Lucas Campana Pereira

Busca de genes associados à resposta ao teste de Montenegro para antígenos de *Leishmania*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

Lucas Campana Pereira

Busca de genes associados à resposta ao teste de Montenegro para antígenos de *Leishmania*

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Henrique Krieger

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pereira, Lucas Campana.
Busca de genes associados à resposta ao teste de Montenegro para antígenos de *Leishmania* / Lucas Campana Pereira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Krieger.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia genética.

Versão do título para o inglês: Search for genes associated with response to the Montenegro skin test for *Leishmania* antigens.

1. Epidemioloagia genética 2. *Leishmania* 3. GWAS
4. Intradermorreação de Montenegro 5. Doenças infecciosas 6. SNPI
I. Krieger, Prof. Dr. Henrique II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0134/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Campana Pereira.

Título da Tese: Busca de genes associados à resposta ao teste de Montenegro para antígenos de *Leishmania*.

Orientador(a): Prof. Dr. Henrique Krieger.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 10 de dezembro de 2008.

PARECER 870/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 91ª reunião realizada em 09.12.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Localização de genes relacionados com a suscetibilidade a infecção por Leishmania"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **09 de dezembro de 2009.**

Atenciosamente,

c/ Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
LUCAS CAMPANA PEREIRA
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEPSH. 077/2010

DECLARAÇÃO

Declaro que o relatório Parcial apresentado pelo pesquisador Lucas Campana Pereira, referente ao projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Localização de genes relacionados com a suscetibilidade a infecção por Leishmania"*, foi analisado e considerado satisfatório por esta Comissão, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

São Paulo, 29 de julho de 2010.

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Aos meus pais, irmãos e
minha esposa pelo apoio
incondicional e companheirismo
em toda essa jornada. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer aos meus Pais e irmãos pela ajuda, força e apoio durante minha vida, sem vocês não seria nada e muito menos chegaria até aqui.

À minha digníssima esposa Ana Laura pelo amor, atenção e companheirismo durante todos esses anos.

Ao orientador e grande amigo Doutor Henrique Krieger pelos ensinamentos diários e pela grande paciência.

Ao grande amigo Doutor Leandro Maza Garrido pela ajuda e apoio por todos esses anos.

Aos colegas de laboratório Doutor Ricardo Ferreira, Doutor Alexandre La Luna, Doutor Antonio Malheiros, às Mestras Julia Pescarini e Ana Paula Fioretti e ao Mestre Fernando Azenha, pela grande ajuda para busca desse objetivo.

Ao Professor Luis Marcelo Aranha de Camargo pela ajuda e ensinamentos durante as viagens ao campo.

À toda equipe que participou das coletas nos Municípios de Monte Negro-RO e Assis Brasil-AC.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP).

Ao CNPq, à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

PEREIRA, L. C. **Busca de genes associados à resposta ao teste de Montenegro para antígenos de *Leishmania.*** 2012. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente trabalho visa, por intermédio de métodos genético-epidemiológicos, a identificar genes associados à resposta a *Leishmanina*. Amostras de indivíduos residentes nos municípios de Monte Negro-RO (10 ^{0} 15 'S, 63 ^{0} 18' W) e Assis Brasil-AC (10° 56′ 27″ S, 69° 34′ 1″ W). A primeira abordagem constou de testes, de regiões candidatas com TaqMan® e a segunda com GWAS, e análises de associação foram feitas utilizando-se os pacotes SPSS e o Plink. Não foram encontradas associações com cinco SNPs (MYD88, IL12, IL10, IFNGR1 e NRAMP1). A análise de dados de varredura genômica com filtros indicou uma região no cromossomo 10 com 3 SNPs próximos que fazem parte de uma região regulatória. O ensaio com rs11251056 apresentou valores limítrofes, tornando-se um possível candidato para trabalhos futuros. A meta-análise apresentou efeitos indicativos no mesmo caminho de trabalhos anteriores, fazendo-nos pensar que, com adição de novos trabalhos, uma possível associação relacionada à suscetibilidade/resistência à infecção poderá ser encontrada.

Palavras-chave: Epidemiologia. *Leishmania.* GWAS. Teste de Montenegro.

ABSTRACT

PEREIRA, L. C. **Search for genes associated with the response to Montenegro skin test for Leishmania antigens**. 2012. 84 p. Ph. D. thesis (Biology of the Interactions Between Hosts and Pathogens) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The present study aims, through genetic-epidemiological methods, to identify genes associated with the response to Leishmania antigens. Using samples from the municipalities of Monte Negro-RO (10 ^{0} 15 'S, 63 ^{0} 18' W) and Assis Brazil-AC (10° 56′ 27″ S, 69° 34′ 1″ W). In the first approach was to test candidate regions tested with TaqMan® and the second was GWAS. Association analyzes were performed using SPSS and Plink. No associations were found with five SNPs (MyD88, IL12, IL10, IFNGR1, and NRAMP1). The analysis of GWAS data with filters indicated a region on chromosome 10 with three nearby SNPs that are part of a regulatory region, although the test rs11251056 have borderline values, becoming a possible candidate for future work. The meta-analysis presented in the same way indicative effects of earlier work, which makes us think that with the addition of new jobs, a possible association related to susceptibility/resistance to infection could be found.

Keywords: Epidemiology. *Leishmania.* GWAS. Montenegro skin test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genótipos observados do teste caso, controle para os SNPS selecionados.....46

Tabela 2 - Valor de p, calculado do teste caso controle dos SNPS selecionados.....46

Tabela 3 - Correlação entre genótipos dos grupos caso e controle, analisando-se 2 SNPS simultaneamente.....47

Tabela 4 - Teste de mistura dos grupos caso e controle 48

Tabela 5 - GWAS inicial com informações dos cromossomos, marcadores, posição, alelo 1, frequência dos afetados e não afetados, alelo 2, qui-quadrado, o valor de p e Odd ratio.....50

Tabela 6 - Lista de SNPS selecionados com GWAS e testados com TaqMan®.....52

Tabela 7 - Valores de qui-quadrado, valor de p e Odd Ratio dos 16 SNPS testados para os grupos caso e controle no município de Assis Brasil.....53

Tabela 8 - Valores de qui-quadrado, valor de p e Odd Ratio dos 16 SNPS testados para os grupos caso e controle no município de Monte Negro 54

Tabela 9 - Associação entre SNPS do cromossomo 10 com a resposta ao antígeno da *Leishmania*.....57

Tabela 10 - Valores de qui-quadrado, valor de p e Odd Ratio para os grupos caso e controle para o município de Assis Brasil.....58

Tabela 11 - Valores de qui-quadrado,valor de p e Odd Ratio para os grupos caso e controle para Monte Negro.....59

Tabelas 12 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs10197139 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....61

Tabelas 13 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs2670726 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....61

Tabelas 14 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs2963232 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....62

Tabelas 15 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs7714384 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....62
Tabelas 16 Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs6960379 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....62
Tabelas 17 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs10816385 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....62
Tabelas 18 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs4880974 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....63
Tabelas 19 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs2783418 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....63
Tabelas 20 Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs1965297 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....63
Tabelas 21 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs9317632 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....63
Tabelas 22 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs1719271 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....64
Tabelas 23 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs12926508 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....64
Tabelas 24 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs238404 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....64
Tabelas 25 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs444709 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....64

Tabelas 26 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs4809987 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....65
Tabelas 27 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs2833644 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....65
Tabelas 28 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs11251062 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....65
Tabelas 29 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs4880557 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....65
Tabelas 30 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs6560798 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....66
Tabelas 31 - Número de observações para cada alelo e Odd Ratio do SNP rs11251056 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).....66
Tabela 32 - Teste de Heterogeneidade para todas as amostras estudadas e todos os ensaios testados.....67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo da Leishmaniose.....22
Figura 2 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsável pela transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.....25
Figura 3 - Teste de Montenegro.....28
Figura 4 - Via bioquímica das *Leishmanioses*.....40
Figura 5 - Dados de GWAS com a amostra de Montenegro.....51
Figura 6 - Dados de GWAS com a amostra de Montenegro, empregando-se filtros.....56
Figura 7 - Varredura do cromossomo 10.....57
Figura 8 – Localização da região regulatória do cromossomo 10 segundo o Ensemble.....59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……...……..……...……..……...15
1.1 Breve histórico sobre as *Leishmanias*.....17
1.2 Epidemiologia.....19
1.3 Parasito.....21
1.4 Aspectos genéticos do hospedeiro que influencia a infecção por *Leishmania*.....25
1.5 Intradermorreação de Montenegro.....27
2 OBJETIVO.....31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....32
3.1 Casuística.....32
3.1.2 Assis Brasil.....33
3.2 Extração e quantificação de DNA.....34
3.3 Genotipagem de SNPS por TaqMan® Genotyping.....34
3.4 Varreduras genômica utilizando-se microarranjos de DNA......35
3.4.1 Digestão de DNA genômico, ligação a adaptadores NSPI e diluição.....35
3.4.2 Reação de PCR para amplificação de fragmentos de 200 a 1200 pb......36
3.4.3 Fragmentação do produto do PCR, denaturação e marcação terminal.....36
3.4.4 Hibridização, Lavagens, Coloração e Leitura.....37
3.4.5 Coleta e Análise dos Dados dos Microarranjos de DNA.....37
3.4.6 Pacote Plink.....38
3.5 Análises Estatísticas.....38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....39
4.1 Genes Candidatos.....39
4.2 Mistura.....47
4.3 GWAS.....48
4.4 Meta-Análise.....60
5 CONCLUSÕES.....68
REFERÊNCIAS.....69

1 INTRODUÇÃO

A Epidemiologia Genética é a ciência que trata a etiologia, distribuição e controle de doenças em grupos de familiares ou com as causas genéticas hereditárias das doenças nas populações, admitindo o conceito de "genético" em sentido amplo, que inclui tanto as heranças biológicas como culturais; da mesma forma, a expressão "familiares" inclui relações tão próximas como a dos gêmeos, e tão abrangentes como grupos étnicos (MORTON, 1976).

Os interesses pela epidemiologia genética de doenças infecciosas se acentuaram pelas propostas de Haldane (1949) que advertiu sobre a importância de alguns polimorfismos humanos na seleção natural, atuando em epidemias, esclarecendo mecanismos hereditários que causam variabilidade na resistência/suscetibilidade aos patógenos. A epidemiologia está associada às características demográficas da população, como migração, fertilidade, mortalidade, distribuição etária que podem ser vitais para o entendimento da distribuição das doenças em famílias, fornecendo indícios para a resposta dos organismos às infecções, podendo também ajudar no controle e prevenção de algumas doenças infecciosas de interesse público, além de sugerir novos processos terapêuticos (BEIGUELMAN, 1994; CAMARGO et al., 2002).

As doenças infecciosas ocorrem a partir da exposição do hospedeiro aos respectivos patógenos, e seu estabelecimento depende do contágio, da constituição genética do patógeno e do hospedeiro (HILL, 2006). Existem diversos métodos para identificar genes relacionados à suscetibilidade ou resistência às doenças infecciosas. Classicamente os estudos genéticos são realizados testando-se polimorfismos de genes candidatos, que possuem algum tipo de evidência biológica com a doença estudada por meio de métodos que basicamente podem ser agrupados em análises de ligação ou de associação genética (FERREIRA; KAWAMATA; KRIEGER, 2007).

Os resultados dos estudos de ligação e associação genética podem mapear e identificar possíveis genes candidatos, que influenciam a infecção. Nesses estudos, as variantes de um gene candidato à resistência de determinada doença infecciosa são estudadas comparativamente entre os indivíduos que têm e os que não têm a infecção (JORDE et al., 2004).

Atualmente, os estudos de associação foram potencializados pela grande disponibilidade de marcadores genéticos, que podem ser utilizados em varreduras genômicas de milhares de SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism” ou polimorfirmo de base única) simultaneamente, através dos microarranjos de DNA.

De acordo com Hill (2006), existem descritos pelo menos 25 genes associados a doenças infecciosas em humanos, estes genes oferecem evidências aceitáveis de associação de um alelo específico com doenças. A determinação de alelos de suscetibilidade para algumas doenças autoimunes e inflamatórias têm permitido investigar doenças infecciosas. A análise de suscetibilidade para certas doenças infecciosas em camundongos levou ao mapeamento e identificação de alguns genes candidatos para estudos em humanos (HILL, 1998).

O crescimento da epidemiologia genética tem sido alimentado por dois grandes desenvolvimentos. O primeiro é o projeto genoma humano que é uma colaboração internacional que começou em 1990 e produziu em 2001 a primeira visão ampla da sequência de um DNA humano, juntamente com estimativas de que compõem cerca de 30.000 genes (VENTER et al., 2001). Os dados estão disponíveis para pesquisa através da internet e oferecem uma sequência extremamente precisa. O segundo desenvolvimento foi o projeto internacional HapMap (alelos consecutivos ao longo de um cromossomo humano) e frequências de single nucleotide polymorphims (SNP) originados de 30 trios (adulto e os pais) de Ibadan, Nigéria; 30 trios de moradores de Utah com ancestrais do norte e Europa ocidental; 44 indivíduos não aparentados de Tóquio e 45 indivíduos Han chineses não aparentados de Pequim (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2003). As frequências de SNPs determinadas a partir deste projeto estão disponíveis publicamente no único banco de dados de polimorfismos, patrocinado pelo Centro Nacional de informações de Biotecnologia, juntamente com a informação de haplótipos.

Atualmente, duas abordagens gerais são empregadas na avaliação genômica para determinar se a genética é responsável por uma doença. Normalmente, ambas as abordagens envolvem projetar um estudo caso-controle para determinar se um SNP é encontrado em frequência diferente entre os casos, quando comparado com os controles. A primeira abordagem é o estudo de associação do tipo genome-wide (GWAS). SNPs do genoma inteiro são selecionados para uma primeira avaliação de regiões de possível interesse. Estudos de GWA são ensaios simples em que o genoma inteiro é escaneado para identificar genes de suscetibilidade a doenças em indivíduos (casos) em comparação com indivíduos sem doença (controles). Análises estatísticas são aplicadas para identificar diferenças significativas entre os grupos, permitindo assim um foco concentrado em SNPs de genes de interesse potencial. O objetivo final de um GWAS é identificar novos alvos genômicos para a intervenção na doença. Atualmente, a principal desvantagem é o custo, mas que está paulatinamente deixando de ser uma barreira, pois as tecnologias para o alto rendimento (high-throughput) de processamento estão melhorando. Outra consideração é o apoio computacional, que é

necessário, já que estudos GWAS geram enormes quantidades de dados, e uma infraestrutura sofisticada para análise de bioinformática é necessária (LOMBARDO; PETERSEN, 2009).

A segunda abordagem mais comum é o estudo de associação de gene candidato. Ao contrário do GWAS, este método é dirigido, para uma seleção de genes com potencial importância na característica estudada. A principal vantagem desta abordagem é que menos genes são examinados e o tamanho da amostra pode ser menor do que o requerido para um GWAS, de modo que o custo é menor. A principal limitação no estudo de gene candidato é que o número de genes analisados é pré-estabelecido e limitado, portanto novas vias ou genes críticos podem não ser levados em conta na análise (LOMBARDO; PETERSEN, 2009).

O primeiro estudo GWA foi publicado em 2005 e investigou pacientes com degeneração macular relacionada à idade. Até 2011, centenas ou milhares de indivíduos foram testados, mais de 1.200 estudos em humanos examinaram mais de 200 doenças e quase 4.000 associações de SNP foram encontrados (JOHNSON; O´DONNELL, 2009; KLEIN et al., 2005).

A abordagem mais comum em estudos GWA é o caso-controle, que compara dois grandes grupos de indivíduos: um grupo controle saudável e um grupo caso afetado por uma doença. Todos os indivíduos em cada grupo são genotipados para a maioria dos SNPs conhecidos. Para cada um destes SNPs se investiga se a frequência do alelo é significativamente alterada entre o grupo caso e o grupo controle. Em tais configurações, a unidade fundamental para o tamanho do efeito é Odd Ratio (OR). Quando a frequência do alelo no grupo caso é muito mais elevada do que no grupo de controle, a razão do OR será maior do que 1, mesmo para a frequência mais baixa do alelo. Além disso, um valor de P significante é geralmente calculado usando um simples teste do qui-quadrado .

1.1 Breve histórico sobre as *Leishmanias*

As leishmanioses tegumentares americanas (LTA) acompanham o homem desde a antiguidade, existindo relatos encontrados na literatura desde o século 1 D.C. (BASANO; CAMARGO, 2004).

Nas Américas (Peru), foram encontradas cerâmicas de 400 a 900 anos d.C., que apresentavam mutilações de lábios e nariz, hoje conhecidas como leishmaniose cutânea-mucosa (LAINSON; SHAW, 1988). Também foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas (SANTOS, 1994).

A indicação mais segura, e talvez mais antiga da existência da doença no Brasil, verifica-se na citação do livro de Tello intitulado “Antiguedad de La syphilis en el Peru”, de 1908, editada em 1827, que descreve a viagem de um missionário pela região amazônica. Este observara a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de insetos tendo, como consequência, lesões destrutivas de boca e nariz (VALE; FURTADO, 2005).

No Brasil, Cerqueira, em 1855, observara a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. Em 1895, foi descrita a moléstia em italianos provenientes de São Paulo no retorno ao seu país. (PESSOA, 1982).

Entretanto, no Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foram confirmadas, pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania* idênticas à *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903) da leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo (PESSOA, 1982).

Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcera de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (BASANO; CAMARGO, 2004).

Estudos recentes sugerem que a LTA surgiu na Amazônia e depois nas regiões de florestas altas e região andina, devido ao fluxo humano durante o império inca e à colonização espanhola. A doença expandiu-se às demais regiões por meio de migrantes que, após o declínio da extração do látex na Amazônia, retornaram às suas origens, na região Nordeste, ou se dirigiram para a região Sudeste, principalmente Minas Gerais e São Paulo, atraídos pelo desenvolvimento gerado pelo cultivo do café. Além disso, novas migrações para o sul da Amazônia, geradas pela construção de estradas, exploração mineral e extração da madeira colaboraram para o surgimento de vários surtos epidêmicos e a franca expansão da endemia, nos últimos 20 anos, em diversas regiões do país (VALE; FURTADO, 2005).

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde como uma das cinco doenças parasitárias endêmicas de maior importância (WHO, 2006).

Essa doença, que pode acometer humano e outros vertebrados, se apresentam sob quatro formas principais: tegumentar americana (LTA) ou cutânea, cutâneo-mucosa (LCM), cutânea difusa (LCD) e visceral (LVA) ou calazar, (SILVA; CAMARGO, 2004).

1.2 Epidemiologia

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, as análises de estudos epidemiológicos da LTA demonstram mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas (BASANO; CAMARGO, 2004). Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas, como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença (BASANO; CAMARGO, 2004).

A incidência da LTA no Brasil apresenta várias estimativas, dentre elas para o período de 1980 a 1990, no qual se chegou a um total de 154.103 casos (WHO, 1990). Outra estimativa, abrangendo os anos de 1985 a 1999, aponta 388.155 casos autóctones de LTA (BRASIL, 2000). Comparando-se os valores absolutos e o coeficiente de detecção, houve um aumento respectivamente de 13.654 casos/ano para 30.550 casos/ano, e de 10,45 casos/100.000 habitantes para 18,63 casos/100.000 habitantes nestes dois períodos. Vários estudos brasileiros apontam para a ocorrência de LTA e seus vetores em todo o território brasileiro, porém apresentando-se com diferentes coeficientes de incidência. Deve-se salientar que a ocorrência do perfil periurbano de transmissão está relacionada à falta de saneamento básico, à situação econômica precária, à migração da população para as periferias das cidades, aos materiais de construção inadequados e ao convívio com animais ermos ou mesmo domesticados que servem de novos reservatórios da doença, aliados ao aumento da população de ratos que se concentram nos "depósitos" de lixo destas áreas (BASANO; CAMARGO, 2004).

Segundo dados de 2008 do Ministério da Saúde, foram registrados 8.576 casos de Leishmaniose cutânea na região norte (935 em Rondônia), 5.915 no nordeste, 1.580 no sudeste, 624 no sul e 2.969 no centro-oeste. De Leishmaniose visceral foram 772 no norte (nenhum caso em Rondônia), 1.370 no nordeste, 691 no sudeste, 308 no centro-oeste e nenhum caso na região sul.

A partir do indicador da densidade de casos, identificou-se, no período de 2004 a 2006, 26 circuitos de produção da doença de importância epidemiológica, os quais foram

responsáveis por 56,9% do total de casos registrados em 2007, distribuídos em 663 municípios do total de 1.803 que apresentaram casos em todo o país (BRASIL, 2010).

Atualmente, pode-se dizer que, no Brasil, a LTA apresenta três padrões epidemiológicos característicos:

a) silvestre – Neste padrão, a transmissão ocorre em área de vegetação primária e é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano, quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia;

b) ocupacional e lazer – Este padrão de transmissão está associado à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo. Por isso ela atinge especialmente homens que se dedicam a profissões que exigem o contato silvestre, como a abertura de estradas, a coleta de produtos naturais, o garimpo, o turismo ecológico ou a extração de madeira. Os flebotomíneos envolvidos nesse primeiro padrão são essencialmente silvestres, assim como os animais que servem de reservatório para o agente causador (preguiças, tamanduás, gambás, etc). Por isso, os casos por transmissão florestal concentram-se predominantemente na região Amazônica e no Centro-Oeste;

c) rural e periurbano em áreas de colonização – Este padrão esta relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais. O mosaico formado por pequenas porções florestais e áreas de baixa densidade demográfica servirá de ambiente perfeito para a transmissão rural. Neste caso, há espécies de flebotomíneos adaptadas tanto às matas quanto às áreas próximas aos domicílios. A infecção pode ocorrer em casa ou até mesmo quando uma criança vai para escola e passa por um pequeno bosque. Áreas rurais de ocupação antiga, sobretudo em Estados como Ceará, Minas Gerais e Paraná, servem como exemplo (BRASIL, 2007).

Apesar dos números acima, a letalidade das leishmanioses tegumentares é inexpressiva, ocorrendo somente em casos esporádicos, como quando surgem infecções secundárias, ou quando ocorrem problemas na medicação do paciente. Muitos casos, inclusive, sequer são registrados, ou porque o infectado não desenvolve a doença (tornando-se apenas um portador), ou porque o enfermo simplesmente não procura um serviço médico (SABROZA, 2012).

O tratamento precoce dos casos ainda deve permanecer como prioridade do programa de controle desta endemia. Quanto às ações preventivas, é necessário haver uma adequação das atividades de controle às condições de cada local atingido pela doença. As pesquisas e a política de enfrentamento contra a enfermidade devem ser adaptadas para cada região, não existindo uma fórmula geral. Contudo, o alastramento do mal está intimamente ligado ao desequilíbrio ambiental, tema que deve ser sempre tratado como prioridade (SABROZA, 2012).

1.3 Parasito

Existem aproximadamente 20 espécies patogênicas de protozoários causadores de leishmanioses, que fazem parte da família Tripanossomatidae, do gênero *Leishmania* e são divididos em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. Os protozoários possuem duas formas principais: uma flagelada (ou promastigota) encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada (ou amastigota), encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (WHO, 2006).

A amastigota possui forma esférica e aflagelada, de 2,5 a 5 μm de diâmetro e não possui mobilidade. É a forma encontrada parasitando intracelularmente as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado. Mais especificamente, seus habitats são os vacúolos digestivos (fagossomos) dos macrófagos que os fagocitam (DUNAISKI, 2006).

Os protozoários reproduzem-se por divisão binária simples, longitudinal, notando-se primeiro a divisão do cinetoplasto em dois, um conservando o antigo flagelo e outro produzindo nova estrutura. Segue-se com a divisão do núcleo e, por fim, a divisão do citossomo (DUNAISKI, 2006).

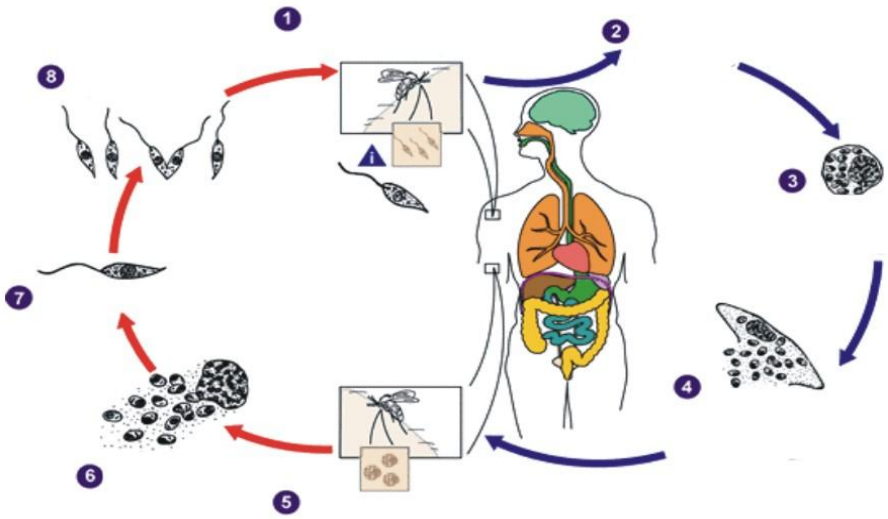
O promastigota possui forma alongada, com 10 a 20 μm de comprimento, e espessura entre 1,5 e 3 μm, apresentando a extremidade anterior arredondada e a posterior mais fina. O flagelo evidente confere mobilidade à célula flexível. É encontrada no intestino do inseto vetor (DUNAISKI, 2006).

Quando a forma amastigota diferencia-se nesta forma, observa-se o desenvolvimento da mitocôndria, que parece expandir-se a partir da parede do cinetoplasto. O núcleo torna-se maior, o complexo de golgi mais evidente e o retículo endoplasmático mais abundante. A estrutura dos filamentos de kDNA dentro do cinetoplasto passa a ser mais frouxa, mas este

conserva o aspecto (DUNAISKI, 2006).A transformação morfogenética entre a forma amastigota e promastigota dura entre 12 e 23 horas (DUNAISKI, 2006).

Quando as formas promastigotas são inoculadas em mamíferos, são rapidamente fagocitadas por macrófagos, no interior dos quais se transformam em amastigotas. O desenvolvimento depende da resposta imune celular do hospedeiro. Quando acontece a recuperação espontânea da infecção, ocorre o desenvolvimento da imunidade celular. Quando não há uma resposta imune celular adequada, a *leishmania* atinge as células do sistema reticuloendotelial. O período habitual de incubação é de 3 a 18 meses, podendo o parasita permanecer latente por um tempo superior, até que aconteça um comprometimento da imunidade celular (SILVA; CAMARGO, 2004).

Figura 1 - Ciclo da leishmaniose



(1) Mosquito extrai sangue do hospedeiro e introduz promastigotas.
(2) Promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos.
(3) Promastigotas assumem a forma de amastigotas dentro dos macrófagos.
(4) Amastigotas são liberados e infectam outras células.
(5) Mosquito ingere sangue humano infectado.
(6) Ingestão de células parasitadas.
(7) Amastigotas se modificam em promastigotas no estômago do mosquito.
(8) Promastigotas se multiplicam no estômago do mosquito transmissor.
Fonte: CDC (2010)

O parasita é transmitido pela picada do inseto vetor, que são pequenos dípteros, pilosos e de cor palha, família *Psycodidae*, ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus*

no Velho Mundo. No Brasil, são conhecidos popularmente pelos nomes mosquito palha, cangalinha, tatuquira, birigui, asa branca, entre outros (REY, 2001). Das 500 espécies de flebotomíneos conhecidas, 30 foram identificadas positivamente como vetores da doença. A fêmea do mosquito, ao picar o hospedeiro infectado, que pode ser um humano ou outro mamífero, desenvolve o parasito no interior do seu intestino, onde as amastigotas se modificam em promastigotas no estômago do mosquito, que migram para a probóscide do mosquito tornando-se infectante ao picar novo hospedeiro (WHO, 2006).

O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão do parasito nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. Muito pouco se sabe de seus criadouros, encontrando-se as formas imaturas em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas, e também nas forquilhas das árvores em tocas de animais, ou seja, em solo úmido, mas não molhado, e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (ARRUDA, 2006).

No Brasil, já foram identificadas 7 espécies de Leishmaniose cutânea, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. As principais espécies são:

a) ***Leishmania (Leishmania) amazonensis*** – distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo "várzea". Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-oeste (Goiás). O principal hospedeiro silvestre é o roedor *Proechimys sp*. (rato-soiá), além de outros roedores: *Oryzomys sp*., *Neacomys sp*., *Nectomys sp* e *Dasyprocta sp*.; os marsupiais *Metachirus sp*., *Philander sp*., *Didelphis sp*. e *Armosa sp*.; e a raposa *Cerdocyon thous*. Tem como principal vetor o *Lutzomyia flaviscutellata*, um flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico, e *L. olmeca* nociva como vetor secundário no Amazonas e em Rondônia. É responsável no homem pela leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa, e por uma forma sem tratamento conhecida por leishmaniose cutânea difusa anérgica (BASANO; CAMARGO, 2004);

b) ***Leishmania (Viannia) guyanensi*** – aparentemente limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas. É encontrada principalmente em florestas de terra firme, em áreas que não se alagam no período de chuvas. Tem como hospedeiros conhecidos a preguiça

(*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), o marsupial *Didelphis sp*. e o roedor *Proechimys sp*., sendo transmitida pelos vetores *Lu. umbratilis* (primariamente), *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (secundariamente). Estes vetores têm a característica de repousar em troncos das árvores em terra firme após o repasto, e quando perturbados de dia (principalmente) ou à noite, atacam em grande número. Causam no homem a Leishmaniose cutânea, com múltiplas lesões, e raramente lesões nas mucosas (BASANO; CAMARGO, 2004);

c) ***Leishmania (Viannia) braziliensis*** – tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Na Amazônia, a infecção é usualmente encontrada em áreas de terra firme. Quanto ao subgênero *Viannia*, existem outras espécies de *Leishmania* recentemente descritas: *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, com poucos casos humanos no Pará; *L. (V) shawi*, com casos humanos encontrados no Pará e Maranhão (BRASIL, 2007). Na transmissão peridoméstica, apresentam-se como hospedeiros: cavalos, cães, jumentos e até gatos. Causa no homem a leishmaniose cutânea e a cutâneo-mucosa (BASANO; CAMARGO, 2004);

d) ***Leishmania. (Viannia) lainsoni*** - distribui-se pela região Amazônica, tem como hospedeiro a paca (*Agouti paca*) e, como único vetor conhecido e de baixa antropofilia a *Lu. ubiquitalis*, causando, com pouca frequência, a Leishmaniose cutânea (BASANO; CAMARGO, 2004);

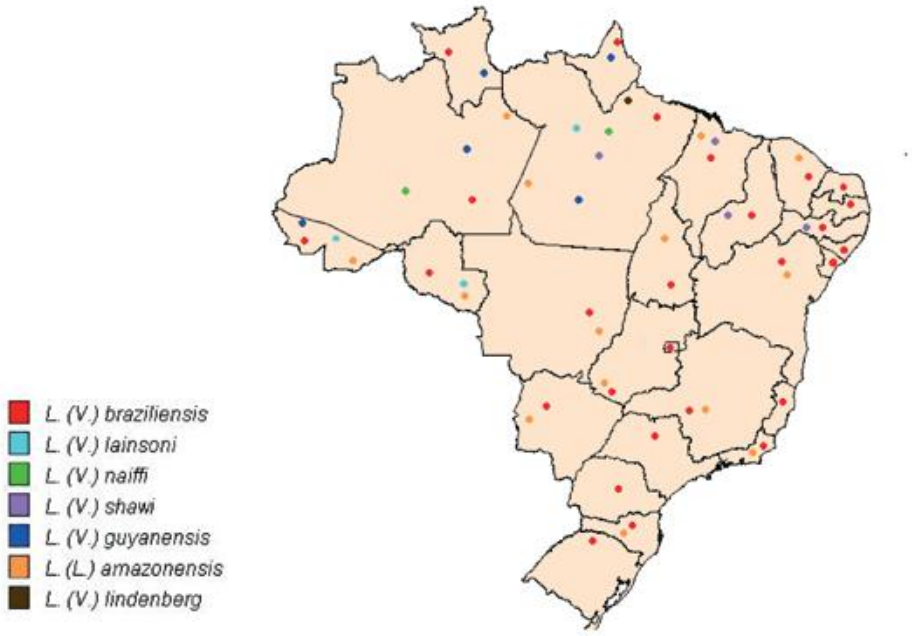
e) ***Leishmania. (Viannia) naiffi*** - distribui-se pelo Brasil nos Estados do Amazonas e Pará, e na Guiana Francesa. Tem como hospedeiro o tatu (*Dasypus novemcinctus*), sendo transmitido provavelmente por 3 espécies de flebotomíneos – *Psychodopigus paraensis*, *Ps. ayrozai*, *Ps. Squamiventris* – que apresentam alta antropofilia e cujos hábitos zoofílicos são pouco conhecidos. Causa no homem principalmente a Leishmaniose cutânea (BASANO; CAMARGO, 2004);

f) ***Leishmania. (Viannia) shawi*** - encontrada no Estado do Pará tem como hospedeiros os macacos (*Cebus apella*, *Chiropotes satanas*), a preguiça "real", o "bentinha" (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*) e o quati (*Nasua nasua*), sendo o vetor uma espécie do complexo *Lu. whitmani*, que tem como

habitat natural os troncos de florestas primárias, atacando avidamente quando molestados (BASANO; CAMARGO, 2004).

A distribuição, pelo Brasil, dos tipos de parasitas está apresentanda na Figura abaixo:

Figura 2 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Brasil.



Fonte: Brasil (2005)

1.4 Aspectos genéticos do hospedeiro que influenciam a infecção por *Leishmania*

Assim como as outras doenças infecciosas, as respostas clínicas das leishmanioses são influenciadas pela interação entre as características genéticas do parasito e do hospedeiro (SILVA; CAMARGO, 2004).

Apesar de ser causada pela mesma espécie de *Leishmania* nas formas cutâneas e mucosas, pacientes com a doença têm mecanismos imunoregulatórios induzidas pelo parasita, que podem explicar a diferença sobre a patogênese, a resposta terapêutica e, talvez, o prognóstico da doença.

Vários estudos indicam associação positiva entre leishmaniose cutânea e antígenos HLA. Com relação aos antígenos classe I, podemos citar a associação com HLA-Bw22 em estudo realizado na Venezuela (LARA et al., 1991) e uma baixa frequência do antígeno HLA-

Cw7 em uma população de pacientes da Guiana Francesa (BARBIER et al., 1987), bem como a associação dos antígenos HLA-A11, -B5 e -B7 com leishmaniose cutânea difusa em egípcios (EL-MOGY et al., 1993) .

Já, no caso dos antígenos de classe II, foi encontrada uma série de associações de antígenos com suscetibilidade (HLA-DQ3 e HLA-DRB1*0407, -DQA1*3011, -DPA1*401, -DPB1*0101) e resistência (HLA-DRB1*1500, -DRB1*1600, -DPB1*0401) à leishmaniose cutânea (OLIVO-DIAZ et al., 2004).

Em brasileiros, foi investigada a associação da LCM (leishmaniose cutânea-mucosa) com alelos de HLA de classes I e II em caucasianos e mulatos, não sendo encontrada diferença significativa para os antígenos HLA de classe I entre pacientes e controles. Porém, para os antígenos HLA de classe II, foi constatada a associação. O antígeno HLA-DQw3 está associado à suscetibilidade para a LCM, enquanto o antígeno HLA-DR2 está associado à resistência. Ainda com as variações étnicas e as diferentes interações entre parasito e hospedeiro, foi verificada a associação do antígeno HLA-DQw3 com susceptibilidade à LCM em caucasianos e mulatos brasileiros. Os antígenos HLA-DQw3 e HLA-DR2 podem ser, respectivamente, prováveis marcadores de risco e proteção genética para LCM (ALVES, et al., 2006).

A presença do alelo TNF-308A, no promotor do gene TNF-α, está relacionada a altos níveis de TNF circulante no sangue periférico, que pode contribuir para uma resposta inflamatória deletéria, como ocorre nos casos de leishmanioses cutânea-mucosa (CABRERA et al., 1995).

Os receptores do tipo Toll fazem parte da família de proteínas transmembrânicas de tipo I que formam uma parte do sistema imunológico inato. Nos vertebrados, também possibilitam a adaptação do sistema imune (TUON et al., 2008). Descoberto inicialmente na mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*), são os responsáveis pelo reconhecimento de várias vias de padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs “pathogen-associated molecular patterns”) expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos (TUON et al., 2008). Monócitos, macrófagos e neutrófilos fagocitam patógenos microbianos e estimulam a resposta de citocinas, dando como resultado o desenvolvimento da imunidade inata ou natural, a resposta inflamatória e medeiam a efetiva imunidade adaptativa. Sua função, em resumo, é o reconhecimento do patógeno e a estimulação da resposta imunológica contra agentes patológicos (TUON et al., 2008).

1.5 Intradermorreação de Montenegro

O Teste de Montenegro é utilizado desde a década de 20, sendo considerado extremamente sensível e específico, segundo os padrões de então, para o diagnóstico da leishmaniose (LOPES; LAENDER, 1945; MONTENEGRO, 1926; SALLES-GOMES, 1939). A facilidade de execução, a alta sensibilidade e o baixo custo fizeram com que seu uso fosse amplamente difundido. Assim, esse teste, também chamado de Reação Intradérmica de Montenegro ou Intradermorreação de Montenegro (IDRM), se estabeleceu como principal exame de rotina, no Brasil e no mundo (BRASIL, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1992).

Pode-se dizer que, até o aparecimento dos métodos de detecção molecular, nenhum teste complementar era tão sensível para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar quanto a IDRM, a qual, contudo, persiste como o mais prático. Além disso, sendo um teste de natureza imunológica e de uso "in vivo", requer que sua produção seja cuidadosamente padronizada e controlada, bem como seus eventuais efeitos adversos devidamente conhecidos nos indivíduos testados. Porém desconhecem-se ainda os determinantes antigênicos responsáveis pela reação de hipersensibilidade tardia revelada pelo teste, e está longe a padronização de um antígeno purificado, ou semi-purificado, à semelhança do antígeno protéico purificado (PPD) para o diagnóstico da tuberculose (SILVA, 2007).

O teste consiste na inoculação, por via intradérmica, de 0,1 mL de antígeno de *Leishmania* (leishmanina), normalmente na face anterior do antebraço do indivíduo a ser examinado. A reação é considerada positiva se, na leitura feita 48 horas após a aplicação, detectar-se enduração no local com mais de 5 milímetros de diâmetro.

Normalmente, a IDRM é lida 48 horas após a aplicação, através da medida da área endurada no local da aplicação, similarmente à leitura do teste tuberculínico. Essa leitura exige, portanto, o contato aplicador-paciente, seja em se tratando de paciente hospitalar ou de visitas domiciliares nos inquéritos epidemiológicos de campo, não ficando registro comprobatório do tamanho da enduração formada ou sua ausência, exceto a anotação do resultado da leitura.

Bearman et al. (1964) e Sokal (1975) mostraram a grande variabilidade entre observadores, quando o teste tuberculínico é lido diretamente no braço do paciente, por palpação. Baseado nos estudos de Bearman et al. (1964), Sokal (1975) propôs a metodologia de demarcação da área endurada com caneta esferográfica, sugerindo assim que poderia ser realizada por qualquer profissional treinado, reduzindo a variação entre observadores. Essa

metodologia foi logo incorporada à IDRM, sem que fossem realizados, no entanto, estudos comparativos entre as medidas efetuadas pelas duas metodologias (palpação e demarcação por caneta esferográfica, Figura 3). Na prática, a leitura deste teste costuma ser feita pela medida direta na pele, do tamanho da enduração, após 48 a 72 horas de sua aplicação (SILVA, 2007).

Figura 3 - Teste de Montenegro

Fonte: Mansur (2006)

Posteriormente, passou-se a documentar a reação por meio da aposição do papel umedecido em álcool sobre o contorno da enduração desenhado com caneta esferográfica, no braço do paciente, produzindo assim um decalque do local da aplicação do teste. Esse papel decalcado funciona como registro permanente do resultado da IDRM, e o decalque do contorno da enduração pode também ser medido. Embora, normalmente, se refira ao método de Sokal, como aquele que envolve a demarcação e decalque da área endurada obtida à IDRM, o método original não propunha o decalque em papel do resultado nem a medida deste no próprio papel (SILVA, 2007).

Por outro lado, o Teste de Montenegro, descrito e utilizado desde 1926, ainda apresenta vários pontos a serem esclarecidos, particularmente os determinantes antigênicos responsáveis por sua capacidade de indução imunológica e os fatores inespecíficos intervenientes nesse resultado.

A LTA pode cursar com uma grande variedade de formas clínicas, e a resposta à IDRM apresenta algumas peculiaridades relacionadas a elas, aspectos revisados de forma bastante abrangente por Marzochi (1992) e Marsden (1985). Os pacientes da forma cutânea clássica normalmente apresentam resposta positiva, iniciando cerca de 40 dias após a infecção e permanecendo mesmo após o tratamento. Por outro lado, pacientes da forma difusa da LTA apresentam teste de Montenegro negativo.

Já na década de 40, Pessoa e Pestana demonstraram a associação entre intensidade da IDRM, tempo de doença e presença de lesões mucosas, bem como a permanência da

positividade da reação em indivíduos curados (PESSOA; PESTANA, 1940). Tais autores concluíram também que a reação aos antígenos de *Leishmania* deveria permanecer por toda a vida do indivíduo. Desde então, a IDRM tem sido também utilizada como ferramenta importante no diagnóstico retrospectivo das leishmanioses. No entanto, em indivíduos com história pregressa de LTA, uma IDRM positiva poderá não ter valor diagnóstico caso o paciente apresente nova úlcera sugestiva na pele (SILVA, 2007).

Episódios nos quais a reação de Montenegro é positiva em indivíduos que não apresentam histórico prévio de leishmanioses e tampouco nenhuma lesão suspeita, podem indicar a possibilidade de infecções subclínicas (GUERRA et al., 1985), enquanto que indivíduos imunodeprimidos, como os portadores de HIV quando doentes, habitualmente apresentam resultados negativos para a reação de Montenegro (GARCIA-GARCIA et al., 2006).

Casos relatados na literatura indicam que os diâmetros das indurações causadas pelo teste de Montenegro não demonstraram correlações significantes com o número e tipo das lesões, ou mesmo com duração da infecção (SADEGHIAN et al., 2006).

A própria reação intradérmica pode causar sensibilização do indivíduo, que positivará em um segundo teste, contudo este é um assunto controverso na literatura; no caso da *Leishmania*, esta sensibilização parece estar relacionada com o intervalo de tempo entre as repetições das reações intradérmicas. Neste caso, intervalos curtos favorecem uma maior sensibilização (JOSÉ et al., 2001). Também vale ressaltar que a falta de padronização nas preparações comerciais pode dificultar a comparação entre testes realizados com diferentes leishmaninas.

A resposta a várias das questões consideradas anteriormente é dificultada, entre outros aspectos, pela inexistência de um antígeno padrão para o teste de Montenegro e, também, por diferenças nos métodos de leitura e de realização do mesmo. No Brasil, na década de 50, foi proposta a produção da leishmanina por sonicação (CORRÊA; AMATO NETO, 1958) e essa técnica vem sendo utilizada, com algumas modificações, até os dias atuais. Por essa mesma época, alguns outros estudos realizados no Brasil, na tentativa de padronização do teste, resultaram na descoberta da relação entre a potência do reativo e a concentração antigênica do mesmo (ROTBERG, 1952), com uma decorrente padronização da concentração em 40 microgramas de antígeno protéico/mL da solução antigênica (MELO et al., 1977), que é utilizada na grande maioria dos reativos produzidos desde então (SILVA, 2007).

Apesar da relativa homogeneização deste parâmetro, os antígenos utilizados são, em geral, diferentes entre si. Os antígenos mais utilizados atualmente constituem extratos

semiparticulados de diferentes espécies de *Leishmania*, diluídos em solução salina, contendo timerosal a 1:10000 ou fenol a 0,4%, como preservantes, e acondicionados em frascos multidose (de 10 a 50 doses de 0,1 mL/ frasco). O uso de frascos multidose faz com que não possamos utilizar de rotina antígenos sem preservativos, sob risco de contaminação da suspensão antigênica.

2 OBJETIVO

O presente trabalho visou, através de métodos genético-epidemiológicos, a identificar genes associados com mecanismos de resistência/suscetibilidade à resposta à infecção por *Leishmania*, já que, de acordo com trabalhos em andamento no nosso laboratório, existem indícios de participação de um gene recessivo que influencia as respostas imunológicas ao teste cutâneo de Montenegro, feito na população do município de Monte Negro (RO). Pretendeu-se identificar este gene recessivo através de estudos de associação do fenótipo com marcadores genéticos e genes candidatos e também, buscando por intermédio de uma varredura genômica abrangente, identificar genes e regiões cromossômicas associadas a este fenótipo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuísticas

Como parte de um grande Trabalho coordenado pelo Professor Doutor Henrique Krieger, Camargo et al. (2002) estudou os padrões demográficos e epidemiológicos da Amazônia Ocidental, onde se pretendeu descrever e analisar uma parte da população principalmente rural, afim de contribuir para a compreensão da epidemiologia genética de algumas infecções parasitárias com ênfase no município de Monte Negro (RO) (10 ^{0} 15 'S, 63 ^{0} 18' W), que está localizado na região ocidental da Amazônia brasileira, com cerca de 13.000 habitantes. A população desse estudo era constituída por migrantes provenientes do sul e sudeste do Brasil, especialmente São Paulo e Minas Gerais, parte dos quais está se miscigenando com os descendentes de pessoas que vieram principalmente do Nordeste do Brasil, durante a exploração da borracha (1880 a 1910), e com aqueles que são descendentes dos primeiros habitantes e que apresentam um forte componente ameríndio. A principal ocupação da maioria dos homens adultos (96%), na população de Monte Negro, está relacionada à agricultura, enquanto cerca de 80% das mulheres adultas são dedicados a atividades domésticas. O analfabetismo atinge cerca de 20% dos adultos, entre crianças, esse percentual cai para 6%. As famílias vivem em casas de madeira, e um terço deles tem acesso à eletricidade. Nas famílias, a idade média dos pais e mães são, respectivamente, 41,9 ± 13,21 e 36,3 ± 13,35 anos. Na geração filial, a idade média em anos para meninos e meninas é, respectivamente, 12,2 ± 8,77 e 10,46 ± 7,37 anos (CAMARGO et al., 2002).

A taxa de alfabetização, nos indivíduos com mais de 15 anos em 2010, era de 85,5%, já o crescimento anual da população é de 1,10%, a natalidade de 2007 foi de 238 vivos, a urbanização de 2007 foi de 52,43%, IDH de 0,685, segundo dados do Portal ODM que apresenta um relatório dinâmico do município de Monte Negro-RO.

Em relação à composição étnica da população de Monte Negro, ela está formada por um componente Africano de 0,25±0,032, Ameríndio de 0,12±0,046 e finalmente o componente Caucasóide de 0,63±0,054 (CAMARGO et al., 2002).

Diversas variáveis têm um efeito no perfil de epidemiologia genética dessa população, notadamente a mistura étnica e as influências demográficas, ecológicas e ambientais (FERREIRA et al., 2006).

A amostra era composta de 924 indivíduos selecionados aleatoriamente, sendo que 313 indivíduos foram selecionados aleatoriamente e submetidos à intradermorreação de Montenegro, com 0,1 ml de leishmanina de *Leishmania amazonensis,* diluída em suspensão salina fenolada a 0,4% (Biomanguinhos-Fiocruz). Após 48h, os diâmetros das indurações foram medidos e variaram entre 0 a 20 mm. Foram considerados positivos indivíduos com indurações igual ou maior de 5mm. Os indivíduos também tiveram uma amostra de sangue extraída e posteriormente congelada a -20 ºC (CAMARGO et al., 2002).

Somente 40 indivíduos foram positivos e o pareamento dos 40 indivíduos controles foi tomado como base o trabalho de Fioretti (2009) que, com o auxílio da técnica de regressão escalonada, mostrou que somente os parâmetros sexo e idade eram significantemente relacionados à resposta ao antígeno de *Leishmania*.

Foi utilizada também uma amostra mais recente do município de Monte Negro (década de 2000), coletada pelo professor Luiz Marcelo Aranha de Camargo, na qual existiam dados de quase 300 indivíduos, com informações de sexo, idade, profissão, grau de escolaridade, naturalidade, endereço, tipos de residência e exames práticos que foram feitos pelos alunos de Medicina da Faculdade São Lucas de Porto Velho-RO, mas a grande maioria não forneceu sangue e não se sujeitou ao teste de IDRM, por várias razões. Utilizamos assim os mesmos parâmetros mencionados anteriormente para o pareamento, e com isso foram selecionados somente 17 casos e 17 controles.

3.1.2 Assis Brasil

A segunda população estudada foi à cidade de Assis Brasil (10° 56′ 27″ S, 69° 34′ 1″ W), no estado do Acre, onde o Professor Camargo, com sua equipe, faz um trabalho junto à comunidade, buscando melhorar as condições de saúde básica desse município.

A população estimada é de 6.075 habitantes e sua área é de 2875.915 km², é uma cidade que faz parte da Fronteira Trinacional Brasil-Peru-Bolívia, além de ser a porta de saída de produtos regionais rumo aos portos marítimos do Oceano Pacífico. A coleta durou uma semana com auxílio de alunos de Medicina da Faculdade São Lucas de Porto Velho-RO.

A cidade apresenta algumas endemias como qualquer cidade da região norte que é desprovida de um sistema relativamente eficaz de saúde, e dentre elas está a Leishmanose. A amostra de sangue foi coletada em tubos vacoette K2E K2EDTA (Greiner Bio-one), durante

uma semana, no período das 8 horas da manhã até as 18 horas, e armazenados em temperatura a - 20 ºC.

No Teste de Intradermorreação de Montenegro, 47 indivíduos consentiram em participar do estudo com IDRM e, após o pareamento utilizando os parâmetros sexo e idade, foram selecionados somente 14 casos e 14 controles.

3.2 Extração e quantificação do DNA

Inicialmente, a Extração de DNA foi realizada a partir de 200 µl utilizando-se o illustra blood genomic prep Mini spin kit (GE Healthcare), posteriormente passou-se a utilizar o illustra Genomiphi V2 DNA amplification Kit (GE Healthcare) para realizar a amplificação total do genoma diretamente de 1 µl de Sangue diluído 3x com tampão PBS com a enzima Phi 29.

Para a realização deste estudo, utilizaram-se amostras de sangue coletadas previamente (CAMARGO et al., 2002). As mesmas apresentaram certo grau de hemólise e presença de coágulos, o que deve ser a causa mais provável do baixo rendimento obtido com o sistema de extração de DNA illustra.

Como alternativa, foi empregada a técnica de amplificação total do genoma, utilizando-se a enzima mesófila Phi-29 (GenomiPhi V2 Amplification Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway , NJ, USA). Esta tecnologia é aceita pela empresa Affymetrix para a obtenção adequada de DNA, quando não se dispõe de quantidade suficiente de DNA e quando uma nova coleta é inviável (GARRIDO, 2010).

Os DNAs obtidos com o protocolo de amplificação diretamente de lisados de sangue com Phi-29 renderam as quantidades necessárias de DNA para cada amostra, bem como apresentaram uma relação de absorbância 260/280 nm entre 1,8 e 2,0, desta forma foi possível dar-se início às genotipagens destas amostras (GARRIDO, 2010).

A quantificação do DNA foi realizada na técnica de fluorometria, utilizando-se o Qubit Quantitation Plataform (Invitrogen – Life Technologies, CA, USA) e também o espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

3.3 Genotipagem de SNPs por TaqMan® Genotyping

Foram determinados os genótipos de 5 SNPs presentes em genes candidatos a influenciar a resposta do hospedeiro ao antígeno da *Leishmania*, nos indivíduos estudados.

O genótipo foi obtido utilizando-se a tecnologia PCR tempo real, empregando-se sondas do tipo TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), para a discriminação dos genótipos, e a leitura foi obtida pelo programa 7500 System version 1.2.3 (Life Technologies, CA, USA).

O sistema TaqMan® utiliza uma sonda fluorescente para permitir a detecção de um produto específico da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da PCR. As vantagens do sistema TaqMan® são as seguintes: É necessária a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente. · As sondas podem ser marcadas com corantes *reporter* distintos e distinguíveis, os quais permitem a amplificação de duas sequencias distintas em um mesmo tubo de reação. O pós-processamento da PCR é eliminado, o que reduz a mão-de-obra do ensaio e os custos de materiais. A principal desvantagem do sistema TaqMan® é a necessidade de síntese de diferentes sondas para seqüências distintas.

As determinações de genótipo foram realizadas em triplicata, utilizando-se o equipamento Realplex Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) em uma configuração para uso de placas de 96 poços. O volume final de reação foi otimizado para 15 µl e a quantidade de DNA usada por reação foi de 2 ng.

O programa utilizado inicia-se com uma denaturação inicial de 10 minutos a 95º C, seguida por 45 ciclos (95 ºC por 15 segundos e 1 minuto a 60 ºC).

Com auxílio do pacote SPSS, foram feitos os testes de correlação entre as amostras de caso controle para o mesmo SNP, ou pares de SNPs. O mesmo programa foi utilizado nos cálculos de correlação e verificação de significância estatística realizadas nas análises iniciais com os dados obtidos com os microarranjos de DNA.

3.4 Varredura Genômica utilizando-se microarranjos de DNA

As frequências alélicas de 262.264 SNPs dos grupos estudados foram determinadas, através do sistema de microarranjos de DNA 250 K Nsp (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, USA). Este procedimento é dividido em várias etapas que estão abaixo sumarizadas.

3.4.1 Digestão do DNA genômico, ligação a adaptadores Nsp I e diluição

Para cada amostra do DNA genômico foram digeridos 250 ng com a enzima Nsp I (New England Biolabs) por 2 horas a 37 ºC, seguida de inativação térmica da enzima (65 ºC

por 20 minutos), posteriormente o DNA digerido foi ligado aos adaptadores NSP I (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay Kit) com T4 DNA ligase (New England Biolabs) a 16 ºC por 3 horas.

Após a etapa de inativação térmica da T4 DNA ligase (70 ºC por 20 minutos), o DNA foi diluído 4 vezes com água (Water molecular biology reagent Sigma-Aldrich).

3.4.2 Reação de PCR para amplificação de fragmentos de 200 a 1200pb

O DNA ligado aos adaptadores NSP I foi usado como molde na reação de polimerização, cuja reação é otimizada para amplificar fragmentos na faixa entre 200 e 1200 pb. Os oligonucleotídeos iniciadores de reação foram fornecidos junto ao Affimetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay Kit.

O roteiro utilizado para a reação de amplificação foi o seguinte: denaturação inicial a 94 ºC por 3 minutos; 30 ciclos (94 ºC por 30 segundos; 60 ºC por 30 segundos; 68 ºC por 15 segundos) e extensão final de 68 ºC por 7 minutos. Este é o protocolo recomendado pela empresa Affymetrix para termocicladores da marca MJ Reseach, como o que foi utilizado neste estudo (MJ Research Inc. - modelo PTC-100, Minessota, MI, USA).

A checagem desta reação foi feita através de eletroforese em gel de agarose (2%). Os DNAs validados para seguir o protocolo após a eletroforese foram purificados com o DNA Amplification Clean-up Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA).

3.4.3 Fragmentação do produto de PCR e marcação terminal do DNA

Os DNAs purificados foram quantificados utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 e diluídos para uma concentração final de 2 µg/µl com o tampão RB Buffer fornecido com o DNA Amplification Clean-up Kit (Clontech).

Na etapa de fragmentação, foram utilizadas 0,25U de DNAse I (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay Kit) para fragmentar 90 µg do DNA de cada amostra purificada na etapa anterior. As condições de incubação da reação de fragmentação foram de 35 minutos a 37 ºC, posteriormente a enzima foi inativada a 95 ºC por 15 minutos.

A eficiência da reação de fragmentação foi verificada através de eletroforese das amostras fragmentadas em gel de agarose de 4%, sendo validadas amostras em que o DNA apresentasse tamanho inferior a 200 pb.

A marcação terminal do DNA com nucleotídeo biotinilado foi realizada com Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, a 37 ºC por 4 horas.

3.4.4 Hibridação, lavagens, coloração e leitura

A etapa de hibridação da amostra com o microarranjo 250 K NSP foi realizada no GeneChip Hybridization Oven 645 (Affimetrix Services Lab, Santa Clara, CA, USA). As sucessivas etapas de lavagem e coloração com Estreptavidina conjugado com Ficoeritrina (SAPE Molecular Probes/Life Technologies) e com o Anticorpo Anti-estreptavidina biotinilado (Vector Laboratories Inc) foram realizadas com o GeneChip Fluidics Station 450 (Affimetrix Services Lab, Santa Clara, CA, USA). Finalmente a leitura do ensaio foi realizada no GeneChip Scanner 3000 7G (Affimetrix Services Lab, Santa Clara, CA, USA). A hibridização tem duração de 16-18 horas sob a temperatura de 50 ºC.

3.4.5 Coleta e análise dos dados de microarranjos de DNA

Após a leitura dos microarranjos no Genechip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), os resultados foram processados pelo programa *Affymetrix Genechip Command Console* (AGCC) onde são armazenadas informações acerca da intensidade do sinal em cada *pixel* dos arranjos. Os arquivos são então analisados pelo programa *Genotyping Console* (GTC) da *Affymetrix* que obtém os genótipos dos indivíduos a partir dos dados de intensidade dos *pixels* nos microarranjos. Entre os dados armazenados para cada SNP no arquivo '*.cel*' podemos citar: a intensidade do sinal, o desvio padrão da intensidade e o número de *pixels* utilizados no cálculo da intensidade, uma marcação dos pixels com valores fora do limite calculado pelo algoritmo.

O arquivo armazena também informações a respeito do experimento relacionado ao microarranjo, inclusive dados sobre a qualidade da leitura dos dados do arranjo – "*call rates"*.

O software de genotipagem lê as intensidades para cada sonda e atribui um "Call Rate" que, em última instância, é a porcentagem de SNPs aos quais pode ser atribuído um genótipo. O valor de corte do "Call rate" varia entre os diferentes tipos de Genechip, no caso do sistema 250K utilizado neste trabalho o valor de corte é 93,00 (GARRIDO, 2010).

Esses dados, bem como informações tabuladas acerca dos indivíduos genotipados, ficam armazenados no GTC e podem ser exportados para dois tipos de arquivo de texto. Um mais simples, com dados separados por tabulações e outro formatado para ser utilizado no

pacote de ferramentas de análise de dados de varreduras genômicas *PLINK* (PURCELL, 2007).

3.4.6 Pacote Plink

Com Plink, grandes conjuntos de dados que incluem centenas de milhares de marcadores genotipados para milhares de pessoas podem ser manipulados e analisados rapidamente em sua totalidade (PURCELL, 2007).

O arquivo .CHP permite ao programa Affymetrix Genotyping Console converter os genótipos aferidos em outros dois arquivos com as extensões .ped e .map que contém todos os dados referentes à genotipagem do microarranjo de cada indivíduo no formato apropriado para a utilização no programa Plink (PURCELL et al., 2007) e, com isso, foram realizados os testes de independência para os resultados brutos e também para resultados com filtros e consequentemente sua visualização dos resultados em gráficos e tabelas com o programa Haploview (http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview).

3.5 Análises estatísticas

Foram feitas análises de associação, correlação e dominância com auxílio do pacote SPSS e o site de estatísticas de acesso livre Genepop, entre as amostras de caso e controle para o mesmo SNP, ou pares de SNPs.

Por fim, uma meta-análise foi feita com uso do programa estatístico Woolf (CABELLO; KRIEGER, 1997), cuja função é analisar uma possível associação do fenótipo com os marcadores, indicando seu efeito e o grau de Heterogeneidades entre as amostras.

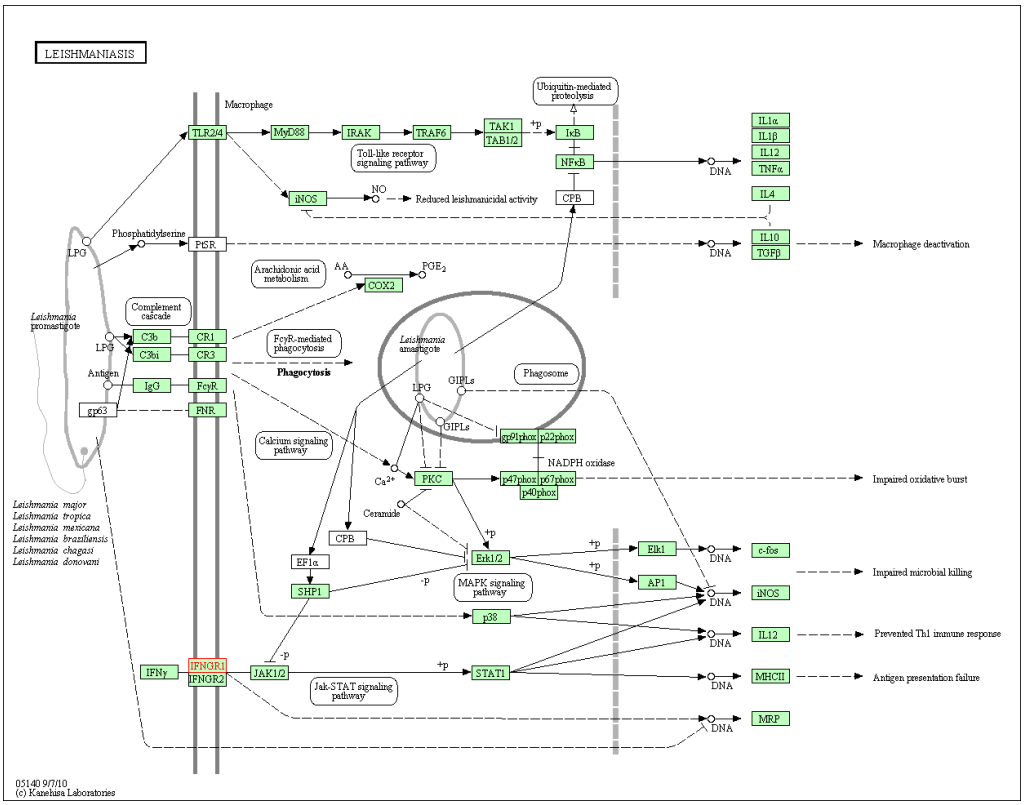
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genes candidatos

Inicialmente, a proposta de nosso trabalho foi a de buscar SNPs que alterassem a expressão gênica do fenótipo estudado e de genes que poderiam estar relacionados a este fenótipo. Buscamos, com isso, confirmar essas alterações no município de Monte Negro (RO). Sua alta miscigenação, principalmente proveniente do sul do país, poderia nos oferecer observações relacionadas ao nosso fenótipo ainda não verificadas em outras populações. Posteriormente, visando a aumentar nossa amostragem, buscamos novos dados na mesma cidade e também no município de Assis Brasil-(AC), cidade fronteiriça com Peru e Bolívia.

Assim, cinco SNPs descritos na literatura, como responsáveis pela sinalização do tipo de resposta obtida, foram selecionados neste estudo para verificar a possível associação entre diferentes genótipos destes polimorfismos com a resposta do hospedeiro ao antígeno de *Leishmania*. Dentre os polimorfismos selecionados, três SNPs relacionados com a modulação da resposta Th1 estão descritos a seguir. O balanço das respostas do tipo Th1 ou Th2 foram os principais alvos, uma vez que a modulação entre estes tipos de resposta pode levar a desenvolvimentos muito distintos das leishmanioses. A posição dos SNPs escolhidos está abaixo na Figura 4 que mostra a via bioquímica da relação parasita e hospedeiro obtida na Enciclopédia Kegg de Genes e Genoma.

Figura 4: Via Bioquímica da Leishmaniose



Fonte: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05140

Células T helper 1 estão relacionadas à produção de citocinas IL-12, IFN-γ e TNF-α e são geralmente relacionadas à cura espontânea da leishmaniose, enquanto que T helper tipo 2 (resposta humoral), caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 e TGF-β estão normalmente associadas à progressão da doença (MATOS et al., 2007; ROCHA et al., 1999).

A defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares depende da eficácia da imunidade mediada por células. A descrição das células Th1 que produzem IL-2 e IFN-γ e as células Th2, que produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, tornaram possível a caracterização das subpopulações de células TCD4+ envolvidas em vários processos patológicos (DELOBEL et al., 2003).

Os distintos TLR exibem vários padrões de expressão. As proteínas TLR têm uma significativa homologia com o receptor IL-1 tipo I. Estudos com vários TLRs demonstram que todos ativam a via de NF-kB, que regulam a expressão de citocinas, através de várias moléculas, incluindo o MyD88, TIRAP/Mai e TRF. A ativação da via do NF-kB conduz à iniciação da resposta adaptativa imune pela produção de citocinas inflamatórias tais como a

IL-1, IL-8, fator de necrose tumoral-alfa, IL-12, e a indução de moléculas de co-estimulação, tais como a CD80, CD86 e CD40 (TUON et al., 2008).

As proteínas da família TLR têm um papel de defesa contra patógenos, atuando como receptores para o reconhecimento dos agentes patogênicos, assim como na transdução de sinal do receptor intracelular (MEDZHITOV, 2001). Estas proteínas contribuem para a imunidade inata ao reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mas também podem ativar a resposta adaptativa Th1 através de uma via de sinalização que inclui o adaptador Myd88 e secreção de IL-12, como podem ser verificadas em experimentos com camundongos e Myd88 células dendríticas - / - (HOU; REIZIS; DE FRANCO, 2008; SCHNARE et al., 2001).

O MyD88 codifica uma proteína citosólica adaptadora que desempenha um papel central na resposta imune inata e adaptativa. Essa proteína funciona como um transdutor de sinal essencial no receptor da interleucina-1 e Toll-like vias de sinalização. Estas vias regulares ativam inúmeros genes pró-inflamatórios (TUON, et al., 2008).

A proteína Myd88 é um membro da família TLR, e é um agente intermediário das cascatas desencadeadas pela IL-1R, e Toll like receptores, respondendo a estímulos de ligantes, tais como IL-1b, IL-18 peptidoglicano, LPS, CpG DNA bacteriano, flagelina, etc (JANSSENS; BEYAERT, 2002; MEDZHITOV, 2001). É possível encontrar exemplos de estudos que relacionem a ativação do sinal de Myd88 imune-dependente com infecção por diferentes espécies de *Leishmania* (TUON et al., 2008). O Myd88 é essencial para maturação/ativação das células dendriticas após a infecção por *L.major* e *L. donovani*. Vargas-Inchaustehui et al. (2009) estudaram i*n vitro* e in vivo os padrões distintos da resposta à infecção por *L. braziliensis* de Myd88 e TLR2 em camundongos. Foi observado que, após o nocaute de Myd88, as células dendriticas mostraram baixos níveis de ativação celular e da produção de IL12 p40, que se correlacionou com o aumento da suscetibilidade desses camundongos à infecção e a uma expansão diminuída da produção de IFNγ e IL17. Além disso, os camundongos desenvolveram lesões maiores e prolongadas em relação aos de camundongos controle. Em contraste, a diminuição de TLR2 resultou em uma ativação de células dendriticas e aumentou a produção de IL12 p40 após a infecção por *L.braziliensis* (VARGAS-INCHAUSTEHUI et al., 2009).

Dhiman et al. (2008) descrevem que o genótipo GG para SNP rs6853 Myd88 do gene foi associado a uma menor produção de anticorpos em indivíduos vacinados contra o sarampo.

Muraille et al. (2003) mostraram que os camundongos B6.MyD (knockout de Myd88) apresentam alta susceptibilidade a *L. major* e devolveram uma resposta típica Th2, sugerindo que as vias de MyD88 são essenciais para o desenvolvimento da proteção IL12 mediada por uma resposta Th1 contra o parasita *Leishmania major*.Já a IL12B codifica uma subunidade de interleucina 12, uma citocina presente em células T e natural killer, e tem uma ampla gama de atividades biológicas. Interleucina 12 é um heterodímero expresso por macrófagos ativados, que servem como um indutor essencial do desenvolvimento de células Th1. Esta citocina é importante para manter um número suficiente de células Th1 para mediar proteção a longo prazo a um patógeno intracelular (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

A IL-12 está envolvida na diferenciação de células T emTh0, que continuará a desenvolver em qualquer células Th1 ou Th2. É conhecido como um fator estimulante da célula T, estimulando seu crescimento e função. Ela estimula a produção de interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) de T e natural killer (NK). Células T que produzem IL-12 têm um co-receptor CD30, que está associado com atividade de IL-12 (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

A IL-12 controla a atividade citotóxica de células NK e os linfócitos CD8 + T citotóxicos. Também parece haver uma ligação entre IL-2 e a transdução de sinal de IL-12 nas células NK. IL-2 estimula a expressão de dois receptores IL-12, IL-12R-β1 e IL-12R-β2, mantendo a expressão de uma proteína associada à sinalização de IL-12 nas células NK (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). Em humanos, a presença ou ausência da expressão da cadeia IL-12Rb2 pode ser marcador de células Th1 e Th2, respectivamente (DELOBEL et al., 2003)

O alelo C do SNP rs3212227, também conhecido como polimorfismo 1188A / C na região 3 'UTR do gene para a subunidade p40 da IL-12 (IL12B), causa baixa secreção de citocinas IL12 (STANILOVA; MITEVA, 2005) e este polimorfismo foi associado com suscetibilidade à tuberculose e salmonelose (FREIDIN et al., 2006). Este SNP poderia estar associado com a resposta à Leishmania, uma vez que a expressão de IL-12 modula a resposta Th1, e este por sua vez é responsável pela produção de IL2, TNF-beta e IFN-γ, ativando macrófagos e combatendo zonas infectadas.

A ativação de macrófagos infectados por Th1 se deve à liberação de IFN-γ liberado pela célula Th1 e é um importante mecanismo efetor mediado por células da imunidade. IFN-γ é produzido por células Th1 e Natural killers (NK). A produção de IFN-γ por células Th1 e NK é principalmente regulada pela IL-12, que é produzida por células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e células dendríticas (DELOBEL et al., 2003).

O alelo C, em homozigose na posição -56 do gene do receptor de interferon-γ (rs2234711), reduz a expressão do receptor para IFN-γ (JÜLIGER et al., 2003), comprometendo os efeitos da diminuição de interferon gama. É relatada a associação deste polimorfismo com doenças infecciosas como a tuberculose (COOKE et al., 2006), hepatite B (ZHOU et al., 2009) e infecção por *H. pylori* (THYE et al., 2003). A diminuição desse receptor provoca o aumento da suscetibilidade à *Leishmania*, relacionando assim nosso fenótipo em questão.

O gene IFNGR1 está localizado no cromossomo 6q23.3 e codifica a cadeia de fixação do ligante (alpha) do receptor de interferon gama. O receptor de interferon-gama humano é um heterodímero de IFNGR1 e IFNGR2. A variação genética em IFNGR1 está associada à susceptibilidade à infecção por Helicobacter pylori. Além disso, defeitos de IFNGR1 são uma causa da suscetibilidade a doenças micobacterianas, e o polimorfismo -56 T/C do receptor desse gene também está associado ao aumento da suscetibilidade à Hanseniase (VELAYATI et al., 2011).

A proteína codificada por IL10 é uma citocina produzida principalmente por monócitos e, em menor medida, por linfócitos. Esta citocina tem efeitos pleiotrópicos na imunorregulação e inflamação. Ela diminui a expressão de citocinas Th1, MHC classe II Ags e moléculas co-estimulatórias em macrófagos. Ela também melhora a sobrevivência da célula B, proliferação e produção de anticorpos. Esta citocina pode bloquear a atividade de NF-kappa B, e está envolvida na regulação da via de sinalização JAK-STAT. Estudos em camundongos nocaute sugeriram a função desta citocina como imunorreguladoras essenciais no trato intestinal. Mutações nesse gene estão associadas a um aumento da susceptibilidade à infecção VIH-1 e artrite reumatóide (O`GARRA; VIEIRA, 2007).

A Interleucina 10 é responsável pela inibição da produção de citocinas por células Th1, resultando na supressão da resposta celular, além de promover a proliferação de células B e as respostas humorais. O genótipo GG do SNP rs180089, localizado na posição -1082 do gene IL10, apresenta uma expressão mais elevada quando comparado com os genótipos AA e GA (FAROUK et al., 2010).

Outro gene candidato estudado foi o SLC11A1 (NRAMP1) que se localiza na região 2q35 do cromossoma 2, e a proteína codificada por ele é detectada no compartimento lisossomal de macrófagos, monócitos e leucócitos periféricos, como também no fígado, baço e pulmões, após indução por linfocinas e produtos bacterianos, exercendo a função de uma bomba de efluxo de cátions divalentes, como Fe^{++} e Mn^{++}. A remoção destes íons é essencial

para a sobrevivência do microorganismo no macrófago, além de privar a bactéria da produção de enzimas protetoras (catalase e superóxido dismutase) (LI, et al., 2011).

Mutações nesse gene têm sido associadas à susceptibilidade às doenças infecciosas como a tuberculose e a hanseníase, e doenças inflamatórias como a artrite reumatóide e doença de Crohn (FERREIRA et al., 2004; LIU et al., 2004).

Ferreira et al. (2004), estudando o polimorfismo *(GT)*n do *NRAMP1*, observou que os indivíduos com resposta negativa à lepromina, ou seja, Mitsuda negativos, que expressavam um determinado tipo de alelo desse polimorfismo, apresentavam sete a oito vezes mais chances de desenvolver a hanseníase, concluindo haver relação entre variações polimórficas e susceptibilidade à doença.

Algumas mutações no gene *NRAMP1* anulam a resistência natural a infecções por *Mycobacteriae*. Liu et al. (2004), investigando 80 indivíduos com tuberculose, descreveram nove polimorfismos, dentre eles o 274C/T, que decorre de uma troca de bases citosina (C) por timina (T) na posição 274 do éxon 3, o polimorfismo D543N, no qual há troca de bases guanina (G) por adenina (A) na posição 1703 do éxon 15, e o terceiro polimorfismo 1729+55del4, no qual há deleção das bases TGTG na região 3' não traduzida (3'UTR). Concluíram que as variantes *NRAMP1* podem ser úteis para análise genética da susceptibilidade humana à hanseníase, em analogia à verificada para parasitoses intracelulares, porque esses polimorfismos são importantes reguladores das vias de diferenciação de macrófagos.

Meisner et al. (2001), tomando como base a associação entre polimorfismo da *NRAMP1* e susceptibilidade à tuberculose, compararam a distribuição do polimorfismo 1729+55del4 na hanseníase e observaram maior frequência de heterozigose entre multibacilares.

A expressão diferencial do gene SLC11A1 pode estar relacionada a doenças autoimunes ou suscetibilidade a doenças infecciosas como a Aids, hanseníase, tuberculose e leishmaniose visceral (BLACKWELL et al., 2001, 2009). Neste estudo, foram selecionados os SNP rs2276631 (274C / T) correspondente a uma substituição silenciosa na posição 66 da proteína (Phe), que resulta em uma menor atividade in vitro da proteína, possivelmente causada por uma menor expressão (GALLANT et al., 2007). Esse SNP está relacionado com nosso fenótipo, já que uma alteração em sua expressão aumenta a suscetibilidade a tipos de *Leishmania* (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006)

Em um povoado na região fronteiriça entre o Sudão e a Etiópia, 90% da população apresentaram evidência imunológica de infecção por *L. donovani*, porém apenas 30%

desenvolveram LVA. Uma pesquisa de gene candidato revelou ligação de resistência natural à LVA com um polimorfismo do gene da proteína 1 de macrófagos (NRAMP1), localizado no segmento do cromossomo 2q35. Outro estudo, também com SLC11A1, mas realizado em uma região geográfica próxima à anterior, demonstrou que um SNP no intron 4 deste gene é o que causa o efeito principal neste fenótipo (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006).

Essa grande influência na resposta celular fez com que esses SNPs candidatos fossem escolhidos, já que eles apresentavam associações como Myd88 implicado na resposta Th1 associado com o fenótipo de resistência observado em camundongos C57BL / 6 após a infecção por L. major (REVAZ-BRETON et al., 2010); também foram verificados níveis baixos de IL12 e altos de IL10 em resposta à infecção por L. major (FILARDY et al., 2010), enquanto Mohamed et al. (2003) associou leishmaniose cutânea com IFNGR1, bem como NRAMP1 mostrou associação significativa à suscetibilidade de vários genes e esteve relacionada à lesão cutânea (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006; CASTELUCCI et al., 2010).

Hatagima et al. (2001) estudou 22 pares de irmãos através da reação de Mitsuda, avaliando também macroscopicamente e histologicamente, utilizando três polimorfismos (274C / T, D543N, 1729 + 55del4) no locus NRAMP1, revelando nenhum sinal de ligação estreita entre a reação de Mitsuda e os marcadores genéticos.

Para se avaliar o possível efeito desses SNPs no fenótipo estudado, após a genotipagem dos mesmos na amostra, foram feitos testes de associação e correlação entre as amostras de caso controle para cada SNP.

Utilizamos para os testes de associação a correção de BONFERRONI, que é um procedimento estatístico utilizado quando se realiza comparações múltiplas. A realização de múltiplas comparações aumenta as chances de ocorrerem erros do tipo I, ou seja, associações não significantes dentro do intervalo de confiança previamente estipulado. A correção de BONFERRONI altera o nível de significância (p) a fim de evitar erros derivados da múltipla comparação.

Assim, comparando dois tratamentos dentro de cinco subgrupos de pacientes, os tratamentos serão significativamente diferentes ao nível 0,05, se houver um valor de P inferior a 0,01 dentro de qualquer dos subconjuntos. Note-se que eles não são significativos ao nível de 0,01, mas só ao nível de 0,05 (BLAND; ALTMAN, 1995).

O coeficiente de correlação indica a força e a direção do relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias. No uso estatístico geral, correlação se refere à medida da relação

entre duas variáveis, embora correlação não implique causalidade. Neste sentido geral, existem vários coeficientes medindo o grau de correlação, adaptados à natureza dos dados.

Com base nos dados do genoma de distribuição, observados na Tabela 1, que apresenta os genótipos encontrados para os grupos caso e controle para os 5 genes candidatos, pode ser visto que nenhuma associação caso-controle significativo foi detectada de acordo com a Tabela 2, uma vez que o nível de significância, após aplicar-se a correção de BONFERRONI, é de 1%, e todos os valores de p ficaram bem acima do esperado, já que estes SNPs de alguma forma alteram a expressão gênica em outros estudos (GOVONI, 1995; SARDINHA et al., 2011; SCHRIEFER et al., 2004; VELAYATI et al., 2011).

Tabela 1 - Genótipos observados do teste caso controle para os SNPs selecionados.

	SNPs									
	Rs6853		Rs32312227		Rs2234711		Rs1800896		Rs2276631	
Genótipo	ca[1]	co[2]	ca	co	ca	co	ca	co	ca	co
AA	30	34	-	-	13	14	-	-	-	-
A/G	8	5	-	-	22	21	-	-	-	-
G/G	2	1	3	4	4	4	-	-	-	-
G/T	-	-	10	13	-	-	-	-	-	-
TT	-	-	26	22	-	-	18	19	7	5
T/C	-	-	-	-	-	-	15	16	12	12
CC	-	-	-	-	-	-	7	5	21	23

1:caso; 2:controle.
Fonte: Pereira (2012)

Tabela 2 - Valor de p, calculado do teste caso controle dos SNPs selecionados.

Gene	SNP	Valor de p	Cromossomo
MYD88	rs6853	0,22	3
IL12	rs3212227	0,34	5
IFNGR1	rs2234711	0,86	6
IL10	rs1800896	0,61	1
SLC11A1 (NRAMP1)	rs2276631	0,48	2

Fonte: Pereira (2012)

Posteriormente, foi realizada uma análise conjunta entre pares de SNPs, para verificar-se a existência ou não de sinergismos entre genótipos, e os resultados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 - Correlação entre genótipos dos grupos caso e controle, analisando-se 2 SNPs simultaneamente.

SNPs	Valor de p
rs6853 x rs3212227	0,761
rs6853 x rs2234711	0,464
rs6853 x rs1800896	0,843
rs6853 x rs2276631	0,271
rs3212227 x rsrs2234711	0,924
rs3212227 x rs1800896	0,618
rs3212227 x rs2276631	0,993
rs2234711 x rs1800896	0,887
rs2234711 x rs2276631	0,847
rs1800896 x rs2276631	0,548

Fonte: Pereira (2012)

Nesta análise, também não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os grupos caso e controle, como pode ser visto pelos altos valores de p obtidos nas análises de todos os pares de SNPs. Nossos resultados com genes candidatos não repetiram associações encontradas na literatura, provavelmente pela escolha de fenótipos diferentes daqueles aqui analisados, ou devido às populações que estudamos apresentarem estruturas diferentes das relatadas em estudos anteriores.

4.2 Mistura

Foram feitos também testes de mistura com auxílio do pacote GENIOC (CABELLO; KRIEGER, 1997) com a população estudada e os cinco sistemas clássicos (ABO, Rh, MNS, Kell e Duffy); as estimativas das proporções raciais são obtidas a partir das frequências fenotípicas, observadas na população híbrida, e das frequências gênicas nas populações ancestrais (Tabela 4). O grupo caso apresentou uma proporção de Africanos de 0,17569 e desvio padrão de 0,05336, de Ameríndios 0,20849 e desvio de 0,08756 e um maior valor de

Caucasianos com 0,61582 e desvio 0,10661. Já no grupo controle, as estimativas foram de Africanos 0,14988, desvio de 0,15516, de Ameríndios de 0,19919 e desvio de 0,18693 e novamente uma maior contribuição de Caucasianos no valor de 0,65093 e desvio de 0,25477.

Podemos observar que a contribuição europeia nos dois grupos estudados é bem mais acentuada em comparação com as outras possíveis contribuições, nas quais notamos a grande influência de famílias do sul do Brasil que migraram para esta região em busca de trabalho. O que é mais importante no contexto é que, quanto à etnicidade, não parecem existir diferenças significantes entre os grupos caso e controle em que poderia prevalecer algum tipo de estratificação (CAMARGO et al., 2002; FIORETTI, 2009).

Tabela 4 - Teste de Mistura dos grupos caso e controle

	Caso		Controle	
Grupo racial	Proporção	Erro padrão	Proporção	Erro padrão
Africanos	0,17569	0,05336	0,14988	0,15516
Ameríndios	0,20849	0,08756	0,19919	0,18693
Caucasianos	0,61582	0,10661	0,65093	0,25477

Fonte: Pereira (2012)

4.3 GWAS

Uma vez que a genotipagem de SNPs em genes candidatos não revelou associações significativas, optou-se pela realização de uma varredura genômica, em que se buscam indicações de associações inéditas para o fenótipo estudado, utilizando como ferramenta 250K SNPs com microarray Genechip *Affymetrix* 250 Nsp I.

Com base nas evidências abordadas obtidas em trabalhos anteriores do nosso grupo (FIORETTI, 2009), pretendeu-se identificar este gene recessivo através de associação do fenótipo com marcadores genéticos. Foram selecionados 40 indivíduos positivos para o teste de Montenegro (casos) e 40 negativos (controle) para se realizar varredura genômica com o Genechip Affymetrix 250K Nsp I.

O “Call rate” dos 80 indivíduos foi em sua maioria abaixo dos 93,00 que é o limiar proposto pela *Affymetrix* (somente 3 indivíduos foram superiores a 93,00), isso provavelmente se deve ao congelamento e descongelamento das amostras, o tempo de armazenamento (década de 90) e a hemólise celular.

Para este tipo de estudo deve ser levado em conta que uma nova coleta de material destes indivíduos é inviável, logo tentamos extrair o máximo de informação genética possível da mesma, a isso se alia o fato de que muitas amostras de sangue, armazenadas do Laboratório de Epidemiologia Genética, terem sido coletadas nas décadas de 60, 70, 80 e 90, em muitos casos com interesse em testes sorológicos apenas, e que devem se encontrar em situação semelhante. Precisa ser ressaltado o grande valor da informação genética contida nesse banco, que não deve ser perdido e tentar desenvolver algoritmos para acessar à informação disponível e minimizar os erros resultantes da genotipagem das amostras (GARRIDO, 2010).

Inicialmente, a extração desses DNAs foi feita com métodos convencionais através de fenol e clorofórmio, Kit da Illustra (GE Health care) utilizando colunas, mas nenhum obteve os 50 ng/ul necessários para a utilização do protocolo Genechip.

Portanto optou-se pelo uso da enzima Phi-29, que é validado como método de obtenção de DNA pela empresa *Affymetrix*. Também se deve salientar que o emprego deste tipo de amplificação possibilitou o uso de amostras, para as quais uma nova coleta é inviável.

Uma primeira análise com a técnica de GWAS (Genome-wide association study), usando todos os 80 indivíduos genotipados, demonstrou que nenhuma amostra apresentou significância após a correção de BONFERRONI.

Os resultados podem ser observados na Tabela 5; para os testes iniciais nos prendemos somente nas informações do qui-quadrado e o valor de p. Para observar os resultados de uma forma mais global é pelo gráfico *Manhattan Plot* (Figura 5).

Na figura 5, SNPs significativos deveriam apresentar valores abaixo de 10^{-7} segundo a correção de BONFERRONI; como pode ser visto em uma primeira análise, nenhum SNP apresentou tal nível de significância.

Tabela 5 - GWAS inicial com informações dos cromossomos, marcadores, posição, alelo 1, frequência dos afetados e não afetados, alelo 2, qui-quadrado, o valor de p e Odd Ratio.

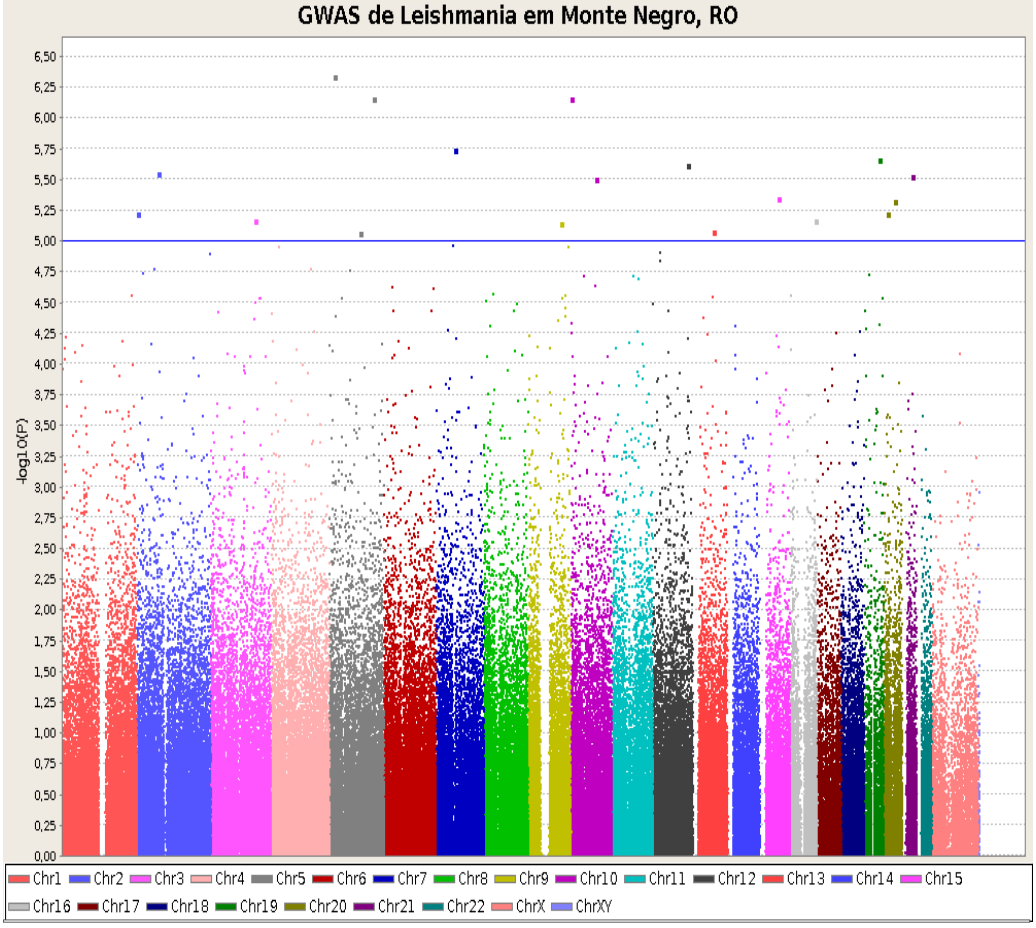
Crs	Marcador	Posição	A1	F_A	F_U	A2	Chisq	P	OD
5	rs7714384	19122412	T	0,09677	0,5167	C	25,44	$4,55\ 10^{-7}$	0,10
5	rs10068216	147753511	G	0,3971	0,04412	A	24,63	$6,92\ 10^{-7}$	14,27
10	rs4880974	2144212	T	0,4079	0,06579	C	24,61	$7,03\ 10^{-7}$	9,78
7	rs69600379	63387952	C	0,1562	0,5667	T	22,79	$1,81\ 10^{-6}$	0,14
19	rs238404	50557530	T	0,5667	0,1346	C	22,41	$2,20\ 10^{-6}$	8,40
12	rs1965297	114658185	G	0,625	0,2361	A	22,21	$2,44\ 10^{-6}$	5,39
2	rs26070726	71421790	G	0,06667	0,4286	A	21,91	$2,85\ 10^{-6}$	0,09

Fonte: Pereira (2012)

Apesar da correção de BONFERRONI ser mais comum, esta é uma correção extremamente severa e conservadora, controlando a probabilidade de falsos positivos apenas e com isso podendo aumentar a probabilidade de produzir falsos negativos, ou seja, reduzindo o poder. Por isso optamos por um limiar de $1x10^{-5}$, também preconizado na literatura (NAKAOKA; INOUE, 2009), evitando falsos positivos e genotipagens com muito ruído, e com isso pode-se observar 17 SNPs sugestivos com P abaixo de 10^{-5}, na Figura 5 representado pela linha azul. Com esses resultados em mãos, optamos pela confecção desses 17 ensaios junto a Life Technologies, onde os SNPs foram genotipados pelo sistema TaqMan® (Tabela 6).

Em uma tentativa de validar os resultados dos SNPs selecionados, os mesmos foram genotipados nas amostras independentes de Assis Brasil, no Acre, e uma amostra mais recente de Monte Negro-RO para tentar confirmar as indicações que o GWAS nos forneceu.

Figura 5 - Dados de GWAS com a amostra de Montenegro (*Manhattan Plot*)



Fonte: Pereira (2012)

Tabela 6 - Lista dos SNPs selecionados com GWAS e testados com TaqMan®.

Número do SNP	Ensaio ID	Gene Symbol	Posição	Caucasiano	Afro American o	Chinês	Japonês
rs10197139	C4435889010	TTC15	2p25	0,03 (A)	0,0(A)	0,0(A)	0,0(A)
rs2670726	C276761910	ZNF638	2p14	0,16(G)	0,07(G)	0,47(A)	0,48(G)
rs2963232	C1596182810		5q21	0,06(A)	0,29(A)	0,27(A)	0,3(T)
rs7714384	C2600855210		5p14.3	0,37(T)	0,49(T)	0,07(T)	0,02(T)
rs10068216*	C23878310	FBXO38	5q32	0,25(G)	0,25(G)	0,23(G)	0,23(G)
rs6960379	RS6960379		7q11.21	0,07 (C)	0,44(T)	0,0 (C)	0,0 (C)
rs10816385	C116571510		9q31.1	0,2(G)	0,39(G)	0,18(A)	0,19(A)
rs4880974	C2797037010		10p15	0,15(T)	0,39(C)	0,05(T)	0,1(T)
rs2783418	C2718390010	NRG3	10q23.1	0,05(G)	0,01 (C)	0,0 (C)	0,0 (C)
rs1965297	C1169926710		12q24.22	0,5(A)	0,11(G)	0,08(G)	0,14(G)
rs9317632	RS9317632	PCDH9	13q21.33	0,16(G)	0,16(G)	0,03(G)	0,02(G)
rs1719271	C32009510		15q22.33	0,08(G)	0,21(G)	0,27(A)	0,21(A)
rs12926508	C143082820	KIAA051	16q24.2	0,08 (C)	0,5 (C)	0,0 (C)	0,03 (C)
rs238404	C314504910	ERCC2	19q13.2	0,49(T)	0,03 (C)	0,43(G)	0,42 (C)
rs444709	C2736482210	MACRO	20p12.1	0,38(G)	0,38(G)	033 (C)	0,4 (C)
rs4809987	C2789320510		20q11.23	0,16(A)	0,13(A)	0,34(A)	0,27(A)
rs2833644	C1607137410	NCRNA	21q22.11	0,07(T)	0,4(T)	0,25(T)	0,26(T)

*Confecção desse SNP falhou e não foi realizado o teste com o sistema TaqMan®
Fonte: Pereira (2012)

A Tabela 7 apresenta as informações para todos os 16 ensaios, para os grupos caso e controles e os alelos encontrados em cada grupo de estudo. Nenhum ensaio apresentou valores de p próximo da significância, ou Odd Ratio com alguma possível indicação relacionada ao fenótipo em questão.

Tabela 7 - Valores de qui-quadrado, valor de p e Odd Ratio dos 16 SNPs testados para os grupos caso e controle no município de Assis Brasil.

ASSIS BRASIL-AC							
	Caso	**Caso**	**Controle**	**Controle**	***Qui-quadrado***	***Valor de p***	***Odd Ratio***
SNP	**Alelo**		**Alelo**				
rs10197139	A=0	G=34	A=0	G=34	-	1	1
rs2670726	A=25	G=3	A=27	G=1	1,07	0,30	0,30
rs2963232	A=21	T=7	A=20	T=8	0,09	0,76	1,2
rs7714384	C=21	T=7	C=23	T=5	0,42	0,51	0,65
rs6960379	C=2	T=26	C=6	T=22	2,33	*	0,28
rs10816385	A=14	G=14	A=16	G=12	0,28	0,59	0,75
rs4880974	C=16	T=12	C=16	T=12	-	1	1
rs2783418	C=1	G=27	C=2	G=26	0,35	*	0,48
rs1965297	A=18	G=10	A=14	G=14	1,16	0,27	1,8
rs9317632	A=24	G=4	A=26	G=2	0,74	*	0,46
rs1719271	A=20	G=8	A=19	G=9	0,08	0,77	1,18
rs12926508	C=14	T=14	C=14	T=14	-	1	1
rs238404	C=15	T=13	C=18	T=10	0,66	0,41	0,64
rs444709	A=18	G=10	A=15	G=13	0,66	0,41	1,56
rs4809987	A=7	G=21	A=5	G=23	0,42	0,51	1,53
rs2833644	C=19	T=9	C=24	T=4	2,50	0,11	0,35

** Sem cálculo, pois o valor esperado de pelo menos uma observação é abaixo de 5.
Fonte: Pereira (2012)

A Tabela 8 apresenta os valores dos alelos encontrados nos grupos caso e controle na segunda amostra de Monte Negro e seus respectivos valores de qui-quadrado, valores de p e Odd Ratio. O ensaio rs7714384, que se localiza no cromossomo 5, apresentou o menor valor de p (0,08) apesar de não ser significante, esse valor pode ser uma possível indicação de associação em amostras futuras.

Tabela 8 - Valores de qui-quadrado, valor de p e Odd Ratio dos 16 SNPs testados para os grupos caso e controle no município de Monte Negro.

MONTE NEGRO-RO							
	Caso	**Caso**	**Controle**	**Controle**	***Qui-quadrado***	***Valor de p***	***Odd Ratio***
SNP	**Alelo**		**Alelo**				
rs10197139	A=0	G=34	A=2	G=32	2,06	*	-
rs2670726	A=30	G=4	A=29	G=5	0,12	*	1,29
rs2963232	A=25	T=9	A=30	T=4	2,37	0,12	0,37
rs7714384	C=21	T=13	C=14	T=20	2,88	0,08	2,30
rs6960379	C=4	T=30	C=7	T=27	0,97	0,32	0,51
rs10816385	A=21	G=13	A=20	G=14	0,06	0,80	1,13
rs4880974	C=24	T=10	C=22	T=12	0,26	0,60	1,30
rs2783418	C=6	G=28	C=2	G=32	2,26	*	3,42
rs1965297	A=17	G=17	A=12	G=22	1,50	0,22	1,83
rs9317632	A=24	G=10	A=27	G=7	0,70	0,39	0,62
rs1719271	A=17	G=17	A=16	G=18	0,05	0,80	1,12
rs12926508	C=11	T=23	C=13	T=21	0,25	0,61	0,77
rs238404	C=22	T=12	C=18	T=16	0,97	0,32	1,62
rs444709	A=14	G=20	A=16	G=18	0,23	0,62	0,78
rs4809987	A=16	G=18	A=15	G=19	0,05	0,80	1,12
rs2833644	C=26	T=8	C=25	T=9	0,08	0,77	1,17

* Sem cálculo, pois o valor esperado de pelo menos uma observação é abaixo de 5.
Fonte: Pereira (2012)

Os resultados encontrados não confirmaram as indicações anteriores, uma vez que não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas entre os grupos caso e controle. Apesar de não serem detectadas associações significantes, esses últimos resultados merecem estudos mais aprofundados em outras amostras, uma vez que foram verificadas Odd Ratio inferiores a 0,5 e superiores a 2.

Tendo em vista os resultados relatados até aqui, buscamos melhorar as informações que poderiam ser extraídas dos dados obtidos, voltando assim aos resultados brutos do GWAS. Optamos por utilizar algumas ferramentas que o pacote Plink poderia nos fornecer para aperfeiçoar nossa análise, evitando assim utilizar falso-positivos e falso-negativos. Com esse objetivo, fizemos uma análise dos dados com filtros preconizados pela literatura utilizando como critério de corte de seleção de indivíduos para análise:

a) os que apresentavam pelo menos 80% dos SNPs genotipados, já que o “call rate” da nossa amostra na sua maioria não apresentou os valores ideais que seriam acima de 93 preconizados pela Affymetrix;

b) Hardy-Weinberg com valor de p acima de 0,001, que é um princípio específico da genética populacional, e descreve a relação entre o alelo e a frequência genotípica, sendo muitas vezes utilizada como medida de controle de qualidade. O mapa geral de Hardy-Weinberg é que o genótipo e as frequências alélicas em uma população permanecem estáveis ao longo de gerações e que existe uma relação fixa entre o alelo e a frequência dos genótipos. Como consequência, desvios dessa relação podem apontar problemas de qualidade no processo de genotipagem; valor comumente utilizado de HWE está na base de 10-4 (ZIEGLER et al., 2008);

c) MAF (Frequência alélica mínima) no valor de 1%, infelizmente, muitos dos SNPs genotipados sobre as matrizes atuais Affymetrix são monomórficas em todas as populações. Assim, eles não têm duas variantes, apenas uma. Por exemplo, nos dados alemães definidos analisados por SAMANI et al. (2007), 8% dos SNPs foram monomórficos. A frequência do MAF é tipicamente usada como filtro de dados. Devido à baixa potência para detectar uma associação entre o SNP e a característica de interesse, é razoável excluir esses SNPs no início. Portanto, os SNPs são muitas vezes excluídos da análise, se a frequência do MAF é baixa. O critério de filtro normalmente varia com o tamanho da amostra, valores variando entre 1% e 5% são comuns (ZIEGLER et al., 2008);

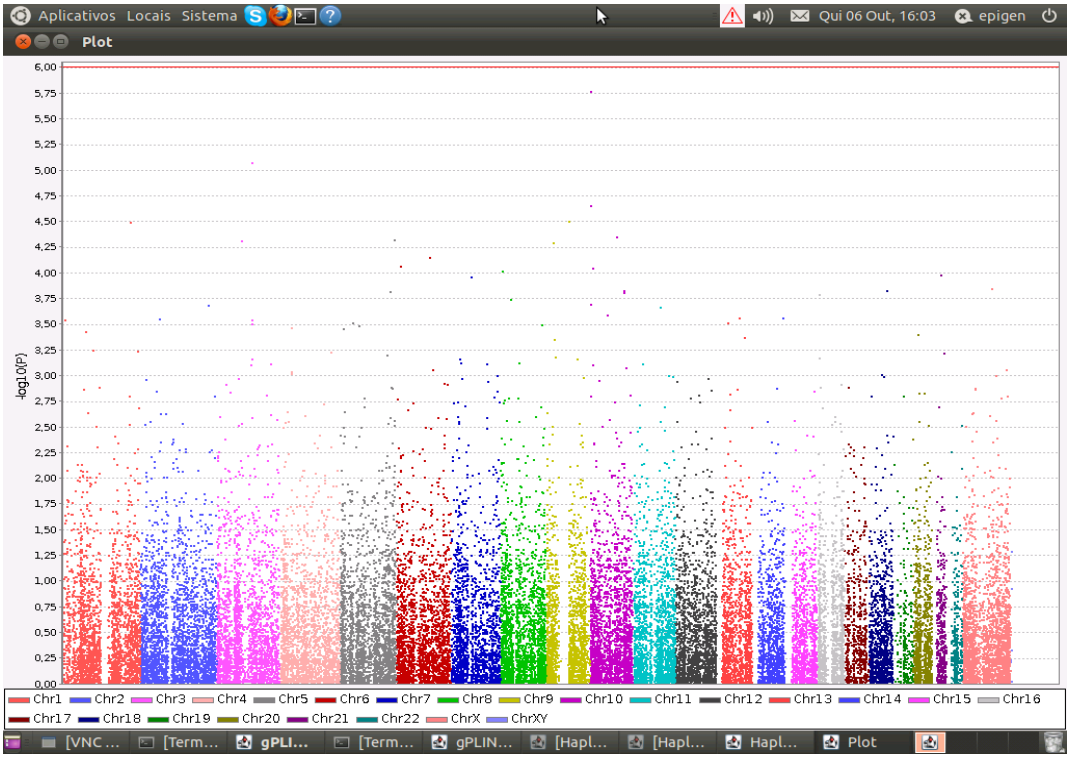
d) SNPs com no máximo 5% de falha de genotipagem, tentando usar apenas SNPs com melhor taxa de genotipagem.

Esses filtros reduzem o risco de se obterem associações espúrias. Após a utilização do conjunto desses filtros, foram selecionados 36702 SNPs e 32 casos e 35 controles.

Nessa análise de associação com os dados filtrados, pode-se observar no *Manhattan Plot*, que as barras dos cromossomos já são bem mais finas, devido à diminuição dos SNPs testados, como é mostrada na Figura 6.

Verificou-se que, no cromossomo 10, o SNP rs4880974 apresentou nível de significância mais próximo ao limiar de BONFERRONI (linha vermelha) e também podem ser observados alguns SNPs sugestivos próximos, visto que este SNP se situa entre dois genes ainda não caracterizados (LOC282980 e LOC399708).

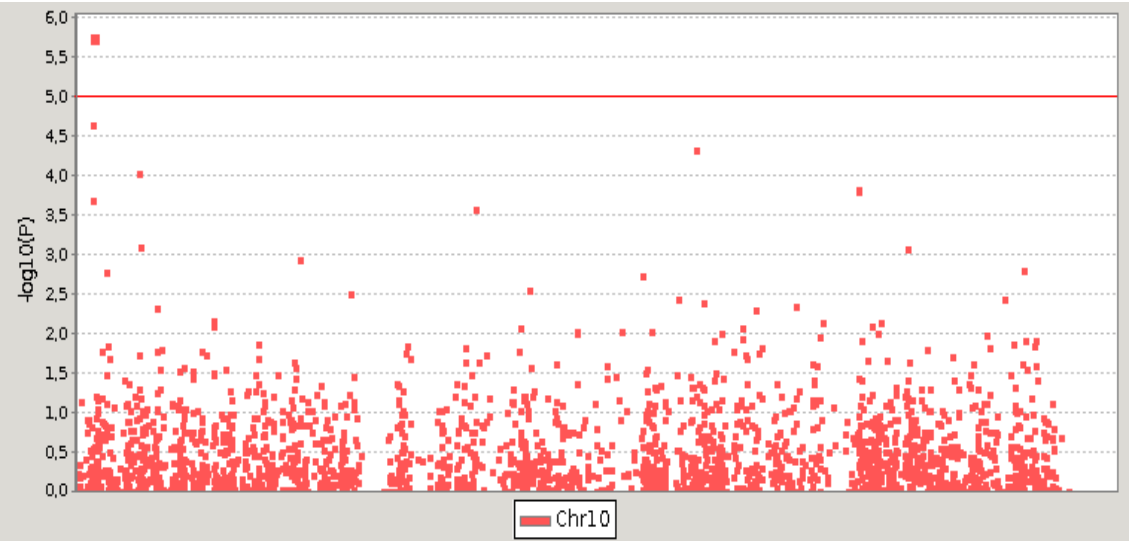
Figura 6 - Dados de GWAS com a amostra de Montenegro, empregando-se filtros.



Fonte: Pereira (2012)

Pode-se verificar na figura 6 uma coluna de SNPs na mesma direção do SNP RS 4880974 no cromossomo 10, enfatizado na Figura 7, que ilustra somente o gráfico *Manhattan Plot* do cromossomo 10, demonstrando que nessa análise, devido à menor quantidade de SNPs testados (2175 SNPs), o SNP rs4880974 passa a linha da correção de BONFERRONI, além disso, pode ser observada a proximidade de mais dois SNPs com o anterior numa distância entre si de menos de 800 pares de base com valores de p que variam entre 1,709 10^{-6} a 2,041 10^{-4} para esses três SNPs.

Figura 7 - Varredura do cromossomo 10.



Fonte: Pereira (2012)

A Tabela 9 apresenta os dados dos SNPs no cromossomo 10 (segundo a montagem 37.3 do genoma humano) e segundo os dados Ensembl (**Cromossomo 10: 2,153,901-2,154,744)**, a posição do marcador rs4880974 é 2144212, do rs11251062 é 2144917 e por fim o marcador rs7922523 na posição 2145052, demonstrando novamente a grande proximidade desses três SNPs; além disso, esta tabela nos fornece as informações da variação dos valores de p encontrados entre 10^{-6} e 10^{-4}.

Tabela 9 - Associação entre SNPs do cromossomo 10 com a resposta ao antígeno da *Leishmania.*

Cromossomo	Marcador	Posição	Alelo 1	F_A[1]	F_U[2]	Valor de p
10	rs4880974	2144212	T	0,4355	0,07353	1,709E-6
10	rs11251062	2144917	G	0,4219	0,09375	2,202E-5
10	rs2783418	84478427	C	0,2188	0,0	4,519E-5
10	rs1002654	8488758	A	0,5	0,1765	9,003E-5
10	rs12264935	106512657	T	0,1129	0,4091	1,496E-4
10	rs10884039	106484451	T	0,08065	0,3571	1,548E-4
10	rs7922523	2145052	T	0,4516	0,1515	2,041E-4

[1]-Frequência dos afetados; [2]-Frequência dos não afetados.
Fonte: Pereira (2012)

De acordo com o banco de dados Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html), essa região corresponde a um possível elemento regulatório. Para se afirmar que essa região é realmente regulatória, foram considerados testes com DNAse1 que têm a função de digerir o

DNA, exceto os DNAs que são protegidos por estarem ligados às proteínas, restando somente os DNAs para um posterior sequenciamento (Ensembl ENSR00000349587).

Com esse resultado, optamos pela genotipagem de quatro novos SNPS que cobrissem essa região indicativa, sendo dois dentro da região regulatória, um a jusante e outro a montante, tentado observar a verdadeira amplitude dessa indicação. Os novos SNPs selecionados foram genotipados nas amostras nova do município de Monte Negro-RO e do município de Assis Brasil-AC.

A Tabela 10 apresenta os resultados encontrados no município de Assis Brasil, e podemos ver os alelos encontrados nos grupos caso e controle, os valores de qui-quadrado, os valores de p e o Odd Ratio.

Todos os novos ensaios não apresentaram valores indicativos de alguma significância relacionada ao fenótipo em estudo, sendo que o menor valor de p encontrado nesse teste foi de somente 0,55 do ensaio rs6560798, valor este muito superior a alguma possível indicação.

Tabela 10 - Valores de qui-quadrado, valor de p e Odd Ratio para os grupos caso e controle para o município de Assis Brasil.

	Assis Brasil						
SNP	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Qui-quadrado**	***valor de p***	***Odd Ratio***
rs11251062	A=21	G=7	G=21	G=7	0	1	1
rs4880557	C=9	T=19	C=8	T=20	0,08	0,77	1,18
rs6560798	A=7	C=21	A=9	C=19	0,35	0,55	0,70
rs11251056	G=15	T=13	G=14	T=14	0,07	0,79	1,15

Fonte: Pereira (2012)

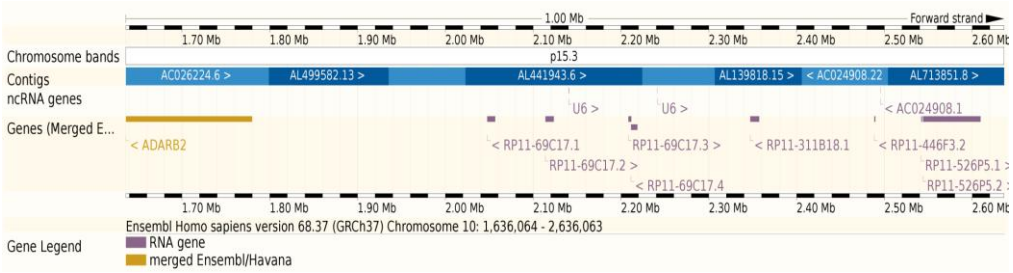
Os resultados encontrados no município de Monte Negro estão apresentados na Tabela 11, com informações dos alelos em cada grupo, do qui-quadrado, do valor de p e do Odd Ratio, com ajuda do pacote estatístico SPSS. O ensaio rs11251056 apresentou valor de p igual 0,05 o que seria um resultado sugestivo, sendo assim um indicativo para testes posteriores. Esse SNP localizado no cromossomo 10, segundo a montagem GRCh37 do genoma humano, está na posição de 2136063 e encontra-se também entre dois genes não caracterizados LOC100129465 e LOC728209 (Figura 8) e está localizado amontante da região, com possível elemento regulatório encontrado com ajuda do Ensembl, podendo ressaltar que SNPs próximos do rs11251056 podem ser também objetos de estudos futuros, visando à confirmação dessa região no cromossomo 10 com nosso fenótipo.

Tabela 11 - Valores de qui-quadrado, valor de p e *Odd Ratio* para os grupos caso e controle no município de Monte Negro.

	Monte Negro						
SNP	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Qui-quadrado**	***valor de p***	***Odd Ratio***
rs11251062	A=26	G=8	G=27	G=7	0,08	0,76	0,84
rs4880557	C=13	T=21	C=11	T=23	0,25	0,61	1,29
rs6560798	A=11	C=23	A=12	C=22	0,06	0,79	0,87
rs11251056	G=23	T=11	G=15	T=19	3,81	0,05	2,64

Fonte: Pereira (2012)

Figura 8 – Localização da região regulatória do cromossomo 10 segundo o Ensembl.



Como os resultados encontrados anteriormente, com ensaio rs11251056, foram testados somente nas amostras de Assis Brasil e na amostra recente de Montenegro, optamos por testar esse SNP na amostra inicial de Montenegro tentando confirmar essa possível indicação. Foram encontrados 49 alelos G e 25 alelos T no grupo caso, e 43 alelos G e 29 alelos T no grupo controle. Os valores de qui-quadrado, p e Odd Ratio obtidos foram respectivamente 0,66, 0,41 e 1,32. Como pode ser observada, essa possível indicação não foi confirmada na amostra inicial de Montenegro; tendo em vista os resultados até aqui, observamos que, para o SNP rs11251056, somente na amostra recente de Monte Negro o resultado de p foi indicativo (0,05), esse resultado pode ser encarado como promissor, apesar de uma amostra com diferentes características populacionais (Assis Brasil-AC) não apresentar resultados semelhantes assim, com uma amostra do mesmo município não se confirmaram. Uma nova abordagem que é o próximo tópico, a meta-análise, poderia nos ajudar na confirmação desses resultados, somando assim as três amostras, tentando aumentar o poder estatístico de nossa inferência e também uma meta-análise das amostras de Monte Negro apenas, visando a confirmar a indicação dos SNPs localizados na região do cromossomo 10, principalmente o ensaio rs11251056.

4.4 Meta-análise

Outra abordagem usada no presente trabalho foi a meta-análise das três amostras utilizadas para os 20 SNPs testados, já que se, as amostras utilizadas forem homogêneas e os Odd Ratios consistentes, torna-nos possível concluir com um incremento das amostras a validação de nossos resultados, ou seja, demonstrar com segurança a possível relação entre marcadores genéticos com a suscetibilidade/resistência dos indivíduos dos municípios estudados.

A Meta-análise utiliza técnicas estatísticas para combinarem, em uma medida resumo, os resultados de estudos independentes voltados a uma única questão. A síntese produzida por meta-análise é ponderada, sendo atribuído um peso diferente a cada estudo, possibilitando assim que contribua de modo diferente para a conclusão final. O método mais utilizado para atribuir peso a cada estudo é o inverso da variância, ou seja, quanto maior a variabilidade, menor a participação do estudo na conclusão final. Devido ao aumento do tamanho das amostras por combinação dos estudos, a síntese produzida por meta-análise, sobre um conjunto de estudos com boa validade, reduz o nosso grau de incerteza sobre os efeitos benéficos ou indesejáveis das intervenções em saúde (MARTINEZ, 2007).

A meta- análise foi obtida através de testes capazes de realizar uma verificação que os efeitos encontrados nos estudos individuais são semelhantes o suficiente para que possa ter certeza de que uma estimativa combinada é uma descrição significativa do conjunto de estudos. No entanto, as estimativas individuais de efeito do tratamento podem variar por acaso. A questão é saber se há mais variação do que seria esperado pelo acaso.

A meta-análise foi feita com auxílio do programa Woolf (CABELLO e KRIEGER, 1997), cuja função principal é analisar a possível associação entre uma determinada característica e um marcador genético conhecido. Deve-se enfatizar que ambas as características devem ser de natureza binária, isto é, cada uma delas poderá ter unicamente duas classes alternativas e mutuamente exclusivas. O programa analisa várias amostras simultaneamente e indica o grau de heterogeneidade entre as mesmas. As formulações utilizadas no programa são as apresentadas por Woolf (1955), com as modificações sugeridas por Haldane (1956), para pequenas amostras.

Fizemos assim uma meta-análise da amostra inicial que foi utilizada no GWAS (40 casos e 40 controles) amostra de Monte Negro inicial, somada com as amostras posteriores de Monte Negro (17 casos e 17 controles) e Assis Brasil (14 casos e 14 controles), que estão

apresentadas nas Tabelas 12 a 31 abaixo, apresentando as informações dos SNPs testados, dos grupos caso e controle, dos alelos encontrados e o Odd Ratio.

Os valores do número amostral diferem para cada ensaio, já que estão embutidos também os alelos encontrados pelo GWAS, e estes podem apresentar alelos "no call", após a leitura do chip, diminuindo assim a quantidade de alelos para a análise, além disso, alguns ensaios não eram cobertos pelo Genechip 250K, por isso apresentaram menores valores de alelos analisados também.

De acordo com essas tabelas, podemos observar que, para os SNPs analisados nas amostras de Monte Negro, em 6 SNPs os Odd Ratio estão em sentindo diferentes, em 10 SNPs concordam para o mesmo lado e, de acordo com o teste de sinal feito com os valores observados e esperados dos Odd Ratio em sentidos diferentes e no mesmo sentido, o qui-quadrado foi de 1,33 com um grau de liberdade. Como estes resultados não são significantes, podemos verificar que aparentemente os mesmos são acaso, e as amostras podem ser analisadas perfeitamente em uma meta-análise, buscando assim valores mais indicativos para nosso fenótipo em questão.

Tabelas 12 – Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs10197139 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs10197139	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd ratio**
MN 1	A=38	G=28	A=47	G=5	0,106
MN 2	A=0	G=34	A=2	G=32	0
AB	A=0	G=34	A=0	G=34	0

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 13 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs2670726 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs2670726	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=55	G=5	A=36	G=30	9,16
MN 2	A=30	G=4	A=29	G=5	1,29
AB	A=25	G=3	A=27	G=1	0,30

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 14 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs2963232 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs2963232	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=31	T=24	A=54	T=4	0,09
MN 2	A=25	T=9	A=30	T=4	0,37
AB	A=21	T=7	A=20	T=8	1,2

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 15 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs7714384 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs7714384	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=56	T=6	C=31	T=29	8,73
MN 2	C=21	T=13	C=14	T=20	2,30
AB	C=21	T=7	C=23	T=5	0,65

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 16 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs6960379 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs6960379	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=10	T=54	C=38	T=26	0,12
MN 2	C=4	T=30	C=7	T=27	0,51
AB	C=2	T=26	C=6	T=22	0,28

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 17 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs10816385 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs10816385	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=65	G=7	A=43	G=25	5,39
MN 2	A=21	G=13	A=20	G=14	1,13
AB	A=14	G=14	A=16	G=12	0,75

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 18 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs4880974 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs4880974	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=41	T=33	C=69	T=5	0,09
MN 2	C=24	T=10	C=22	T=12	1,30
AB	C=16	T=12	C=16	T=12	1

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 19 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs2783418 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs2783418	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=18	G=52	C=0	G=74	1
MN 2	C=6	G=28	C=2	G=32	3,42
AB	C=1	G=27	C=2	G=26	0,48

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 20 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs1965297 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs1965297	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=27	G=47	A=54	G=18	0,19
MN 2	A=17	G=17	A=12	G=22	1,83
AB	A=18	G=10	A=14	G=14	1,8

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 21 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs9317632 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs9317632	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=51	G=21	A=72	G=2	0,06
MN 2	A=24	G=10	A=27	G=7	0,62
AB	A=24	G=4	A=26	G=2	0,46

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 22 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs1719271 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs1719271	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=37	G=25	A=14	G=48	5,07
MN 2	A=17	G=17	A=16	G=18	1,12
AB	A=20	G=8	A=19	G=9	1,18

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 23 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs12926508 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs12926508	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=14	T=54	C=34	T=28	0,21
MN 2	C=11	T=23	C=13	T=21	0,77
AB	C=14	T=14	C=14	T=14	1

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 24 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs238404 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs238404	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=28	T=36	C=45	T=7	0,120
MN 2	C=22	T=12	C=18	T=16	1,62
AB	C=15	T=13	C=18	T=10	0,64

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 25 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs444709 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs444709	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=51	G=21	A=26	G=42	3,92
MN 2	A=14	G=20	A=16	G=18	0,78
AB	A=18	G=10	A=15	G=13	1,56

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 26 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs4809987 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs4809987	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=14	G=56	A=34	G=26	0,191
MN 2	A=16	G=18	A=15	G=19	1,12
AB	A=7	G=21	A=5	G=23	1,53

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 27 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs2833644 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs2833644	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	C=31	T=25	C=60	T=6	0,124
MN 2	C=26	T=8	C=25	T=9	1,17
AB	C=19	T=9	C=24	T=4	0,35

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 28 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs11251062 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs11251062	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	A=42	G=28	A=58	G=10	0,25
MN 2	A=26	G=8	A=27	G=7	0,84
AB	A=21	G=7	A=21	G=7	1

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 29 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs4880557 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs4880557	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 2	C=13	T=21	C=11	T=23	1,29
AB	C=9	T=19	C=8	T=20	1,18

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 30 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs6560798 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs6560798	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 2	A=11	C=23	A=12	C=22	0,87
AB	A=7	C=21	A=9	C=19	0,70

Fonte: Pereira (2012)

Tabelas 31 - Número de observações para cada alelo e *Odd Ratio* do SNP rs11251056 para os grupos caso e controle das amostras de Monte Negro (MN1 e MN2) e Assis Brasil (AB).

rs11251056	**Caso**	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Odd Ratio**
MN 1	G=49	T=25	G=43	T=29	1,32
MN 2	G=23	T=11	G=15	T=19	2,64
AB	G=15	T=13	G=14	T=14	1,15

Fonte: Pereira (2012)

A Tabela 32 apresenta todos os alelos das amostras caso e controle e os valores do efeito para todas as amostras testadas, além disso, a Tabela 32 nos fornece o teste de Heterogeneidade e o Odd Ratio para 19 graus de liberdade.

Apesar de nenhum SNP ser significativo no grau de liberdade testado, alguns SNPs apresentaram uma potencial sugestão como o SNP rs6960379, com o maior valor de efeito encontrado (23,141), esse SNP está relacionado à esquizofrenia e dependência à nicotina (GRUPE et al., 2006; ROSE et al., 2011), e os SNPs rs2670726 e rs2783418, com valores de Odd Ratio de 3,48 e 7,71 respectivamente. O primeiro está localizado no cromossomo 2, é o gene ZNF638, estas proteínas dedo de zinco constituem a maior família de reguladores de transcrição em eucariotos, estes fatores estão envolvidos em processos diversos em muitos tecidos, incluindo o desenvolvimento, diferenciação, supressão de tumores e também na diminuição da expressão de genes específicos do adipócito. Eles podem ser considerados “blocos” para a construção de grandes proteínas ligantes de DNA (MERUVU, et al., 2011). Onde podemos inferir que esse SNP apresenta uma possível relação com o fenótipo em questão, já que pode participar da diferenciação da resposta imune ao antígeno da *Leishmania*.

Já o rs2783418 se localiza no cromossomo 10, este gene é o Neoregulina 3 (NRG3) que codifica receptores transmenbrana da tirosina (ErbB3 e ErbB4) que são membros de fatores de crescimento da epiderme (KAO, et al. 2010), podendo dessa forma ter alguma participação na infecção da leishmaniose cutânea.

Tabela 32 - Teste de Heterogeneidade para todas as amostras estudadas e todos os ensaios testados.

	Caso	**Caso**	**Controle**	**Controle**	**Efeito**	***Het***	***Odd Ratio***
SNP*	**No de Alelos**		**No de Alelos**				
rs10197139	A=38	G=90	A=49	G=71	14,407	1,493	0,61
rs2670726	A=110	G=12	A=92	G=36	8,743	11,062	3,58
rs2963232	A=77	T=39	A=104	T=16	10,286	9,499	0,30
rs7714384	C=98	T=26	C=68	T=54	12,156	10,657	2,99
rs6960379	C=16	T=110	C=51	T=75	23,141	3,832	0,21
rs10816385	A=100	G=34	A=79	G=51	4,433	9,160	1,89
rs4880974	C=81	T=55	C=107	T=29	6,616	16,685	0,39
rs2783418	C=25	G=107	C=4	G=132	6,598	10,379	7,71
rs1965297	A=62	G=74	A=80	G=54	4,250	19,185	0,56
rs9317632	A=99	G=35	A=125	G=11	10,093	6,439	0,24
rs1719271	A=74	G=50	A=49	G=75	9,281	7,575	2,26
rs12926508	C=39	T=91	C=61	T=63	8,680	7,098	0,44
rs238404	C=65	T=61	C=81	T=33	6,869	14,943	0,43
rs444709	A=83	G=51	A=55	G=75	7,942	7,451	2,21
rs4809987	A=37	G=95	A=54	G=68	6,238	11,844	0,49
rs2833644	C=76	T=42	C=109	T=19	11,192	9,139	0,31
rs11251062	A=89	G=43	A=106	G=24	0,045	4,680	0,46
rs4880557	C=22	T=40	C=19	T=43	0,327	0,014	1,24
rs6560798	A=18	C=44	A=21	C=41	0,338	0,076	0,79
rs11251056	G=87	T=49	G=72	T=62	2,538	1,637	1,52

Fonte: Pereira (2012)

5 CONCLUSÕES

1. Não foram encontradas associações com cinco SNPs (MYD88, IL12, IL10, IFNGR1 e NRAMP1) que alteram a expressão de genes relacionados, de alguma forma, ao fenótipo estudado;

2. Com auxílio do GWAS sem filtros, foram encontrados 17 SNPs com uma possível indicação de associação, uma réplica deste ensaio em amostra independente não se confirmou com auxílio de sondas qPCR TaqMan®;

3. A análise de dados de varredura genômica com filtros indica uma região no cromossomo 10 com 3 SNPs próximos que fazem parte de uma região regulatória, associada a resposta à Leishmanina;

4. Genotipagem da região do cromossomo 10, em amostra independente por PCR tempo real, não confirmou algum tipo de associação, apesar do ensaio rs11251056 apresentar valores limítrofes, tornando-se uma sugestão para trabalhos futuros;

5. A meta-análise apresentou efeitos indicativos no mesmo caminho de trabalhos anteriores, fazendo-nos pensar que, com adição de novos trabalhos, uma possível associação relacionada à suscetibilidade/resistência à infecção poderá ser encontrada.

REFERÊNCIAS*

ALVES, C. et al. Antígenos de hiscompatibilidade humanos e dermatologia: da pesquisa para a prática **clínica. An. Bras. Dermatol.**, v. 81, n. 1, p. 65-73, 2006.

AMATO, V. S. Tratamento de Leishmaniose tegumentar. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, n. 26, p. 1-6, 2006.

ARRUDA, M. M. **Manual de Leishmanioses**. Disponível em: <http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1258562831/6365_crmv-pr_manual-zoonoses_leishmanioses.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2011.

BARBIER, D. et al. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. **Tis. Ant.**, v. 30, n. 2, p. 63-67, 1987.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishamniose tegumentar americana, epidemiologia e perspectiva de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.,** v. 7, p. 328-337, 2004.

BEARMAN, J. E. et al. A Study of Variability in Tuberculin Test Reading. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 90, p. 913-919. 1964.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 460 p.

BLACKWELL, J. et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. **Parasite Immunol.,** v. 31, p. 254-256, 2009.

_____ et al. SLC11A1 (formely NRAMP1) and disease resistance. **Cell Microbiol.**, v. 3, n. 12, p. 773-784, 2001.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Multiple significance tests: the BONFERRONI method. **BMJ**., v. 310, p. 170, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de controle da Leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Indicadores de saúde**. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php>. Acesso em: 8 set. 2009.

---

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, DF, 2007.

CABELLO, P.; KRIEGER, H. **Genioc-Programoteca**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1997.

CABRERA, M. et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med**., v. 182 n. 5, p. 1259-1264, 1995.

CAMARGO, L. M. A. et al. A rural community in a Brazilian Western Amazonian Region: some demographic and epidemiological patterns. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 97, n. 2, p. 193-195, 2002.

CAMPINO, S.; KWIATKOWSKI, D.; DESSEIN, A. Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. **Semin. Immunol**., v. 18, p. 411-422, 2006.

CASTELLUCCI, L. et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **BMC Med. Genet.**, v. 11/10, p. 1471-1479, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>. Acesso em : 10 out. 2010.

COOKE, G. S. et al. Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. **Am. J. Resp. Crit. Care**, v. 174, n. 3, p. 339-343, 2006.

CORRÊA, M. A.; AMATO NETO, V. Intradermorreações com antígeno de culturas de *Leishmania braziliensis* submetidas à ação do ultrassom: resultados obtidos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v. 17, p. 39-42, 1958.

DELOBEL, P. et al. American cutaneous Leishmaniasis, Lepromatous leprosy, and pulmonary tuberculosis coinfection with downregulation of the T-helper 1 cell response. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 629-633, 2003.

DHIMAN, N. et al. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. **Vaccine**, v. 26, n. 14, p. 1731-1736, 2008.

DUNAISKI, M. **Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana na Região do Vale do Ribeira – Paraná:** cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

EL-MOGY, M. H. et al. Histocompatibility antigens in Egyptians with cutaneous leishmaniasis: a preliminary study. **J. Dermatol. Sci**., v. 5, n. 2, p. 89-91, 1993.

ENSEMBLE GENOME BROWSER. Sanger Institute. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: 14 Ago. 2011.

FAROUK, S. et al. Interleukin 10 Gene Polymorphisms and Development of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis in a Selected Sudanese Population. **Pub. Health Geno**., v. 13, p.362-367, 2010.

FERREIRA, F. R. et al. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response**. Int. J. Lepr. Mycobact. Dis.**, v. 72, n. 4, p. 457-467, 2004.

FERREIRA, R. G. M. et al. Evidence of a major gene related to the infection of *Leishmania brazilienis* in a western amazonian population. **Eur. J. Hum. Genet.,** v. 14, p. 344, 2006. Supl. 1.

_____; KAWAMATA, C. E. M.; KRIEGER, H. **Genes em indivíduos e famílias.** Ed. **Diagnóstico e tratamento** - Antonio Carlos Lopes. São Paulo: Manole, 2007. v. 3, cap. 4, p. 217-225.

_____ et al. Ethnic admixture composition of two western Amazonian population. **Hum. Biol**., v. 74, p. 607-613, 2002.

FILARDY, A. A. et al. A proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12 low IL-10 high regulatory phenotype in macrophages. **J. Immunol.,** v. 185, p. 2044-2050, 2010.

FIORETTI, A. P. **Epidemiologia genética da intradermorreação de montenegro em uma localidade de Rondônia**, 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FREIDIN, M. B. et al. Association between the 1188A/C polymorphism in the human IL12B gene and TH1-mediated infectious disease. **Int. J. Immunogenet.** v. 33, n. 3, p. 231-232, 2006.

GALLANT, C. J. et al. Reduced in vitro functional activity of human NRAMP1 (SLC11A1) allele that predisposes to increased risk of pediatric tuberculosis disease. **Genes Immun**., v. 8, n. 8, p. 691-698, 2007.

GARCIA-GARCIA, J. A. et al. Use of noninvasive markers to detect Leishmania infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. **J. Clin. Microbiol**., v. 44, n. 12, p. 4455-4458, 2006.

GARRIDO, L. M. **Investigação dos fatores genéticos humanos associados à infecção por *Leishmania***. Relatório Científico - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 40 f.

GONTIJO, B.; CARVALHO M. M. L. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.

GOVONI, G. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp1 gene in macrophages. **Genomics**, v. 27, n. 1, p. 9-19, 1995.

GRUPE, A. et al. A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease. **Am. J. Hum. Genet.,** v. 78, n. 1, p. 78-88, 2006

GUERRA, M. O. P.; FURTADO, T. et al. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 60, n. 6, p. 365-369. 1985.

HALDANE, J. B. S. Disease and evolution. **Science Supply**, p. 68–76, 1949.

HILL, A. V. S. Aspects of genetic suscetibility to human infectious diseases. **Annu. Rev. Genet**., v. 40, p. 469-486, 2006.

HATAGIMA, A. No evidence of linkage between Mitsuda reaction and the NRAMP1 locus. **Int. J. Other Mycobact. Dis**., v. 69, n. 2, p. 99-103, 2001.

HAPLOVIEW. Broad Institute. Disponível em: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>. Acesso em: 11 Jan. 2012

HILL, A. V. S. Host genetics of infectious diseases: old and new approaches converge. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 4, n. 4, p. 695-697, 1998.

HOU, B.; REIZIS, B.; DE FRANCO, A. L. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and extrinsic mechanisms. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 272-282, 2008.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Inicial sequencing and analysis of human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. A universal role for MYD88 in TLR/IL-1R mediated signaling. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, n. 9, p. 474-482, 2002.

JOHNSON, A. D.; O`DONNELL, C. J. An open access database of genome-wide association results. **BMC Med. Genet.,** v. 10, n. 6, p. 1-17, 2009.

JOSÉ, F. F. et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Rev. Soc. Bras. Med. Tro.**, v. 34, n. 6, p. 537-542, 2001.

JORDE, L. B. et al. **Genética médica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 363 p.

JULIGER, S. et al. Functional analysis of a promoter variant of the gene encoding the interferon-gamma receptor chain I. **Immunogenetics**, v. 54, n. 10, p. 675-680, 2003.

KANESIHA LABORATORIES. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05140>. Acesso em: 9 Jul. 2010.

KAO, W. T. et al. Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v. 107, n. 35, p. 15619-15624, 2010.

KLEIN, R. J. et al. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular DegeneRation. **Science,** v. 308, n. 5720, p. 385–389, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **New world Leishmaniasis**: the neotropical Leishmania species. 9th ed. London: Feg Cox, 1988. 37 p.

LARA, M. L. et al. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. study of HLA haplotypesin 24 families from Venezuela. **Hum. Immunol**., v. 30, n. 2, p. 129-135, 1991.

LI, X. W. et al. SLC11A1 (NRAMP1) Polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis. **Plos One**, v. 6, n. 1, p.15831, 2011.

LIU, W. et al. VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study Int **J. Tuberc. Dis**., v. 8, n. 4, p. 428-434, 2004.

LOMBARDO, K. M. R.; PETERSEN, G. M. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: Fundamentals. **Sur. Res. Ver.**, v. 147, p. 469-474, 2010

LOPES, C. F.; LAENDER, J. F. A intradermorreação de Montenegro no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Brasil-Medico**, n. 5-6, p. 41-46, 1945.

MANSUR, A.; BARI, A. Sensitivity of Leishmania skin test in patients of acute cutaneous Leishmaniasis. **Dermat. J.**, v. 12, n. 4, p.1-4, 2006.

MARSDEN, P. D. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Parasitol. Today**, v. 1, n. 5, p. 129-133, 1985.

MARTINEZ, E. Z. Metanálise de ensaios clínicos controlados aleatorizados: aspectos quantitativos. **Medicina,** v. 40, n. 2, p. 223-235, 2007.

MARZOCHI, M. C. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **JBM**, v. 63, n. 5/6, p. 82-104. 1992.

MATOS, G. I. et al. IFNG+874 T/A polymorphism is not associated with American Tegumetary *Leishamaniasis* susceptibility but can influence *Leishamania* induced IFN-γ production. **BMC Infect. Dis**., v. 7, n. 33, p. 1-6, 2007.

MEDZHITOV, R. CpG DNA: security code for host defense. **Nat. Immunol**., v. 2, n. 1, p. 15-6, 2001.

MEISNER, S. J. et al. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 65, n. 6, p. 733-735, 2001.

MELO, M. N.; MAYRINK, W. et al. Standardization of the Montenegro antigen. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 19, n. 3, p.161-164, 1977.

MERUVU, S.; HUGENDUBLER, L.; MUELLER, E. Regulation of adipocyte differentiation by the zinc finger protein ZNF638. **J. Biol. Chem**., v. 286, n. 30, p. 26516-26523, 2011.

MOHAMED, H. S. et al. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in the Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. **Genes Immun**., v. 4, p. 351-355, 2003.

MONTENEGRO, J. A cutis reacção na leishmaniose. **Ann. Fac. Med. Univ. SP**, v. 1, p. 323-330, 1926.

MORTON, N. Heritability of IQ. **Science**, v. 194, p. 9-10, 1976.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol. Rev**., v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

MURAILLE, E. et al. Genetically resistant mice lacking MyD88-Adapter protein display a high susceptibility to *Leishmania major* Infection. associated with a polarized Th2 response. **J. Immunol.,** v. 170, p. 4237-4241, 2003.

NAKAOKA, H.; INOUE, I. Meta-analysis of genetic association studies:methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. **J. Hum. Genet**., v. 54, p. 615-623, 2009.

O`GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Immunology,** v. 7, p. 425-428, 2007.

OLIVO-DIAZ, A. et al. Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. **Hum. Immunol**., v. 65, n. 3, p. 255-261, 2004.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. A intradermo-reação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose. **Arq. Hig. Saude Pública**, p. 125-137, 1940.

PESSÔA, S. M. **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PRESKY, D. H. et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 93, p. 14002–14007, 1996.

PURCELL, S. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am. J. Hum. Genet.,** v. 81, p. 559–575, 2007.

REVAZ-BRETON, M. et al. The MyD88 protein 88 pathways is differently involved in immune responses induced by distinct substrains of Leishmania major. **Eur. J. Immunol**., v. 40, p. 1697-1707, 2010.

REY, L. **Parasitologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, P. N. et al. Down-regulation of Th1 type response in early human American cutaneous leishamaniasis. **J. Infect. Dis**., v. 180, p. 1731-1734, 1999.

ROSE, J. E. et al. Personalized smoking cessation: interactions between nicotine dose, dependence and quit-success genotype score. **Mol. Med**., v. 16, n. 7-8, p. 247-253, 2010.

ROTBERG, A. Contribuição para o estudo da alergia na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Hosp. N. S. Aparecida**, v. 5, n. 1, p. 1-88, 1952.

SABROZA, P. **Epidemiologia das Leishmanioses**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=355&sid=6>. Acesso em: 14 jan. 2012.

SADEGHIAN, G. et al. Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical formand duRation of cutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Online. J**., v. 12, n. 7, p. 3, 2006.

SALLES-GOMES, L. A Intra-dermo-reacção de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. **Brasil-Médico**, n. 49, p. 1079-1087, 1939.

SAMANI, N. J. et al.Genome-wide association analysis of coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 443–453, 2007.

SANTOS, R. V.; COIMBRA, J. R. C. E. A. **Saúde e povos indígenas.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994. 251 p.

SARDINHA, J. F. J. et al. Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology. **An. Bras. Dermatol.,** v. 86, n. 4, p. 708-715, 2011.

SCHNARE, M. et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat. Immunol**., v. 2, n. 10, p. 947-950, 2001.

SCHRIEFER, S. et al. Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. **Infect. Immun.,** v. 72, n. 1, p. 508-514, 2004.

SILVA, A. F. **A reação intradérmica de montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose tegumentar**. 2007. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, L. J.; CAMARGO, V. L. F. N. Infectologia: as Leishmanioses. **Prática hospitalar**, v. 36, p. 29-40, 2004.

SOKAL, J. E. Editorial: measurement of delayed skin-test responses. **N. Engl. J. Med.**, v. 293, n. 10, p. 501-502, 1975.

STANILOVA, S.; MITEVA, L. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. **Genes Immun**., v. 6, p. 364-366, 2005.

THYE, T. et al. Genome-wide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting Helicobacter pylori infection. **Am. J. Hum. Genet.,** v. 72, n. 2, p. 448-453, 2003.

TUON, F. F. et al. Toll-like receptors and Leishmaniasis. **Infect. Immun.,** v. 76, n. 3, p. 866-872, 2008.

VALE, E. S.; FURTADO T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An. Bras. Dermatol.,** v. 80, p. 421-428, 2005.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. et al. Distinct roles for MyD88 and Toll-Like Receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 2948–2956, 2009.

VELAYATI, A. A. et al. Case report: interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to leprosy in children of a single family. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 84, n. 4, p. 627–629, 2011.

VENTER, J. C. et al. Human genome project. **Nature**, v. 291, n. 5507, p. 931-945, 2001

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniases**: report of WHO expert committee. Technical report series 793. Geneva, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis the disease and its epidemiology.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/ disease _epidemio logy/en/index.html>. Acesso em: 11 Dez. 2006.

ZHOU, J. et al. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. **Immunogenetics**, v. 61, n. 6, p. 423-430, 2009.

ZIEGLER, A.; KONIG, I. R.; THOMPSON. J. R. Biostatiscal aspects of genome-wide association studies. **Biometrical Journal**, v. 50, p. 1-8, 2008.