
- de Araujo, F. F., Costa-Silva, M. F., Pereira, A. A. S., Rego, F. D., Pereira, V. H. S., de Souza, J. P., Fernandes, L. O. B., Martins-Filho, O. A., Gontijo, C. M. F., Peruhype-Magalhaes, V., & Teixeira-Carvalho, A. (2021). Chemokines in Leishmaniasis: Map of cell movements highlights the landscape of infection and pathogenesis. *Cytokine*, *147*, 155339. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155339>
- de Mesquita, T. G. R., Junior, J., da Silva, L. D. O., Silva, G. A. V., de Araujo, F. J., Pinheiro, S. K., Kerr, H. K. A., da Silva, L. S., de Souza, L. M., de Almeida, S. A., Queiroz, K., de Souza, J. L., da Silva, C. C., Sequera, H. D. G., de Souza, M. L. G., Barbosa, A. N., Pontes, G. S., Guerra, M. V. F., & Ramasawmy, R. (2022). Distinct plasma chemokines and cytokines signatures in Leishmania guyanensis-infected patients with cutaneous leishmaniasis. *Front Immunol*, *13*, 974051. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.974051>
- de Oliveira, B. C., da Silva, A. A., de Andrade Cavalcante, M. K., de Brito, M. E. F., de Castro, M., de Medeiros, V. L. S., de Freitas, E. S. R., & Pereira, V. R. A. (2023). Central and Effector Memory Human CD4+ and CD8+ T Cells during Cutaneous Leishmaniasis and after In Vitro Stimulation with Leishmania (Viannia) braziliensis Epitopes. *Vaccines (Basel)*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/vaccines11010158>
- Dhari, A. K., Abed, A. M., & Abed, S. M. (2024). The level of IL-12, IL-10, IL-4, and MMP-13 in cutaneous leishmaniasis patients. *Medical Journal of Babylon*, *21*(Suppl 2), S244–S249. [https://doi.org/10.4103/mjbl.Mjbl\\_1202\\_23](https://doi.org/10.4103/mjbl.Mjbl_1202_23)
- Diaz, N. L., Zerpa, O., & Tapia, F. J. (2013). Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *108*(4), 446–452. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013008>
- Dos Santos, J. C., Leite Quixabeira, V. B., Teodoro Silva, M. V., Damen, M., Schraa, K., Jaeger, M., Oosting, M., Keating, S. T., Dorta, M. L., Alves Pinto, S., Bugalho Duarte, F., de Araujo Pereira, L. I., Netea, M. G., Ribeiro-Dias, F., & Joosten, L. A. B. (2020).

Genetic variation in Interleukin-32 influence the immune response against New World Leishmania species and susceptibility to American Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(2), e0008029. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008029>

- Dowlati, Y. (1996). Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 425–431. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00058-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00058-2)
- Dubie, T., & Mohammed, Y. (2020). Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. *J Immunol Res*, 2020, 2496713. <https://doi.org/10.1155/2020/2496713>
- Dudakov, J. A., Hanash, A. M., & van den Brink, M. R. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*, 33, 747–785. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112123>
- El Kasmi, K. C., Qualls, J. E., Pesce, J. T., Smith, A. M., Thompson, R. W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R. J., Konig, T., Schleicher, U., Koo, M. S., Kaplan, G., Fitzgerald, K. A., Tuomanen, E. I., Orme, I. M., Kanneganti, T. D., Bogdan, C., Wynn, T. A., & Murray, P. J. (2008). Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol*, 9(12), 1399–1406. <https://doi.org/10.1038/ni.1671>
- Eman Salman, K., Ali Hafedh, A., & Nagham Yaseen, A.-B. (2023). The role of Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF-ALPHA) serum level and genetic polymorphisms with cutaneous leishmania infections. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 73(9), S40–S45. <https://doi.org/10.47391/jpma.Iq-08>
- Farooq Ramzi, U., Jabbar Saheb, E., & Muhammed Hussein, W. (2024). The association of serum level and polymorphisms of IFN-gamma (rs2069705) with the susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Cytokine*, 184, 156785. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156785>
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G., & Buchner, A. (2007). G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*, 39(2), 175–191. <https://doi.org/10.3758/bf03193146>
- Fox, T., Hunt, B. J., Ariens, R. A. S., Towers, G. J., Lever, R., Garner, P., & Kuehn, R. (2024). Systematic reviews of clinical laboratory studies: Pilot risk of bias tool developed by consensus. *Cochrane Evid Synth Methods*, 2(8), e12098. <https://doi.org/10.1002/cesm.12098>
- Gagnier, J. J., Kienle, G., Altman, D. G., Moher, D., Sox, H., Riley, D., & Group\*, C. (2013). The CARE Guidelines: Consensus-based Clinical Case Reporting Guideline Development. *Glob Adv Health Med*, 2(5), 38–43. <https://doi.org/10.7453/gahmj.2013.008>
- Galdas, P. (2017). Revisiting Bias in Qualitative Research. *International Journal of Qualitative Methods*, 16(1). <https://doi.org/10.1177/1609406917748992>
- Galdino, H., Maldaner, A. E., Pessoni, L. L., Soriani, F. M., Pereira, L. I. d. A., Pinto, S. A., Duarte, F. B., Gomes, C. M., Fleuri, A. K. A., Dorta, M. L., de Oliveira, M. A. P., Teixeira, M. M., Batista, A. C., Joosten, L. A. B., Vieira, L. Q., & Ribeiro-Dias, F.

- (2014). Interleukin 32 $\gamma$  (IL-32 $\gamma$ ) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American Tegumentary Leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-249>
- Garcia de Moura, R., Covre, L. P., Fantecelle, C. H., Gajardo, V. A. T., Cunha, C. B., Stringari, L. L., Belew, A. T., Daniel, C. B., Zeidler, S. V. V., Tadokoro, C. E., de Matos Guedes, H. L., Zanotti, R. L., Mosser, D., Falqueto, A., Akbar, A. N., & Gomes, D. C. O. (2021). PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol*, 12, 632667. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632667>
- Gaze, S. T., Dutra, W. O., Lessa, M., Lessa, H., Guimaraes, L. H., Jesus, A. R., Carvalho, L. P., Machado, P., Carvalho, E. M., & Gollob, K. J. (2006). Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol*, 63(1), 70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01707.x>
- Gerhard, T. (2008). Bias: considerations for research practice. *Am J Health Syst Pharm*, 65(22), 2159–2168. <https://doi.org/10.2146/ajhp070369>
- Ghazanfari, M., Shahriari, B., Rahnama, V., Khazaei, M., Naderi, S., & Motazedian, M. H. (2022). The level of interleukin-17, 23, and gamma interferon in cutaneous leishmaniasis patients before and after intra lesion treatment. *J Parasit Dis*, 46(2), 476–482. <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01428-4>
- Gimblet, C., Loesche, M. A., Carvalho, L., Carvalho, E. M., Grice, E. A., Artis, D., & Scott, P. (2015). IL-22 Protects against Tissue Damage during Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One*, 10(8), e0134698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134698>
- Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L. P., Delavechia, T., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2012). Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis*, 12, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-75>
- Goncalves de Albuquerque, S. D. C., da Costa Oliveira, C. N., Vaitkevicius-Antao, V., Silva, A. C., Luna, C. F., de Lorena, V. M. B., & de Paiva-Cavalcanti, M. (2019). Study of association of the rs2275913 IL-17A single nucleotide polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Cytokine*, 123, 154784. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154784>
- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., & Mosser, D. M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med*, 208(6), 1253–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20101751>
- Gontijo, B., & Carvalho, M. L. R. (2003). American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36(1), 71–80. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822003000100011>
- Gonzalez, K., Calzada, J. E., Corbett, C. E. P., Saldana, A., & Laurenti, M. D. (2020). Involvement of the Inflammasome and Th17 Cells in Skin Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Mediators Inflamm*, 2020, 9278931. <https://doi.org/10.1155/2020/9278931>

- González, M. C., Terán-Angel, G., Rodríguez, O., Puccio, F., Zerpa, O., & Convit, J. (2010). Regulatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) in American cutaneous leishmaniasis patients. *Boletín De Malariología Y Salud Ambiental*, 50(2), 243–250.
- Greenhalgh, T., & Peacock, R. (2005). Effectiveness and efficiency of search methods in systematic reviews of complex evidence: audit of primary sources. *BMJ*, 331(7524), 1064–1065. <https://doi.org/10.1136/bmj.38636.593461.68>
- Guglani, L., & Khader, S. A. (2010). Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS*, 5(2), 120–127. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328335c2f6>
- Guimaraes, L. H., Saldanha, M., Menezes, T., Moreno, L., Torres, A., Costa, R., Passos, S., Badaro, R., Arruda, S., & Carvalho, L. P. (2015). A Potential Role for Mononuclear Phagocytes in Cutaneous Ulcer Development in Human Immunodeficiency Virus-Leishmania braziliensis Coinfection. *Am J Trop Med Hyg*, 93(6), 1219–1223. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0475>
- Guimaraes, L. H., Zacarias, E., Nolasco, S. T., Filho, A. N., Lago, J., Machado, P. R. L., Oliveira, J., Carvalho, L. P., Carvalho, A., Carvalho, E. M., & Arruda, S. (2024). The Leishmania Skin Test Predicts Clinic-Immunologic and Therapeutic Outcomes in Cutaneous Leishmaniasis. *Pathogens*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/pathogens13111018>
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>
- Higgins, J. P., Thompson, S. G., Deeks, J. J., & Altman, D. G. (2003). Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*, 327(7414), 557–560. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>
- Higgins, J. P. T., Thomas, J., Chandler, J., Cumpston, M., Li, T., Page, M. J., & Welch, V. A. (2024). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* (Vol. 6.5) [website]. Cochrane.
- Hussein, A. M., & Ali, H. Z. (2022). Detection of TNF Alpha Level as Biomarker in Different Stages of Cutaneous Leishmaniasis Infection. *Iraqi Journal of Science*, 3313–3321. <https://doi.org/10.24996/ijs.2022.63.8.6>
- Katara, G. K., Raj, A., Kumar, R., Avishek, K., Kaushal, H., Ansari, N. A., Bumb, R. A., & Salotra, P. (2013). Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica. *BMC Immunol*, 14, 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-52>
- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9(8), 604–615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>
- Kihel, A., Hammi, I., Darif, D., Lemrani, M., Riyad, M., Guessous, F., & Akarid, K. (2021). The different faces of the NLRP3 inflammasome in cutaneous Leishmaniasis: A review. *Cytokine*, 147, 155248. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155248>

- Kip, A. E., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., de Vries, P. J., & Dorlo, T. P. (2015). Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.04298-14>
- Kleinewietfeld, M., & Hafler, D. A. (2013). The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*, 25(4), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.009>
- Komai, T., Inoue, M., Okamura, T., Morita, K., Iwasaki, Y., Sumitomo, S., Shoda, H., Yamamoto, K., & Fujio, K. (2018). Transforming Growth Factor-beta and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. *Front Immunol*, 9, 1364. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01364>
- Kotepui, K. U., Kwankaew, P., Masangkay, F. R., Mahittikorn, A., & Kotepui, M. (2022). Transforming Growth Factor-beta Concerning Malarial Infection and Severity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Trop Med Infect Dis*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7100299>
- Kuhn, T. (1975). *A estrutura das revoluções científicas*. Perspectiva.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11(5), 210–214. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00075-1)
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M., van Baarsen, L., van Capel, T. M., Schuitemaker, J. H., Kapsenberg, M. L., & de Jong, E. C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*, 127(2), 331–341. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>
- Leng, S. X., McElhaney, J. E., Walston, J. D., Xie, D., Fedarko, N. S., & Kuchel, G. A. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63(8), 879–884. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.8.879>
- Lera-Nonose, D., De Oliveira, L. F., Brustolin, A., Santos, T. S., Oyama, J., Ramos-Milare, A., Terron-Monich, M. S., Demarchi, I. G., Neto, Q. A. L., Teixeira, J. J. V., & Lonardoni, M. V. C. (2021). Genetic variations in the human immune system influence susceptibility to tegumentary leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol*, 17(5), 513–537. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1906650>
- Lima, L. B. d. S., Menolli, R. A., & Ayala, T. S. (2023). Immunomodulation of Macrophages May Benefit Cutaneous Leishmaniasis Outcome. *Current Tropical Medicine Reports*, 10(4), 281–294. <https://doi.org/10.1007/s40475-023-00303-x>
- Llanos-Cuentas, E. A., Marsden, P. D., Lago, E. L., Barreto, A. C., Cuba, C. C., & Johnson, W. D. (1984). Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 17(4), 169–177. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821984000400003>

- Locksley, Richard M., Pingel, S., Lacy, D., Wakil, Adil E., Bix, M., & Fowell, Deborah J. (1999). Susceptibility to Infectious Diseases: Leishmaniasis as a Paradigm. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(s2), S305–S308. <https://doi.org/10.1086/513843>
- Lopes, D. M., de Almeida, T., de Souza, R. D. P., Ribeiro, L. E. V., Page, B., Fernandes, J. S., Carvalho, E. M., & Cardoso, L. S. (2018). Susceptibility of dendritic cells from individuals with schistosomiasis to infection by *Leishmania braziliensis*. *Mol Immunol*, 93, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.018>
- Lopez-Carvajal, L., Velez, I., Arbelaez, M. P., & Olliaro, P. (2018). Eligibility criteria and outcome measures adopted in clinical trials of treatments of cutaneous leishmaniasis: systematic literature review covering the period 1991–2015. *Trop Med Int Health*, 23(5), 448–475. <https://doi.org/10.1111/tmi.13048>
- Man, E., Price, H. P., & Hoskins, C. (2022). Current and future strategies against cutaneous parasites. *Pharm Res*, 39(4), 631–651. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03232-y>
- Martinez-Valencia, A. J., Daza-Rivera, C. F., Rosales-Chilama, M., Cossio, A., Casadiego Rincon, E. J., Desai, M. M., Saravia, N. G., & Gomez, M. A. (2017). Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(7), e0005713. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005713>
- Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. (2016). Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*, 110(6), 247–260. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042>
- Matta, N. E., Nogueira, R. S., Franco, A. M., de Souza, E. S. I., Mattos, M. S., Oliveira-Neto, M. P., Coutinho, S. G., Leon, L. L., & Da-Cruz, A. M. (2009). *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg*, 80(3), 339–344.
- Mattison, R. G., Hanna, R. E., & Nizami, W. A. (1992). Ultrastructure and histochemistry of the digestive tract of juvenile *Paramphistomum epiclitum* (Paramphistomidae: Digenea) during migration in Indian ruminants. *Int J Parasitol*, 22(8), 1089–1101. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90029-k](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90029-k)
- Melby, P. C., Andrade-Narvaez, F. J., Darnell, B. J., Valencia-Pacheco, G., Tryon, V. V., & Palomo-Cetina, A. (1994). Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, 62(3), 837–842. <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.837-842.1994>
- Mendonça, A. L. d. O., & Videira, A. A. P. (2007). Progresso científico e incomensurabilidade em Thomas Kuhn. *Scientiae Studia*, 5(2), 169–183. <https://doi.org/10.1590/s1678-31662007000200003>
- Microsoft. (2025). *Microsoft Excel*. In *Microsoft 365 MSO* (Version 2509)
- Miller, L. S., & Modlin, R. L. (2007). Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol*, 127(2), 262–263. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700559>

- Mirzaei, A., Maleki, M., Masoumi, E., & Maspi, N. (2021). A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. *Cytokine*, *145*, 155297. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155297>
- Morales-Primo, A. U., Becker, I., Pedraza-Zamora, C. P., & Zamora-Chimal, J. (2024). Th17 Cell and Inflammatory Infiltrate Interactions in Cutaneous Leishmaniasis: Unraveling Immunopathogenic Mechanisms. *Immune Netw*, *24*(2), e14. <https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e14>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Muniz, A. C., Bacellar, O., Lago, E. L., Carvalho, A. M., Carneiro, P. P., Guimaraes, L. H., Rocha, P. N., Carvalho, L. P., Glesby, M., & Carvalho, E. M. (2016). Immunologic Markers of Protection in Leishmania (Viannia) braziliensis Infection: A 5-Year Cohort Study. *J Infect Dis*, *214*(4), 570–576. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw196>
- Nascimento, M. T., Cordeiro, R. S. O., Abreu, C., Santos, C. P., Peixoto, F., Duarte, G. A., Cardoso, T., de Oliveira, C. I., Carvalho, E. M., & Carvalho, L. P. (2022). Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Agonist, Downregulates the Inflammatory Response in Cutaneous Leishmaniasis Patients Without Interfering in Leishmania braziliensis Killing by Monocytes. *Front Cell Infect Microbiol*, *12*, 884237. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.884237>
- Nascimento, M. T., Franca, M., Carvalho, A. M., Amorim, C. F., Peixoto, F., Beiting, D., Scott, P., Carvalho, E. M., & Carvalho, L. P. (2021). Inhibition of gamma-secretase activity without interfering in Notch signalling decreases inflammatory response in patients with cutaneous leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect*, *10*(1), 1219–1226. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1932608>
- Nateghi Rostami, M., Seyyedani Jasbi, E., Khamesipour, A., & Mohammadi, A. M. (2016). Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) and its soluble receptor type 1 (sTNFR I) in human active and healed leishmaniasis. *Parasite Immunol*, *38*(4), 255–260. <https://doi.org/10.1111/pim.12305>
- Network, E. (2026). *Equator*. <https://www.equator-network.org/>
- Novais, F. O., Carvalho, A. M., Clark, M. L., Carvalho, L. P., Beiting, D. P., Brodsky, I. E., Carvalho, E. M., & Scott, P. (2017). CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1beta production. *PLoS Pathog*, *13*(2), e1006196. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006196>
- Novais, F. O., Nguyen, B. T., Beiting, D. P., Carvalho, L. P., Glennie, N. D., Passos, S., Carvalho, E. M., & Scott, P. (2014). Human classical monocytes control the intracellular stage of Leishmania braziliensis by reactive oxygen species. *J Infect Dis*, *209*(8), 1288–1296. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu013>
- Novoa, R., Bacellar, O., Nascimento, M., Cardoso, T. M., Ramasawmy, R., Oliveira, W. N., Schriefer, A., & Carvalho, E. M. (2011). IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in L. braziliensis Infection. *Parasite Immunol*, *33*(2), 132–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01256.x>

- Nylen, S., & Sacks, D. (2007). Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*, 28(9), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.004>
- Oghumu, S., Lezama-Davila, C. M., Isaac-Marquez, A. P., & Satoskar, A. R. (2010). Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol*, 126(3), 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.02.010>
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M. C., & Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop*, 118(2), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>
- Oliveira, W. N., Ribeiro, L. E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 66(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.12.016>
- Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z., & Elmagarmid, A. (2016). Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*, 5(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hrobjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S.,...Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, 372, n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- PAHO, P. A. H., Organization. (2024, 2024–12–11). Leishmaniasis: Epidemiological Report for the Americas. No.13, December 2024. *Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas*; 11 p. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/63165>  
[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/63165/OPSCDEAFT240021\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/63165/OPSCDEAFT240021_eng.pdf?sequence=1)
- Passelli, K., Billion, O., & Tacchini-Cottier, F. (2021). The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by Leishmania Infection. *Front Immunol*, 12, 649348. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.649348>
- Passos, S., Carvalho, L. P., Costa, R. S., Campos, T. M., Novais, F. O., Magalhaes, A., Machado, P. R., Beiting, D., Mosser, D., Carvalho, E. M., & Scott, P. (2015). Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *J Infect Dis*, 211(2), 274–282. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu439>
- Paulo, M., Jean, K., Roque, A., Aurelie, C., Cibele, A., & Edgar, M. C. (2002). Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Dermatology*, 12(5), 449–451.
- Pereira, M. G., & Galvão, T. F. (2014). Heterogeneidade e viés de publicação em revisões sistemáticas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 23(4), 775–778. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742014000400021>

- Peters, N. C., Pagan, A. J., Lawyer, P. G., Hand, T. W., Henrique Roma, E., Stamper, L. W., Romano, A., & Sacks, D. L. (2014). Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6C<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> effector T cells that are required for protection against re-infection. *PLoS Pathog*, *10*(12), e1004538. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004538>
- Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceicao-Silva, F., & Modlin, R. L. (1993). Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*, *91*(4), 1390–1395. <https://doi.org/10.1172/JCI116341>
- Pitta, M. G., Romano, A., Cabantous, S., Henri, S., Hammad, A., Kouriba, B., Argiro, L., el Kheir, M., Bucheton, B., Mary, C., El-Safi, S. H., & Dessein, A. (2009). IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest*, *119*(8), 2379–2387. <https://doi.org/10.1172/JCI38813>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., Lopez-Velez, R., Garcia-Hernandez, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, *11*(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Prajeeth, C. K., Haeblerlein, S., Sebald, H., Schleicher, U., Bogdan, C., & Adams, J. H. (2011). *Leishmania*-Infected Macrophages Are Targets of NK Cell-Derived Cytokines but Not of NK Cell Cytotoxicity. *Infection and Immunity*, *79*(7), 2699–2708. <https://doi.org/10.1128/iai.00079-11>
- Quixabeira, V. B. L., Pereira, L. I. A., Veras, P. R. V., da Costa, A. C. V., Fonseca, L. G., Galdino, H., Jr., da Silva, I. A., Jr., Morato, C. I., Pinto, S. A., Pereira, A., Dorta, M. L., Oliveira, M. A. P., Gomes, R. S., & Ribeiro-Dias, F. (2019). Alterations in monocyte subsets and cytokine production after TLR activation in American Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol*, *41*(5), e12623. <https://doi.org/10.1111/pim.12623>
- Ratzlaff, F. R., Osmari, V., da Silva, D., de Paula Vasconcellos, J. S., Potter, L., Fernandes, F. D., de Mello Filho, J. A., de Avila Botton, S., Vogel, F. S. F., & Sangioni, L. A. (2023). Identification of infection by *Leishmania* spp. in wild and domestic animals in Brazil: a systematic review with meta-analysis (2001-2021). *Parasitol Res*, *122*(7), 1605–1619. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07862-y>
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*, *58*, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Reis, L. C., Brito, M. E., Souza, M. A., Medeiros, A. C., Silva, C. J., Luna, C. F., & Pereira, V. R. (2009). Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Lab Anal*, *23*(1), 63–69. <https://doi.org/10.1002/jcla.20291>
- Rezaei, Z., Tahmasebi, A., & Pourabbas, B. (2024). Using meta-analysis and machine learning to investigate the transcriptional response of immune cells to *Leishmania* infection. *PLoS Negl Trop Dis*, *18*(1), e0011892. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011892>
- Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O., & Carvalho, E. M. (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, *31*(1), 143–148. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998000100020>

- Ribeiro-Dias, F., & Oliveira, Iara Barreto N. (2022). A Critical Overview of Interleukin 32 in Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.849340>
- Richens, J. L., Urbanowicz, R. A., Metcalf, R., Corne, J., O'Shea, P., & Fairclough, L. (2010). Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits. *J Biomol Screen*, 15(5), 562–568. <https://doi.org/10.1177/1087057110362099>
- Ritter, U., Moll, H., Laskay, T., Brocker, E., Velazco, O., Becker, I., & Gillitzer, R. (1996). Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis*, 173(3), 699–709. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.3.699>
- Rocha, P. N., Almeida, R. P., Bacellar, O., de Jesus, A. R., Filho, D. C., Filho, A. C., Barral, A., Coffman, R. L., & Carvalho, E. M. (1999). Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 180(5), 1731–1734. <https://doi.org/10.1086/315071>
- Rodrigues, G. F., Alcântara, L. S., Barros, J. P. B., de Lima, A. C. S., Campos, M. B., Moraes, C., Ferreira, A. F., Matta, V. L. R., Laurenti, M. D., Corbett, C. E. P., Silveira, F. T., & Gomes, C. M. C. (2023). In situ expression of Th17 immunologic mediators in American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* in the Brazilian Amazon. *Frontiers in Tropical Diseases*, 4. <https://doi.org/10.3389/ftd.2023.1067595>
- Rodrigues, K. M. d. P. (2011). *A influência do sistema de sinalização Notch e das citocinas inflamatórias IL-17 e IL-18 na resposta ao tratamento da leishmaniose tegumentar americana* Fundação Oswaldo Cruz]. Rio de Janeiro. <https://arca.fiocruz.br/handle/icict/5747>
- Rohatgi, A. (2011). *WebPlotDigitizer*. In <https://automeris.io>
- Rover, C., Knapp, G., & Friede, T. (2015). Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman approach and its modification for random-effects meta-analysis with few studies. *BMC Med Res Methodol*, 15, 99. <https://doi.org/10.1186/s12874-015-0091-1>
- Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>
- Saidi, N., Blaizot, R., Prevot, G., Aoun, K., Demar, M., Cazenave, P. A., Bouratbine, A., & Pied, S. (2023). Clinical and immunological spectra of human cutaneous leishmaniasis in North Africa and French Guiana. *Front Immunol*, 14, 1134020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1134020>
- Santos, C. d. S., Boaventura, V., Ribeiro Cardoso, C., Tavares, N., Lordelo, M. J., Noronha, A., Costa, J., Borges, V. M., de Oliveira, C. I., Van Weyenbergh, J., Barral, A., Barral-Netto, M., & Brodskyn, C. I. (2013). CD8+ Granzyme B+–Mediated Tissue Injury vs. CD4+IFN $\gamma$ +–Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), 1533–1540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2013.4>

- Santos, D., Campos, T. M., Saldanha, M., Oliveira, S. C., Nascimento, M., Zamboni, D. S., Machado, P. R., Arruda, S., Scott, P., Carvalho, E. M., & Carvalho, L. P. (2018). IL-1beta Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol*, 138(5), 1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.029>
- Santos, E., Cardoso, D., & Apóstolo, J. (2022). Como medir e explorar a heterogeneidade de uma meta-análise: Estratégias metodológicas fundamentais. *Revista de Enfermagem Referência, VI Série*(Nº 1). <https://doi.org/10.12707/rv21077>
- Santos, E., & Cunha, M. (2013). Interpretação crítica dos resultados estatísticos de uma meta - análise: Estratégias metodológicas. *Millenium-Journal of Education, Technologies, and Health*(44), 85-98.
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Shen, J., Sun, X., Pan, B., Cao, S., Cao, J., Che, D., Liu, F., Zhang, S., & Yu, Y. (2018). IL-17 induces macrophages to M2-like phenotype via NF-kappaB. *Cancer Manag Res*, 10, 4217–4228. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S174899>
- Sideri, S., Papageorgiou, S. N., & Eliades, T. (2018). Registration in the international prospective register of systematic reviews (PROSPERO) of systematic review protocols was associated with increased review quality. *J Clin Epidemiol*, 100, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2018.01.003>
- Silva, Menezes, M. S. d. A., & Sousa, S. M. B. d. (2024). Leishmaniose tegumentar americana em um estado endêmico do Brasil: uma revisão de escopo. *Observatório De La Economía Latinoamericana*, 22(12). <https://doi.org/10.55905/oelv22n12-217>
- Silva, J. M. d. (2024). *Análise do desfecho clínico de cura, presença de macrófagos, níveis de citocinas e expressão da anexina-A1 durante a infecção tegumentar dos pacientes com Leishmania braziliensis* <http://ri.ufmt.br/handle/1/6476>
- Silva, J. M. D., Silva, H., Sarmiento, A. L. C., Hueb, M., & Damazo, A. S. (2024). Analysis of clinical cure outcome, macrophages number, cytokines levels and expression of annexin-A1 in the cutaneous infection in patients with Leishmania braziliensis. *Rev Soc Bras Med Trop*, 57, e00412. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0036-2024>
- Skinner, B. F. (1953). *Ciência e comportamento humano* (J. C. TODOROV & R. AZZI, Trans.; 11 ed.). Martins Fontes.
- Souza, M. A., Castro, M. C., Oliveira, A. P., Almeida, A. F., Reis, L. C., Silva, C. J., Brito, M. E., & Pereira, V. R. (2012). American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand J Immunol*, 76(2), 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02717.x>

- Souza, M. A., de Castro, M. C., de Oliveira, A. P., de Almeida, A. F., de Almeida, T. M., Reis, L. C., Medeiros, A. C., de Brito, M. E., & Pereira, V. R. (2013). Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog*, *57*, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.02.004>
- Spolski, R., & Leonard, W. J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, *13*(5), 379–395. <https://doi.org/10.1038/nrd4296>
- Stafford, J. L., Neumann, N. F., & Belosevic, M. (2002). Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol*, *28*(3), 187–248. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046731>
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*, *7*(9). <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Taslimi, Y., Agbajogu, C., Brynjolfsson, S. F., Masoudzadeh, N., Mashayekhi, V., Gharibzadeh, S., Ostensson, M., Nakka, S. S., Mizbani, A., Rafati, S., & Harandi, A. M. (2020). Profiling inflammatory response in lesions of cutaneous leishmaniasis patients using a non-invasive sampling method combined with a high-throughput protein detection assay. *Cytokine*, *130*, 155056. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155056>
- Team, J. (2025). *JASP (Versão 0.95.4)*. In (Version 0.95.4) [software estatístico]. <https://jasp-stats.org/>
- Telino, E., De Luca, P. M., Matos, D. C., Azeredo-Coutinho, R. B., Meirelles, M. N., Conceicao-Silva, F., Schubach, A., & Mendonca, S. C. (2006). In vitro responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of Leishmania promastigotes. *Clin Exp Immunol*, *143*(2), 338–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.02995.x>
- Toledo, V. P., Mayrink, W., Gollob, K. J., Oliveira, M. A., Costa, C. A., Genaro, O., Pinto, J. A., & Afonso, L. C. (2001). Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *96*(1), 89–98. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000100010>
- Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B., Assolini, J. P., Goncalves, M. D., Carloto, A. C. M., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2018). Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front Immunol*, *9*, 2529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>
- Torchinsky, M. B., Garaude, J., Martin, A. P., & Blander, J. M. (2009). Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*, *458*(7234), 78–82. <https://doi.org/10.1038/nature07781>
- Turetz, M. L., Machado, P. R., Ko, A. I., Alves, F., Bittencourt, A., Almeida, R. P., Mobashery, N., Johnson, W. D., Jr., & Carvalho, E. M. (2002). Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, *186*(12), 1829–1834. <https://doi.org/10.1086/345772>

- van Zuuren, E. J., Logullo, P., Price, A., Fedorowicz, Z., Hughes, E. L., & Gattrell, W. T. (2022). Existing guidance on reporting of consensus methodology: a systematic review to inform ACCORD guideline development. *BMJ Open*, *12*(9), e065154. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-065154>
- Vargas-Inchaustegui, D. A., Hogg, A. E., Tulliano, G., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J., Endsley, J. J., & Soong, L. (2010). CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun*, *78*(1), 301–308. <https://doi.org/10.1128/IAI.00959-09>
- Varikuti, S., Jha, B. K., Volpedo, G., Ryan, N. M., Halsey, G., Hamza, O. M., McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2018). Host-Directed Drug Therapies for Neglected Tropical Diseases Caused by Protozoan Parasites. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02655>
- Volpedo, G., Pacheco-Fernandez, T., Holcomb, E. A., Cipriano, N., Cox, B., & Satoskar, A. R. (2021). Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). *Front Cell Infect Microbiol*, *11*, 685296. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.685296>
- WHO, Jain, S., Virrey Agua, J. F., Ruiz-Postigo, J. A., Maia-Elkhoury, A. N., Valadas, S., Zamani, G., Osman, M., Yajima, A., & Beshaha, A. B. (2025). *Global leishmaniasis surveillance updates 2024: Consolidating gains and new initiatives*. W. H. Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer10045-535-552>
- Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, I. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J. W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R.,...Mons, B. (2016). The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data*, *3*, 160018. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>
- Wronska, A. K., Kaczmarek, A., Sobich, J., Grzelak, S., & Bogus, M. I. (2022). Intracellular cytokine detection based on flow cytometry in hemocytes from *Galleria mellonella* larvae: A new protocol. *PLoS One*, *17*(9), e0274120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274120>
- Yektaeian, N., Dousti, M., & Hatam, G. (2025). The prevalence of *Leishmania* RNA virus in cutaneous leishmaniasis: a meta-analysis and systematic review. *BMC Infect Dis*, *25*(1), 1026. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11326-2>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, *112*(5), 1557–1569. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

## Anexo A - Checklist dos elementos de uma revisão sistemática seguindo as orientações do PRISMA Statement 2020.

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	Título, Introdução e Metodologia
<b>ABSTRACT</b>			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	Resumo e Abstract
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	Parágrafos 2 e 3 do capítulo 2
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	3 últimos parágrafos no final do capítulo 2
<b>METHODS</b>			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	Seção 3.2
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	Seção 3.3
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	Seção 3.3
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	Seção 3.3
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	Seção 3.3
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	Seção 3.4 e 3.5
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	Seção 3.4 e 3.5
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	Seção 3.7
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	Seção 3.4 e 3.8
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	Final da seção 3.4
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	Seção 3.8
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	Seção 3.10
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	Seção 3.10 e 3.9
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among	Seção 3.10

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
		study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	Seção 3.6
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	Seção 3.8 e 3.10
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	Seção 3.7 e 3.10
<b>RESULTS</b>			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	Fluxograma 1
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	Página 52
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	Quadro 2
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	Quadro 3 Gráfico 1 Gráfico 4 Gráfico 7 Gráfico 10 Gráfico 11 Gráfico 14 Gráfico 15 Gráfico 19 Gráfico 20 Gráfico 21 Gráfico 23 Gráfico 24 Gráfico 25 Gráfico 26 Gráfico 27
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	Páginas 63 a 68
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	Páginas: 70 77 82 87 89 93 96 101 103 104 106 108 109 111 112
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	117
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	Páginas: 70 77 82 87 89 93 96

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
			101 103 104 106 108 109 111 112
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	Páginas: 70 77 82 87 89 93 96 101 103 104 106 108 109 111 112
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	Seção 5.1 Quadro 3 Obs. A ferramenta GRADE não se aplica a estudos experimentais de bancada. Mas o grau de confiança nos resultados dos estudos foi discutida e descrita.
<b>DISCUSSION</b>			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	Quando foram obtidos estudos suficientes, esta discussão foi realizada nas seções de resultados das meta-análises e na seção de discussão.
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	Quadro 3
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	Seção 3.3
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	Seção 6
<b>OTHER INFORMATION</b>			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	Seção 3.1
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	Seção 3.1
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or	Seção 3.1

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
		in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	Seção 3.11
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	Seção 3.11
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	Planilha com a extração de dados; link na seção 3.11.

Fonte: (Page et al., 2021)

## Anexo B – Instrumento de Avaliação da qualidade e risco de viés

Quadro 4 - Instrumento “Risk of bias tool for clinical laboratory studies” (Fox et al., 2024, p. 5) para a avaliação do risco de viés em estudos experimentais.

Questão	Descrição
<b><i>Domain 1: Collection and handling of samples</i></b>	
Have patients been clinically evaluated to ensure they fulfil the criteria for inclusion?	This question is used to ensure that appropriate diagnostic tests been performed to ensure that participants providing samples meet the criteria for the exposure and control groups. Samples taken from participants who have not been formally diagnosed may not accurately represent the population group.
Have statistical calculations been performed to determine an appropriate sample size?	This is required to ensure the sample size is large enough to detect a difference between the groups. Underpowered studies may yield significant results more easily and lead to the publishing of experiments that were never necessarily intended to be published.
Are samples contemporaneous?	The integrity of samples obtained at different time points will be affected by the time spent in storage.
Have patients been matched on non-investigational characteristics that may introduce confounding?	Matching characteristics across groups that are not being investigated, such as age, sex, and health status, reduces confounding bias.
Have samples from both groups been collected and prepared in the same way?	Samples should be consistently handled to ensure this does not influence how they respond in laboratory experiments, e.g., test and control samples should be subjected to the same number of freeze-thaw cycles and sampling to avoid biased degradation or contamination.
D1 Risk of bias	If all above questions are answered “sim”, there is a low risk of bias. If one question is answered “não” or “não informou” there are some concerns. If more than one question is answered “não” or “não informou” there is a high risk of bias for this domain.
<b><i>Domain 2: Experimental methods</i></b>	
Is a validated methodology used? If not, is the methodology well described?	Methods used may be widely accepted, or new methods can be used that are adequately described and justified.
Has a normal range been calculated?	This study design requires appropriate statistical calculations to establish a normal range (typically considered a range of values that you would expect to see for 95% of a healthy population when conducting a specific test).
Have statistical methods been planned to compare the values of experimental groups with controls?	Prespecified methods for comparing the values of experimental groups with controls ensures that a statistical plan is followed.
Are the people evaluating the data blind to the source of the samples?	Knowledge of the group from which the samples have been obtained may introduce bias in evaluation of the data.
Is an internal and external control used?	An internal control is used to monitor and assure the reproducibility of results. An external control is a real, positive clinical sample used to monitor for errors in the experimental process.
D2 Risk of bias	If all above questions are answered “sim”, there is a low risk of bias. If one question is answered “não” or “não informou” there are some concerns. If more than one question is answered “não” or “não informou” there is a high risk of bias for this domain.
<b><i>Domain 3: Reporting of the results</i></b>	
Are the results quantified and with appropriate analysis?	Results should be fully quantified to allow appropriate analysis. For example, mean or median, Inter-quartile range or SD.
Are all, or nearly all, data available?	An appropriate analysis should include data from all samples that were included. If a subset of data is presented in the article, it should be randomly selected.

Are appropriate statistical tests used to test for differences between groups?	This allows validated comparison between values.
Are the data available in a repository and accessible to others?	Laboratory data should be made publicly available to allow external analysis and comparison. Coefficients of inter and intra assay variation should be made available.
D3 Risk of bias	If all above questions are answered “sim”, there is a low risk of bias. If one question is answered “não” or “não informou” there are some concerns. If more than one question is answered “não” or “não informou” there is a high risk of bias for this domain.
Overall risk of bias	The overall risk of bias is calculated based on the highest domain judgement. If there is high risk of bias in one or more domains, the overall risk of bias is high. If all domains are at low risk of bias, the study is at overall low risk of bias for this outcome.

---

Fonte: Adaptado de (Fox et al., 2024, p. 5).