



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL - MECS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23 EM  
PORTADORES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA AMAZÔNIA  
OCIDENTAL**

Paula Alessandra Martins da Silva

Rio Branco

2018



Paula Alessandra Martins da Silva

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23 EM PORTADORES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane de Oliveira Cardoso

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Rio Branco

2018

Universidade Federal do Acre  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental  
Curso de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23  
EM PORTADORES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL**

**Mestranda:** Paula Alessandra Martins da Silva

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Profa. Dra Cristiane de Oliveira Cardoso (Orientadora)  
Universidade Federal do Acre - UFAC

**Examinadores:**



---


Profª Dra Andreia Fernandes Brilhante – UFAC/AC (Membro Externo)

---

Profª Dra Carolina Pontes Soares – UFAC/AC (Membro Externo)

**Data da Aprovação da Defesa: 23/03/2018**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas MECs para o formato da Dissertação foram contempladas.



---

Profa. Dra Cristiane de Oliveira Cardoso

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a Deus por ter me guiado e iluminado meu caminho até aqui.

À minha família, a base da minha vida.

À minha mãe Adma Martins, em especial, por ser exemplo de perseverança e dedicação.

Ao meu esposo Maikon Fabro, sempre companheiro e compreensivo.

Ao meu bebê que vem crescendo a bordo e me dando forças pra continuar.

E principalmente aos meus amigos e companheiros de mestrado Hemeson Lira e Ranna Neves, pois sem vocês eu não teria chegado até aqui.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à grande amizade construída no mestrado, com meus amigos Hemeson Lira e Ranna Neves, por todo apoio e incentivo que me deram e me ajudaram a nunca desistir, sendo o esteio de todos os dias na luta diária durante a pesquisa e por ter colaborado muito com ela durante esses meses, sem nunca falhar. Vocês foram minhas pernas quando elas enfraqueciam.

A minha orientadora Dra Prof<sup>a</sup> Cristiane Cardoso por todo o conhecimento passado, ensinamentos, dedicação, garra, incentivo e sabedoria, um grande exemplo de pesquisadora.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem participar da banca e suas contribuições.

Aos colegas de mestrado pela ajuda toda vez que precisava tirar dúvidas sobre o trabalho.

Ao meu Coorientador Prof<sup>o</sup> Dr. Emerson Correia por me auxiliar no laboratório de genética no processamento das minhas amostras.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos passados e na insistência em nos tornar melhores na arguição em sala de aula.

Aos colegas de trabalho pelo apoio e compreensão das minhas ausências dedicadas à pesquisa.

Aos alunos de medicina da UFAC da Prof<sup>a</sup> Dra Cristiane Cardoso, pelo apoio nas coletas das amostras.





“Para a maioria dos cientistas a imunologia é adaptativa e o conhecer é visto como “adaptar-se”, é ser guiado por uma nova interação, ser instruído a acolher o novo, incorporar o que não se esperava”.

**Nelson Monteiro Vaz**



## RESUMO

**Introdução.** A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose de importância médica mundial. No Brasil, o maior coeficiente de detecção é encontrado no estado do Acre, sendo o município de Xapuri um dos que tem mais contribuído para o aumento do número casos de LTA. **Objetivo.** Caracterizar a epidemiologia e a resposta imunológica dos indivíduos portadores LTA, até novembro de 2017, no município de Xapuri – Acre, avaliando a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-23 nas amostras coletadas. **Metodologia.** Estudo retrospectivo. Amostra aleatória convencional. Foram realizadas entrevistas utilizando um questionário socioeconômico e clínico-epidemiológico, e coletadas 144 amostras. As citocinas foram dosadas através do método de Ensaio Imunoenzimático. **Resultados.** A maioria dos casos de LTA acometem indivíduos do sexo feminino, moradores da zona rural e urbana, com faixa etária entre 18 e 37 anos. Níveis diminuídos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e aumentados de IL-17A e IL-23 foram apresentados entre os grupos. Houve diferença significativa entre os grupos para IL-17A e IL-23, principalmente entre cicatriz recente e antiga, com data de lesão até três anos. **Conclusão.** O município de Xapuri apresenta uma transmissão silvestre e domiciliar da LTA. A maioria foi infectada durante a infância e as mulheres as mais acometidas. Houve uma tendência de resposta do tipo Th<sub>2</sub>, que vem sendo relacionada com o agravamento e progressão da LTA. Destacamos um aumento dos níveis das citocinas IL-17A e IL-23, até três anos da data da lesão, indicando o agravamento da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana. Imunologia. Citocinas.

IL-17A. Amazônia Ocidental.

## ABSTRACT

**Introduction.** American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a worldwide medical importance zoonosis. In Brazil, the highest coefficient of ACL detection is in the state of Acre, and Xapuri is considered one of the cities which has contributed most to the increase of ACL cases. **Objective.** This study aims to characterize the epidemiology and the immune response of individuals with ACL up to November 2017, in Xapuri, evaluating the production of cytokines IFN -  $\gamma$ , TNF -  $\alpha$ , IL - 17A and IL - 23 in the collected samples. **Methodology.** Retrospective study. Conventional random sample. The interviews were carried out using a socioeconomic and clinical-epidemiological questionnaire and 144 samples were collected. Cytokines were dosed by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Results.** In most cases female individuals, rural and urban residents, with ages from 18 to 37 years are affected. Decrease levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and increased levels of IL-17A and IL-23 were presented between the groups. There was a significant difference between the groups in the IL-17A and IL-23 levels, mainly between recent and old scar, with a lesion date up to three years for individuals with a recent scar. **Conclusion.** Xapuri presents a wild and domestic ACL transmission. Most were infected during childhood and women were the most affected. There was a tendency for Th2 type response, which has been related to the worsening and progression of ACL. It is worth mentioning an increase in cytokines IL-17A and IL-23 up to three years from the injury date, indicating a worsening of the disease.

Key words: American Cutaneous Leishmaniasis. Immunology. Cytokines. IL-17A. Western Amazon.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Mapa de casos confirmados de Leishmaniose cutânea no Mundo no ano de 2015.....14
- Figura 2** – Mapa da América do Sul com a imagem da Amazônia Legal e Internacional, demonstrando a Tríplice Fronteira (Brasil, Peru e Bolívia.....16
- Figura 3** – Perfis de resposta imunológica na Leishmaniose Cutânea.....20
- Figura 4** – Representação da diferenciação da célula  $Th_0$  em  $Th_{17}$ .....22
- Figura 5** – Representação do papel da IL-23 no perfil de resposta  $Th_{17}$ .....23
- Figura 6** – Estudos experimentais em camundongos com a IL-17 e IL-23.....24
- Figura 7** – Mapa político do Brasil, indicando a localização do Estado do Acre e destacando o município de Xapuri.....28
- Figura 8** – Mapa de geoprocessamento do município de Xapuri – Acre.....29
- Figura 9** – Prevalência do sexo dos indivíduos portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.....38
- Figura 10** – Frequência da localidade dos indivíduos controles e portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.....40
- Figura 11** – Produção de IFN- $\gamma$  quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas.....41
- Figura 12** – Produção de TNF- $\alpha$  pelos grupos de indivíduos estudados.....43
- Figura 13** – Produção de IL-17A quantificado por ELISA em 144 amostras de

soro analisadas.....45

**Figura 14** – Produção de IL-23 quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas.....46

**Figura 15** – Gráfico de dispersão demonstrando a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-23 em relação à data da lesão em anos, quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas .....48

**Fonte:** Elaborada pela autora

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Prevalência do sexo dos indivíduos portadores de LTA do município de Xapuri - Acre.....37

**Tabela 2** – Frequência da faixa etária dos portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.....39

**Tabela 3** – Frequência da localidade dos indivíduos controles e portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.....39

**Fonte:** Elaborada pela autora





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CCR6	Receptor de Quimiocina do tipo 6
CXCL1	Quimiocina de Interleucina 1
CXCL2	Quimiocina de Interleucina 2
CXCL8	Quimiocina de Interleucina 8
CXCL10	Quimiocina de Interleucina 10
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GM-CSF	Fator Estimulador da colonização de Granulócitos e Macrófagos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-17A	Interleucina 17 – membro A
IL-23	Interleucina 23
IL-23R	Receptor de Interleucina 23
IFN- $\gamma$	Interferon Fator Gama
IMAC	Instituto de Meio Ambiente do Acre
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzida
LC	Leishmaniose Cutânea
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial de Saúde
RORC	Receptor Órfão para Retinóide do subtipo C
ROR $\gamma$ (t)	Receptor Órfão para Retinóide do subtipo Gama (timo)

SINAN	Sistema de Informação e Agravos de Notificação
TCD4 <sup>+</sup>	Linfócito TCD4
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Fator Beta
Th <sub>1</sub>	Linfócito Thelper 1
Th <sub>2</sub>	Linfócito Thelper 2
Th <sub>17</sub>	Linfócito Thelper 17
Treg	Linfócito Tregulador
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Fator Alfa
UFAC	Universidade Federal do Acre
WHO	World Health Organization

**Fonte:** Elaborada pela autora

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana</b> .....	17
<b>1.2 Resposta Imune na interação entre parasita e hospedeiro</b> .....	18
<b>1.3 Interleucinas 17 (IL-17) e 23 (IL-23)</b> .....	21
<b>1.4 Estudos experimentais em camundongos com a IL-17 e IL-23</b> .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	27
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4.1 Área de estudo</b> .....	28
<b>4.2 Coleta de dados</b> .....	30
<b>4.3 População e amostra</b> .....	30
<b>4.4 Critérios de Inclusão</b> .....	31
<b>4.5 Critérios de Exclusão</b> .....	31
<b>4.6 Procedimentos Metodológicos</b> .....	31
<i>4.6.1 Coleta de dados clínicos-epidemiológicos e material biológico do indivíduo</i> .....	31
<i>4.6.2 Enzimaimunoensaio - ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)</i> .....	33
<b>4.6 Análise Estatística</b> .....	34
<b>4.8 Aspéctos Éticos</b> .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXO A – Ficha de investigação do SINAN</b> .....	56
<b>ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética da Uninorte</b> .....	58
<b>ANEXO C – Imagens fotográficas das etapas desenvolvidas na pesquisa a campo</b> .....	64
<b>APÊNDICE A – Questionário sociodemográfico e clínico epidemiológico</b> .....	71
<b>APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de materiais biológicos de humanos</b> .....	74
<b>APÊNDICE C - Termo de autorização do uso de imagem</b> .....	76



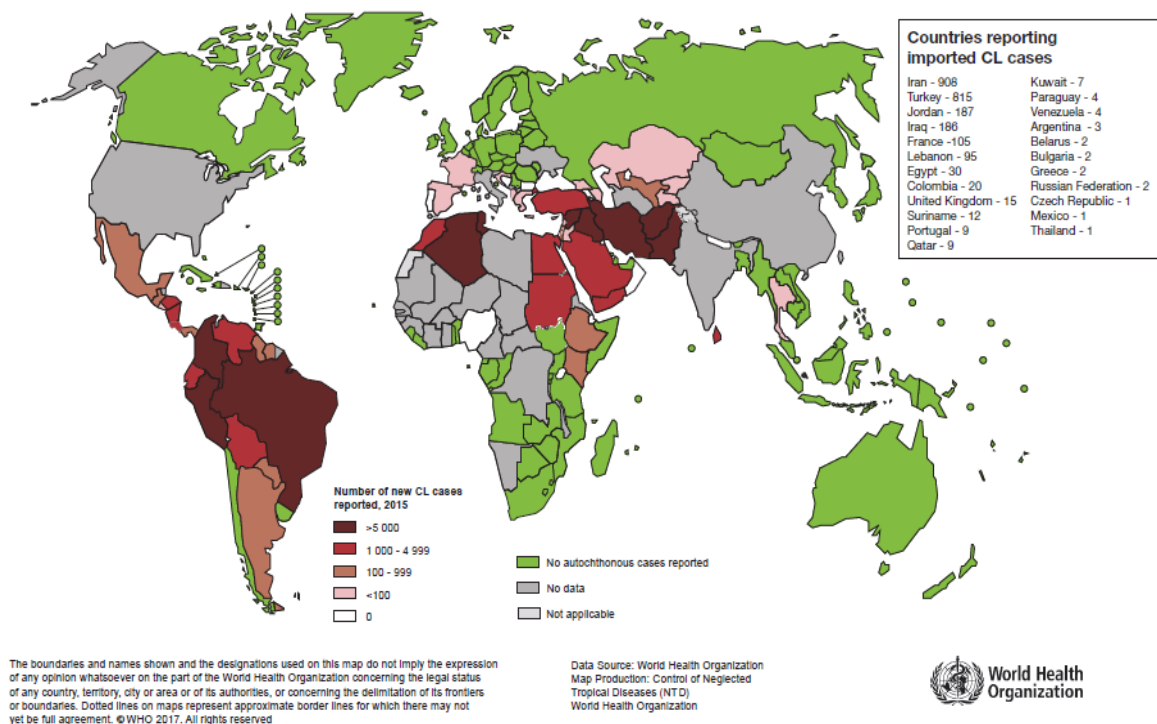
## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos entre os continentes da África, América, Ásia e Europa, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. Um total de 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas<sup>1</sup>.

No ano de 2015, o Brasil representava um dos países com número de casos mais elevados de leishmaniose cutânea no mundo, com aproximadamente 5000 casos novos no ano, assim como a Colômbia e o Peru. Houve também um grande aumento dos casos na América do Sul, África e Ásia, como mostrado no **Figura 1**. A LTA apresenta uma ampla distribuição geográfica, alto índice de casos e de difícil controle, sendo um grande problema de saúde pública no país<sup>2,3,4,5</sup>.

**Figura 1** – Mapa de casos confirmados de Leishmaniose cutânea no Mundo no ano de 2015.

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015



**Fonte:** WHO – [www.who.int/leishmaniasis/burden/Status\\_of\\_endemicity\\_of\\_CL\\_worldwide\\_2015\\_with\\_imported\\_cases](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases)

De acordo com os dados notificados no Sistema de Informação e Agravos de Notificação - SINAN/DATASUS, no período de 2005 a 2015 houve um crescente

aumento dos números de casos confirmados da LTA no Brasil. Os maiores índices foram registrados no período de 2010 e 2015, na maioria das vezes a Região Norte liderou. No ano de 2015, conforme o DATASUS foram confirmados mais de 20 mil casos de LTA, onde 46% deles foi registrado na região Norte do país, o que mostra a grande representatividade da região no Brasil<sup>6</sup>.

A região Norte merece grande atenção, por ser uma área endêmica em alguns Estados, em virtude de sua ampla floresta Amazônica, clima tropical, desmatamento, crescimento da área urbana e proximidade da área rural, além de abertura de estradas, favorecendo o aumento da prevalência da doença na região<sup>7</sup>.

Entre 2005 e 2015, o Estado do Pará obteve o maior número de casos confirmados notificados pelo SINAN (DATASUS), durante o período, liderando os índices em todos esses anos. O mais elevado índice do período na Região Norte, foi registrado no ano de 2015. O Pará representou 40% de casos confirmados e o Acre 12% neste ano. Comparado aos anos anteriores, houve uma diferença estatística muito grande, o que pode indicar um aumento desse número e/ou uma maior notificação, já que se trata de uma doença subnotificada e negligenciada pelas autoridades<sup>6</sup>.

Em especial, temos a tríplice fronteira (**Figura 2**) na região Norte do Brasil (Brasil – Peru – Bolívia), que precisa ser monitorada, pois a existência de um intenso fluxo migratório pode estar associada aos altos índices de LTA. Os três países são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose mucosa no mundo<sup>8</sup>. Fazendo fronteira com estes dois países, no Brasil temos o Estado do Acre, que segundo Teles<sup>9</sup> e Guzmán<sup>10</sup>, é considerado o Estado com o mais elevado índice de LTA nos últimos anos.

**Figura 2** – Mapa da América do Sul com a imagem da Amazônia Legal e Internacional, demonstrando a Tríplice Fronteira (Brasil, Peru e Bolívia)



**Fonte:** Portal Amazônia, Santos, 2016.

O Estado está dividido em duas macrorregiões, o Vale do Acre e o Vale do Juruá, e em cinco microrregiões (Cruzeiro do Sul, Brasiléia, Rio Branco, Sena Madureira e Tarauacá)<sup>11</sup> destas, Brasiléia e Sena Madureira são as que possuem maior relevância no estado do Acre com relação à LTA<sup>4,5,12</sup>.

O vale do Acre é a região que apresenta o mais elevado número de casos de LTA do Estado, sendo o município de Xapuri um dos principais focos da doença. Dados do SINAN mostram que no período de 2013 a 2015, o município de Xapuri, foi o terceiro município com mais número de casos confirmados de LTA no estado, perdendo apenas para a capital Rio Branco, que liderou os casos, e o município de Sena Madureira<sup>4,5</sup>.

Fatores demográficos e econômicos estão diretamente relacionados com a doença, onde a população mais pobre é a mais vulnerável. O contato com as florestas, os desmatamentos, construção de barragens e migração de pessoas não

imunes para áreas endêmicas são os principais fatores para a expansão da LTA e o aumento do número de casos de portadores da doença<sup>7,13</sup>.

### 1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

Há uma variedade de agentes, hospedeiros e vetores, constituindo um complexo padrão de transmissão para a leishmaniose. As três espécies de *Leishmania*, como agentes etiológicos da LTA mais encontradas no Brasil, são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) brasiliensis*<sup>14</sup>. É uma doença infecciosa e parasitária, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*<sup>15</sup>.

É considerada uma zoonose<sup>16</sup> e seu ciclo de vida é do tipo heteroxeno, tendo hospedeiros vertebrados e um inseto como vetor. São transmitidos por vários gêneros e espécies de flebotomídeos, através da regurgitação das formas promastigotas do parasito pelas fêmeas infectadas durante o hematofagismo<sup>17,18</sup>.

A doença se manifesta de duas formas: tegumentar e visceral<sup>19</sup>. A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave, acometendo fígado, baço e a medula óssea, com risco de complicações e morte se não for tratada. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta lesões do tipo cutânea, mucocutânea e disseminada<sup>20</sup>, ocorrendo inicialmente na pele, podendo se manifestar apenas no local da inoculação ou se expandir para outras regiões da pele e mucosas, como nariz, laringe e orofaringe<sup>21,22,23</sup>.

A leishmaniose cutânea apresenta lesões crostosas em forma de úlcera e bordas elevadas, com formação de mácula, pápula ou nódulo. Essas lesões, muitas vezes, apresentam infiltrações purulentas pela colonização de bactérias e fungos<sup>22,23,24</sup>.

A leishmaniose mucosa é um agravamento da cutânea, portanto, é secundária a ela, acometendo regiões mucosas de uma forma mais grave, inicialmente com ulcerações superficiais e, posteriormente, com ulcerações mais severas, podendo ocasionar mutilações dos órgãos atingidos<sup>23,24</sup>.

O diagnóstico clínico se dá através das características da lesão associado aos fatores epidemiológicos e história clínica do indivíduo. Além disso, é feito o diagnóstico laboratorial, que é de suma importância para o direcionamento do paciente ao tratamento adequado e para minimizar os possíveis agravos, a exemplo



de severas mutilações. Entretanto, o diagnóstico desta patologia não é fácil de ser realizado, uma vez que os sinais e sintomas podem estar presentes em outras enfermidades e comumente configuram doenças dermatológicas<sup>25,26</sup>.

A identificação dos indivíduos assintomáticos baseia-se em resultados positivos de testes sorológicos e Intradermorreação de Montenegro (IDRM)<sup>27</sup>, em indivíduos aparentemente saudáveis, residentes em áreas de transmissão de LTA, com história prévia negativa para LTA e ausência de cicatriz sugestiva de lesão cutânea. Para confirmação da infecção por LTA é realizada o método parasitológico de raspagem da lesão, sendo esse fundamental para o diagnóstico diferencial com outras doenças, como sífilis, hanseníase, paracoccidioidomicose, histoplasmose, picadas de insetos, dentre outros<sup>26, 28,29</sup>.

Fatores imunes intrínsecos ao hospedeiro determinam processos de recidiva das lesões em todas as formas clínicas da LTA<sup>30</sup>. Esta recidiva pode estar associada a uma recaída infecciosa ou uma infecção perene. Por isso, Corvalan<sup>26</sup> enfatiza a importância da resposta imune-celular no que diz respeito à resistência à infecção e à recuperação do indivíduo, que irá depender da interação entre parasita e hospedeiro.

## **1.2 Resposta Imune na interação entre parasita e hospedeiro**

A infecção se inicia quando o flebotomíneo inocula as formas promastigotas da *Leishmania* no hospedeiro homem, durante a hematofagia. As formas metacíclicas infectantes que conseguem passar pela primeira linha de defesa do organismo do hospedeiro é fagocitada pelos macrófagos e células dendríticas (células apresentadoras de antígeno), aonde irão se desenvolver na forma de amastigotas, com posterior multiplicação por divisão binária. O curso da infecção é totalmente dependente da resposta imune do hospedeiro e da interação com a espécie de *Leishmania*<sup>22,31</sup>.

A célula apresentadora de antígeno (APC) fagocita a *Leishmania*, ativando a resposta imune inata do hospedeiro, recrutando novos macrófagos para o local da infecção e secretando a citocina IL-12 para ativação da célula Natural Killer (NK), que libera a citocina IFN- $\gamma$  ativando os macrófagos com consequente eliminação do parasita. O macrófago infectado atinge o sistema linfático, apresentando o antígeno aos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, onde a resposta imune adaptativa será iniciada com liberação

de citocinas, definindo o perfil imunológico que irá provocar a eliminação ou persistência do parasita no hospedeiro (**Figura 3**)<sup>32</sup>.

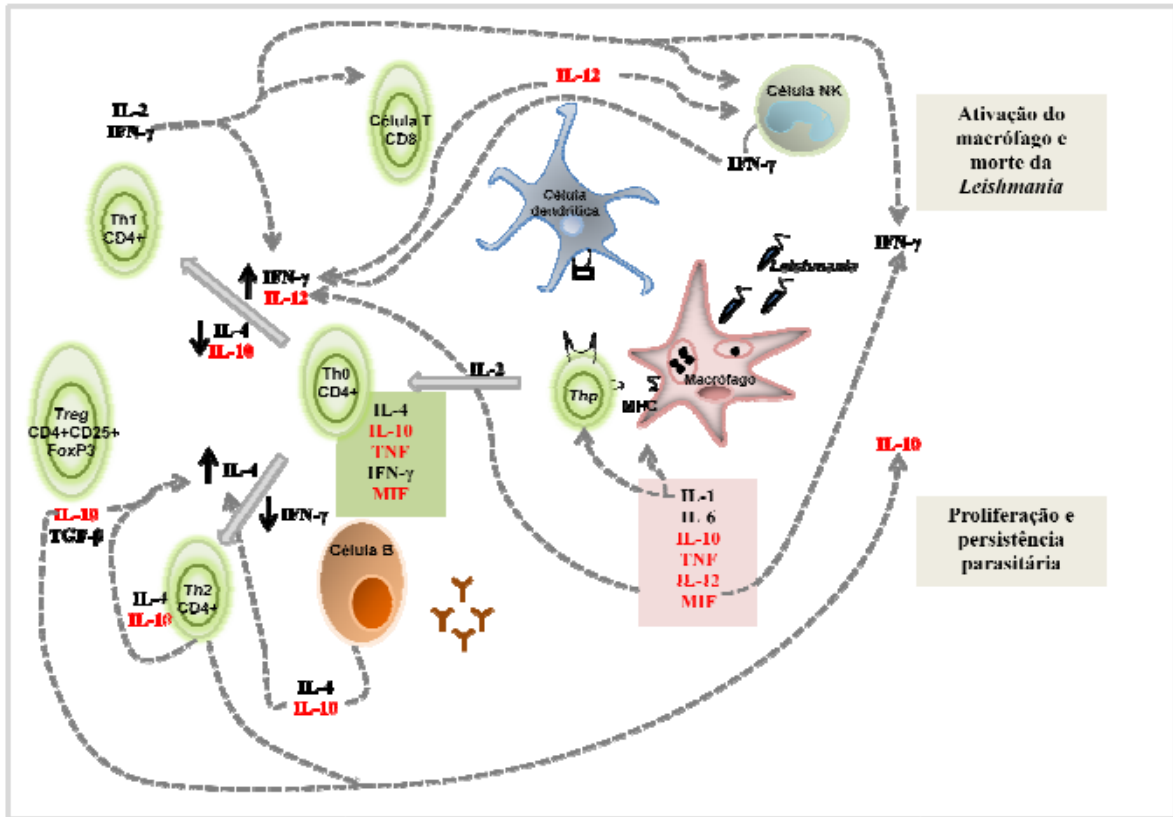
As citocinas são glicoproteínas ou polipeptídeos de baixo peso molecular. São consideradas quimiocinas quando desempenham o papel de recrutar células para o local da infecção. Podem também ativar células tornando-as efetoras e controlar a secreção de outras citocinas. Muitas são consideradas pro-inflamatórias, liberadas durante uma resposta imunológica, e outras homeostáticas, controlando a migração celular<sup>33,34</sup>. São classificadas como Interleucinas (IL), Fator de Necrose Tumoral (TNF), quimiocinas (quimiotaxia), Interferons (IFN) e Fatores de Crescimento mesenquimal<sup>35,36</sup>.

Quando o linfócito inativo (naive) é ativado através da apresentação do antígeno e liberação de citocinas pela APC, este se tornará efetor (Th<sub>0</sub>) e irá desempenhar seu papel conforme as citocinas que forem secretadas. Estudos imunológicos identificaram que a *Leishmania* é capaz de ativar especificamente o tipo de resposta imunológica do indivíduo infectado, definindo qual o perfil de diferenciação irá acontecer com o Linfócito Th<sub>0</sub> no hospedeiro (**Figura 3**)<sup>32,37,38</sup>.

O Linfócito Th<sub>0</sub> pode se diferenciar, preferencialmente, em célula Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>. Caso sejam secretadas as citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  com diminuição de IL-4 e IL-10 a célula irá se diferenciar em Th<sub>1</sub>, com possível eliminação do parasito através da ativação de células NK e do macrófago infectado. Na ocorrência da liberação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF $\beta$  (Fator de Transformação do Crescimento) e diminuição de IFN- $\gamma$ , o perfil de resposta será do tipo Th<sub>2</sub>, que ativa a célula B para produção de anticorpos específicos que não conseguem eliminar o antígeno, portanto, está associado à proliferação e persistência do parasito (**Figura 3**)<sup>13,32,37,38</sup>.

Além disso, o linfócito TCD4<sup>+</sup> pode diferenciar-se em Treg, com a secreção e liberação de citocinas IL-10 e TGF $\beta$ . São células reguladoras, capazes de suprimir a atividade de macrófagos, controlando os perfis Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, evitando uma exacerbação da resposta imunológica e aumento da inflamação (**Figura 3**)<sup>39,40</sup>.

**Figura 3** – Perfis de resposta imunológica na Leishmaniose Cutânea.



**Fonte:** Hozmuller *et al.*, 2006, adaptada por Covas<sup>13</sup>.

Estudos experimentais relacionados com a produção de IFN- $\gamma$  na LTA demonstraram que indivíduos vivendo em regiões endêmicas para a doença, com secreção de IFN- $\gamma$ , sem lesões passadas ou ativas, são resistentes ao desenvolvimento das lesões. Além disso, quando utilizado extrato de *L. brasiliensis* em cultura celular desses pacientes, eles produziram IFN- $\gamma$ , confirmando a exposição à infecção. Acredita-se que estes indivíduos resistiram à doença através da produção de IFN- $\gamma$ , controlando a infecção, sem lesão detectável, com cura espontânea<sup>41</sup>.

Em modelos experimentais, apresentaram aumento da IL-10, indicando ser um modulador para o perfil Th<sub>2</sub> interferindo no desenvolvimento do padrão Th<sub>1</sub>. Além disso, foi identificado que o aumento da IL-10 e TGF $\beta$  impediram a cicatrização das lesões, sugerindo que estas duas citocinas neutralizam os níveis de IFN- $\gamma$ <sup>41</sup>. Quando a IL-10 foi removida apresentaram proteção para a LTA<sup>40,42,43</sup>.

Outra população de células foi relacionada com a produção de IL-10<sup>44</sup>, a célula Th<sub>17</sub>, que secreta a interleucina 17 (IL-17)<sup>45</sup>. Esta subpopulação vem sendo relacionada com a progressão de diversas doenças, como o Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e a Artrite Reumatóide. Outra citocina descoberta recentemente é a IL-23<sup>46</sup>, que está envolvida com o desenvolvimento de doenças autoimunes.

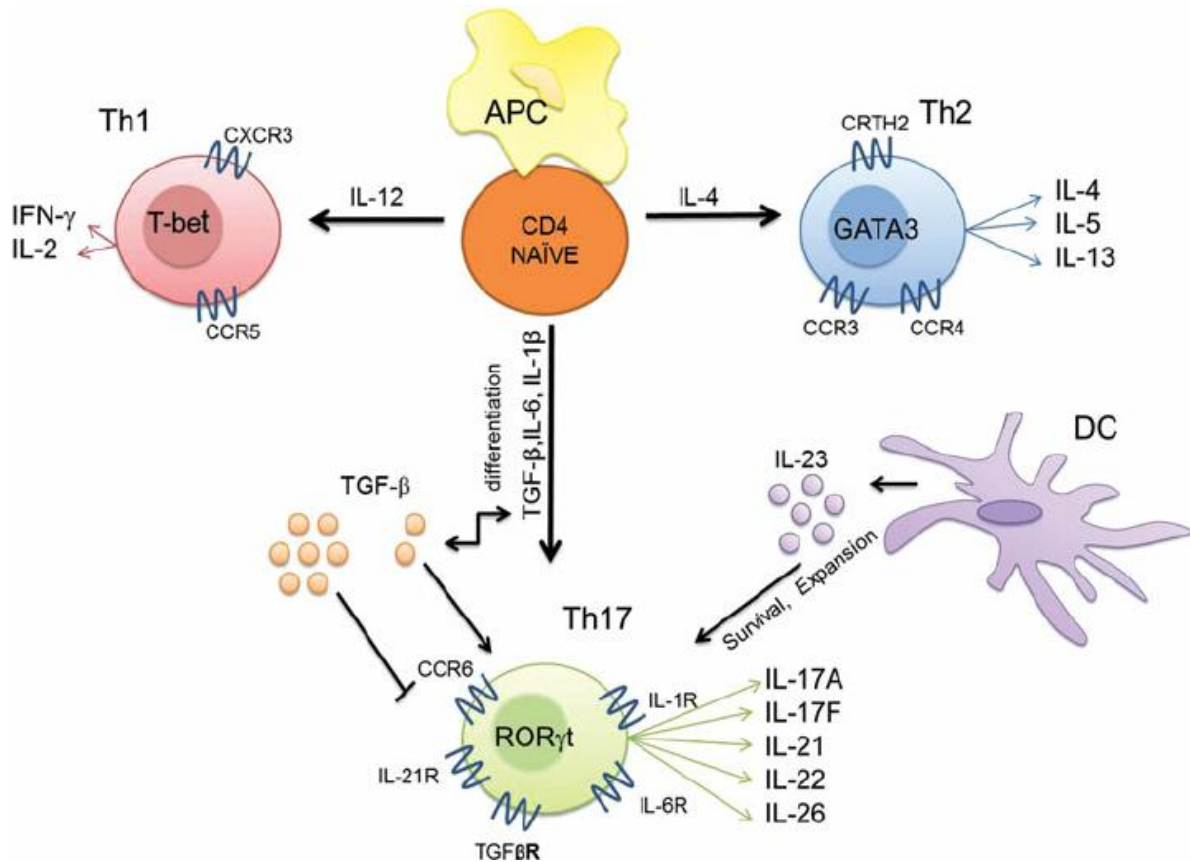
### 1.3 Interleucinas 17 (IL-17) e 23 (IL-23)

A interleucina IL-17 tem o papel de ativar outras células e induzir uma resposta inflamatória, desencadeando o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para a inflamação, através da liberação de quimiocinas pelas células endoteliais, danificando o tecido inflamado. Estudos realizados em camundongos têm associado a produção da IL-17 à progressão e cronicidade de doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas, como a LTA<sup>45,47,48,49</sup>.

A IL-23 faz parte da família de interleucinas IL-12<sup>46</sup> e é quem conduz a expansão das células Th<sub>17</sub><sup>50,51</sup>, sendo crucial na produção da interleucina IL-17 e na manutenção do infiltrado neutrofílico, ocasionando a persistência do parasita em seu hospedeiro e favorecendo a progressão e o agravamento de doenças autoimunes e inflamatórias<sup>52,53,54</sup>.

Com a secreção das citocinas IL-1, IL-6, IL-21 e TGF- $\beta$ , a célula Th<sub>0</sub> se diferencia em Th<sub>17</sub>. A célula Th<sub>17</sub> expressa o gene CCR6 que está associado ao fator de transcrição ROR $\gamma$ t e receptores das citocinas IL-1 (IL-1R), IL-6 (IL-6R), IL-21 (IL-21R) e TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R), todos envolvidos na diferenciação do linfócito em Th<sub>17</sub>. Normalmente, níveis aumentados de TGF- $\beta$  favorecem a diferenciação da Th<sub>0</sub> em Treg, mas em níveis baixos, favorece a diferenciação do Linfócito TCD4<sup>+</sup> em Th<sub>17</sub>. Outro receptor de interleucina que a mesma expressa é a IL-23R (**Figura 4**)<sup>32,47,55,56,57,58,59,60,61,62</sup>.

**Figura 4** – Representação da diferenciação da célula Th<sub>0</sub> em Th<sub>17</sub>.



**Fonte:** Garrido-Mesa, N et al. Functional Plasticity of Th17 Cells: Implications in Gastrointestinal Tract Function, 2013.

A IL-23 é produzida pela APC, que se liga ao seu receptor na Th<sub>17</sub>, favorecendo a expansão clonal da célula e mantendo os níveis da interleucina IL-17 produzida pela Th<sub>17</sub>. A IL-23 é responsável pela manutenção do infiltrado neutrofílico que configura o agravamento da doença. Os níveis de IL-23 são dependentes da regulação pela IL-6, produzidas pelas APCs (**Figura 5**)<sup>47,48</sup>.

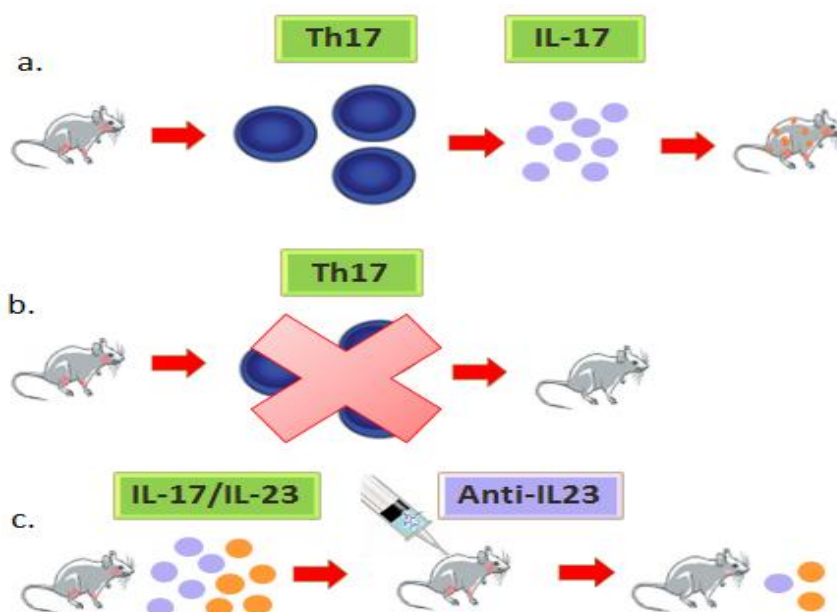


#### 1.4 Estudos experimentais em camundongos com a IL-17 e IL-17

Experimentos com camundongos indicaram que a IL-17 tem efeito protetor na Leishmaniose Visceral<sup>67</sup>. Enquanto que na LTA, observou-se uma grande produção de células Th<sub>17</sub> com secreção de IL-17, sendo um importante modulador da infecção patogênica e progressão da LTA, juntamente com liberação das interleucinas IL-23, IL-1 e uma resposta do tipo Th<sub>2</sub>, além da manutenção do infiltrado neutrofílico, intensificando a inflamação e dano tecidual (**Figura 6a**). Em camundongos portadores da LTA, onde houve a inibição da diferenciação em Th<sub>17</sub>, a doença não progrediu e verificou-se uma melhora do quadro clínico (**Figura 6b**)<sup>67,68,69,70,71</sup>.

Estudos em camundongos utilizando anticorpos Anti-IL-23, com níveis elevados de IL-23 e IL-17, para inibição da IL-23, apresentou uma boa melhora no quadro clínico, com redução dos níveis das interleucinas e dos focos inflamatórios, impedindo a progressão e recaídas em algumas doenças autoimunes, como na encefalomielite. Dessa forma, demonstrou ser uma terapia eficaz, indicando que a interleucinas está totalmente ligada a gravidade da doença e na manutenção da expansão da Th<sub>17</sub> e, conseqüentemente, dos níveis de IL-17 na inflamação (**Figura 6c**)<sup>71</sup>.

**Figura 6** – Estudos experimentais em camundongos com a IL-17 e IL-23



**Fonte:** Ilustração da própria autora.

Este estudo busca identificar se as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL17A e IL-23 estão sendo produzidas pelos indivíduos portadores e não portadores da LTA nessa população. E dessa forma, poder avaliar a relação dessas citocinas com a progressão e agravamento da doença.



## 2 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos com as leishmanioses, em várias regiões do Brasil, têm sido realizados. O estado do Acre possui a maior taxa de detecção da doença no país, com estudos avançados em fauna e epidemiologia, mas carente na compreensão do comportamento do hospedeiro.

Este trabalho subsidiará novos estudos imunológicos no Acre em indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana provenientes de área endêmica, além de contribuir para elucidar parte da dinâmica da resposta imunológica frente a essa parasitose.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a epidemiologia e a produção de citocinas em indivíduos portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), até novembro de 2017, no município de Xapuri – Acre.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

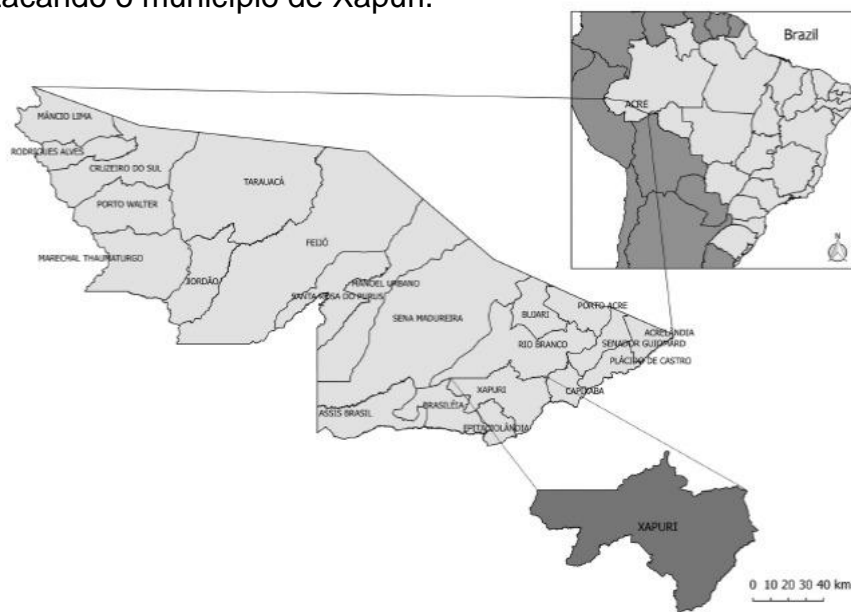
- Determinar a epidemiologia dos indivíduos estudados na população do município de Xapuri – Acre, portadores ou não da LTA;
- Verificar a existência da citocina IFN- $\gamma$  nas amostras de sangue venoso coletadas de indivíduos portadores ou não da LTA;
- Verificar a existência da citocina TNF- $\alpha$  nas amostras de sangue venoso coletadas de indivíduos portadores ou não da LTA;
- Verificar a existência da citocina IL-17A nas amostras de sangue venoso coletadas de indivíduos portadores ou não da LTA;
- Verificar a existência da citocina IL-23 nas amostras de sangue venoso coletadas de indivíduos portadores ou não da LTA.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

A área de estudo foi o município de Xapuri – Acre, que está localizado a 188 km da capital Rio Branco, é banhado pelos Rios Acre e Xapuri. Está situada ao sul com Eпитaciolândia, a leste com Capixaba, ao norte com o município de Rio Branco, a sudoeste com o município de Brasiléia e a oeste com Sena Madureira<sup>72</sup>, como no mapa da **Figura 7**. Segundo o IBGE<sup>73</sup>, em 2016, população estimada era de 17.894 habitantes, com 5.347,468 km<sup>2</sup> de área territorial.

**Figura 7** - Mapa político do Brasil, indicando a localização do Estado do Acre e destacando o município de Xapuri.



**Fonte:** Brilhante, Andreia F. et al., Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia, 2017.

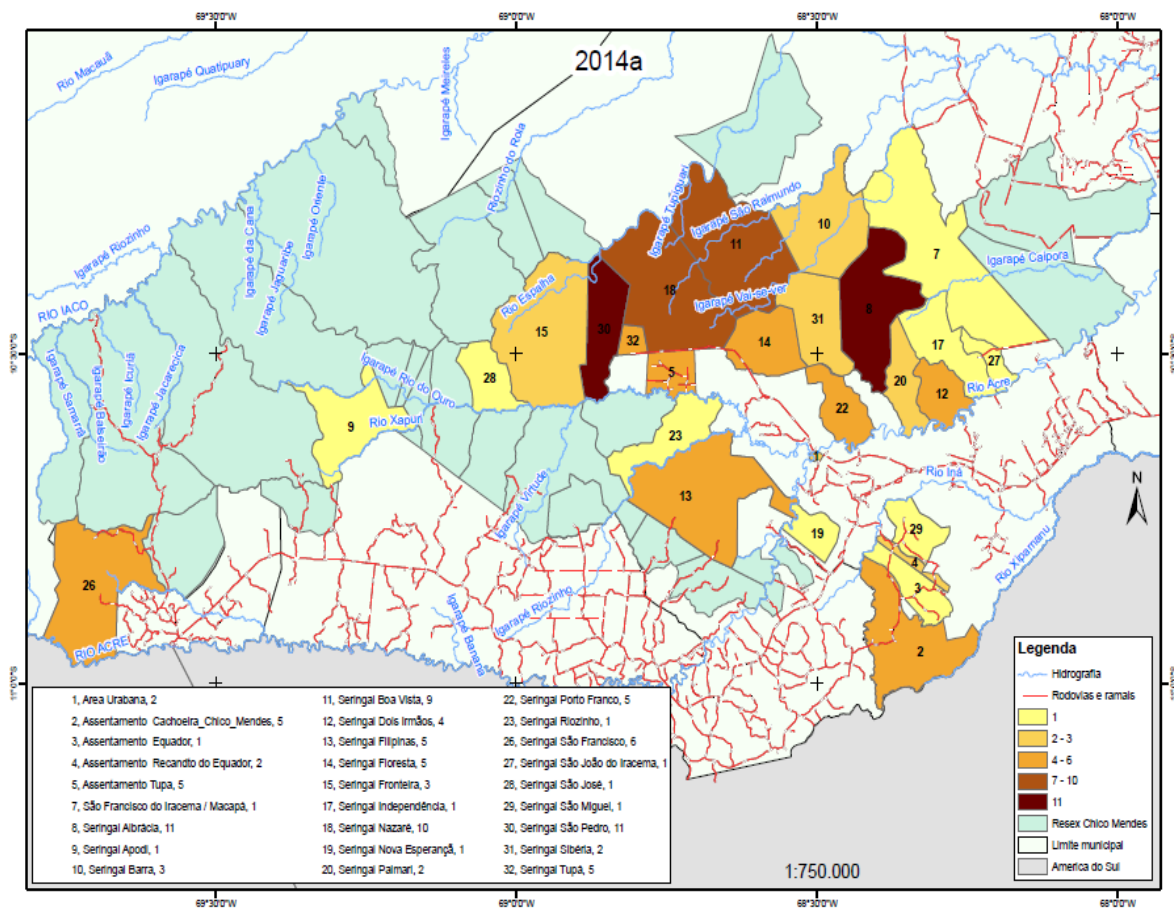
O município era habitado pela tribo indígena Xapurys, que originou o nome atual do município. Ele foi colonizado em 1861, por Manoel Urbano da Encarnação. O local de confluência do Rio Acre com o Rio Xapuri era estratégico para o comércio no Ciclo da Borracha. Só em 1903, durante a Revolução Acreana, o município foi

tomado pelas tropas do Coronel Plácido de Castro. Tornou-se uma vila em 1904 e oficialmente um município em 1912<sup>73,74</sup>.

É conhecido pela luta dos seringalistas, em 1980, em defesa dos seringais nativos, que tinha como líder ativista Chico Mendes, de onde veio o nome da Reserva Extrativista Chico Mendes<sup>72,73,74</sup>.

O município é dividido em distritos com nomes de seringais e assentamentos feitos recentemente, na zona rural/ramais. As coletas foram realizadas na zona urbana de Xapuri, além de comunidades rurais, como Seringal Sibéria, Seringal Boa Vista, Assentamento Cachoeira Chico Mendes, Assentamento Equador e Recanto do Equador, como mostrado no mapa<sup>75</sup> da **Figura 8**.

**Figura 8** - Mapa de geoprocessamento do município de Xapuri – Acre, 2016.



**Fonte:** Instituto de meio Ambiente do Acre – IMAC

## 4.2 Coleta de dados

Os dados foram coletados a partir de uma entrevista na abordagem do paciente em suas residências, Hospital e unidades de saúde do município de Xapuri, através da aplicação de um questionário contendo informações pessoais, clínicas e epidemiológicas do mesmo baseado na Ficha de Investigação do SINAN (Apêndice A e Anexo A).

## 4.3 População e amostra

O estudo foi do tipo qualitativo experimental retrospectivo, utilizando amostras do tipo aleatória convencional que envolve os indivíduos residentes no município de Xapuri, portadores da LTA, ou seja, presença de lesão ou cicatriz característica da doença, com histórico e/ou confirmação, que se mantiveram em repouso e sem nenhuma outra comorbidade. E o grupo controle, que são indivíduos sem lesão ou cicatriz característica de leishmaniose, nas mesmas condições que os portadores.

Os indivíduos selecionados são maiores de 18 anos, tanto da zona urbana como da zona rural, independente do sexo, que apresentaram a presença ou ausência da lesão ou cicatriz até novembro de 2017. Foram selecionados 195 indivíduos para coleta de dados clínico-epidemiológicos, destes 144 amostras de sangue foram coletadas para dosagem das citocinas.

Para avaliação da concentração das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-23, as 144 amostras foram testadas e divididas em 4 grupos para análise estatística: 39 amostras do grupo controle (grupo "0"); 32 com lesões ativas (grupo "1"); 7 com cicatrizes recentes até 3 anos (grupo "2"); e 66 com cicatrizes antigas acima de 3 anos (grupo "3"). Estas amostras foram dosadas pelo método de ELISA, utilizando anticorpos sensibilizados em placas.

O material coletado foi processado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Uberaba – Minas Gerais.

#### 4.4 Critérios de Inclusão

- Indivíduos diagnosticados para LTA até o ano de 2017, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B) e o termo de uso de imagem (Apêndice C), autorizando a sua participação na pesquisa.
- Indivíduos negativos para LTA, vivendo no mesmo ambiente dos portadores, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B) e o termo de uso de imagem (Apêndice C), autorizando a sua participação na pesquisa.

#### 4.5 Critérios de Exclusão

- Indivíduos que no momento da coleta estiveram com comorbidades;
- Menores de 18 anos;
- Indígenas;
- Indivíduos que não concordaram em participar da pesquisa.

#### 4.6 Procedimentos Metodológicos

##### *4.6.1 Coleta de dados clínicos-epidemiológicos e material biológico do indivíduo*

A equipe foi composta pela pesquisadora e orientadora do mestrado de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Acre (UFAC), mestrandos de Ciências da Saúde (biomédica, biólogo e gestora em saúde coletiva), alunos do curso de medicina da UFAC e um agente de saúde de Xapuri que foi o guia local para as coletas. Estes foram treinados para o preenchimento do questionário, para coleta sanguínea (biomédica e estudantes de medicina) e coleta de células da mucosa oral (biomédica, biólogo e gestora em saúde coletiva).

As coletas foram realizadas em locais distintos tanto dentro da cidade como na zona Rural. Para tanto foram necessárias 10 visitas à campo com tempo de permanência de 3 dias cada vista. Na zona rural de Xapuri, enquanto fosse possível

trafegar as coletas eram executadas, nos demais períodos usava-se o tempo para a coleta urbana.

Os indivíduos, maiores de idade, eram abordados em suas residências, tanto no centro de Xapuri quanto em comunidades de zonas rurais/ramais do município, nos Hospitais e nas unidades de saúde central do município. Estes eram convidados a participar da pesquisa, onde foi esclarecido o objetivo, informando-o a respeito dos procedimentos (coleta de dados sociodemográficos, clínico-epidemiológicos, amostras biológicas e fotografias da lesão/cicatriz), e a importância deste estudo para a população, além da leitura e explicação dos termos de autorização e a não divulgação de seu nome na pesquisa.

Após o parecer favorável do indivíduo quanto a sua participação na pesquisa, este formalizou seu aceite assinando os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B) e Termo de Autorização do Uso de Imagem (Apêndice C), necessários para realização deste estudo, ambos em duas vias e rubricados em todas as páginas pelo pesquisador, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador responsável, necessários para realização deste estudo.

Por conseguinte, o indivíduo respondeu a um questionário estruturado sociodemográfico e clínico-epidemiológico (Apêndice A), além da imagem fotografada restrita às lesões/cicatrizes que o mesmo possuía.

A coleta de sangue total foi realizada por punção venosa, na própria residência do indivíduo ou na unidade de saúde, utilizando um tubo sem coagulante (para dosagem de citocinas), com volume de 10 ml, para análise do soro. Outro tubo de 4 ml com EDTA foi utilizado para coleta do plasma (extração de DNA). Os tubos com o sangue foram armazenados em isopor com gelox entre 2°C e 8°C. Após as coletas do dia, as amostras eram centrifugadas por 15 minutos a 3400 rpm para separação do soro e plasma e aliqüotados em microtubos de 1,5 ml e armazenadas em freezer a -20°C.

Após, 3 dias de coletas, as amostras armazenadas foram coladas em isopor com gelox, entre 2 e 8°C e transportadas para o laboratório de genética da UFAC, onde eram armazenadas em freezer a -20°C, para posterior dosagem das citocinas de escolha através do soro, pelo método de ELISA.

As amostras de soro congeladas foram encaminhadas, em isopor com gelo seco, para um laboratório de apoio, o Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Uberaba –

Minas Gerais, para a dosagem das citocinas de escolha (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23) através da técnica de ELISA.

As amostras foram utilizadas apenas para esta pesquisa, conforme projeto aprovado pelo CEP da União Educacional do Norte – UNINORTE/AC (Anexo B), portanto, não serão feitos biorrepositórios ou biobancos para uso futuro.

#### 4.6.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)

As citocinas e quimiocinas presentes no soro, foram dosadas com kits da BD-PHARMINGEM - USA, utilizando-se placas com 96 poços de fundo chato (NUNC-Maxisorp, USA). As placas foram sensibilizadas com 50 $\mu$ l de anticorpo primário (1 $\mu$ g/ml) em tampão carbonato para sensibilização (pH = 7,4). As placas recobertas pelos anticorpos permaneceram incubadas “overnight” à 4-8°C e posteriormente foram lavadas com PBS/Tween a 0,05% em lavadora automática, bloqueadas com 20 $\mu$ l para IFN- $\gamma$  e 40 $\mu$ l para TNF- $\alpha$ , IL-17A E IL-23 de PBS/BSA 0,1% (4 horas/temperatura ambiente) e lavadas novamente com PBS/Tween 0,05%. As amostras de sobrenadante ou plasma diluídas 1:1 em PBS/BSA 1% foram adicionadas às placas, e paralelamente realizada a curva padrão com diluição seriada da respectiva citocina ou quimiocina recombinante. As amostras juntamente com a curva padrão foram incubadas “overnight” a 4° C. As cavidades foram então lavadas com PBS/Tween 20 à 0,05 % e distribuía-se posteriormente 50 $\mu$ l/poço de anticorpo secundário (1 $\mu$ g/ml) permanecendo por três a quatro horas à temperatura ambiente e lavando-se com solução de PBS/Tween 20 à 0,05%. Após esta etapa, pipeta-se 50  $\mu$ l/poço de estreptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (0,5 $\mu$ l/ml em solução de PBS/BSA 1%), permanecendo por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lava-se com solução de PBS/Tween à 0,05% adicionando-se 100 $\mu$ l por poço do substrato p-nitrofenilfosfato (pNpp tabletes, SIGMA- USA) dissolvido em água destilada e realiza-se leitura a 405 nm.



#### **4.7 Análise Estatística**

Os dados clínico-epidemiológicos foram agrupados por meio de uma planilha eletrônica no programa EXCEL com os critérios de relevância do estudo, para análise de frequência absoluta e frequência simples de idade e localidade, além da prevalência de portadores de acordo com sexo dos indivíduos estudados, para sua caracterização. Para avaliação da produção das citocinas os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo aplicativo Statview. Os testes não-paramétricos foram aplicados para dados com distribuição não Gaussiana, expressos em medianas e quartis de 25% e 75%, no gráfico de caixa Box Plot e um gráfico de dispersão para cada citocina, de acordo com sua concentração. No gráfico de box plot foi avaliada a concentração de cada citocina para cada grupo. O gráfico de dispersão avaliou a concentração da citocina de acordo com a data da lesão/cicatriz de cada indivíduo para cada grupo.

Os testes utilizados para avaliar os níveis de significância foram os Teste de Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney e Bonferroni/Dunn. As correlações foram feitas através do teste de Spearman. O nível de significância para todos os teste foi de 5%.

#### **4.8 Aspéctos Éticos**

As providências empregadas para redução dos riscos envolveram profissionais capacitados para realização da coleta de material biológico, restrição da imagem do indivíduo com exibição, apenas, das lesões/cicatrices de interesse para pesquisa, sigilo e discrição quanto à identidade e informações fornecidas pelos mesmos, onde os nomes não serão citados na divulgação da pesquisa.

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da União Educacional do Norte (UNINORTE) de Rio Branco - Acre, e obteve parecer favorável para a sua execução, conforme projeto aprovado (CAEE 63499416.1.0000.5009) (Anexo B).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo epidemiológico, contou com a participação de 195 (n) indivíduos para avaliação de sexo, faixa etária e localidade entre portadores e não portadores (grupo controle) da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Xapuri – Acre. Destes 18 indivíduos (cerca de 9%) fazem parte do grupo controle e 177 (91%) são portadores da LTA.

Entre indivíduos portadores, 122 são do sexo feminino e 55 do sexo masculino, conforme mostra a **Tabela 1**. De acordo com a **Figura 9** a maior prevalência de portadores foi registrada no sexo feminino, com 1,4% e o sexo masculino representou apenas 0,4%.

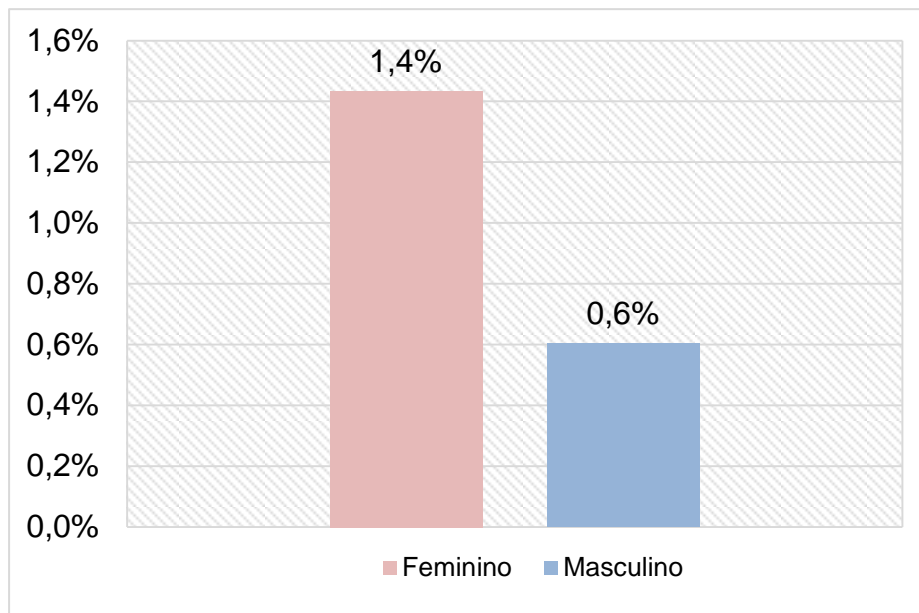
**Tabela 1** - Prevalência do sexo dos indivíduos portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.

Sexo	Portadores (n)	População de Xapuri no ano de 2016 (SINAN)	PREVALÊNCIA
Feminino	122	8507	1,4%
Masculino	55	9099	0,6%
<b>TOTAL</b>	<b>177*</b>	<b>17606**</b>	<b>1,0%</b>

n: portadores de LTA;

\*Total de indivíduos portadores da LTA. \*\*População de Xapuri em 2016.

**Figura 9** – Prevalência do sexo dos indivíduos portadores de LTA do município de Xapuri – Acre. Gráfico mostrando a prevalência da LTA nos sexos feminino e masculino dos indivíduos entrevistados.



Fonte: Produção do próprio autor.

Normalmente, a LTA está associada ao desmatamento, exploração da floresta e agricultura<sup>76</sup>, portanto, em virtude das atividades laborais na mata e de lazer, como a pesca, estarem relacionadas ao homem, geralmente, a doença está mais aumentada no sexo masculino com a sua exposição, como indicou Chagas *et al.*<sup>77</sup>, Silva M *et al.*<sup>78</sup>.

Ao contrário do que dizem os autores acima, no estudo aqui realizado, o sexo feminino prevaleceu com 69% dos casos em portadores, assim como indicou Silva e Muniz<sup>4</sup> na sua pesquisa no Estado do Acre, onde relatou que o município de Xapuri foi o que mais contribuiu no número de casos entre as mulheres e Rosa<sup>79</sup> em uma pesquisa no Paraná sobre LTA.

A frequência de idade apresenta distribuição normal entre os indivíduos com faixa etária de 18 a 67 anos, onde grande parte dos sujeitos estudados está na faixa de 18 a 37 anos, representando 40% dos indivíduos portadores de LTA. Os idosos, entre 58 e 89 anos de idade, representaram 20% dos portadores. A variação da faixa etária predominante foi entre 28 e 37 anos de idade, representando 21%. Entre os indivíduos controles, predominou a faixa etária de 28 a 37 anos de idade, totalizando 3,6% dos indivíduos estudados, conforme a **Tabela 2**, abaixo.

**Tabela 2** - Frequência da faixa etária dos portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.

Idade	Controles		Portadores		TOTAL
	n	f	n	f	
18 a 27 anos	1	0,5%	37	19%	38
28 a 37 anos	7	3,6%	40	21%	47
38 a 47 anos	2	1%	32	16%	34
48 a 57 anos	3	2%	30	15%	33
58 a 67 anos	3	1,5%	23	12%	26
68 a 77 anos	0	0%	12	6%	12
78 a 89 anos	2	1%	3	2%	5
<b>TOTAL</b>	18	10%	177**	91%	195*

n: total da amostra estudada; f: frequência

\*Total de indivíduos estudados; \*\*Total de indivíduos portadores da LTA.

A faixa etária predominante da população de estudo foi de 18 e 37 anos (40%). Embora para a análise da idade de ter adquirido a LTA, nossa pesquisa está em consonância com a maioria dos estudos, onde os indivíduos estudados também informaram que adquiriram a infecção durante a infância, o que pode ser confirmado Blanco<sup>80</sup> e Hakkour *et al.*<sup>81</sup>. Suas pesquisas foram realizadas na Colômbia e Marrocos, respectivamente, demonstraram um índice mais elevado na infância, podendo estar relacionado com a menor competência imunológica das crianças nessa fase.

Quanto ao local de moradia dos indivíduos estudados, estes foram divididos em dois grupos: zona rural (seringais e assentamentos) e zona urbana. Dessa maneira, tem-se que 48% dos portadores, moravam na zona rural e 42% na zona urbana de Xapuri. Entre o grupo controle, a frequência foi igual para a zona rural e urbana com 5% para cada grupo, como representado na **Tabela 3** e **Figura 10**.

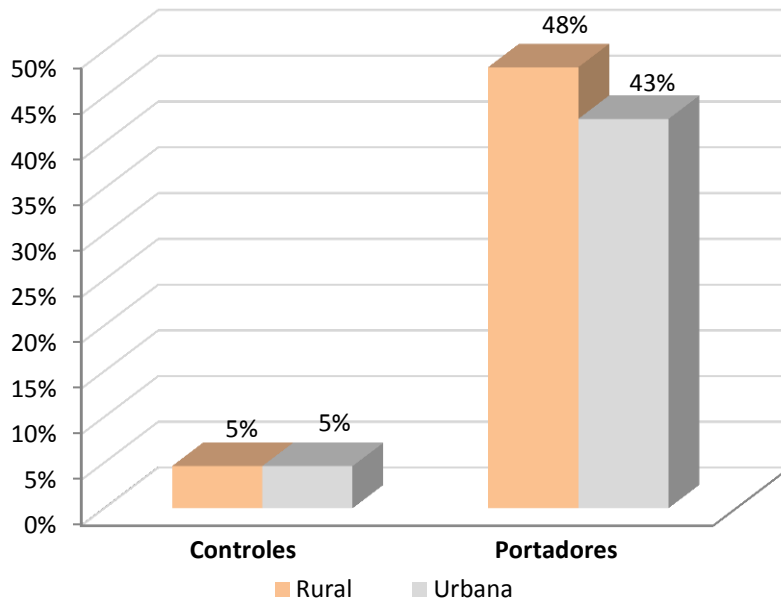
**Tabela 3** - Frequência da localidade dos indivíduos controles e portadores de LTA do município de Xapuri – Acre.

Zona	Controles		Portadores		TOTAL
	n	f	n	f	
Rural	9	5%	94	48%	103
Urbana	9	5%	83	42%	92
<b>TOTAL</b>	18	10%	177**	90%	195*

n: total da amostra estudada; f: frequência.

\*Total de indivíduos estudados; \*\*Total de indivíduos portadores da LTA.

**Figura 10** - Frequência da localidade dos indivíduos controles e portadores de LTA do município de Xapuri – Acre. Gráfico mostrando a frequência de moradores da zona urbana e rural entre os indivíduos entrevistados.



**Fonte:** Produção do próprio autor

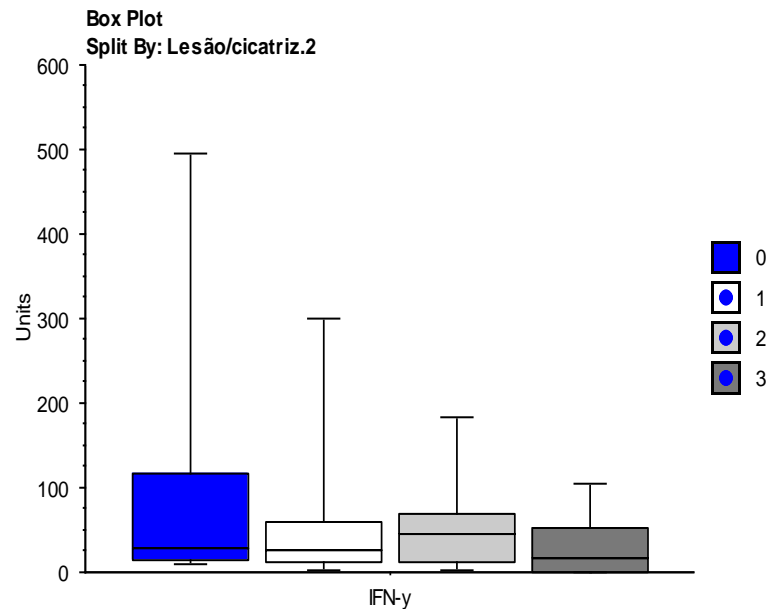
A maioria dos indivíduos entrevistados residia próximo ou na área de floresta, em casas sem telas nas janelas e portas, desprotegidos do flebotomíneo, por isso os resultados apresentarem grande número de casos em moradores da zona rural, representando 48%, sugerindo haver transmissão peri e intradomiciliar<sup>82,83</sup>. O número crescente de casos na zona urbana, 42% neste estudo, pode ser em consequência ao hábito desses moradores de visitar os familiares, que moram na zona rural, aos fins de semana, como relatado por Brilhante *et al.*<sup>82</sup>.

No gráfico da produção de citocina IFN- $\gamma$  (**Figura 11**), os resultados demonstraram pouca produção entre os grupos. O grupo controle (0) foi o que apresentou níveis maiores em relação aos outros grupos. Houve uma maior produção em lesões ativas (1) comparada com os grupos de cicatrizes recentes (2) e antigas (3), mas a maior mediana foi encontrada no grupo 2. Houve diferença significativa na produção das citocinas IFN- $\gamma$  entre os grupos (p-valor = 0,048).

A produção da citocina em lesões ativas pode estar relacionada com o perfil de resposta do tipo Th<sub>1</sub>, que aumenta os níveis IFN- $\gamma$  com possível eliminação do

parasito. Muniz<sup>84</sup> associou a produção de IFN- $\gamma$  por células NK com a cura da LTA causada pela *L. braziliensis* em sua pesquisa.

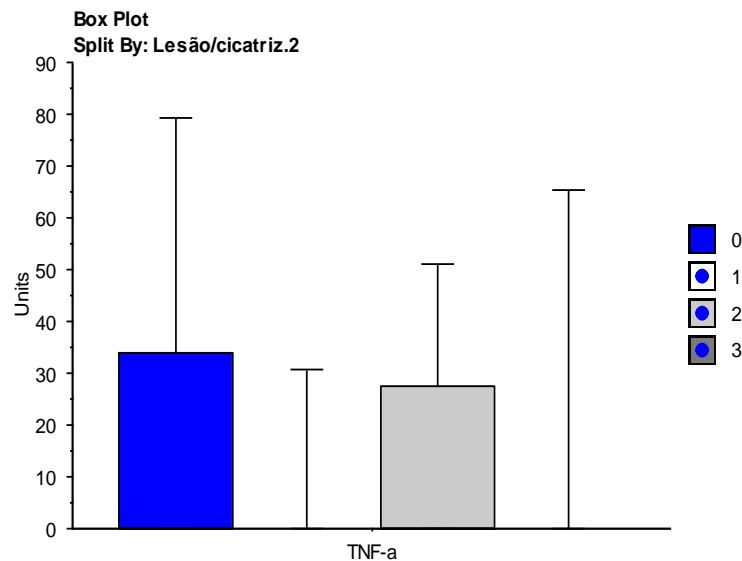
**Figura 11** – Produção de IFN- $\gamma$ , quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas.



Notas: Grupo 0: 39 amostras controle; Grupo 1: 32 amostras de lesões ativas; Grupo 2: 7 amostras de cicatrizes recentes; Grupo 3: 66 amostras de cicatrizes antigas.

Em relação ao TNF- $\alpha$  (**Figura 12**), houve pouca produção da citocinas pelos grupos, com medianas em concentração zero. O grupo de cicatrizes antigas foram os que mais produziram TNF- $\alpha$  comparados aos grupos de lesões ativas e cicatrizes recentes, mas a mediana se manteve entre eles. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados (p-valor = 0,852).

**Figura 12** – Produção de TNF- $\alpha$ , quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas.



Notas: Grupo 0: 39 amostras controle; Grupo 1: 32 amostras de lesões ativas; Grupo 2: 7 amostras de cicatrizes recentes; Grupo 3: 66 amostras de cicatrizes antigas.

Os resultados demonstraram pouca produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os grupos de indivíduos com lesões ativas e cicatrizes recentes ou antigas. Níveis aumentados dessas citocinas são secretadas pelas células Th<sub>1</sub>, que estão associadas à proteção contra a LTA<sup>13,32,37,38</sup>. A tendência de diminuição das citocinas pode indicar um perfil de resposta imunológica do tipo Th<sub>2</sub>, com redução das mesmas, abordado em vários estudos, como de Castro *et al.*<sup>85</sup>, que evidenciou a presença de uma resposta do tipo Th<sub>2</sub> em lesões ativas na LTA, por exemplo.

Pirmez *et al.*<sup>86</sup> demonstrou que indivíduos com lesões cutâneas têm o padrão de resposta Th<sub>1</sub> e aqueles com lesões mucocutâneas tem resposta do tipo Th<sub>2</sub> em estudos imunológicos de associação entre as citocinas e as lesões apresentadas pelo indivíduo infectado com *Leishmania brasiliensis*, demonstrando o agravamento da doença.

Segundo Belkaid *et al.*<sup>40</sup>, Ajdary *et al.*<sup>87</sup> e Louzir *et al.*<sup>88</sup>, as lesões ativas, normalmente, estão associadas ao aumento da secreção de IL-4 e diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$ . Assim como afirmou Sypek *et al.*<sup>89</sup> e Heinzl *et al.*<sup>90</sup>, que indivíduos com lesões cutâneas ativas demonstraram uma redução na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  indetectável, obtendo uma resposta do tipo Th<sub>2</sub>.

Salhi *et al.*<sup>41</sup> em estudos com a IL-10 demonstraram o aumento do risco de lesão cutânea em indivíduos expostos, pois a citocina inibe a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, responsáveis por ativar a citocina IFN- $\gamma$  liberados pelas células NK, reduzindo a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos ativados, conseqüentemente impedindo a eliminação do parasita, permitindo a permanência dele no hospedeiro através da mudança do padrão de resposta do tipo Th<sub>1</sub> para Th<sub>2</sub><sup>91</sup>.

No gráfico de produção da citocina IL-17A (**Figura 13**), o grupo de cicatrizes recentes (menor que 3 anos) apresentou uma maior produção da citocina comparado aos outros grupos. O restante dos grupos apresentaram pouca produção de IL-17A com medianas mais baixas que o grupo 2, principalmente o grupo de cicatrizes antigas. Houve diferença significativa entre os grupos na produção da citocina (p-valor = 0,341).

A IL-17 tem demonstrado participação no processo inflamatório da LTA, com o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, causando a exacerbação da inflamação e manutenção do infiltrado neutrofílico, danificando o tecido lesado<sup>50,52,53,54,92</sup>. Portanto, ela pode estar em níveis aumentados nas cicatrizes recentes.

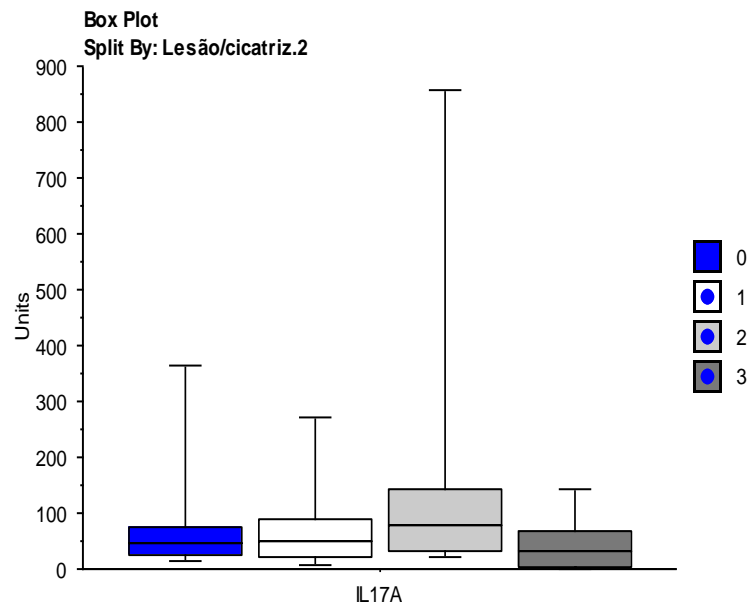
Gonzalez-Lombana *et al.*<sup>93</sup> demonstrou que os níveis de IL-17 foram elevados em indivíduos infectados com *L. braziliensis* nas lesões ativas, mas nas lesões curadas foram encontrados níveis mais baixos nesses indivíduos.

Viana<sup>94</sup>, afirmou em seu estudo com *L. braziliensis*, em cultura de células mononucleares, que houve uma grande produção de IL-17 com um perfil inflamatório.

Em seus estudos, Martins<sup>95</sup> observou que macrófagos de BALB/c estimulados com a IL-17, não induziu a morte da *Leishmania*, comprovando ser a citocina responsável pela persistência do parasito.



**Figura 13** – Produção de IL-17A, quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas.



Notas: Grupo 0: 39 amostras controle; Grupo 1: 32 amostras de lesões ativas; Grupo 2: 7 amostras de cicatrizes recentes; Grupo 3: 66 amostras de cicatrizes antigas.

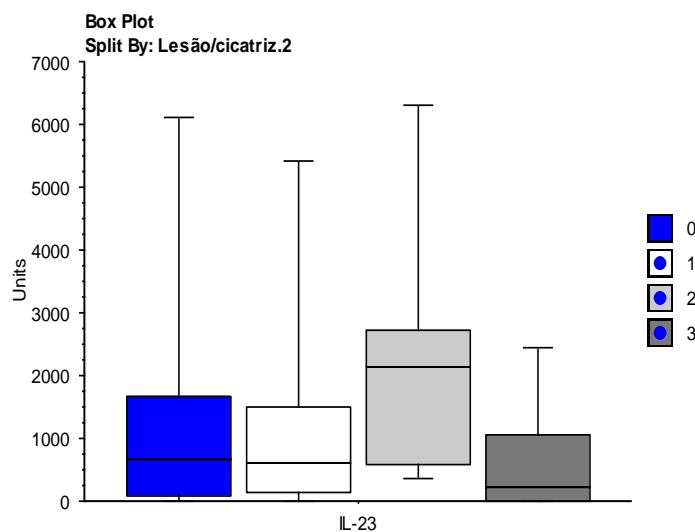
Ao avaliar as concentrações da citocina IL-23 (**Figura 14**), observaram-se níveis elevados de sua produção entre os grupos, destacando o grupo de cicatriz recente com uma maior produção e média alta. A variação na concentração da citocina nos grupos controle e lesão ativa apresentaram níveis similares entre eles. O grupo de cicatriz antiga foi o que apresentou menor produção da citocina comparada aos outros grupos. Houve diferença significativa entre os grupos (p-valor = 0,128).

A IL-23 é quem conduz a expansão das células  $Th_{17}$ <sup>46,50,51</sup>. McGeachy *et al.*<sup>44</sup> afirmou em suas pesquisas que as células  $Th_{17}$  medeiam a inflamação na LTA através da indução pela IL-23. Portanto, a IL-23 é um importante modulador da produção e manutenção da IL-17.

No estudo realizado por Castro<sup>96</sup>, por exemplo, foi observada a presença significativa de IL-17 e IL-23 em amostras de culturas de células de pacientes, sugerindo a associação desse perfil com a patogênese da doença. Em estudos experimentais utilizando camundongos BALB/c, Kostka *et al.*<sup>68</sup>, demonstrou que a

citocina IL-23 é importante na manutenção e indução da produção de células Th<sub>17</sub> e que esta célula é responsável pelo recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação, com conseqüente exacerbação da doença. Como também, Almeida<sup>97</sup>, em sua pesquisa observou que em lesões ativas as citocinas IL-17 e IL-23 estavam presentes.

**Figura 14** – Produção de IL-23, quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas



Notas: Grupo 0: 39 amostras controle; Grupo 1: 32 amostras de lesões ativas; Grupo 2: 7 amostras de cicatrizes recentes; Grupo 3: 66 amostras de cicatrizes antigas.

Ao comparar a produção das citocinas entre os grupos com cicatriz recente (2) e antiga (3), houve diferença significativa em relação à produção das citocinas IL-17A (p-valor = 0,042) e IL-23 (p-valor = 0,009). Não houve diferença significativa entre os dois grupos quando avaliado a produção de IFN- $\gamma$  (p-valor = 0,290).

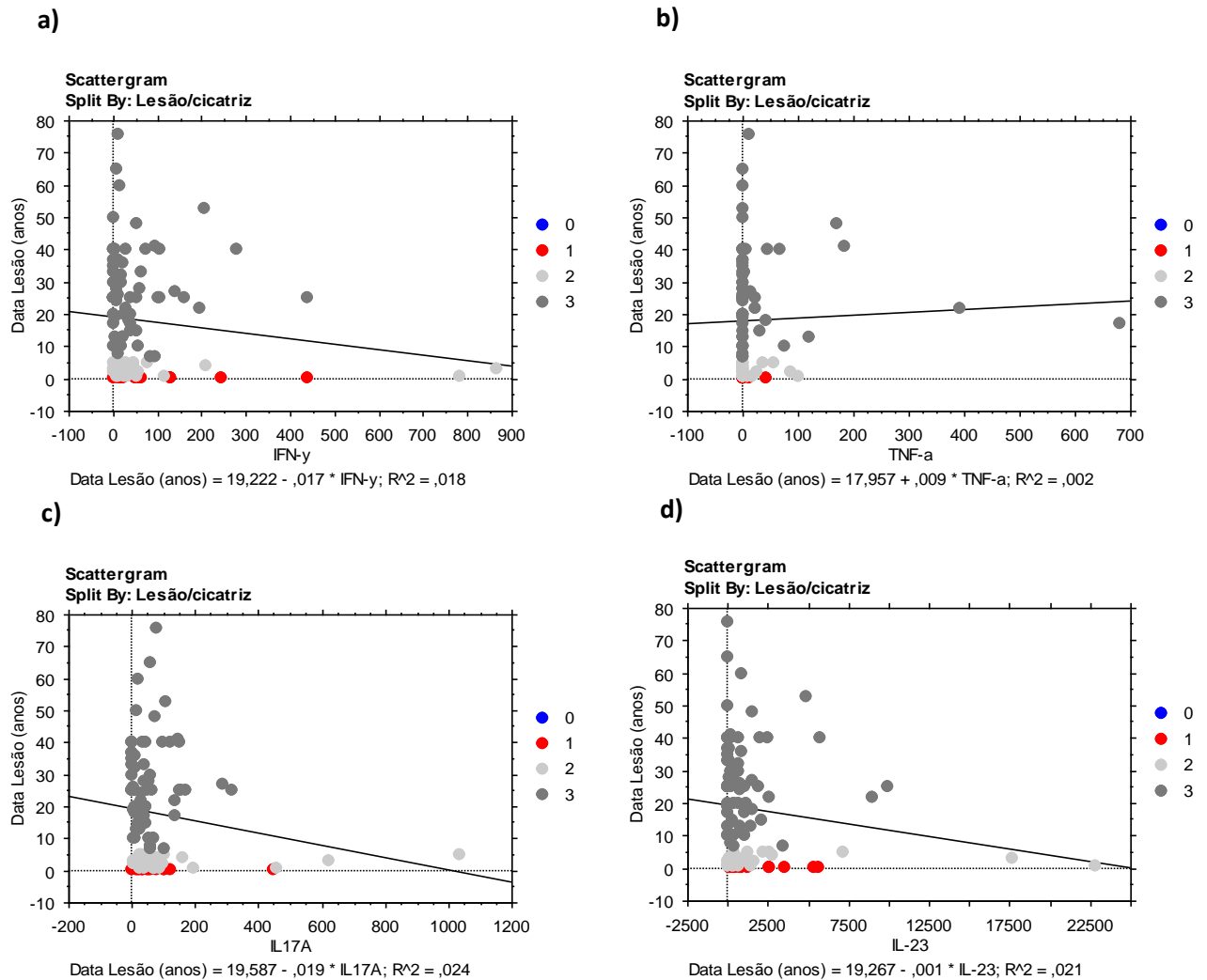
No gráfico de dispersão, em que se avaliou a concentração das citocinas em relação à data da lesão entre os grupos dos indivíduos estudados, observou-se que a maioria apresentou pouca produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com valores bem próximos de zero, entre os grupos de lesão ativa (1), cicatrizes recentes (2) e antigas (3). Indivíduos isolados apresentaram concentrações maiores, das citocinas acima citadas, no grupo 3 (**Figuras 15a e 15b**).

Níveis mais elevados foram apresentadas pelos indivíduos com cicatrizes recentes em relação à data da lesão na produção da IL-17A, comparado ao grupo de lesão ativa, com uma variação de até 3 anos da data da lesão. Em indivíduos com cicatriz antiga, acima de 3 anos da data da lesão, foi observado pouca produção de IL-17A, comparado ao grupo de cicatriz recente (**Figura 15c**).

Os maiores níveis de produção entre os três grupos foi da citocina IL-23, principalmente pelo grupo de cicatriz recente, com uma variação da data da lesão até 3 anos (**Figura 15d**).

O grupo controle (0) não foi demonstrado no gráfico, por representar os indivíduos sem lesão ativa e/ou cicatrizes.

**Figura 15** – Gráfico de dispersão demonstrando a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-23 em relação à data da lesão em anos, quantificado por ELISA em 144 amostras de soro analisadas.



**Figura a:** produção de IFN- $\gamma$ /data da lesão (anos); **Figura b:** produção de TNF- $\alpha$ /data da lesão (anos); **Figura c:** produção de IL-17A/data da lesão (anos); **Figura d:** produção de IL-23/data da lesão (anos); Notas: Grupo 0: 39 amostras controle; Grupo 1: 32 amostras de lesões ativas; Grupo 2: 7 amostras de cicatrizes recentes; Grupo 3: 66 amostras de cicatrizes antigas.

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à data da lesão na produção das citocinas de IFN- $\gamma$  (p-valor = 0,600) e TNF- $\alpha$  (p-valor = 0,639). Com relação à produção das citocinas IL-17A (p-valor = 0,038) e IL-23 (p-valor = 0,022), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos indivíduos estudados.

No presente estudo, as citocinas IL-17A e IL-23 foram as que apresentaram níveis mais elevados entre os grupos apresentados, comparado com as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Houve diferença significativa na produção das citocinas entre os grupos, com exceção da TNF- $\alpha$ , mas principalmente entre o grupo de cicatriz recente e antiga, em relação à produção de IL-17A e IL-23. O grupo controle apresentou níveis aumentados de IL-23, mas pouca produção das outras citocinas estudadas. Com relação à data da lesão e concentração das citocinas, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas na produção das citocinas IL-17A e IL-23, entre os grupos estudados.

## 6 CONCLUSÃO

O município de Xapuri apresenta uma transmissão urbana e rural da LTA, sendo as mulheres as mais acometidas, relatando a maioria dos indivíduos participantes deste estudo, terem sido infectados durante a infância.

Com a dosagem dos níveis séricos das citocinas, observou-se uma tendência de resposta do tipo Th<sub>2</sub>, onde IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  apresentaram níveis diminuídos e IL-17A e IL-23 aumentados, quando comparados com lesão ativa e cicatriz recente (até três anos da data da lesão).

Este estudo chama a atenção para a importância de um diagnóstico rápido, por dar indícios da propensão que os indivíduos apresentam ao desenvolvimento de um quadro de leishmaniose não curável facilmente na área de estudo.

Estudos futuros que consigam unir a genética e a resposta imunológica, partindo deste estudo inicial, conseguirão prever o curso da LTA, traçando protocolos de tratamentos mais eficientes, poupando gastos públicos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes durante o período da doença.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Diseases covered by NTD Department [Internet]. WHO. 2008 [cited 25 June 2017]. Available from: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/).
2. World Health Organization. Gamapserver.who.int [Internet]. WHO. 2015 [cited 8 June 2016]. Available from: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_2015\\_CL.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2015_CL.png)
3. Negrão G, Ferreira M. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Percurso*. 2014; 6 (1): 147-168.
4. Silva N, Muniz V. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*. 2009; 25(6):1325-1336.
5. Silva N, Viana A, Cordeiro J, Cavasini C. Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Acre, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1999; 33(6):554-559.
6. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. SINAN. 2015 [cited 5 no 2017]. Available from: <http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-tegumentar-americana>.
7. Dedet J, Pratlong F, Lanotte G, Ravel C. The parasite. *Cutaneous leishmaniasis*. Elsevier Science Publisher; 1999. 17 (3): 261-268.
8. World health organization. Control de la leishmaniasis. 60ª Asamblea Mundial de la salud [internet]. WHO. 2013 [cited 8 June 2016]. Available from: [http://www.who.int/iris/bitstreamq/10665253151A60\\_10-sp.pdfua=1/en/>](http://www.who.int/iris/bitstreamq/10665253151A60_10-sp.pdfua=1/en/>).
9. Teles C. Leishmaniose em Assis Brasil com ênfase na fauna de flebotomíneos e agentes etiológicos circulantes na área de fronteira [Doutorado em Ciências]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo; 2015.
10. Oliart-Guzmán H, Camargo Martins A, Silva Mantovani S, Braña A, Delfino B, Moraes T et al. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana na fronteira Amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. *Revista de Patologia Tropical*. 2013; 42(2).
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Microrregiões do Acre. IBGE. 2014 [cited 5 March 2016]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>
12. Nunes M, Cavasini C, Silva N, Galati E. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2008; 11(2):241-51.
13. Covas C. Estudo da Influência de polimorfismos nos genes IL-10, IL-12, MIF e TNF na Imunopatogênese da Leishmaniose tegumentar americana [Mestrado em Ciências]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2010.

14. Lainson R, Shaw J, Silveira F. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987; 81(4):702-703.
15. Ross R. Notes on *Leishmania*'s bodies. *British Medical Journal*. 1903; 11:1401.
16. Lonardoni M. Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Pública*. 1993; 27(5):378-379.
17. Silveira F, Lainson R, Shaw J, Braga R, Ishikawa E, Souza A. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (*Rodentia: Dasyproctidae*), no estado do Pará, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1991; 33(1):18-22.
18. Lainson R, Shaw J. Chapter 17. New World leishmaniasis. *In: Cox G, Kreier J, Wakelin D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Arnold, London, Sydney, Auckland. 2005: 313–349.
19. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology - Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; 27(5):305-318.
20. Murray H, Berman J, Davies C, Saravia N. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*. 2005; 366(9496):1561-1577.
21. Da-Cruz A, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: José Rodrigues Coura - Guanabara Koogan; 2005: 697-712.
22. Silveira F, Lainson R, Corbett C. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3):239-251.
23. Lessa M, Lessa H, Castro T, Oliveira A, Scherifer A, Machado P et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007; 73(6).
24. Calvopina M, Armijos R, Hashiguchi Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(7):663-672.
25. Corvalan F. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em saliva de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana [Doutorado em Ciências da Saúde]. Campo Grande: Universidade de Brasília; 2011.
26. Marzochi M. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*. Janeiro de 1992; 63(5/6):82-104.



27. Montenegro J. A cutis-reação na leishmaniose. Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo. 1926; 1:323-330.
28. Portal da Saúde do Governo Federal. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010 p. 2. ed. atual.
29. Manson-Bahr P. The Leishmaniasis. Peters W & Kilich-Kendrick R. 1987; 2:703-728.
30. Costa J, Vale K, França F, Saldanha A, Silva J, Lago E et al. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1990; 23(4):205-208.
31. Silveira F, Muller S. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Revista Paraense de Medicina. 2008; 22(1).
32. Menezes J. Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonenses* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* [Mestrado em Ciências]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.
33. Raz E, Mahabaleshwar H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fish-eye view. Development. 2009; 136(8):1223-1229.
34. Oppenheim J, Zachariae C, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. Annual Review Immunology. 1991; 9:617-648.
35. Sommer C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press. 2010;279-302.
36. Lin E, Calvano S, Lowry S. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery. 2000; 127(2):117-126.
37. Assis M. Quantificação de mediadores dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg na resposta imune contra Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica [Doutorado em Inovação Terapêutica]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
38. Pinheiro R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. Infarma. 2004; 16(7/8).
39. Bentes P. Estudo de associação de polimorfismos dos genes IL-10 e IL10RA com Leishmaniose cutânea em uma população caso-controle do Estado do Amazonas, Brasil [Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas]. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2014.

40. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual Review of Immunology*. 2009; 27:551-589.
41. Salhi A, Rodrigues V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano L et al. Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Immunology*. 2008; 180(9):6139-6148.
42. Anderson C, Mendez S, Sacks D. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of *Leishmania major* in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology*. 2005; 174(5):2934-2941.
43. Kane M, Mosser D. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 2001; 166(2):1141-1147.
44. McGeachy M, Cua D. The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Seminars in Immunology*. 2007; 19(6):372-376.
45. Yao Z, Painter S, Fanslow W, Ulrich D, Macduff B, Spriggs M et al. Human IL-17: A novel cytokine derived from T-cells. *The Journal of Immunology*. 1995; 155(12):5483-5486.
46. Murphy C, Langrish C, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein R et al. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003; 198(12):1951–1957.
47. Garrido-Mesa N, Algieri F, Rodríguez N, Gálvez J. Functional Plasticity of Th17 Cells: Implications in Gastrointestinal Tract Function. *International Reviews of Immunology*. 2013; 32(5/6):493-510.
48. Camporeale A, Poli V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity?. *Frontiers in Bioscience*. 2012; 17:2306-2326.
49. Basso A, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Research*. 2009; 19(4):399-411.
50. Langrish C, Chen Y, Blumenschein M, Mattson J, Basham B. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005; 201(2):233–240.
51. Maeda S, Hayami Y, Naniwa T, Ueda R. The Th17/IL-23 Axis and Natural Immunity in Psoriatic Arthritis. *International Journal of Rheumatology*. 2012; 2012:539683.
52. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*, 2006; 116:1310-1316.
53. Zhang G, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X et al. Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in IL-12 Receptor- 2-Deficient Mice: IL-12 Responsiveness Is Not Required in the Pathogenesis of Inflammatory Demyelination

- in the Central Nervous System. *The Journal of Immunology*. 2003; 170(4):2153-2160.
54. Becher B, Durell B, Noelle R. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 110(4):493-497.
55. Crome S, Wang A, Kang C, Levings M. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4<sup>+</sup> T cells. *European Journal of Immunology*. 2009; 39(6):1480-1493.
56. Van De Veerdonk F, Gresnigt M, Kullberg B, Van Der Meer J, Joosten L, Netea M. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*. 2009; 42(12):776-787.
57. Manel N, Unutmaz D, Littman D. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t. *Nature Immunology*. 2008; 9(6):641-649.
58. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(8):1849-1861.
59. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(29):12099-12104.
60. Zhou Z, Li X, Li H, Guo M, Liu S, Li C. Genetic Analysis of IL-17 Gene Polymorphisms in Gout in a Male Chinese Han Population. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0148082.
61. Nascimento M. Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum/chagasi* [Mestrado em Ciências]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2012.
62. Espinoza J, Takami A, Onizuka M, Kawase T, Sao H, Akiyama H et al. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. *Bone Marrow Transplantation*. 2011; 46(11):1455-1463.
63. Prado C, de Paz B, Gómez J, López P, Rodríguez-Carrio J, Suárez A. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50(10):1794-1801.
64. Shah K, Lee W, Lee S, Kim S, Kang S, Craft J et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*. 2010; 12(2):R53.

65. Curtis M, Way S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009; 126(2):177-185.
66. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2009; 115(2):335-343.
67. Pitta M, Romano A, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala-azar caused by *Leishmania donovani*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119(8): 2379-2387.
68. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey M, von Stebut E. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. *The Journal of Immunology*. 2009; 182(5):3039-3046.
69. Katara G, Raj A, Kumar R, Avishek K, Kaushal H, Ansari N et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunology*. 2013; 14:52.
70. Anderson C, Stumhofer J, Hunter C, Sacks D. IL-27 Regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ Cells in Nonhealing *Leishmania major* Infection. *The Journal of Immunology*. 2009; 183(7):4619-4627.
71. Chen Y, Langrish C, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(5):1317-1326.
72. Governo do Estado do Acre. Municípios do Acre. Acre; 2016. Disponível em: <http://www.ac.gov.br/wps/portal/acre/Acre/estado-acre/municipios>.
73. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Xapuri - Acre. Acre: IBGE; 2016. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=120070>.
74. Associação dos Municípios do Acre. Xapuri - Acre. Acre: AMAC; 2016. Disponível em: [http://www.amac-acre.com.br/site/?page\\_id=698](http://www.amac-acre.com.br/site/?page_id=698).
75. Instituto de Meio Ambiente. Mapa de Geoprocessamento do município de Xapuri - Acre. Acre: IMAC; 2016.
76. Rodrigues A, Hueb M, Santos T, Fontes C. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39(2):139-145.
77. Chagas A, Pessoa F, Medeiros J, Py-Daniel V, Mesquita É, Balestrassi D. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2006; 9(2):186-192.
78. Silva M, Cavasini C, Santos da Silva N, Bianchi Galati E. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no

- município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2008; 11(2):241-251.
79. Rosa C. Fatores de risco para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no município de Bandeirantes – Paraná [Doutorado em Ciências]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2015.
80. Blanco V, Cossio A, Martinez J, Gove Saravia N. Perfil Clínico e Epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar nas crianças colombianas: considerações sobre tratamento local. *Sociedade Americana de Medicina Tropical e Higiene*. 2013; 89(2):359 – 364.
81. Hakkour M, Hmamouch A, El Alem M, Rhalem A, Amarir F, Touzani M et al. New epidemiological aspects of visceral and cutaneous leishmaniasis in Taza, Morocco. *Parasites & Vectors*. 2016; 9:612.
82. Brilhante A. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no município de Xapuri, Estado do Acre, Brasil: estudo em população humana, cães domésticos e vetores [Doutorado em Ciências]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2017.
83. Melchior L, Brilhante A, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in Acre state, Brazil. *Infectious Diseases of Poverty*. 2017;6(1).
84. Muniz A. Marcadores Imunológicos de proteção na infecção por *Leishmaniose braziliensis*: um estudo de coorte [Doutorado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2016.
85. Castro M, Almeida A, Oliveira A, Assis M, Rocha L, Pereira V. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology*. 2012; 279(2):180-186.
86. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Oliveira M, Silva F, Modlin R. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; 91(4):1390-1395.
87. Ajdary S, Alimohammadian M, Eslami M, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the Immune Profile of Nonhealing Cutaneous Leishmaniasis Patients with Those with Active Lesions and Those Who Have Recovered from Infection. *Infection and Immunity*. 2000; 68(4):1760-1764.
88. Louzir H, Melby P, Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ismail R et al. Immunologic Determinants of Disease Evolution in Localized Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania major*. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998; 177(6):1687-1695.
89. Sypek J. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *Journal of Experimental Medicine*. 1993; 177(6):1797-1802.

90. Heinzl F. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine*. 1993; 177(5):1505-1509.
91. Gazzinelli R, Oswald I, James S, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. *The Journal of Immunology*. 1992; 148: 1792–1796.
92. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo V. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*. 2008; 453(7198):1051-1057.
93. Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira W, Passos S, Carvalho L et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. *PLoS Pathogens*. 2013; 9(3):e1003243.
94. Viana A. Estudo das características funcionais de monócitos humanos infectados in vitro com diferentes cepas de *Leishmania* e análise da expressão dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) em linfócitos de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar [Doutorado em Ciências]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
95. Martins L. Avaliação da ação da IL-17 em macrófagos peritoneais murinos [Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.
96. Castro M. Estudo do papel de linfócitos T CD4+ e CD8 e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana [Doutorado Inovação Terapêutica]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2013.
97. Almeida A. Avaliação da produção de citocinas TH17, TH1 e TH2 por linfócitos T em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana [Mestrado em Ciências]. Recife: Fundação Oswaldo Cruz; 2013.

## ANEXO A - Ficha de investigação do SINAN

República Federativa do Brasil  
Ministério da SaúdeSINAN  
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO  
FICHA DE INVESTIGAÇÃO LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

N°

## CASO CONFIRMADO:

Leishmaniose cutânea: todo indivíduo com presença de úlcera cutânea, com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura, com confirmação por diagnóstico laboratorial ou clínico epidemiológico.

Leishmaniose mucosa: todo indivíduo com presença de úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração ou perda do septo nasal, podendo atingir lábios e boca (palato e nasofaringe), com confirmação por diagnóstico laboratorial ou clínico epidemiológico.

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual	2 Agravado/enferma LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA		Código (CID10) B 5 5. 1	3 Data da Notificação	
	4 UF	6 Município de Notificação	Código (IBGE)			
	8 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)			Código	7 Data do Diagnóstico	
	8 Nome do Paciente				9 Data de Nascimento	
Notificação Individual	10 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	11 Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	12 Gestante 1 - 1º trimestre 2 - 2º trimestre 3 - 3º trimestre 4 - Idade gestacional Ignorada 5 - Não 6 - Não se aplica 8 - Ignorado	13 Raça/Cor 1 - Branco 2 - Preto 3 - Amarelo 4 - Pardo 5 - Indígena 9 - Ignorado		
	14 Escolaridade 0 - Analfabeto 1 - 1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2 - 4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3 - 5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4 - Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5 - Ensino médio incompleto (antigo colégio ou 2º grau) 6 - Ensino médio completo (antigo colégio ou 2º grau) 7 - Educação superior incompleta 8 - Educação superior completa 9 - Ignorado 10 - Não se aplica					
	16 Número do Cartão SUS		18 Nome da mãe			
	17 UF		18 Município de Residência	Código (IBGE)	19 Distrito	
Dados de Residência	20 Bairro		21 Logradouro (rua, avenida, ...)		Código	
	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)			24 Geo campo 1	
	26 Geo campo 2		28 Ponto de Referência		27 CEP	
	28 (DDD) Telefone		29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30 País (se residente fora do Brasil)		
	<b>Dados Complementares do Caso</b>					
	Dados Clínicos	31 Data da Investigação		32 Ocupação		
33 Presença de Lesão 1 - Sim 2 - Não Cutânea <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/>		34 Em Caso de Presença de Lesão Mucosa, Há Presença de Cicatrizes Cutâneas 1 - Sim 2 - Não <input type="checkbox"/>		35 Co-infecção HIV 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado <input type="checkbox"/>		
Dados Labor.	36 Parasitológico Direto 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado <input type="checkbox"/>		37 IRM 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado <input type="checkbox"/>		38 Histopatologia 1 - Encontro do Parasita 2 - Compatível 3 - Não Compatível 4 - Não Realizado <input type="checkbox"/>	
	39 Tipo de Entrada 1 - Caso Novo 2 - Recidiva 3 - Transferência 9 - Ignorado <input type="checkbox"/>		40 Forma Clínica 1 - Cutânea 2 - Mucosa 9 - Ignorado <input type="checkbox"/>			
Tratamento	41 Data do Início do Tratamento		42 Droga Inicial Administrada 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina b 3 - Pentamidina 4 - Outras 5 - Não Utilizada <input type="checkbox"/>			
	43 Peso Kg	44 Dose Prescrita em mg/kg/dia Sb <sup>+5</sup> 1 - Menor que 10 2 - Maior ou igual a 10 e menor que 15 3 - Igual a 15 4 - Maior que 15 e menor que 20 6 - Maior ou igual a 20 <input type="checkbox"/>				
	46 Nº Total de Ampolas Prescritas Ampolas		48 Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial 1 - Anfotericina b 2 - Pentamidina 3 - Outros 4 - Não Se Aplica <input type="checkbox"/>			





## ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética da União Educacional do Norte – UNINORTE/AC



UNIÃO EDUCACIONAL DO  
NORTE LTDA - UNINORTE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ASPECTOS GERAIS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NOS MUNICÍPIOS DE RIO BRANCO E XAPURI - ACRE

**Pesquisador:** PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA

**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 63499416.1.0000.5009

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Acre- UFAC

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal do Acre- UFAC

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.316.615

#### **Apresentação do Projeto:**

O presente trabalho refere-se à identificação dos aspectos gerais de transmissão e desenvolvimento da Leishmaniose Tegumentar Americana nos indivíduos portadores da doença residentes em Rio Branco e Xapuri – Acre, conhecendo o perfil imunogenético desses indivíduos, sua percepção quanto à infecção e os tratamentos alternativos utilizados. A metodologia da pesquisa caracteriza-se como qualitativa exploratória-experimental e observacional-descritiva. Foi feito um levantamento na literatura especializada das áreas a serem abordadas no estudo, através de artigos publicados e dissertações apresentadas. Será utilizado um questionário estruturado (Apêndice A), baseado na Ficha de Notificação do SINAN (Anexo A), como instrumento de pesquisa. Para a análise imunogenética, será realizada coleta de amostra biológica e imagem da lesão ativa/cicatriz, com autorização do paciente através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C) e o Termo do uso de Imagem (Apêndice D), respectivamente. Espera-se obter o perfil imunológico e genético dos indivíduos portadores da LTA estudados, para identificação da resistência ou susceptibilidade à infecção, os tratamentos utilizados e o conhecimento sobre a percepção deles em relação à doença. Dessa forma, poder

**Endereço:** BR 364, KM 02-Alameda Hungria, 200 - Jardim Europa I

**Bairro:** JARDIM EUROPA

**CEP:** 69.915-497

**UF:** AC

**Município:** RIO BRANCO

**Telefone:** (68)3302-7022

**E-mail:** cep.uninorte@uninorteac.com.br



UNIÃO EDUCACIONAL DO  
NORTE LTDA - UNINORTE



Continuação do Parecer: 2.316.615

determinar os riscos desses indivíduos à doença e melhorar as medidas de controle e o tratamento de cada indivíduo.

\* O projeto apresenta clareza na sua exposição condizendo com o exigido pela plataforma.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Identificar os aspectos gerais da transmissão e desenvolvimento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) nos indivíduos portadores, até o período de 2017, nos municípios de Xapuri e Rio Branco – Acre.

Objetivo Secundário:

- 1) Descrever o perfil sociodemográfico dos indivíduos portadores da LTA do município de Xapuri e Rio Branco - Acre.
- 2) Analisar a dinâmica de contaminação dos indivíduos leishmanióticos.
- 3) Identificar a prevalência de LTA por bairro/zona rural dos municípios.
- 4) Identificar e descrever os tipos de tratamentos alternativos utilizados pelos portadores.
- 5) Descrever a percepção dos indivíduos portadores de LTA em relação à doença e seu tratamento.
- 6) Identificar os principais medicamentos utilizados para tratamento dos portadores de LTA nos serviços de saúde.
- 7) Dosar as citocinas IFN-, TNF-, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e IL-17 em soro de indivíduos portadores da LTA por ELISA;
- 8) Identificar as citocinas IFN-, TNF-, IL10, IL-12 e IL17 produzidas por células de indivíduos com LTA em sobrenadantes de células cultivadas em períodos de 24 horas, 48 horas e 72 horas, sob diferentes estímulos.
- 9) Verificar a existência do polimorfismo do gene da citocina IL-17 em indivíduos com LTA.
- 10) Avaliar a expressão do receptor da citocina IL-17 (receptor IL-17R) em superfície celular dos indivíduos portadores da LTA.

\* O objetivos primários e secundários claros e consistentes e sem margem de interpretações divergentes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Diante disso, os riscos serão explicitados ao participante, sendo eles: Na dimensão física

**Endereço:** BR 364, KM 02-Alameda Hungria, 200 - Jardim Europa I

**Bairro:** JARDIM EUROPA

**CEP:** 69.915-497

**UF:** AC

**Município:** RIO BRANCO

**Telefone:** (68)3302-7022

**E-mail:** cep.uninorte@uninorteac.com.br



UNIÃO EDUCACIONAL DO  
NORTE LTDA - UNINORTE



Continuação do Parecer: 2.316.615

(hematoma após coleta sanguínea), dimensão psíquica, moral e social (constrangimento à exposição das lesões e de suas informações).

Em consoante ao exposto, podemos ponderar que a gradação das dimensões são de níveis considerados baixos.

As providências a serem empregadas para redução dos riscos envolvem profissionais capacitados para realização da coleta de material biológico, restrição da imagem do indivíduo apenas às lesões/cicatrizes de interesse para pesquisa, além do comprometimento do sigilo e discrição quanto à identidade e informações fornecidas pelos mesmos, que se dará através de um banco de dados e imagens protegidos com restrição de usuários

com acesso permitido (senha), onde nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados dessa pesquisa, os nomes não serão citados.

#### Benefícios:

Apesar dos riscos serem considerados de nível baixo, os participantes da pesquisa terão benefícios ao participarem, como: garantia na assistência

integral e gratuita pela coleta de dados genéticos, sanguíneos e o uso das imagens que serão obtidas, com a prestação de assistência imediata pelo serviço público de saúde e até mesmo indenização caso haja complicações e/ou danos. Além disso, o participante terá plena liberdade em recusar-se a participar ou realizar a retirada do seu consentimento em qualquer fase da pesquisa.

As informações que obtivermos deste estudo poderão nos ajudar a tratar melhor no futuro de outro paciente com leishmaniose, pois poderemos prever o curso da doença, auxiliando precocemente no tratamento ao saber como o indivíduo poderá reagir diante da infecção, diminuindo assim, a possibilidade de agravamento da doença e promovendo o fortalecimento de campanhas de controle, além de mobilizar a comunidade em ações sanitárias através de um retorno social e acesso aos resultados.

\* Os riscos e benefícios mencionados pela pesquisadora são condizentes com o tipo de abordagem e argumento apresentados no projeto de pesquisa, não requerendo recomendações complementares.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante no tocante às contribuições para a sociedade acadêmica com os resultados

**Endereço:** BR 364, KM 02-Alameda Hungria, 200 - Jardim Europa I

**Bairro:** JARDIM EUROPA

**CEP:** 69.915-497

**UF:** AC **Município:** RIO BRANCO

**Telefone:** (68)3302-7022

**E-mail:** cep.uninorte@uninorteac.com.br



UNIÃO EDUCACIONAL DO  
NORTE LTDA - UNINORTE



Continuação do Parecer: 2.316.615

obtidos, uma vez que os mesmos indicarão caminhos novos para uma melhor percepção do problema aqui apresentado e daí, exigir novo olhar no tocante à pesquisas em torno da LEISHMANIOSE no Estado do Acre.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatórias cumprem em sua totalidade, as exigências requeridas por este CEP, uma vez que foram apresentadas pela pesquisadora, todas as revisões solicitadas no primeiro parecer.

**Recomendações:**

sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto pronto para início da pesquisa.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP informa que:

1 - Esta pesquisa não poderá ser descontinuada pelo pesquisador responsável, sem justifica previamente aceita pelo CEP, sob pena de ser considerada antiética, conforme estabelece a Resolução CNS nº 466/2012, X.3-4.

2 - Conforme item XI.1, do capítulo XI, da Resolução CNS nº 466/12, a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais. Portanto, cabe ao pesquisador responsável:

- Desenvolver o projeto conforme delineado;
- Elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- Apresentar os dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- Manter os dados da pesquisa em arquivo físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 05 anos após o término da pesquisa;
- Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- Justificar fundamentalmente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do Projeto ou a não publicação dos resultados.

3 - Em conformidade com as diretrizes estabelecidas na Resolução nº 466/2012: o Relatório Parcial deve ser apresentado após a coleta de dados, "demonstrando fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento" item II.20 e o Resultado Final deverá ser apresentado "após

**Endereço:** BR 364, KM 02-Alameda Hungria, 200 - Jardim Europa I

**Bairro:** JARDIM EUROPA **CEP:** 69.915-497

**UF:** AC **Município:** RIO BRANCO

**Telefone:** (68)3302-7022

**E-mail:** cep.uninorte@uninorteac.com.br



UNIÃO EDUCACIONAL DO  
NORTE LTDA - UNINORTE



Continuação do Parecer: 2.316.615

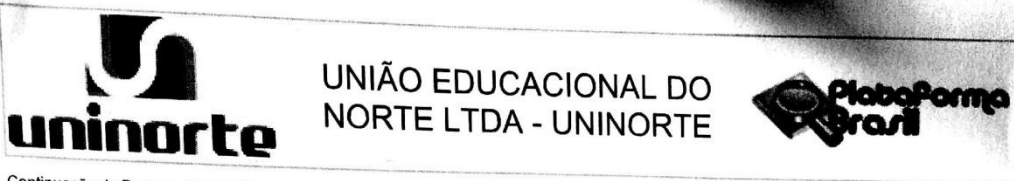
encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados", item II.19.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_779440.pdf	31/08/2017 01:51:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	31/08/2017 01:51:12	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	31/08/2017 01:50:58	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	30/08/2017 15:29:45	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Outros	TAUI.pdf	30/08/2017 15:29:33	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/08/2017 15:29:13	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Autorizacao_Xapuri.pdf	19/12/2016 18:11:31	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_AO_CEP.PDF	24/10/2016 19:01:49	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_2.PDF	24/10/2016 19:01:03	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_1.PDF	24/10/2016 19:00:44	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_FINANCEIRO.pdf	01/09/2016 17:53:03	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Outros	ANEXO_A.pdf	31/08/2016 19:02:58	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Autorizacao_SEMSA.PDF	31/08/2016 18:28:58	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito

Endereço: BR 364, KM 02-Alameda Hungria, 200 - Jardim Europa I  
Bairro: JARDIM EUROPA CEP: 69.915-497  
UF: AC Município: RIO BRANCO  
Telefone: (68)3302-7022

E-mail: cep.uninorte@uninorteac.com.br



Continuação do Parecer: 2.316.615

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_2.PDF	31/08/2016 18:28:46	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_1.PDF	31/08/2016 18:28:36	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Outros	APENDICE_B.pdf	31/08/2016 18:27:50	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito
Outros	APENDICE_A.pdf	31/08/2016 18:27:21	PAULA ALESSANDRA MARTINS DA SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO BRANCO, 03 de Outubro de 2017

*Ariavado Manzati Junior*  
 Assinado digitalmente por Ariavado Manzati Junior  
 Ariavado Manzati Junior  
 (Coordenador)  
 UNINORTE

**Endereço:** BR 364, KM 02-Alameda Hungria, 200 - Jardim Europa I  
**Bairro:** JARDIM EUROPA **CEP:** 69.915-497  
**UF:** AC **Município:** RIO BRANCO **E-mail:** cep.uninorte@uninorteac.com.br  
**Telefone:** (68)3302-7022

**ANEXO C – Imagens fotográficas das etapas desenvolvidas na pesquisa a campo**

**Figura A – Imagens da equipe de pesquisadores e estudantes de medicina da UFAC**



**Figura A1**



**Figura A2**



**Figura A3**

**Figura B –** Imagens das localidades dos indivíduos estudados em Xapuri – Acre



**Figura B1 –** Zona Urbana



**Figura B2 –** Zona Rural



**Figura B3 –** Local da travessia de balsa para a Zona Rural da Sibéria



**Figura C –** Imagens das residências localizadas próximas às florestas em Xapuri – Acre



**Figura C1**



**Figura C2**



**Figura C3**



**Figura C4**

**Figura D –** Imagens dos locais em que os indivíduos eram abordados



**Figura D1 –** Abordagem na residência



**Figura D2 –** Abordagem na unidade de saúde

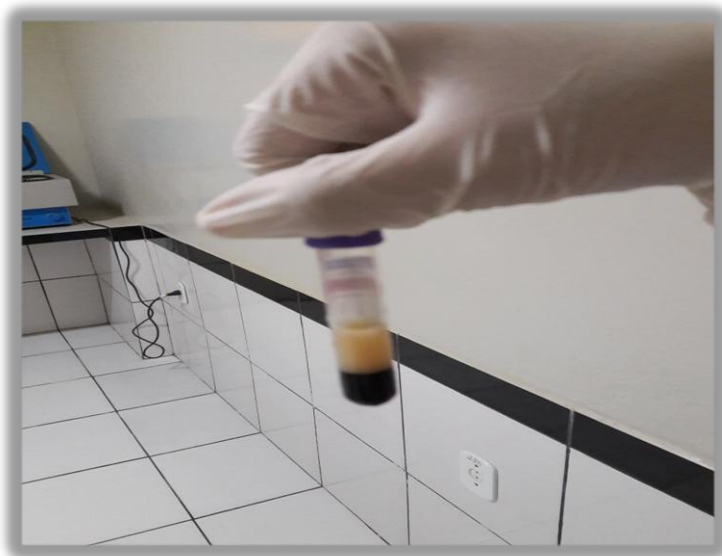


**Figura D3 –** Abordagem no Hospital Geral de Xapuri

**Figura E** – Imagem da assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e de Autorização de Imagem das lesões



**Figura F** – Imagem da separação do plasma para análise



**Figura G – Imagens das lesões ativas fotografadas**



**Figura G1**



**Figura G2**



**Figura G3**



**Figura G4**

**Figura H – Imagens das cicatrizes fotografadas**



**Figura H1**



**Figura H2**



**Figura H3**



**Figura H4**

**APÊNDICE A – Questionário sociodemográfico e clínico epidemiológico**

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**A. Identificação**

Nome Completo:

---

Endereço:

---

Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) F ( ) M

- Escolaridade: ( ) NÃO ALFABETIZADO  
( ) ENSINO FUNDAMENTAL INCOMPLETO  
( ) ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO  
( ) ENSINO MÉDIO INCOMPLETO  
( ) ENSINO COMPLETO  
( ) ENSINO SUPERIOR INCOMPLETO  
( ) ENSINO SUPERIOR COMPLETO  
( ) PÓS-GRADUAÇÃO

**B. Dados clínicos-epidemiológicos**

1. PRESENÇA DE LESÃO?  
( ) CUTÂNEA ( ) MUCOSA
  
2. PRESENÇA DE CICATRIZ?  
( ) CUTÂNEA ( ) MUCOSA
  
3. COINFECÇÃO COM HIV?  
( ) Sim ( ) Não ( ) IGNORADO
  
4. PARASITOLÓGICO DIRETO?  
( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO ( ) NÃO REALIZADO
  
5. HISTOPATOLOGIA:

- ENCONTRO DO PARASITA     COMPATÍVEL  
 NÃO COMPATÍVEL
6.    IRM:  
 POSITIVO     NEGATIVO     NÃO REALIZADO
7.    HISTOPATOLOGIA:  
 ENCONTRO DO PARASITA     NÃO COMPATÍVEL
8.    TIPO DE ENTRADA:  
 CASO NOVO     RECIDIVA
9.    FORMA CLÍNICA:  
 CUTÂNEA     MUCOSA
10.   DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: \_\_\_\_\_
11.   DROGA INICIAL ADMINISTRADA:  
 ANTIMONIAL PENTAVALENTE     ANFOTERICINA B  
 PENTAMIDINA     OUTRAS
12.   DOSE PRESCRITA EM MG/KG/ DIA:  
\_\_\_\_\_
13.   NÚMERO TOTAL DE AMPOLAS PRESCRITAS:  
\_\_\_\_\_
14.   DROGA UTILIZADA NA FALÊNCIA DO TRATAMENTO INICIAL:  
 ANFOTERICINA B     PENTAMIDINA     OUTROS     NÃO SE APLICA
15.   CRITÉRIOS DE CONFIRMAÇÃO:  
 LABORATORIAL     CLÍNICO – EPIDEMIOLÓGICO
16.   CLASSIFICAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA:  
 AUTÓCTONE     IMPORTADO     INDETERMINADO
17.   AUTÓCTONE DO MUNÍCIPIO DE RESIDÊNCIA:  
 Sim     Não     INDETERMINADO
18.   DOENÇA RELACIONADO AO TRABALHO?

Sim  Não  IGNORADO

19. EVOLUÇÃO DO CASO:

CURA  ABANDONO  ÓBITO POR LTA

ÓBITO POR OUTRAS CAUSAS  TRANSFERÊNCIA

MUDANÇA DE DIAGNÓSTICO

20. DATA DO ENCERRAMENTO: \_\_\_\_\_



## **APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de materiais biológicos de humanos**

Título do Projeto: Avaliação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23 em portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia Ocidental

Nós, Hemeson Lira de Moura, Paula Alessandra Martins da Silva e Ranna Kíssia Alves das Neves, responsáveis pela pesquisa “Avaliação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23 em portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia Ocidental”, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário do nosso estudo.

Esta pesquisa pretende identificar aspectos epidemiológicos, clínicos e genéticos da leishmaniose nos indivíduos estudados no município de Xapuri. Acreditamos que ela seja importante porque há poucos estudos sobre essa doença no município e não se sabe qual o perfil genético desses indivíduos, além dos tipos de tratamentos que são utilizados normalmente.

Para sua realização será feito o seguinte: o paciente irá responder a um questionário, onde serão registrados dados pessoais, endereço, dados clínicos e epidemiológicos sobre a infecção e o tratamento utilizado pelo paciente, além da sua percepção sobre a doença, função realizada por profissional da equipe capacitado. Em seguida, será realizada uma coleta de sangue venoso e de células bucais com utilização de escova, por profissional da equipe de pesquisa capacitado. A amostra será armazenada sob-refrigeração para diagnóstico imunológico e molecular.

Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato com algum dos pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa.

Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo

sobre sua participação. O material biológico coletado será apenas o utilizado pelo técnico em saúde no momento do exame e será destinado ao diagnóstico imunológico e molecular.

Eu, \_\_\_\_\_, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com os pesquisadores responsáveis, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo e autorizo a retirada do material biológico (coleta de sangue venoso e células bucais) para fins de diagnóstico imunológico e molecular.

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Localidade: \_\_\_\_\_

Número do Documento (RG): \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável \_\_\_\_\_

**Hemeson Lira de Moura**

Aluno de Mestrado – UFAC  
End: Rua A, 1055, João Eduardo I  
Rio Branco – AC  
Tel: 68 – 992154665  
Email: hemesonlira@gmail.com

**Paula Alessandra Martins da Silva**

Aluna de Mestrado - UFAC  
End: Av. Lauro Muller, 3741, Formoso  
Cruzeiro do Sul – AC  
Tel: 68 - 999869143  
Email: paulaczsz@hotmail.com

**Ranna Kíssia Alves das Neves**

Aluna de Mestrado – UFAC  
End: Rua Fausto Robalo, 221,  
Estação Experimental  
Rio Branco – AC  
Tel: 68 – 999819498  
Email: rannaneves@gmail.com

**Cristiane Oliveira Cardoso**

Profª Adjunto UFAC  
End: BR 364 Km 04  
Rio Branco – AC  
Tel: 68 – 30912518  
Email: crisdeocardoso@gmail.com

**Comitê de Ética em Pesquisa UFAC:** End. Br 364, Km04. Tel: 68 3901-2500

## APÊNDICE C - Termo de autorização do uso de imagem

Eu \_\_\_\_\_,  
portador da Cédula de Identidade RG nº \_\_\_\_\_, residente à  
Rua \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, na  
cidade de \_\_\_\_\_, AUTORIZO o uso não identificado de minha  
imagem e/ou imagem de minha propriedade e as lesões ativas ou cicatriciais da  
Leishmaniose Tegumentar Americana e qualquer material entre fotos, documentos e  
outros meios de comunicação, para ser utilizada exclusivamente para a pesquisa,  
desde que não haja desvirtuamento da sua finalidade.

A presente autorização é concedida a título gratuito, abrangendo o uso da  
imagem acima mencionada em todo território nacional e no exterior, das seguintes  
formas: tese de mestrado; artigos científicos (revistas científicas); pôsteres;  
apresentação oral de trabalhos em multimídia. Por esta ser a expressão da minha  
vontade declaro que autorizo o uso acima descrito.

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável legal

**Hemeson Lira de Moura**

Aluno de Mestrado – UFAC  
End: Rua A, 1055, João Eduardo I  
Rio Branco – AC  
Tel: 68 – 992154665  
Email: hemesonlira@gmail.com

**Ranna Kíssia Alves das Neves**

Aluna de Mestrado – UFAC  
End: Rua Fausto Robalo, 221,  
Estação Experimental  
Rio Branco – AC  
Tel: 68 – 999819498  
Email: rannaneves@gmail.com

**Paula Alessandra Martins da Silva**

Aluna de Mestrado - UFAC  
End: Av. Lauro Muller, 3741, Formoso  
Cruzeiro do Sul – AC  
Tel: 68 - 999869143  
Email: paulaczsz@hotmail.com

**Cristiane Oliveira Cardoso**

Profª Adjunto UFAC  
End: BR 364 Km 04  
Rio Branco – AC  
Tel: 68 – 30912518  
Email: crisdeocardoso@gmail.com

**Comitê de Ética em Pesquisa UFAC:** End. Br 364, Km04. Tel: 68 3901-2500