Amanda Farage Frade

**Identificação de polimorfismos genéticos com impacto
no desenvolvimento e progressão da leishmaniose
visceral em indivíduos de áreas endêmicas do
Maranhão e Piauí**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Anna Carla Goldberg

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Frade, Amanda Farage

Polimorfismo genético em citocinas com impacto no desenvolvimento e progressão da leishmaniose visceral em indivíduos de áreas endêmicas do Maranhão e Piauí / Amanda Farage Frade. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Anna Carla Goldberg.

Descritores: 1.Leishmaniose visceral 2.Citocinas 3.Polimorfismo genético 4.Suscetibilidade à doença

USP/FM/DBD-210/10

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese:

A Deus, por ter me guiado e iluminado meus caminhos, pela saúde e força dadas, pelas pessoas que colocou em meu caminho, verdadeiros anjos que apareceram e me ajudaram em algum momento em que precisava, pois, sem tudo isso, não chegaria a lugar nenhum.

À minha família, meus pais Amadeu Macias Frade e Sarah Farage Frade, que sempre me apoiaram e me incentivaram para a realização deste sonho, que, mesmo distantes, estavam ao meu lado. Sem eles com certeza não chegaria ao fim da realização de mais este sonho, agradeço pela formação do meu caráter, da minha dignidade, por terem me ensinado que o caminho da verdade, sinceridade e lealdade e franqueza sempre foi o mais correto, agradeço por todos os ensinamentos de vida e por sempre me darem forças nos momentos de fraqueza, sempre erguerem minha cabeça frente as dificuldades da vida. Aos meus irmãos, Amadeu e Amarah, por todo carinho e apoio, toda força, todos os conselhos, agradeço a vocês do fundo do meu coração por sempre estarem do meu lado, e agradeço por serem minha família, amo muito vocês, muito obrigada!!!

Ao meu verdadeiro amor, Darcy Barros Filho, por toda a paciência, pelo companheirismo, por estar sempre do meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis de *stress*, por ter entendido minha ausência em vários momentos desta tese, por todo amadurecimento e aprendizado, por todo carinho, agradeço por ter me mostrado que sempre existe um caminho diferente de se resolver os problemas, muitas vezes mais fácil e tranquilo, agradeço pela realização deste sonho e muitos outros que estão por vir e que viveremos juntos, sempre apoiando um ao outro, muito, muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço esta tese:

À minha orientadora, Profa. Dra. Anna Carla Goldberg, a quem eu respeito e admiro seu trabalho como pesquisadora, por ter acreditado em mim, por ter me recebido em sua equipe de trabalho apesar da minha inexperiência na área de atuação, e que até então era apenas um sonho de realização profissional, pela sua orientação, pelo carinho e paciência durante a elaboração da tese, pela minha maturidade profissional e científica, pelas discussões calorosas, por todos os conselhos de vida, por muitas vezes ter sido minha mãe nos momentos que precisei obrigada por ter me ajudado na realização desta etapa tão importante da minha vida!!!

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, por ter me recebido inicialmente como aluna em seu laboratório, por todo carinho, pelas discussões científicas, pela força, por todo apoio técnico-científico e financeiro durante a elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Luiza Guilherme e sua equipe, Samar Freschi, Raquel Alencar, Selma Palácios, Carolina Cappi, por toda colaboração, carinho e amizade durante a elaboração do trabalho.

Ao Prof. Dr. Edécio Cunha-Neto e sua equipe de Bioquímica, Chagas e HIV, a Eliane Mairena por todos os ensinamentos científicos, pelos conselhos de vida profissional e pessoal, às amigas Priscila e Andrea Kuramoto, por toda a colaboração, incentivo e apoio.

À Dra. Verônica Coelho e sua equipe de terapia celular, Geórgia Porto, Ana Paula Guembes, Carolina Lavine, Fernanda Martelo, Evelyn Volsi, Sandra Maria, Maisa Takenaka, Pedro Vieira e Hernandez por toda ajuda para sanar diversas dúvidas técnicas, discussões científicas, análise de resultados, formatação de tese, enfim, todos sem exceção, me ajudaram muito em diversas etapas da minha tese.

À equipe do Dr. Elcio do laboratório de HLA, Hécio Rodrigues, Nicolas Panajotopoulos Carlos Sérgio, Germano Phreus, Cláudia Rosales, Ivete Maria, Célia Yamaguti, Olga Morita, Marcelo Barrocal, Mario D'Angelo, Thiago Guerino, Fernanda Vilalva, Karina Blanez e Jonas Klein sempre me auxiliando no que fosse preciso para a realização da tese, desde prontuários médicos até amostras de sangue para controles e padronização das técnicas, sempre disponíveis a me ensinar o que fosse preciso, mesmo com a rotina maçante de um laboratório de tipificação de HLA, muito obrigada.

Ao Dr. Chin Jin Lia, do laboratório de Patologia da FMUSP, por toda colaboração, pelos ensinamentos e pela ajuda na análise dos RNAs. A sua aluna, Mirna Alameddine, que em seu momento de maior sufoco com o término de sua tese, entre outras atribuições de sua vida profissional e pessoal conseguiu achar tempo e paciência para me ensinar a técnica de *microarray*, por toda força e incentivo, muito obrigada!!! Não tenho como agradecer toda a ajuda.

Ao meu grande mestre, Dr. Antonio Walter Ferreira, que sempre me incentivou e torceu por mim, por todos os conselhos, por todo incentivo e por acreditar que sonhos podem ser realizados, muito obrigada.

Às grande amigas e verdadeiros anjos da guarda que Deus colocou no meu caminho, Malu Marin e Dra. Lea Campos de Oliveira, por terem me recebido super bem no laboratório, por terem me ensinado as técnicas iniciais que precisava aprender para efetuar a minha tese, por todos os ensinamentos, por toda colaboração na parte técnica, na escrita da tese, nas correções de artigos, por todo carinho e amizade, por todos os conselhos de vida profissional e pessoal, e por terem me mostrado que conseguimos fazer verdadeiros amigos no ambiente de trabalho, sem vocês eu certamente não teria conseguido realizar este trabalho, meninas, muito, muito, obrigada!!!

Às amigas do grupo de aterosclerose, Dra. Beatriz Stolf e Carolina Luque, pelas discussões científicas, por estarem sempre ao meu lado nas horas mais difíceis, pelo carinho e amizade que felizmente consegui conquistar durante as longas jornadas no laboratório.

Às queridas amigas Maisa Takenaka e Carolina Borba, que iniciaram a jornada no laboratório junto comigo, passamos juntas por todos os momentos de *stress*, da pós-graduação, desde o dia da prova, dia da entrevista, dificuldades de padronizações de técnicas, qualificação e defesa, sempre uma ajudando a outra, trocando experiências científicas, obrigada pelos conselhos, pela força, pela amizade, sempre estiveram do meu lado, obrigada.

À equipe de Lesihmaníacos, aos pesquisadores Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral por terem me recebido de braços abertos em seus laboratórios na FioCruz Salvador/BA, ao Dr. Carlos Henrique por toda ajuda e colaboração na triagem e obtenção de novas amostras, à querida Dra. Dorcas Lamounier Costa por toda a colaboração e ajuda na finalização das análises estatísticas, pelo envio dos dados clínicos dos pacientes que mesmo de longe, foi uma das pesquisadoras que acompanhou mais de perto a finalização da tese, e ao aluno Fernando Silva, que foi peça principal para a obtenção, coleta, triagem, separação e envio das amostras do Piauí para São Paulo, muito obrigada a todos.

À equipe do Dr. Mitermeyer Reis, do Laboratório de Patologia e biologia Molecular, principalmente a equipe de estudos em Leptospirose da FioCruz de Salvador, ao Dr. Alan McBride e ao seu aluno de mestrado Adenizar Delgado das Chagas Junior pela colaboração na extração de RNA das amostras dos pacientes LV, pela doação das colunas de extração de RNA e pela colaboração científica e análise dos resultados e por todas sugestões para melhorar a qualidade do estudo.

À Prof.Dra. Ana Lepique, por toda ajuda e por compartilhar sua expertise na padronização da extração das amostras de RNA armazenadas com DMSO, pela incansável colaboração, mesmo sem ter nenhuma ligação com este projeto, sempre esteve disponível para esclarecer minhas duvidas e ajudar no que fosse necessário, mesmo de longe, quando estive na Fiocruz.

A toda equipe dos laboratórios do LIMI (Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação) e LIP (Laboratório de Imunoparasitologia), da FioCruz de Salvador, que me receberam tão bem durante o mês que estive realizando as extrações de RNA, por todos os ensinamentos e a colaboração no que foi preciso, principalmente, as alunas Gilvaneia Santos e Rayssa Carvalho, as estagiárias Hanny e Manu, a técnica responsável pelas amostras dos pacientes Juqueline Rocha Cristal e a secretária Elze Santos.

À grande amiga e pesquisadora que muito admiro, Dra. Sandra Moraes, por todo carinho e amizade, por ter me apresentado e me indicado para trabalhar com a Dra. Anna Carla, por ter confiado e acreditado no meu trabalho; sem o seu intermédio não conseguiria chegar onde cheguei, sou muito grata a você.

A toda equipe de secretariado, Sr. Jair Martins, Gisele, Sonia, Fernanda e Silvano, que sempre me ajudaram na parte de documentação administrativa, sempre com muito carinho e dedicação, obrigada a todos vocês. A equipe de secretariado da pós-graduação, Tânia Mota e Andrea Silva por sempre me ajudarem em tudo que precisei, na documentação, envio de formulários, aviso de prazos, sempre com carinho e dedicação, obrigada!!!

À minha família em São Paulo, minha sogra Licia Campos e meus cunhados Rogério e Eduardo Barros, por terem me recebido tão bem em sua família e em sua casa, por todo carinho, pelos finais de semana maravilhosos, pela paciência durante minhas ausências, pela compreensão e acolhimento na fase final da elaboração da tese, às minhas cunhadas Laís Orrico e Kelly Prado

pelo imenso carinho, por todos os conselhos, por estarem sempre ao meu lado quando precisei muito obrigada!!!

Às queridas amigas de longas datas Monica Eriko Kudo, Ana Carolina Rodrigues da Silva, e à amiga Cristiane Delabio Rodrigues pela imensa amizade, carinho, por todos os conselhos, por sempre estarem dispostas a escutar desabaços nos momentos mais estressantes, por todos os momentos de alegria que passamos juntas, por sempre terem uma palavra amiga nas horas mais difíceis, por sempre estarem ao meu lado, pelas broncas, enfim, eu amo vocês amigas, vocês sempre estão no meu coração!!!

A todos aqueles que me ajudaram de alguma forma direta ou indiretamente para a realização deste sonho, de longe ou de pertinho, e que infelizmente não pude lembrar aqui, agora, mas sem vocês essa tese não teria terminado.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Leishmaniose: Aspectos gerais.....	1
1.2 Leishmaniose Visceral:.....	2
1.3 Polimorfismo genético e susceptibilidade genética à LV:	17
1.4. A escolha de genes candidatos:	21
2. OBJETIVO GERAL.....	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
ETAPA 1.....	29
3.2 Métodos	30
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO:.....	51
6. CONCLUSÃO	58
ANEXO A - DOCUMENTOS DE APROVAÇÃO DOS CEPS	60
ANEXO B: ETAPA 2.....	66
1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL?	66
2. MATERIAIS E MÉTODOS:	67
ANEXO C: Tabela com dados clínicos dos Pacientes LV	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

cRNA: RNA Complementar

D.O: Densidade ótica

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DTH: *Delayed-type Hypersensitivity Test* (Teste de hipersensibilidade tardio)

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (anti-coagulante ácido etilenodiamino tetra-acético)

Fig.: Figura

g: Gramas

H₂O: Água

HEPES : “*4-2-hydroxyethyl 1-piperazineethanesulfonic acid*”

IL: Interleucina

IL-6: Citocina - Interleukin 6

IL6: gene- Interleukin 6

IL8: Gene- Interleukin 8

L : Litro

LV: Leishmaniose visceral

M: Molar

ng: Nanograma

NO: Oxido de nitrogênio

NaCl: Cloreto de Sódio

OR : “*Odds Ratio*”- (Razão de Chances)

RNA: Ácido Ribonucléico

RPM: rotações por minuto

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Tab.: Tabela

T° A: Temperatura ambiente

***TGFB1*: gene – Transforming growth factor beta 1**

TGF-β1: citocina- Transforming growth factor beta 1

α: Alfa

β: Beta

γ: gamma

μ: micro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos reagentes para cada gene	35
Tabela 2	Genes e seus respectivos iniciadores e enzimas de restrição	36
Tabela 3	Frequências genotípicas e alélicas <i>TGFB1</i> -509 C/T nos controles e pacientes com VL	44
Tabela 4	Frequências genotípicas e alélicas <i>TGFB1</i> +869 T/C nos controles e pacientes com VL.	45
Tabela 5	Frequências genotípicas e alélicas <i>IL6</i> -174 G/C nos controles e pacientes com VL	46
Tabela 6	Frequências genotípicas e alélicas <i>IL8</i> -251 A/T nos controles e pacientes com VL	47
Tabela 7	Frequência dos haplótipos de <i>TGFB1</i>	48
Tabela 8	Análise Regressão Univariada: <i>TGFB1</i> vs sangramento	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral	3
Figura 2. Ciclo Evolutivo da LV	5
Figura 3. Exemplo de digestão enzimática da sequência amplificada da IL6 pela enzima <i>NLAIII</i>.	34
Figura 4. Exemplo da digestão enzimática em gel de agarose.	35
Figura 5. Padronização da extração de RNA das amostras obtidas na FioCruz, Salvador/BA. Amostras	67
Figura 6. Análise das amostras de RNA pelo sistema Bioanalyzer	70
Figura 7: Esquema da técnica de <i>microarray</i>, extração de RNA, transcrição de cDNA, transformação em cRNA, hibridização da membranas	73
Figura 8: Esquema das seqüências de genes de controle interno das membranas.	74
Figura 9: Foto direta das membranas de <i>microarrays</i> geradas pela câmera CCD.	75
Figura 10: Foto invertida das membranas de <i>microarrays</i> geradas pela câmera CCD	75

RESUMO

A leishmaniose visceral constitui grave doença infecciosa causada por um protozoário parasita intracelular obrigatório. Alguns fatores podem alterar a gravidade das manifestações clínicas, sendo um deles a predisposição genética. Este estudo investigou polimorfismos dos genes *TGFB1*, *IL8* e *IL6*, que são citocinas relacionadas com o desencadeamento e a gravidade da doença, visando identificar fatores de susceptibilidade. Os polimorfismos *TGFB1* -509 C/T e *TGFB1* +869 T/C, *IL8* -251A/T e *IL6* -174G/C foram analisados por PCR-RFLP, em 198 pacientes com leishmaniose visceral (LV), 98 indivíduos com infecção assintomática (teste de hipersensibilidade tardia - DTH+) e 100 indivíduos sem evidências de infecção (DTH-). O alelo T na posição -509 do gene *TGFB1* conferiu risco duas vezes maior de desenvolver LV ou ser positivo para o teste DTH ($p = 0,007$, OR = 1,9 [1,19-3,02]), em comparação com indivíduos DTH-. Os resultados sugerem uma associação do polimorfismo *TGFB1* -509C/T com a susceptibilidade à LV, podendo contribuir para o desencadeamento da doença clínica.

Descritores: Leishmaniose Visceral, citocinas, polimorfismos genético, suscetibilidade à doença.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a serious protozoan infectious disease caused by an obligate intracellular parasite. Some factors can affect the severity of the clinical manifestations; one of which is genetic susceptibility. This study investigated polymorphisms in the *TGFB1*, *IL8* and *IL6* genes, which are cytokines related with the onset and severity of the disease, to look for genetic susceptibility factors. Polymorphisms at *TGFB1* -509C/T and +869T/C, and *IL8* -251A/T and *IL6* -174G/C were analyzed by a PCR-RFLP technique, in 198 patients with Visceral Leishmaniasis (VL), 98 individuals with asymptomatic infection (positive delayed-type hypersensitivity, DTH+) and 100 individuals with no evidence of infection (DTH-). The T allele of the *TGFB1* polymorphism in position -509C/T conferred a two risk fold to develop LV or to be DTH+ ($p=0.007$; OR=1.9 [1.19 – 3.02]) when compared with DTH- individuals. We suggest the *TGFB1* -509C/T polymorphism is associated with susceptibility to LV and may contribute to development of the clinical disease.

Descriptors: Visceral Leishmaniasis; cytokines, gene polymorphisms, disease susceptibility.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Leishmaniose: Aspectos gerais

A Leishmaniose é uma doença causada por diferentes espécies de parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. A doença abrange um grande espectro de manifestações clínicas, variando desde uma forma assintomática, lesões ulcerativas na pele (como na forma cutânea da doença), inflamação destrutiva das mucosas da orofaringe (forma mucocutânea) até uma infecção visceral disseminada (forma visceral). O parasita, dependendo da espécie e cepa, também contribui para a grande variabilidade dos sintomas observados. (Murray et al., 2005; Singh, 2006).

Atualmente existe mais de 1000 vetores responsáveis pela transmissão da doença conhecidos, e cada espécie do parasita tem o vetor específico de sua preferência, além de uma distribuição geográfica diferente. No velho mundo, a transmissão é feita principalmente por moscas do gênero *Phlebotomus*. Nas Américas e principalmente no Brasil, o vetor principal da leishmaniose cutânea é *Lutzomia flaviscutellata*, e da forma visceral é *Lutzomia longipalpus* (Sacks and Kamhawi, 2001).

A leishmaniose é endêmica em 88 países, principalmente nas áreas dos trópicos, subtropicos e sudeste europeu, afetando em torno de 12 milhões de pessoas em todo mundo, com uma taxa de incidência de 1,5 a 2 milhões de novos casos/ano (Singh, 2006; Sharma and Singh, 2009). Estima-se que haja,

atualmente, 350 milhões de pessoas vivendo em áreas sob o risco da infecção (Herwaldt, 1999; Desjeux, 2004).

1.2 Leishmaniose Visceral:

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar (febre negra) é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, principalmente *L. donovani* e *L. infantum* presentes no velho mundo, e *L. chagasi* encontrada no novo mundo (revisado por (Malla and Mahajan, 2006).

Estima-se que existam, atualmente, cerca de 500.000 casos novos/ano de LV no mundo, e cerca de 90% destes casos se encontrem em países em desenvolvimento como a Índia, o Afeganistão, o Paquistão, a Síria, a Arábia Saudita, o Irã e a região nordeste do Brasil (Herwaldt, BL; (Desjeux, 2001; Malla and Mahajan, 2006; Blackwell *et al.*, 2009), (Fig.1). A incidência mundial de morte causada por LV vem crescendo cada vez mais. No Brasil, nos últimos anos, mudanças importantes no padrão de transmissão foram observadas com o processo de urbanização. Devido ao grande desmatamento, os insetos vetores ficam mais expostos ao contato dos hospedeiros vertebrados, principalmente cães e o homem. Além do mais, com o advento de casos de co-infecção de LV com o vírus causador da imunodeficiência adquirida, casos que assintomáticos tornaram-se sintomáticos (Roberts, 2005).

Fig.1: Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral. Figura retirada do site: www.who.int/tdroid/dw/leish_map.htm. (Who, 2003)

O ultimo levantamento do Ministério da Saúde, feito em 2008, mostrou uma alta taxa de incidência de casos na região nordeste, com 1.370 indivíduos infectados. A maioria desses casos foi identificada no Maranhão, na Bahia e no Piauí. Em segundo lugar, está a região norte, onde foram notificados 772 casos, a maioria nos estados do Pará e de Tocantins. A região centro-oeste, com crescente número de casos novos, notificou 308 casos, quase todos no estado do Mato Grosso do Sul. Já na região sul, não houve nenhuma notificação (Ms, 2010) A doença apresenta uma taxa de letalidade de 5,6/1000 casos no Brasil, sendo que, se for analisada cada região separadamente, a região centro-oeste foi a que apresentou a maior taxa de letalidade, atingindo 10,1% dos pacientes infectados.

Isto ocorre devido a existência de pacientes com quadros graves, muitas vezes fatais e que claramente tem um padrão de progressão da doença muito

diferente da maioria. Estes casos existem em paralelo com os casos de evolução mais benigna, assim como os portadores assintomáticos, sugerindo haver um ou mais componentes individuais que, juntamente com a variação nos vetores e nos próprios parasitas, altera a história natural da doença.

1.2.1 Patógeno e Ciclo evolutivo:

Embora seja amplamente descrita como uma infecção humana, a doença também pode ser transmitida a uma grande diversidade de mamíferos, tais como roedores, preguiças, porcos, coelhos, cães selvagens e domésticos - sendo estes últimos os principais reservatórios naturais da doença nas cidades e nos perímetros urbanos (Lainson *et al.*, ; Tripathi *et al.*, 2007).

O patógeno tem um ciclo evolutivo digenético, com duas formas evolutivas distintas (Figura 2). A forma promastigota é flagelar, móvel, tem cerca de 30 µm de extensão e vive no tubo digestivo do flebótomo, aderido às microvilosidades, onde prolifera e se transforma na forma promastigota pró-cíclica (Sacks and Kamhawi, 2001; Ansari *et al.*, 2007). Estas formas dirigem-se para o intestino posterior do inseto vetor onde transformam-se na forma promastigota metacíclica, a forma infectante do mamífero hospedeiro (Jeronimo *et al.*, 2000).

Fig.2: Ciclo evolutivo da Leishmaniose Visceral. (Imagens, 2010)

Durante o repasto sanguíneo do vetor, as formas promastigotas metacíclicas, ressuspensas na saliva são inoculadas na pele do mamífero hospedeiro, infectando inicialmente os neutrófilos, as primeiras células hospedeiras a alcançar o local da infecção (Van Zandbergen *et al.*, 2004).

Posteriormente, os neutrófilos infectados sofrem apoptose e são fagocitados, juntamente com os parasitas, por macrófagos e células dendríticas.

Após a entrada das formas promastigotas metacíclicas nestas células alcançam os fagossomos onde ocorre a transformação em amastigotas, a forma ovóide e não flagelar, medindo de 3 a 5µ. Estas formas, por sua vez, crescem e multiplicam-se rapidamente, rompendo a própria célula e caindo na

corrente sanguínea. Ao serem ingeridas pelo inseto vetor, voltam a transformar-se em promastigotas, fechando seu ciclo evolutivo (Herwaldt, 1999; Singh, 2006).

1.2.2 Fisiopatologia da Leishmaniose:

Um dos principais mecanismos de virulência das leishmanioses está ligado à presença de receptores de membrana específicos na superfície das formas promastigotas. Estes receptores são compostos principalmente por glicoconjugados, como os lipofosfoglicanos (LPGs) (Späth *et al.*, 2000) e as metaloproteinases; um exemplo é a leishmaniolisina, também conhecida como gp63 (Etges *et al.*, 1986b; Sacks and Kamhawi, 2001).

A gp63 tem a capacidade de ligar-se na fração C3 do complemento, aumentando a opsonização para a sua entrada nos macrófagos. Este processo leva a um aumento de Ca^{+} intracelular, que, por sua vez, leva à diminuição da produção de proteína C quinase (PKC) (Etges *et al.*, 1986a; Sacks and Kamhawi, 2001) e um aumento na produção da citocina imunossupressora IL-10, aumentando, assim, a infectividade do parasita (Guerbouj *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2002). Em conjunto, os LPGs e as metaloproteinases representam os mais importantes fatores de virulência do parasita (Sacks and Kamhawi, 2001; Joshi *et al.*, 2002).

Além dos receptores de membrana, a entrada dos parasitas nas células é facilitada por mecanismos de escape adicionais que promovem a sobrevivência dos parasitas dentro das células hospedeiras, inibindo as funções microbidas e a resposta imune do hospedeiro.

As formas promastigotas também induzem um aumento na ativação de TGF- β 1 latente através de ativação da catepsina B, uma cisteína protease. A alta produção de TGF- β 1 , por sua vez, altera o fenótipo dos macrófagos, inibindo a produção IFN- γ , TNF- α e aumentando a produção de arginase, o que leva à inibição da produção do NO com maior sobrevivência dos parasitas e à progressão da doença (Gatti *et al.*, 2007). Dentro da célula há diferenciação do parasita para a forma amastigota, a forma não flagelada capaz de rápida multiplicação, e assim, com a disseminação do parasita pelo organismo, estabelece-se a infecção clínica (Killick-Kendrick, 1990; Pearson and Sousa, 1996).

As formas amastigotas intracelulares inibem a resposta microbida dos macrófagos por meio de diversos mecanismos como: ativação do supressor de sinalização para citocinas (SOCS-3), ativação de PTPs (proteína tirosina fosfatases) do hospedeiro, como a PTP-SHP-1, levando à inativação de MAPK (mitogen-activated protein kinase) e ERK (extracellular signal-related kinase) e inibição de NF- κ B [revisado por(Kaye *et al.*, 2004)], resultando também numa supressão da produção de fatores microbidas como o superóxido e o óxido nítrico (NO).

Paralelamente, uma vez estabelecida a infecção, ocorre uma diminuição, na célula infectada, da expressão de moléculas MHC classe I e II (Kaye *et al.*, 1994), a inibição na secreção da citocina pró-inflamatória IL-12, e, paralelamente, um aumento na produção de IL-10 e TGF- β 1 (Barral-Netto *et al.*, 1992; Späth *et al.*, 2000). Uma consequência importante será a ineficiência da resposta imune adquirida na resposta à infecção.

O modelo murino é amplamente utilizado para se estudar a LV e os resultados obtidos reforçam a noção que o padrão da resposta imune na defesa contra a infecção e no aparecimento das diferentes formas clínicas conhecidas no homem é importante. Neste modelo, conforme a linhagem de camundongo empregada há uma clara dicotomia na resposta de acordo com o padrão de resposta imune característico de cada linhagem, já que o controle da doença é dependente da produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ , com a ativação de células T CD4+, T CD8+ e células Natural Killer (NK) (Karplus *et al.*, 2002; Murray, 2004). Assim, a cura da infecção no modelo murino é dependente de um perfil Th1 da resposta imune do hospedeiro (ex: C57BL/6), enquanto que o desvio para o perfil Th2 (ex: BALB/c), (Blackwell, 1996; Blackwell *et al.*, 2009) com alta produção de TGF- β 1 e IL-10 e a supressão na produção de IFN- γ , leva à progressão da doença e maior gravidade [revisado por (Kaye *et al.*, 2004; Peruhype-Magalhães *et al.*, 2006)].

Na leishmaniose visceral humana não existe a clara dicotomia da resposta imune observada no modelo experimental. O que ocorre é uma diversidade na resposta imune, onde as citocinas formam uma complexa rede

de interações sinérgicas e antagonistas, as quais não apenas induzem, mas também suprimem certos componentes da resposta imune (Barral-Netto *et al.*, 1992; Caldas *et al.*, 2005; Peruhype-Magalhães *et al.*, 2006).

Uma vez infectado, o paciente pode apresentar um espectro variado de sinais e sintomas da doença. Na maioria dos casos de infecção, ocorre a cura espontânea da doença. Nestes casos, os indivíduos infectados não apresentam sinais e sintomas da doença. A infecção sofrida é evidenciada pelo teste intradérmico de hipersensibilidade tardia (“delayed type hypersensitivity” – DTH), positivo contra a leishmanina. .

Por outro lado, o indivíduo pode apresentar a forma sintomática da LV com um quadro clínico mais grave, de desenvolvimento lento, com ocorrência de febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e caquexia profunda (Wilson *et al.*, 2005). Sem tratamento, a doença pode resultar em morte do paciente. Em alguns casos, há uma forma ainda mais severa e potencialmente fatal, na fase mais precoce da doença, na qual o indivíduo apresenta altos níveis de anticorpos anti-leishmania. Nesta fase os pacientes não conseguem responder ao teste intradérmico. (Reed *et al.*, 1986). Somente após 6 a 12 meses de tratamento com a terapia apropriada, ocorre a conversão do teste intradérmico para a positividade (Caldas *et al.*, 2005) e os níveis de IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-12 e de anticorpos IgG começam a cair (Karplus *et al.*, 2002; Caldas *et al.*, 2005).

1.2.3 Resposta Imune do hospedeiro:

A resposta imune contra a LV é modulada por diversos fatores próprios do indivíduo infectado, como seu estado nutricional e idade, além do seu padrão de resposta imune, determinado ao menos em parte pelo seu plantel genético (susceptibilidade genética) e pela espécie do parasita. O conjunto dos fatores determinará a gravidade da doença, modificando a forma clínica da doença, variando de assintomática à grave com sangramento (Blackwell, 1998) revisado por (Murray *et al.*, ; Roberts, 2005)

Pesquisando-se os níveis plasmáticos de citocinas, é possível avaliar o tipo de resposta formada contra o parasita. Em indivíduos com a forma ativa da doença, observa-se um balanço na produção de resposta Th1/Th2, com altos níveis plasmáticos de IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10. (Barral-Netto *et al.*, 1992; Peruhype-Magalhães *et al.*, 2006).

Caldas et al, 2005, analisaram, durante um ano, pacientes com a doença ativa e após o tratamento. Encontraram elevados níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-12, IL-10 e TGF- β 1 durante a doença ativa, e que houve um decréscimo destes níveis de citocinas após a cura da doença, assim como houve um decréscimo nos níveis de anticorpos anti-leishmania da classe e IgG1 e IgG3. Entretanto, mesmo após a cura, foi verificado que os níveis plasmáticos das citocinas IFN- γ e IL-10 continuaram elevados, sugerindo a coexistência de padrões Th1/Th2 tanto nos pacientes com LV ativa como nos indivíduos curados.

Em casos mais graves da doença, pode ocorrer uma falha na geração de IFN- γ , e a ausência desta citocina leva à baixa produção dos fatores microbicidas dos macrófagos, como o óxido nítrico (NO) e os radicais livres de oxigênio (ROs) (Jeronimo, Duggal *et al.*, 2007). Assim como elevadas taxas de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β 1, (Barral-Netto *et al.*, 1992; Caldas *et al.*, 2005; Mcconville and Handman, 2007), fatores estes que influenciam a sobrevivência da *Leishmania* dentro dos macrófagos ao impedir a superprodução das suas moléculas leishmanicidas, um efeito diretamente correlacionados com a progressão e gravidade da doença (Barral-Netto *et al.*, 1992).

A IL-8 é um membro importante da família das quimiocinas CXC, envolvida na indução e expansão de reações inflamatórias agudas, processos inflamatórios crônicos e proteção contra a apoptose nos neutrófilos, induzidos por *Leishmania*

Correa *et al.*, 2006, de mostrou que os níveis plasmáticos de IL-8 estavam aumentados em pacientes com LV de uma região endêmica de Belo Horizonte. Estes dados estão de acordo com um estudo feito em Bangladesh (Secor *et al.*, 2006) em pacientes com as formas clínicas e sub-clínicas de kala-azar, que também apresentavam níveis plasmáticos aumentados de IL-8.

O TGF- β 1 é membro de uma família de polipeptídeos diméricos de fatores de crescimento, envolvidos com diversos processos regulatórios celulares que incluem a diferenciação, a angiogênese, a apoptose, interações

com a matriz extracelular, o desenvolvimento de fibrose e o controle da resposta imune (Blobe *et al.*, 2000)

O TGF- β 1 é uma citocina que está diretamente envolvida na desativação de monócitos/macrófagos resultando na inibição da produção de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio. O TGF- β 1 pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , e ativar a produção de citocinas antiinflamatórias, do tipo TNF- α e IL-1, mudando o fenótipo para um perfil Th2 (Bogdan and Nathan, 1993) e representa um dos principais fatores de importância na progressão e gravidade da LV (Barral-Netto *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 1998).

Saha *et al.*, estudando células mononucleares de sangue periférico de pacientes com Kala-azar e pós-kala-azar, mostraram níveis aumentados de TGF- β 1 tanto nos pacientes com a forma ativa da doença como em pacientes tratados com antimonial pentavalente. A ativação do TGF- β 1 latente, por ação da catepsina B, uma cisteína proteinase das formas promastigotas de *Leishmania donovani*, foi demonstrada por Gantt *et al.*, 2003, comprovando a importância de altos níveis de TGF- β 1 para a sobrevivência dos parasitas dentro dos macrófagos (Gantt *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2007).

A IL-6 é um componente multifuncional da resposta inflamatória, normalmente ausente da circulação, mas abundantemente produzido em resposta à infecção ou dano tecidual. IL-6 é produzida principalmente por macrófagos e células T, levando à produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (Heinrich *et al.*, 2003; Kamimura *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009).

Níveis plasmáticos elevados de IL-6 encontrados em pacientes com a forma ativa de LV foram associados com um melhor prognóstico da doença, mostrando haver uma forte relação entre a presença desta citocina e a capacidade de pacientes infectados combaterem a doença (Van Der Poll *et al.*, 1995; Caldas *et al.*, 2005; Ansari *et al.*, 2006).

1.2.4. Diagnóstico:

O diagnóstico da LV pode ser feito por exames parasitológicos, imunológicos, hematológicos, bioquímicos ou histopatológicos.

Pode-se identificar a presença de parasitas por exames diretos, como a análise de esfregaços de baço, medula, fígado, linfonodos, ou sangue periférico, ou ainda pelo isolamento em cultivo *in vitro* ou inoculação em animais (xenodiagnóstico).

Dentre os testes imunológicos, destaca-se o DTH conhecido como reação de Montenegro, tendo sido descrito por este em 1926. O DTH é mundialmente utilizado que utiliza antígenos macerados da forma promastigota de diferentes formas de *Leishmania sp* (La Placa *et al.*, 1975; Pellegrino *et al.*, 1977). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990), a preparação do antígeno de *Leishmania* pré - identificada, na sua fase de crescimento log, na concentração de 1×10^9 , que deve ser lisada por sonicação e liofilizada para posterior ressuspensão em solução salina, estéril e filtrada. A

concentração preconizada no Brasil é de 40 µg/ ml, diluído em salina - mertiolate, da qual se usa 0,1 a 0,2 ml na aplicação intra-dérmica (Fmtam, 2010) Na LV ativa, a resposta ao DTH é negativa, devido à ausência de resposta Th1 causada pela infecção, e pode permanecer negativa por até um ano após a infecção inicial (Manson-Bahr, 1961; Pampiglione *et al.*, 1975). Após o tratamento, o teste intradérmico torna-se positivo. Indivíduos que foram infectados, e que não apresentaram a forma sintomática da doença, ou seja, assintomáticos, tem resposta positiva ao DTH, indicando resistência ao desenvolvimento da forma ativa da infecção (Crescente *et al.*, 2009).

Os exames sorológicos para a detecção de anticorpos da classe IgG, são utilizados em larga escala por laboratórios clínicos, se valem de técnicas como a aglutinação, o ELISA e a imunocromatografia, onde o antígeno K39 na forma recombinante, presente em formas amastigotas, é o mais utilizado. Embora com baixa sensibilidade nos casos assintomáticos da doença, pode chegar até 90 a 100% de sensibilidade em casos sintomáticos, dependendo da região onde o teste está sendo aplicado. (Sundar *et al.*, 2002).

Um recente estudo em uma região de baixa endemicidade de LV, comparando dois testes sorológicos diferentes, a imunofluorescência indireta e a imunocromatografia (Monno *et al.*, 2009), encontrou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade utilizando o antígeno recombinante K39 em imunocromatografia, mostrando que testes mais invasivos, como a análise de aspirados de baço ou medula, podem ser substituídos pela imunocromatografia.

O exame de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) pode ser utilizado para a detecção da presença de parasitas no sangue periférico. Estudos comparativos entre PCR e técnicas sorológicas como o "*Western Blot*" e a imunofluorescência indireta, considerada como o padrão-ouro, revelou uma sensibilidade de 80%, com especificidade de 100%, tanto em pacientes sintomáticos como assintomáticos (Gatti *et al.*, 2004).

Já outro estudo, onde foi feita a análise de 50 pacientes com suspeita de LV, encontrou 100% de sensibilidade do teste de PCR em comparação ao teste sorológico usando K39 recombinante e ao exame parasitológico por microscopia ótica (Ozerdem *et al.*, 2009).

1.2.5. Tratamento:

Até o momento, não existe nenhuma vacina eficaz para o controle da LV, o tratamento da doença é basicamente feito por meio de medicamentos administrados por via parenteral, por um longo período de administração, o que torna a adesão ao tratamento um desafio para as autoridades sanitárias.

As drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}). Existem dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados: o antimoniato de N-metilglucamina (comercializado no Brasil como Glucantime) e o estibogluconato de sódio, ainda não comercializado no Brasil.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada com o esquema de tratamento de 20 mg/Sb+5/Kg/dia por um período de 30 a 40 dias. Os antimoniais devem ser administrados por via parenteral, intramuscular ou intravenosa, diariamente por 28 dias (Roberts, MTM, 2006)

Existem muitos efeitos colaterais relatados, tais como dores articulares, e musculares, dor abdominal, cefaléia, mal estar geral, dispnéia, erupção cutânea, edema facial e alterações nos testes das funções hepática, renal e pancreática. Alterações no eletrocardiograma são dose-dependentes e geralmente reversíveis com a suspensão do tratamento.

Em países com casos de resistência à terapêutica com antimoniais, como Índia e Afeganistão, usa-se o miltefosina, a primeira droga, de administração oral, eficaz no tratamento da LV. (Berman, J, 2005). Embora apresente elevadas taxas de cura, não pode ser usada em mulheres grávidas ou que tenham a intenção de engravidar, devido a sua ação teratogênica.

A miltefosina mostrou-se ineficaz na presença de co-infecções, segundo estudos de Ritmeijer, em 2006, que analisou pacientes, na Etiópia, co-infectados com HIV. (Ritmeijer *et al.*, 2006),

A anfotericina B lipossomal é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular; é o tratamento de escolha nos países desenvolvidos, principalmente na Europa. Apresenta altas taxas de cura (90-100%) e tratamento por um período mais curto. Porém o seu custo muito elevado (cerca de U\$ 2.000 por tratamento)

torna seu uso muito limitado em países pobres ou em desenvolvimento, como é o caso do Brasil.(Murray, 2004; Bern, Adler-Moore *et al.*, 2006).

A anfotericina é considerada como a droga de primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente, ou ainda, na impossibilidade de seu uso (Ms, 2010).No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece tratamento, específico e gratuito para a doença, com antimonial pentavalente como droga de primeira escolha, com o mesmo regime de tratamento indicado pela OMS.

Devido à dificuldade de administração e aos inúmeros efeitos colaterais, os pacientes muitas vezes abandonam o tratamento, o que pode ocasionar o aparecimento de resistência dos parasitas.

1.3 Polimorfismo genético e susceptibilidade genética à LV:

Há diversos tipos de polimorfismos. Um tipo comum é de seqüências repetitivas. Os STR (*“Small tandem repeats”*), caracterizados por repetições de seqüências com 2 a 5 nucleotídeos, são também conhecidos como microsátélites. Nos VNTR (*“Variable number of tandem repeats”*) ou minisátélites, pode-se verificar um número variável de repetições, com seqüências de nucleotídeos maiores. Finalmente, os SNPs (*“Single Nucleotide*

Polymorphisms”), mostram variação de apenas um único nucleotídeo, e contam na casa dos milhões, distribuídos por todo o genoma.

Os polimorfismos tipo SNP podem influenciar na importância relativa dos muitos fatores de risco associados a doenças comuns. Um grande número destes polimorfismos de nucleotídeo único de interesse está localizado em regiões que precedem a fase de leitura aberta do gene ou em regiões intergênicas que regulam a expressão do gene, determinando fenótipos que expressam diferentes quantidades das proteínas codificadas, sendo considerados “polimorfismos funcionais”, ao lado de variantes que levam a modificações da própria proteína. Polimorfismos podem também ser considerados como marcadores genéticos, já que são transmitidos juntamente com outros genes em ligação (*linkage*), localizados em regiões cromossômicas vizinhas, que podem, por sua vez, impactar na suscetibilidade à doença.

A influência de fatores genéticos do hospedeiro relacionados ao desenvolvimento das diferentes formas de leishmaniose tem sido evidenciada por meio de estudos de larga escala, na forma de varredura do genoma dos indivíduos - “*Genome wide scanning*” (Bucheton, Abel, El-Safi *et al.*, 2003; Jamieson *et al.*, 2007; Jeronimo, Duggal *et al.*, 2007) e também através de estudos de genes candidatos, (Peacock *et al.*, 2002; Bucheton, Abel, Kheir *et al.*, 2003; Jeronimo, Holst *et al.*, 2007; Blackwell *et al.*, 2009) onde é feita uma avaliação do grau de associação entre uma variante polimórfica e a presença da doença propriamente dita ou de alguma característica específica da doença.

Os primeiros estudos realizados para mensurar o impacto genético na susceptibilidade a LV foram realizados em modelos experimentais de camundongos. Por meio desses estudos, foi possível observar os primeiros indícios e confirmar a presença de diversos genes de susceptibilidade ao desenvolvimento das diferentes formas de LV. (Blackwell, 1996; Blackwell *et al.*, 2009).

1.3.1 Fatores de risco genético na LV.

Por meio de estudos de ligação, foi possível identificar genes de suscetibilidade, tanto na leishmaniose visceral como na leishmaniose mucosa, em outras palavras, mostrando haver de fato a influência de fatores genéticos no desenvolvimento da LV (Barral-Netto *et al.*, 1992; Bucheton, Abel, El-Safi *et al.*, 2003; Jeronimo, Duggal *et al.*, 2007).

O primeiro estudo de ligação para identificar genes de susceptibilidade à LV foi feito em pacientes e suas famílias em uma vila do Sudão, endêmica para *L. donovani*. Este estudo demonstrou haver uma forte ligação entre a presença da doença sintomática e a segregação de variantes genéticas na região do cromossomo 22q12 (Bucheton, Abel, El-Safi *et al.*, 2003).

Porém, um estudo de 59 famílias no Sudão, com casos de LV, com ou sem a forma pós-kala-azar, encontrou ligação dos genes *IL4* e *IFNGR1* com

susceptibilidade à LV, porém não confirmou os genes identificados no estudo de Bucheton (Mohamed et al., 2003).

Jeronimo et al, 2007, estudou em uma zona endêmica, na cidade de Natal, famílias de pacientes infectados com LV assim como as famílias residentes nas casas vizinhas. Foi feita a análise de 405 marcadores de regiões microsatélites em 1254 indivíduos, e identificadas quatro regiões de interesse nos cromossomos 2, 13,15 e 19.

Recentemente, Ettiger *et al*, também estudaram uma população do nordeste do Brasil, e comparou grupos de indivíduos infectados com LV, com fenótipos diferentes da doença: pacientes com LV sintomáticos, assintomáticos com DTH+, DTH- e as respectivas famílias. Foi encontrada grande associação entre susceptibilidade a LV e genes de resposta imune presentes no cromossomo 22, independentemente da forma clínica da doença, concordando com o estudo de Bucheton et al, 2003 (Ettinger et al., 2009), estes dados sugerem que indivíduos que herdaram alelos nessa região cromossômica podem estar mais predispostos a desenvolver formas sintomáticas de infecções por *Leishmania*.

1.4. A escolha de genes candidatos:

Por meio de estudos de genes candidatos é possível selecionar polimorfismos em genes alvos diretamente envolvidos na resposta imune do hospedeiro, associando as diferenças alélicas e/ou genotípicas encontradas na população com a susceptibilidade à doença ou a características específicas da doença. É uma abordagem útil quando não há famílias, isto é, quando as amostras são provenientes de indivíduos não relacionados. De modo geral, é o tipo de estudo preferido para identificar variantes com baixo impacto na suscetibilidade a doenças, como no caso de genes de citocinas. Este tipo de abordagem exige também cuidados na escolha da população, e, em especial, a escolha dos controles para comparação dos resultados obtidos. O estudo proposto pela nossa equipe de pesquisa analisou 3 grupos de amostras, todas oriundas da mesma região endêmica. Apesar de não ter sido feita uma análise de ancestralidade nestas amostras, a escolha de pacientes com LV, indivíduos assintomáticos DTH+ e indivíduos DTH- de uma mesma região buscou homogenizar o fundo genético da amostragem com o objetivo de evitar o viés nos resultados.

Inicialmente estudamos 4 polimorfismos do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) nas seguintes posições dos genes candidatos reconhecidamente ligados à resposta imune a LV: *IL8* -251 T/A, *IL6* -174 G/C,

TGFB1 -509 C/T e *TGFB1+869 T/C*. Segue abaixo os dados da literatura que levaram-nos à escolha destes genes candidatos.

IL8

IL-8 é um membro importante da família de quimiocinas CXC, envolvidos na reação inflamatória aguda e em processos inflamatórios crônicos, é um forte quimiotática de neutrófilos e linfócitos T. O polimorfismo *IL-8 -251A/T* está localizado na região promotora, onde os carreadores do alelo A apresentam níveis plasmáticos de IL-8 mais altos (Lurje *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que neutrófilos infectados com *Leishmania* pode aumentar a produção de IL-8 (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Peruhype-Magalhães *et al* (2006) estudando pacientes com LV em área endêmica de Belo Horizonte-Brasil mostram que os níveis plasmáticos de IL-8 estão aumentadas em pacientes com VL(Peruhype-Magalhães *et al.*, 2006).

TGFB1

Existem dois polimorfismos funcionais muito estudados no gene do *TGFB1*. O SNP na região promotora – 509 C/T, onde a troca do alelo C pelo alelo T modifica uma sequência consenso YY1, associada com uma

desregulação na transcrição do gene (Shrivastava and Calame, 1994). Além disso, os carreadores do alelo T apresentam níveis plasmáticos mais altos de TGF- β 1 (Grainger *et al.*, 1999) Já no polimorfismo *TGFB1+869T/C*, a mudança do alelo T pelo alelo C leva uma modificação na região 10 da proteína, de leucina para prolina, resultando em um aumento nos níveis séricos de TGF- β 1 *in vitro* (57)

Estes polimorfismos que afetam diretamente a produção da citocina, já foram descritos em estudos associando a susceptibilidade a doenças infecciosas como tuberculose (Mak *et al.*, 2007; Mak *et al.*, 2009), brucelose (Karaoglan I, 2009) e doenças respiratórias como relacionadas a processos de fibrose como câncer pulmonar (Kang, 2005) e asma grave (Pullein,LJ; 2001). Porém, apesar da relevante participação do TGF- β 1 na fisiopatologia da LV, ainda não está esclarecido o papel de polimorfismos deste gene na suscetibilidade à LV ou na progressão e gravidade da doença.

IL6

IL-6 é uma citocina antiinflamatória, capaz de inibir TNF- α e IL-1, e estimular a produção IL-10 e IL1RA. Os níveis plasmáticos de IL-6 são determinados em parte, por fatores genéticos. Um polimorfismo na região 5' do gene, na posição -174 do gene *IL6* (-174G/C) resulta em supressão da transcrição de IL-6 em resposta a estímulos inflamatórios, como

lipopolissacarídeos (LPS) ou IL-1. A presença do alelo C, em heterozigose ou homozigose resulta em uma baixa expressão de IL-6 (15). Castellucci et al, 2006, comparando pacientes com a forma cutânea e mucocutânea da doença encontraram associação entre o polimorfismos da região -174 G/C e a forma cutânea da doença, sugerindo que indivíduos que possuem o alelo raro tem maior risco de desenvolver a doença (Castellucci *et al.*, 2006). Não é sabido se na LV há também uma participação desta variante no desenvolvimento da doença.

Nota:

Este projeto faz parte de uma das plataformas do Instituto de Investigação em Imunologia (iii) - sob a responsabilidade da Dra. Anna Carla Goldberg - que visa a genotipagem em leishmaniose, dentre outras doenças. Esse instituto fica sediado em São Paulo, no Laboratório de Imunologia do InCor, FMUSP sob a coordenação geral do Prof. Dr. Jorge Kalil.

Trata-se de um projeto em colaboração com o grupo do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – (Salvador, Bahia) e Universidade Federal do Maranhão sob a responsabilidade da Dra. Aldina Barral, o Laboratório de pesquisa em Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella da Universidade Federal do Piauí sob a

responsabilidade do Dr. Carlos Henrique Costa e Dra. Dorcas Lamourier Costa.
(Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT nº. 025/2006 - estudo de Doenças Negligenciadas) aprovado em janeiro de 2007.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Identificar polimorfismos genéticos em genes de citocinas com impacto no desenvolvimento e progressão da leishmaniose visceral em indivíduos de áreas endêmicas no Piauí e Maranhão

2.1 Objetivos específicos

1. Analisar polimorfismos em genes candidatos, envolvidos na resposta imune à leishmaniose visceral: *IL6*, *IL8* e *TGFbeta*.
2. Efetuar análise de expressão gênica por *microarray* para identificar genes relevantes na imunidade à LV, correlacionando a informação obtida com a gravidade da doença (ver anexo B)
3. Validar os achados nos ensaios de expressão gênica através de PCR em tempo real e escolher genes candidatos, a partir dos resultados obtidos, para estudo de novos polimorfismos genéticos em genes relevantes.

MATERIAIS E METODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

ETAPA 1

3.1. Casuística

Todos os indivíduos que fizeram parte deste estudo (pacientes e controles) foram provenientes de áreas endêmicas localizadas nos estados do Maranhão e Piauí e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelas comissões locais de Ética (Anexo 1, 2 e 3). Estes indivíduos fazem parte de uma *coorte* estabelecida pela equipe médica do grupo de pesquisadores envolvidos neste projeto.

Todos foram examinados pela equipe médica e submetidos a clínicos e exames laboratoriais que incluiu cultura de sangue (mielograma e sorologia para leishmaniose). Foi também realizada análise sérica das citocinas IL-8, TGF- β 1 e IL-6 pela equipe da FioCruz-Salvador/Bahia.

O exame clínico dos pacientes incluiu a análise da gravidade da doença avaliando-se idade, dispnéia, edema, insuficiência renal, tamanho do baço, tempo de doença, icterícia, sangramento, infecções bacterianas, tratamento utilizado (antibióticos, antimônio ou anfotericina B) (Anexo 4). Evolução para cura ou morte.

Os fenótipos da doença e controles foram definidos, neste estudo, como:

DTH-: Indivíduos que apresentaram testes sorológicos e teste DTH negativos, bem como exames clínicos e laboratoriais negativos. Estes indivíduos constituíram nosso “grupo controle”.

DTH+: Indivíduos que, apesar de apresentarem a reação DTH positiva, não desenvolveram sinais e sintomas clínicos da doença, ou seja, apresentam a forma assintomática da doença e foram capazes de se curarem sozinhos. Foram aqui definidos como “grupo casos”.

LV: Pacientes com a doença ativa, confirmada por exames clínicos e laboratoriais. Foram aqui definidos como “grupo pacientes”

Foram coletadas 209 amostras de sangue com EDTA de pacientes com LV, tratados com antimonial pentavalente; 104 amostras de indivíduos DTH+ e 104 amostras de indivíduos controles saudáveis (DTH-).

3.2 Métodos

3.2.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir da amostra colhida com EDTA. As extrações foram realizadas pelo método que utiliza sais de Brometo de Tetrametilamônio (Bignon; Viña, 1995).

O sangue foi inicialmente centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O “buffy-coat” (“papa de leucócitos”) foi recuperado e transferido para 2 tubos de 2ml (aproximadamente 500µl em cada tubo) ao qual foi adicionado igual volume de tampão de lise, DTAB 12% (brometo de dodeciltrimetilamônio). Os tubos foram então homogeneizados e incubados em banho-maria 68°C por 5 minutos. Dois volumes de clorofórmio foram acrescentados e os tubos agitados vigorosamente. Após centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm, a camada superior (aquosa), onde estava o DNA, foi recuperada e foram adicionados 2 volumes de CTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio). Esta mistura foi homogeneizada até a obtenção do precipitado DNA/CTAB. Após nova centrifugação por 2 minutos à 10.000 rpm, o “pellet” DNA/CTAB foi ressuspenso em 300µl de NaCl 1,2 M (cloreto de sódio) e reprecipitado em 750µl de etanol absoluto. Centrifugou-se mais 2 minutos a 13000 rpm, e o “pellet” foi ressuspenso em etanol 70%, para retirar o excesso de sal. Uma última centrifugação foi realizada a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o DNA obtido foi dissolvido em H₂O.

Depois da extração, foram realizadas a quantificação dos ácidos nucleicos em espectrofotômetro e a verificação do seu índice de pureza, idealmente, próximo de 1,8 (Nanodrop). Esta determinação foi feita através da medida espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Uma densidade ótica (D.O.) corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA dupla fita.

3.2.2 Tipificação do polimorfismo tipo SNP dos genes IL-6, IL-8 e TGF-B

Foram analisados neste estudo os seguintes polimorfismos do tipo SNP: *IL6* -174 G/C, *IL8* -251 A/T, *TGFB*+869 T/C e *TGFB* -509 C/T.

A tipificação dos SNPs (detecção de cada variante alélica) foi realizada pela a técnica de PCR-RFLP (do inglês *Polymerase chain reaction plus restriction fragment length polymorphism*) que consiste na detecção do polimorfismo pela utilização de enzimas de restrição que reconhecem ou não um sítio de clivagem onde a troca de nucleotídeos está presente.

Reação de PCR

Numa primeira etapa foi realizada a amplificação da sequência gênica que incorpora a região da mutação, através da técnica de PCR. As concentrações finais de reagentes utilizados na reação de PCR estão descritas na Tabela 1.

TAB.1. CONCENTRAÇÕES DE REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR

REAGENTES [] Estoque	GENES [] utilizada			
	<i>TGFbeta</i> +869	<i>TGFbeta</i> -509	<i>IL6</i> -174	<i>IL8</i> -251
Tampão (10X)	1x	1x	1X	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM	1,5 mM
Primer R' (12,5pM)	1pmol	0.8 pmol	0,75 pmol	1pmol
Primer F1' / F2' (12,5pM)	1pmol	0.8 pmol	0,75 pmol	1pmol
DNTPs (1mM)	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
Enzima Taq (5U/ul)	1 U/μL	1 U/μL	1 U/μL	1 U/μL
DNA	100 ng	50 ng	50 ng	100 ng
H ₂ O qsp	12 μL	25 μL	25 μL	25 μL

[]: Concentração; qsp: quantidade suficiente para.

A PCR foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 2 min a 94°C seguida de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C; 30 segundos na temperatura (T°) de anelamento específica para cada “*primer*” (Tab. 2) e 30 segundos a 72°C. Seguiu-se com mais 10min a 72°C para extensão final e o produto de PCR foi mantido a 4°C.

Para identificação do produto amplificado, 12 a 25μL do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose preparado com solução de TEA 1x e corado com brometo de etídio (0,5μg/ml). As bandas específicas de amplificação foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas no sistema de foto documentação Alphamager (Alpha Innotec Corporation, CA, USA). O produto amplificado de tamanho específico foi comparado a um padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb) (Invitrogen- Carlsbad, Califórnia, USA).

RFLP

Após a amplificação gênica, foi realizada a digestão enzimática utilizando-se enzimas de restrição específicas para a identificação do SNP. Os produtos amplificados foram digeridos, por 3h a 37°C, com 1U ou 2U de cada enzima (New England Biolabs- EUA), de acordo com a sua especificação, e tampão específico, num volume final de 20 µL (Exemplo fig. 3) Após o período de incubação, a reação foi bloqueada incubando-se as misturas a 4°C.

Fig.3: Exemplo de digestão enzimática da sequência amplificada da *IL6* pela enzima *NLAIII*. *: Alelo selvagem, onde a enzima reconhece a sequência e “corta” o fragmento de DNA. **: Alelo polimórfico, onde a enzima não reconhece a sequência, não ocorre o corte do fragmento

A detecção dos produtos amplificados e digeridos com as enzimas foi realizada através eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (0,5µg/ml). As bandas específicas de amplificação foram visualizadas em UV e fotografadas no Sistema Alphamager (Alpha Innotech Corporation, CA, EUA) (Ex.Fig.4). O produto amplificado de tamanho específico foi comparado ao padrão de peso molecular de 100 ou de 50 pb (Invitrogen- Carlsbad, Califórnia, USA) dependendo do tamanho do fragmento gerado. As enzimas e o tamanho do produto da digestão enzimática estão descritos na Tab. 2.

Fig. 4: Exemplo da digestão enzimática em gel de agarose. ND:Amostra não-digerida (198 bps)/ Linhas 1, 2 e 4: Genótipo CC (122/45/31 bp)/ Linha 3 e Linha 7: genótipo GG (167/31 bp)/ Linha 5 e 6: genótipo GC (167/122/45/31).

TABELA 2. GENES/SNPS, INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE PCR, TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS “PRIMERS”, TAMANHO DO PRODUTO AMPLIFICADO, ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA REAÇÃO DE RFLP E TAMANHO GERADO APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Gene/SNP	Alelo WT/ VAR	Primers	PCR °C	Enzima	% Gel	Produto de PCR	Alelos: Produtos de digestão
<i>IL-6</i> -174 rs:1800791	G C	F: TGA CTT CAG CTT TACT CTT GT R: CTGA TTG GAA ACC TTAT TAA G	51	<i>Nla III</i> (2U)	3%	198 bp	G: 167/31 C: 122/45/31
<i>IL8</i> -251 rs: 4973	A T	F: TTG TTCTAACACCTGCCACT CT R: TGTGAGACTCAGGTTTGCC'	61	<i>MfeI</i> (1U)	4%	221 bp	T: 221 A: 141/80
<i>TGFB</i> -509 rs: 1800469	C T	F: GGGGACAGTAAATGTATGG' R: TGAGACACAGGGGAGCC	56	<i>Dde I</i> (2U)	2%	265 bp	C: 144/50/52/18 T: 197/52/50/18
<i>TGFB</i> +869 rs:1982073	T C	F: TTCAA GACCACCCACCTTCT R: TCGCGGGTGCTGTTGTACA	60	<i>MspA1</i> (2U)	4%	501 bp	C: 273 T: 285

rs n°: Número de referência do SNP; F= Forward; R= Reverse; WT= alelo “selvagem (wide type)”; VAR= alelo variante; PCR °C= Temperatura de anelamento do primer; pb=pares de base

3.2.3 Dosagem de citocinas:

As dosagens de níveis plasmáticos de citocinas foram realizadas pelo Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Gonçalo Moniz- FioCruz/BA.

TGF-β1

A concentração TGF- β1 foi determinada através do método de ELISA quantitativo utilizando o kit comercial Quantikine Human TGF β1 Immunoassay

(R & D, Minneapolis, E.U.A.). Foram determinados os níveis de TGF- β 1 plasmático de somente 111 pacientes LV, não tendo sido determinados nos demais grupos.

Inicialmente o TGF- β 1 plasmático latente foi ativado adicionando-se 20ul de HCl 1N a 40ul de plasma . Após 10 minutos de incubação em T° A. a amostra foi neutralizada com 20ul de NaOH 1,2N/0,5M de HEPES.

O kit é provido de uma placa de 96 orifícios de poliestireno recoberta com anticorpo anti-TGF- β 1. Cinquenta microlitros do reagente de diluição (solução protéica específica do kit) foram adicionados em cada orifício de placa. Em seguida 50ul de cada amostra, previamente ativada, controles e padrão foram adicionados e incubados por 2 horas em T°A.. Em seguida líquidos serão removidos e a placa foi lavada por 4 vezes com Tampão de lavagem. Em seguida, 100ul do conjugado Peroxidase-HRP foram adicionados e incubados por 2 horas em T°A. As 4 lavagens foram repetidas e 100ul da solução de substrato (H_2O_2 + TMB, 1:1) foram adicionados e incubados por 30min em T°A, ao abrigo da luz. Em seguida foram adicionados 50ul de "Stop Solution" (HCl 1N). A densidade óptica foi obtida em leitora de ELISA (espectrofotômetro), em 450nm.

Foi gerada, inicialmente, uma curva padrão utilizando as diluições seriadas da amostra de TGF- β 1 humano recombinante (padrão), com um pico máximo de 2000pg/ml (31,2 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/ml), "plotando-se" a média da absorbância no eixo y contra a concentração (pg/ml) no eixo X ..

Todas as amostras de plasma, padrões e brancos, foram testadas em duplicata. Foi calculada uma média dos resultados das duplicatas, corrigidas pelo fator de diluição, e os valores das amostras foram subtraídos do valor do branco.

IL-6 e IL-8

A quantificação das citocinas IL-6 e IL-8 foi realizada por imunofluorescência e análise por citometria de fluxo utilizado-se o kit comercial CBA-Flex (*BD Cytometric Bead Array-Flex Set*), composto por uma população de mesmo tamanho de partículas, com intensidade de fluorescência distinta. Além da fluorescência, cada partícula é revestida por anticorpos específicos para cada citocina. A detecção das citocinas foi obtida através da adição de anticorpos específicos conjugados com ficoeritrina, PE. A quantificação foi determinada em pg/ml baseada em curva padrão obtida através de diluições conhecidas.

Inicialmente foi realizado o preparo das amostras, reagentes e padrões segundo o protocolo do kit. Após homogeneização 50µL das partículas de captura foram adicionadas a cada tubo teste. Em seguida 50µL de cada amostra e de cada diluição do padrão foram adicionados, seguindo com incubação por 1 hora à T^oA. A seguir, 50µL do reagente de detecção (PE) foram adicionados. Após leve homogeneização foi realizada nova incubação por 3 horas, em T^oA. Foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem a cada tubo seguindo-se com centrifugação a 1800rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi

descartado e foram adicionados 300 µL de tampão de lavagem, seguindo-se com homogeneização.

A aquisição do teste foi feita em citômetro FacsCalibur (BD-Califórnia-EUA) e para a análise dos resultados utilizou-se o programa Fcap e a quantidade de citocina foi gerada em pg/ml a partir da curva padrão . A quantidade (pg/ml) de cada citocina foi calculada utilizando software CBA.

3.2.4. Análise estatística

Comparação entre genótipos, alelos, DTH-, DTH+ e LV

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism* 5.0. As frequências alélicas e genótípicas foram calculadas por contagem direta. A significância estatística das comparações entre os pacientes LV, casos DTH+ e controles DTH- foi estimada através do teste do Qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher foi utilizado quando um valor na tabela de contingência foi menor que 5. Para cada comparação foi calculada uma força de associação (OR - "Odds Ratio", razão de chances). Valores de OR > 1 indicaram presença de um fator de risco, OR < 1 um fator protetor e na presença de OR=1, um equilíbrio entre risco e proteção, não havendo associação. O intervalo de confiança de 95% foi calculado.

O equilíbrio de *Hardy–Weinberg* (HWE) foi calculado comparando-se os genótipos esperados e observados. O cálculo das amostras para este estudo foi obtido utilizando-se o programa PS (*“Power and Sample Size Calculations”*) v.2.1.30 (<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>). (V.2.1.30, 2010)

Para o cálculo dos haplótipos foi utilizado o programa *Phase* v2 1.1 (Stephens *et al.*, 2001).

Comparação entre dados clínicos, genótipos e níveis de citocinas.

As análises estatísticas geradas pela análise dos dados clínicos foram realizadas e nos enviadas pela Dra. Dorcas Lamourier Costa (Laboratório de pesquisa em Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella-UFPI).

Os quatro polimorfismos foram analisados como variáveis independentes em modelos de regressão logística univariada pelo software (*Stata*) As variáveis dependentes foram: idade, dispnéia, edema, insuficiência renal, esplenomegalia, icterícia, hemorragia, infecção bacteriana, os níveis de AST e ALT (menos ou mais de 60 U/L), contagem de plaquetas (abaixo ou acima 50000 / mm³), e os níveis plasmáticos das citocinas (alterados os valores acima de 25 pg / mL) (Anexo C).

A relação entre variáveis foi medida pela razão de *odds* (RO) ou coeficiente de correlação (r). As diferenças entre variáveis dicotômicas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de *Fisher* quando os dados eram esparsos. A análise de correlação de *Spearman* foi empregada para detectar concordância entre variáveis contínuas com dados esparsos e a análise de correlação de Pearson foi empregada para variáveis com distribuição normal. Em todas as análises foram considerados os testes bi-caudais e um nível de significância estatística α de 0,05.

As variáveis contínuas foram transformadas em variáveis categóricas de acordo com a variação da gravidade associada a cada uma. Para se encontrar os melhores pontos de corte, foram realizadas análises preliminares com pequenos intervalos e a associação gravidade foi avaliada pelo teste qui-quadrado. Os intervalos estatisticamente semelhantes foram agrupados e novamente analisados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Todos os 4 polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, sem estratificação aparente na população.

O cálculo do Poder amostral – “Power”, assumindo uma significância de 0,05 e um risco relativo de 2,5, mostrou um poder do teste para o *IL-6* -174 G/C de 10%, devido à baixa frequência do alelo polimórfico em nossa população. Já no caso dos SNPs *TGFB1* -509 (C/T), *TGFB1* +869 (T/C) e *IL8*-251(T/A), o poder calculado foi de 73%, 88% e 90%, respectivamente, indicando que o tamanho da amostragem foi adequado para este estudo. As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos analisados e suas distribuições nos grupos de estudo estão apresentadas nas tabelas 3, 4, 5 e 6 .

Na análise alélica do polimorfismo *TGFB1* -509C/T o alelo T estava presente em 41% no grupo LV, 49% no grupo DTH+ e 37% no grupo controle DTH-, e foi estatisticamente significante quando se comparou as os grupos DTH+ versus DTH- ($p= 0.001$, OR= 0.52) assim como quando se fez a análise estatística agrupando os indivíduos DTH+ e LV versus DTH- ($p=0.01$, OR= 0,64) (Tab. 3). A frequência do genótipo CC foi 32%, 29% e 46% para os grupos LV, DTH+ e DTH-, respectivamente. O genótipo CT esteve presente em 54%, 44% e 42% e genótipo TT em 14%, 27% e 12%, respectivamente, para os grupos LV, DTH+ e DTH-. Esses dados estão apresentados na Tabela. 3.

Quando os grupos de genótipos que incluem o alelo T, responsável pela alta produção de TGF- β 1 foram associados (TT + TC), foi observada uma

diferença estatisticamente significativa entre o grupo LV e o grupo controle DTH- ($p=0,02$, OR=1,8). Esta mesma diferença também foi observada na comparação dos casos DTH+ com os controles DTH- ($p=0,02$, OR=1,09). Quando foi agrupada a frequência desses genótipos (TT+TC) e avaliada agrupando-se os pacientes LV com o grupo DTH+ comparando com o grupo DTH-, foi observada uma significância ainda maior ($p=0,007$, OR=1,9).

TABELA 3: FREQUÊNCIA GENOTÍPICAS E ALÉLICAS TGFB1 - 509 C/T NOS PACIENTES LV E INDÍVIDUOS DTH+ E DTH-

<i>TGFB1 -509</i>	VL $n=196(\%)$	DTH+ $n=101(\%)$	DTH- $n=98(\%)$	χ^2	p Value	OR (95%CI)
<i>Frequência genotípica</i>						
CC	63(32)	29(29)	45(46)			
CT	106(54)	45(44)	41(42)			
TT	27(14)	27(27)	12(12)			
<i>Comparações genotípicas</i>						
TT + TC vs CC						
LV vs DTH+				0,40	0,545	0,85 (0,5 - 1,44)
LV vs DTH+ e DTH-				1,12	0,3	1,25 (0,83- 1,9)
DTH+ vs DTH-				5,33	0,02	1,7 (1,09 - 2,95)
LV e DTH+ vs DTH-				7,26	0,007	1,9 (1,19 - 3,02)
LV vs DTH-				5,33	0,02	1,8 (1,09 - 2,95)
<i>Frequências Alélicas</i>						
C	232(59)	103(51)	131(67)			
T	160(41)	99(49)	65(37)			
<i>Comparações Alélicas C vs T</i>						
LV vs DTH+				3,64	0,056	1,4 (0,99 - 1,96)
LV vs DTH+ and DTH-				0,01	0,91	1,02 (0,76 - 1,35)
DTH+ vs DTH-				10,31	0,001	1.94 (1.29 - 2.01)
LV e DTH+ vs DTH-				6,64	0,01	1.56 (1.11 - 2.19)
LV vs DTH-				3,24	0,07	0,72 (0,5 - 1,03)

O valor de p foi calculado por tabelas de contingências utilizando-se o teste χ^2 CC vs TT+CT). $p < 0.05$ foi considerado .
significante/ Abreviações : IL: Interleucina; OR: Odds Ratio

Em relação aos polimorfismos *TGFB1 +869 T/C*, *IL6 -174G/C*, e *IL8A/T*, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados, tanto nas frequências alélicas quanto nas genotípicas. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

TABELA 4: FREQUÊNCIA GENOTÍPICAS E ALÉLICAS *TGFB1+869T/C* NOS PACIENTES LV E INDÍVIDUOS DTH+ E DTH-

<i>TGFB1 +869</i>	VL <i>n=172</i> (%)	DTH+ <i>n=92</i> (%)	DTH- <i>n=85</i> (%)	χ^2	<i>p</i>	OR (95%CI)
<i>Frequência genotípica</i>						
CC	38(22)	24(26)	21(25)			
CT	96 (56)	48(52)	40(47)			
TT	38 (22)	20(22)	24(28)			
<i>Comparações genotípicas</i>						
CC e CT vs TT						
LV vs DTH+						ns
LV vs DTH+ and DTH-						ns
DTH+ vs DTH-						ns
LV e DTH+ vs DTH-						ns
LV vs DTH-						ns
<i>Frequências alélicas</i>						
C	172 (50)	96(52)	82(48)			ns
T	172(50)	88(48)	88(52)			ns
<i>Comparações alélicas C vs T</i>						
LV vs DTH+						ns
LV vs DTH+ e DTH-						ns
DTH+ vs DTH-						ns
LV e DTH+ vs DTH-						ns
LV vs DTH-						ns

O valor de *p* foi calculado por tabelas de contingências utilizando-se o teste χ^2 TT vs TC+CC). *p*< 0.05 foi considerado significante/ Abreviações : IL: Interleucina; OR: odds Ratio

TABELA 5: FREQUÊNCIA GENOTÍPICAS E ALÉLICAS *IL6-174* G/C NOS PACIENTES

<i>IL6 -174</i>	LV	E	INDÍVIDUOS	DTH+	E	DTH-
	VL n=188 (%)	DTH+ n=98 (%)	DTH- n=100 (%)	χ^2	p	OR (95%CI)
<i>Frequência genotípica</i>						
GG	143(76)	71 (72)	80(80)			
GC	41 (22)	27 (28)	17 (17)			
CC	4 (2)	0	3 (3)			
<i>Comparações genotípicas</i>						
OC and GC vs GG						
LV vs DTH+						ns
LV vs DTH+ and DTH-						ns
DTH+ vs DTH-						ns
LV and DTH+ vs DTH-						ns
LV vs DTH-						ns
<i>Frequências Alélicas</i>						
G	327 (87)	169 (86)	177 (88.5)			ns
C	49(13)	27 (14)	23(11,5)			ns
<i>Comparações alélicas C vs G</i>						
LV vs DTH+						ns
LV vs DTH+ and DTH-						ns
DTH+ vs DTH-						ns
LV e DTH+ vs DTH-						ns
LV vs DTH-						ns

O valor de p foi calculado por tabelas de contingências utilizando-se o teste χ^2 GG vs GC+CC). $p < 0.05$ foi considerado

significante/ Abreviações : IL: Interleucina; OR: Odds Ratio

TABELA 6: FREQUÊNCIA GENOTÍPICAS E ALÉLICAS *IL8-251* A/T NOS PACIENTES LV E INDÍVIDUOS DTH+ E DTH-

<i>IL8 -251</i>	VL <i>n</i> =184(%)	DTH+ <i>n</i> =96(%)	DTH- <i>n</i> =97(%)	χ^2	<i>p</i>	OR (95%CI)
<i>Frequência genotípica</i>						
AA	45 (25)	15 (16)	22 (23)			
TA	80 (43)	48 (50)	46 (47)			
TT	59 (32)	33 (34)	29 (30)			
<i>Comparações genotípicas</i>						
TT e TA vs AA						
LV vs DTH+					ns	
LV vs DTH+ e DTH-					ns	
DTH+ vs DTH-					ns	
LV e DTH+ vs DTH-					ns	
LV vs DTH-					ns	
<i>Frequências alélicas</i>						
A	170 (46)	78 (41)	90 (46)			
T	198 (54)	114 (59)	104 (54)			
<i>Comparações alélicas A vs T</i>						
LV vs DTH+					ns	
LV vs DTH+ e DTH-					ns	
DTH+ vs DTH-					ns	
LV e DTH+ vs DTH-					ns	
LV vs DTH-					ns	

O valor de *p* foi calculado por tabelas de contingências utilizando-se o teste χ^2 TT vs AA+AT). *p* < 0.05 foi considerado significativo/ Abreviações : IL: Interleucina; OR: odds Ratio

Na análise da presença do haplótipo *TGFB1* -509C/T – *TGFB1* +869T/C, foi observada uma diferença estatisticamente significativa para o haplótipo TT (-509T e +869T), quando comparou-se o grupo LV com os casos DTH+ (*p*=0,026, OR= 2,54). Porém, após a correção do teste por múltiplas análises (*Bonferroni*) a significância foi perdida. Estes dados estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE *TGFB1*

<i>TGFB</i> -509	<i>TGFB</i> +869	DTH –	DTH +	LV	OR	95% IC	χ^2	<i>p</i>
		2n=168 (%)	2n=184 (%)	2n=344 (%)				
C	C	27 (16,1)	21 (11,4)	44 (13)				ns
C	T	80 (47,6)	76 (41,3)	162 (47)				ns
T	C	56 (33,3)	74 (40,2)	128 (37)				ns
T	T	5 (2,9)	13 (7,0)	10 (3)	2,539*	[1,0 9-5,09]	4,975	0,0257*

Associação dos genes estudados com características clínicas e os níveis de citocinas de pacientes com LV:

Não houve correlação entre a os níveis plasmáticos das citocinas e os polimorfismos *TGFB1* e *IL8*. No entanto, a presença do alelo C do *IL6* -174 foi correlacionada com os níveis plasmáticos mais elevados desta citocina ($p = 0,011$). Finalmente, a presença do alelo T -509 no gene *TGFB1* foi correlacionado com eventos de sangramento (O.R. = 1.16, $p = 0.037$ [1.008 - 1.207]).

TAB. 8 ANÁLISE REGRESSÃO UNIVARIADA : *TGFB1* VS. SANGRAMENTO

Regress sangramento TGFbeta509_dicotômico						
Source	SS	df	MS	Number of obs = 147		
-----+-----				F(1, 145) = 4.45		
Model	.711515667	1	.711515667	Prob > F = 0.0365		
Residual	23.1660354	145	.159765761	R-squared = 0.0298		
-----+-----				Adj R-squared = 0.0231		
Total	23.877551	146	.16354487	Root MSE = .39971		

sangram	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
-----+-----						
TGFbeta509~o	-.1483586	.0703011	-2.11	0.037	-.2873059	-.0094112
_cons	.4008838	.0989123	4.05	0.000	.2053878	.5963799

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO:

A lacuna de informação sobre quais os fatores ambientais e genéticos que determinam as diferentes respostas individuais à infecção pela *Leishmania*, em indivíduos que habitam uma mesma zona endêmica, cidade, bairro, ou até a mesma casa e apresentam variação nos seus sintomas e na resposta terapêutica ressalta a importância em identificar estes fatores e o seu papel na fisiopatologia da LV. Baseado nas características clínicas dos pacientes decidiu-se pela pesquisa de genes previamente relacionados com a doença (genes candidatos), optando pela escolha de polimorfismos cuja importância funcional já tivesse sido descrita na literatura. Dados já publicados mostram que, de fato, há componentes genéticos do hospedeiro influenciando no desfecho da doença e algumas citocinas foram identificadas como componentes importantes da resistência ou suscetibilidade à doença (Jamieson *et al.*, 2007; Jeronimo, Holst *et al.*, 2007; Pitta *et al.*, 2009).

A população estudada neste projeto foi composta de indivíduos não relacionados, de duas áreas endêmicas vizinhas, porém diferentes. A análise separada das amostras apresentou a mesma distribuição alélica para todos os genes estudados, assim, optou-se por agrupar as amostras das duas regiões para a análise final.

Os dados analisados mostraram que a frequência do alelo T no polimorfismo *TGFB1* -509 C/T foi mais elevada em pacientes com LV e em indivíduos DTH+ do que nos controles. No entanto, em nosso estudo não houve

associação entre o alelo T e os níveis séricos de TGF- β 1. Saha et al, estudando as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Kalazar e pós-Kalazar, de duas áreas endêmicas na Índia, apresentaram aumento da produção de TGF- β 1 em resposta a antígenos específicos em pacientes com a forma ativa da doença (Saha *et al.*, 2007). Além disso, Caldas et al (2005) estudando indivíduos infectados pelo *Leishmania* em São Luiz, Maranhão, Brasil, mostrou que altos níveis plasmáticos de TGF- β 1 estão associados com a forma ativa da LV (Caldas *et al.*, 2005). É possível que o impacto do polimorfismo no controle da transcrição *TGFB1* e, como consequência, no nível plasmático de TGF- β 1 seja mais sutil e não pôde ser evidenciado em nosso estudo. Os níveis mais elevados de TGF- β 1 em pacientes LV é o resultado final de muitos eventos diferentes que ocorrem dentro do organismo infectado que poderia mascarar o efeito da variação do gene. Uma possível explicação para a associação observada seria o notável uso deste aumento de TGF- β 1, localmente produzido em macrófagos infectados, como um mecanismo de escape mais eficiente pelo parasita (Rodrigues *et al.*, 1998; Omer *et al.*, 2000). A razão pela qual a frequência do alelo T também está aumentada em indivíduos assintomáticos, não pode ser presentemente explicada, mas talvez, neste grupo de indivíduos, o efeito causado por esta variante alélica do gene de *TGFB1* esteja sendo compensado por outros fatores, bloqueando com sucesso a progressão da doença para a forma ativa. Na análise de regressão para avaliação do impacto do polimorfismo nos diversos sintomas e eventos clinicamente relevantes, foi evidenciada uma associação negativa do alelo T

com a presença de hemorragia. A razão de chances calculada foi de 0,86, um valor pequeno, porém significativo ($p=0,37$). Uma relação causal entre a ocorrência de sangramento e um aumento de transcrição do gene *TGFB1* devido à presença do alelo T (-509) não é evidente. Estudo recente (tese de Doutorado- (Costa, 2009)) sugere que estes pacientes desenvolvem um quadro de endotelite disseminada, desencadeada pela resposta inflamatória sistêmica, mediada por citocinas, levando à exposição do fator tecidual e ao desencadeamento da cascata de coagulação, resultando, entre outras consequências, em plaquetopenia e discrasia sanguínea.

No entanto, $TGF\beta$ -1 não é um iniciador do processo inflamatório, mas é secretado em resposta aos estímulos inflamatórios sistêmicos desencadeados pela intensa parasitemia, exercendo ação moduladora sobre os diversos sintomas clínicos decorrentes da intensa inflamação. Assim, a contribuição desta citocina na proteção contra a ocorrência de sangramentos e agravamento do quadro dos pacientes pode se dar simplesmente pelo seu impacto modulador na atividade inflamatória na circulação ou mesmo em nível tecidual, no fígado.

A mudança no códon 10 do *TGFB1* 869 T/C, resulta em um aumento dos níveis séricos de $TGF\beta$ 1 *in vitro* (Dunning *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Porém, em nossa população estudada não houve correlação entre níveis de $TGF\beta$ 1 e os carreadores do alelo C.

Apesar de nossos resultados não terem revelado qualquer associação entre o polimorfismo *IL6* -174 G/C e LV, não descartamos que possa haver

variações em outros polimorfismos funcionais que existem no gene *IL6*, tais como as variantes nas posições -572 G/C, -597 G/A, -373AnTn (Terry *et al.*, 2000; Christiansen *et al.*, 2004), e que venham a ter algum impacto na doença. A frequência muito baixa (3%) do genótipo GG na população estudada está em concordância com estudos genéticos realizados no Brasil e outros países latino-americanos, que confirmam que o polimorfismo é bastante raro (Hoffmann *et al.*, 2002; Castellucci *et al.*, 2006; Gatti *et al.*, 2007; Visentainer *et al.*, 2008). A frequência do alelo C não alcançou os 15%, ocasionando uma significativa queda do poder estatístico com o número de pacientes que tínhamos à disposição para estudar. Aumentar o número de pacientes analisados para se aumentar o poder estatístico poderia uma boa estratégia, porém no caso de um polimorfismo raro como o *IL6* -174G/C, para se alcançar um poder ideal de 80%, nós teríamos que analisar 898 pacientes com LV.

Há ainda muitas controvérsias sobre o impacto do polimorfismo -174 G/C na transcrição do gene *IL6* e os níveis de IL-6 no plasma. Enquanto alguns autores encontraram que a presença do alelo C ou o genótipo CC, em pacientes com inflamação crônica, está associada com níveis mais altos de IL-6 (Rivera-Chavez *et al.*, 2003; Christiansen *et al.*, 2004), outros sugerem que o alelo C está associado com baixos níveis de IL-6 plasmático (Fishman *et al.*, 1998). No nosso estudo, a análise de regressão logística univariada evidenciou relação entre níveis alterados (altos) de IL-6 no plasma e pacientes carreadores positivos para o alelo C do polimorfismo *IL6* -174. No entanto, acreditamos que a avaliação deste achado terá de aguardar informações mais precisas do

impacto do polimorfismo nas múltiplas funções desta citocina, participante ativa da patogênese das leishmanioses. A mesma variante C foi associada com a susceptibilidade à leishmaniose mucosa e com um risco aumentado para o desenvolvimento da forma cutânea da doença em uma amostra da população brasileira (Castellucci et al., 2006). Ensaio funcionais para analisar o aumento dos níveis de IL-6 no plasma de indivíduos com a doença ativa, além de estender a análise para outros polimorfismos funcionais do gene *IL6* seriam importantes para estabelecer se de fato estes têm um papel na suscetibilidade à LV, de forma similar ao que ocorre na leishmaniose cutânea mucosa.

O polimorfismo no *IL8* -251 T/A, localizado na região promotora, está associado a altos níveis plasmáticos desta citocina [21]. Neste estudo, nenhuma relação entre os níveis de IL-8 e o polimorfismo foi observada. De fato, a grande maioria dos pacientes LV tinha níveis alterados de IL-8 plasmático e cerca de 20% apresentaram níveis plasmáticos de IL-8 acima 200 pg/mL, independentemente do genótipo. Nossos dados estão de acordo com outros estudos. Um destes mostrou níveis plasmáticos de IL-8 aumentados em pacientes com LV em uma região endêmica de Belo Horizonte, Brasil (Peruhype-Magalhães et al., 2006). Os dados são também concordantes com um estudo em Bangladesh (Bern, Amann et al., 2006) em pacientes com Kala-azar clínica e subclínica, que também mostrou aumento dos níveis plasmáticos de IL-8. A regressão logística univariada mostrou haver uma relação entre níveis de IL-8 e baixa contagem de plaquetas ($p < 0,03$), mas novamente, sem nenhuma relação com o genótipo. Embora tenhamos analisado apenas um

polimorfismo funcional, nossos resultados confirmam a importância da IL-8 na severidade da doença, mas indicam que um papel para este e para vários outros polimorfismos do gene *IL8*, todos em forte desequilíbrio de ligação, (Hull *et al.*, 2004) não é provável.

Nossos resultados sugerem que o polimorfismo em *TGFB1* -509 C/T pode contribuir para susceptibilidade e severidade de LV. É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho que sugere um possível papel do polimorfismo - 509 C/T do *TGFB1* na susceptibilidade a LV. Porém, este estudo foi feito apenas com um polimorfismo e não com diversos SNPs distribuídos em torno ou dentro do gene específico, que é a maneira mais adequada para se efetuar um estudo de associação entre polimorfismos e susceptibilidade genética. O aumento de variantes analisadas só é possível com um número maior de amostras. O número mínimo em cada grupo costuma ser entre 300 e 500 amostras. Por este motivo, os resultados deste trabalho não podem ser considerados definitivos.

Finalmente, um dos objetivos desta tese foi efetuar uma varredura na expressão gênica de citocinas, quimiocinas e na via de transdução de sinal mais envolvida na resposta inflamatória, a via do NF- κ B, para buscar novos genes para estudos de suscetibilidade à doença. Esta parte do trabalho encontra-se ainda em andamento e os resultados preliminares podem ser vistos no Anexo B.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A partir da varredura da superfamília de quimiocinas e seus receptores (e das outras membranas caso haja RNA suficiente), incluindo moléculas-chaves na inflamação, ativação celular e na apoptose, onde serão analisados aproximadamente 112 genes, realizaremos a análise de polimorfismos genéticos funcionais em 20 genes candidatos que serão escolhidos a partir dos resultados obtidos na análise destes *microarrays*, que tenham apresentado diferença de expressão significativa na comparação entre as duas formas da doença, ou antes e após o tratamento. Deverão também ter polimorfismos com impacto funcional documentado.

Os resultados dos genes identificados como marcadores na genotipagem e nos *microarrays*, poderão vir a ser validados por expressão gênica através de PCR em tempo real, em todos os pacientes nos quais for possível obter amostra de RNA.

ANEXOS

ANEXO A - DOCUMENTOS DE APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA.

Documentos de aprovação dos comitês de ética em Pesquisa do Incor e das Instituições envolvidas no projeto (Piauí e Maranhão), aprovação da CAPESQ, CONEP, Folha de Rosto do Sisnep.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/02/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0929/08**, intitulado: **"ANÁLISE DE GENES POLIMÓRFICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A INDUÇÃO PELO TNF E IMPLANTAÇÃO DO BANCO DE IMUNOGENÔMICA DO INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO EM IMUNOLOGIA"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Anna Carla Goldberg**

Pesquisador (a) Executante: **Amanda Farage Frade**

CAPPesq, 17 de Fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
 Presidente da Comissão de
 Ética para Análise de Projetos
 de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo A.1. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas -FMUSP

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 69/2005

Protocolo: 172

Projeto de Pesquisa: Aspectos do Vetor, do Hospedeiro e da Relação Vetor-Parasita-Hospedeiro na Progressão Infecção para Doença na Leishmaniose Visceral Humana

Pesquisador Responsável: Dra. Aldina Barral

Instituição ou Departamento: LIP/FIOCRUZ

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 01 de julho de 2005

Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Coordenadora
CEP – CPqGM/FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer N°. 109/2005

Pesquisador (a) Responsável: **Aldina Maria Prado Barral**

Equipe executora: **Aldina Maria Prado Barral**

Tipo de Pesquisa: **Projeto de Pesquisa**

Registro do CEP: 151/05 Processo N°. 33104-972/2005

Instituição: **Município da Raposa-Secretaria Municipal da Raposa**

Grupo: **III**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão analisou na sessão do dia 17.05.05 o processo N°. 33104-972/2005, referente ao projeto de pesquisa: “Aspectos do vetor, do hospedeiro e da relação vetor-parasita-hospedeiro na progressão infecção para doença na leishmaniose visceral humana”, tendo como pesquisadora responsável a Profª. **Aldina Maria Prado Barral**, cujo objetivo é “Avaliar se aspectos relacionados com a exposição humana aos flebótomos, variabilidade genética de moléculas chave e a resposta imune da população humana interferem na progressão infecção para doença na leishmaniose visceral humana”. Na reunião ordinária do dia 17.05.05 classificado aprovado.

Assim, mediante a importância social e científica, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer **FAVORÁVEL** à realização do projeto, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Solicita-se ao pesquisador o envio a este CEP, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final gravado em CD-ROM.

São Luís, 17 de maio de 2005.

Nair Portela Silva Coutinho
Nair Portela Silva Coutinho

Vice-Coordenadora do CEP-HUUFMA

Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Universitário da UFMA
aprovado em reunião de:

17.05.05.

Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Rua Barão de Itapary, 227 Centro C.E.P. 65. 020-070 São Luís – Maranhão Tel: (98) 3219-1223
E-mail huufma@huufma.br

ADM-14

Anexo A.3. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP 64049-550
Telefones: (86) 3215-5734 Fax (86) 3215-5560

Teresina, 14 de Dezembro de 2005

À
Profª. Ms. DORCAS LAMOUNIER COSTA
Depto. de Medicina Comunitária - CCS

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Universidade Federal do Piauí analisou, de acordo com os requisitos da Resolução CNS 196/96, que trata das "diretrizes e normas envolvendo seres humanos", o protocolo de pesquisa encaminhado por V.sa., intitulado "INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DE LEISHMANIA CHAGASI SOBRE A PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL" o qual teve parecer "aprovado" sob o número 0116/2005. Ressaltamos que o parecer consubstanciado emitido na reunião encontra-se arquivado para eventuais consultas.

Atenciosamente,

Profa. Dra. REGINA FERRAZ MENDES
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo A.4. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do PIAUÍ.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOJENDO SERES HUMANOS
 (versão outubro/99) Para preencher o documento, use as indicações da página 2.

1. Projeto de Pesquisa: "Influência do genótipo de Leishmania chagasi sobre a patogenia da leishmaniose visceral."			
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) Medicina		3. Código: 4.01	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4) E
5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso) Todos os outros que não se enquadram em áreas temáticas especiais		6. Código(s): Grupo III	7. Fase: (Só área temática 3) I (x) II () III () IV ()
8. Unitermos: (3 opções)			
SUJEITOS DA PESQUISA			
9. Número de sujeitos No Centro: 96 Total: 96	10. Grupos Especiais: <18 anos (x) Portador de Deficiência Mental () Embrião/Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros () Não se aplica ()		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
11. Nome: Dorcas Lamounier Costa			
12. Identidade: 332.460 SSP-DF	13. CPF: 185.547.501-44	19. Endereço (Rua, n°): R. Gov. Artur de Vasconcelos 181-Centro Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella	
14. Nacionalidade: Brasileira	15. Profissão: Médica	20. CEP: 64.001-450	21. Cidade: Teresina
16. Maior Titulação: Mestrado	17. Cargo: Professor Assistente Nível 2	23. Fone: (86) 221.3413; 94821587	24. Fax: (86) 221.2424
18. Instituição a que pertence: Universidade Federal do Piauí		25. E-mail: dorcasslamou@uol.com	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: 20/março/2005			
Assinatura			
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO			
26. Nome: Universidade Federal do Piauí		29. Endereço: (Rua, n°): R. Gov. Artur de Vasconcelos 181-Centro Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella	
27. Unidade/Órgão: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella	30. CEP: 64.001-450	31. Cidade: Teresina	32. U.F.: Piauí
28. Participação Estrangeira: Sim () Não (x)	33. Fone: (86) 221.3413	34. Fax: (86) 221.2424	
35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (x) Nacional (x) Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução Nome: Dorcas Lamounier Costa Data: 08/09/05 Cargo: Médica Pesquisadora Assinatura: <i>[Assinatura]</i>			
Assinatura			
PATROCINADOR Não se aplica ()			
36. Nome: Universidade Federal de Minas Gerais		39. Endereço: Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 7009	
37. Responsável: profa. Regina Lunardi Rocha	40. CEP: 30.130-100	41. Cidade: Belo Horizonte	42. UF: MG
38. Cargo/Função: Professora orientadora	43. Fone: (31) 3248.9641	44. Fax: (31) 3248.9640	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP			
45. Data de Entrada: 8/9/05	46. Registro no CEP: 8/9/05	47. Conclusão: Aprovado (x) Data: 12/9/05	48. Não Aprovado () Data: / /
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: Data: / / Data: / /			
Encaminhado a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação () 52. Data: / /		53. Coordenador/Nome Assinatura: _____ Anexar o parecer consubstanciado	
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP			
54. Nº Expediente:	56. Data Recebimento:	57. Registro na CONEP:	
55. Processo:			
58. Observações:			

Anexo A.5. Folha de Rosto do SISNEP.

ANEXO B: ETAPA 2

1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL?

Na segunda etapa do projeto - em andamento - faremos uma varredura na família das citocinas, da via das quimiocinas e seus receptores, e de genes da via do NF- κ B, para uma análise mais abrangente da resposta imune a LV, na tentativa de identificar genes relevantes na imunidade a LV.

Para realizar a análise de expressão gênica de uma forma que reflita a condição imunológica real no momento da infecção dos pacientes, optou-se por amostras de sangue periférico, e não de aspirado de medula óssea, já que este tipo de amostra não reflete as respostas imunológicas de um modo geral, e sim a nível muito localizado, podendo levar a um viés de interpretação dos resultados. Além disso, há maior concentração de parasitas nas células da medula óssea criando um viés adicional gerado pelos mecanismos de escape induzidos nas células infectadas.

A informação obtida será relacionada comparando-se a expressão gênica entre os fenótipos extremos da doença, ou seja, pacientes com a forma benigna e pacientes com a forma mais grave da doença, geralmente pacientes que apresentam sangramento.

Para a análise de expressão gênica, utilizamos o sistema de *microarray SuperArray-SaBiosciences* (Frederick, MD, USA), que utiliza membranas de

nylon contendo as seqüências de genes alvos. Utilizaremos membranas que contém grupos específicos de genes alvos (ver anexo 4).

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

Até o momento, foram realizadas as padronizações da extração de RNA, pelos métodos em coluna, onde foram testadas colunas de duas empresas diferentes (SABiosciences e Qiagen) e pelo método de Trizol (Invitrogen).

Inicialmente, durante a etapa realizada no laboratório de Investigação Médica em Imunologia, da FioCruz de Salvador, onde estavam armazenadas as amostras dos pacientes com LV, tentou-se extrair RNA de amostras de *pellet* de sangue total, congeladas em nitrogênio líquido, com solução conservadora de congelamento de células contendo 10% de DMSO e 90% de Soro Fetal Bovino.

Testou-se diversas formas de extração, sempre comparando as amostras congeladas com amostras frescas: antes vs depois do congelamento, extração com Trizol vs extração com coluna, extração com tratamento com DNase vs sem tratamento com DNase, além de precipitação das amostras de RNA com EDTA para aumentar a concentração final do RNA. Quando as amostras foram extraídas pelas colunas de extração, obteve-se uma grande banda de contaminação de DNA genômico. Assim, para eliminar essa contaminação, foi padronizado o uso de DNase com e sem posterior tratamento com EDTA (Fig. 5).

Fig. 5: Padronização da extração de RNA das amostras obtidas na FioCruz, Salvador/BA. Amostras - 01: Extraída por Trizol, sem congelamento – 536 ng/uL, 02: Passagem amostra 1 pela coluna SABiosciences após extração por Trizol – 30ng/uL, 03: Amostra congelada com DMSO, extraída com Trizol – 75 ng/uL, 04: Amostra congelada com DMSO, extraída na coluna Sabiosciences – 53,34 ng/uL, 05: Amostra congelada com DMSO, extraída na coluna Qiagen – 249 ng/uL, 06: Amostra congelada com DMSO, extraída na coluna SABiosciences após tratamento com DNase e EDTA – 50ng/uL, 07: Amostra congelada com DMSO, extraída na coluna Qiagen após tratamento com DNase e EDTA – 109ng/uL.

Porém, parte das amostras de RNA que foram adquiridas estavam muito degradadas, e quando se fez a transcrição para cRNA , após a passagem pela coluna de limpeza (onde se retira todos os RNAs degradados e microRNAs), a concentração obtida era insuficiente para se realizar a hibridização das membranas. Optou-se por utilizar amostras de *pellet* de sangue total, congeladas com 1 mL de Trizol, provenientes do Laboratório de Pesquisa, e novas padronizações foram realizadas.

Após modificações do protocolo do fabricante, foram feitas novas modificações no método de extração. Finalmente, foi obtido o melhor resultado na revelação das membranas utilizando-se a extração por Trizol.

Revelamos três membranas de controles.

2.1. Casuística:

O protocolo inicial foi modificado e optamos por efetuar a análise de expressão gênica por *microarray* em amostras de sangue periférico congeladas com Trizol de 5 pacientes com a forma benigna da LV e 5 pacientes com as formas mais graves da doença. Utilizaremos as amostras antes e 3 meses após término do tratamento quimioterápico.

O diagnóstico dos pacientes com LV foi realizado com base em exames clínicos, parasitológicos e sorológicos.

2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA :

As amostras utilizadas provenientes do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, Universidade Federal do Piauí, foram enviadas em gelo seco ao Laboratório de Imunologia do InCor-SP.

Para a extração de RNA partimos de amostras de sangue congeladas com Trizol, contendo cerca de 5×10^6 células e a extração foi realizada seguindo o protocolo de extração de RNA com Trizol - Invitrogen®, conforme a padronização feita anteriormente.

Avaliação da qualidade e quantidade de RNA

A concentração do RNA total e a possível contaminação por proteína, nas amostras, foram estimadas pela absorbância em 240 nm e relação de absorbância 240/260 com o uso de espectrofotometro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA). A integridade dessas amostras foi verificada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, quando a concentração de RNA total era superior a 350 ng/μL. Nas amostras de RNA com concentração abaixo de 350 ng/μL, a avaliação foi feita por microeletroforese capilar em chip (RNA Pico Chips e RNA Nano Chips, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) utilizando-se Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), gentilmente cedido pelo Prof. **Dr. Chin Lia** (Departamento de Patologia- FMUSP - Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental). Este sistema, muito eficaz em caso de amostras de RNA com baixas concentrações (que era o caso de muitas amostras enviadas para o laboratório do Incor) (Fig. 6), foi capaz de avaliar a integridade das amostras com concentrações abaixo de 30 ng/μL, pois utiliza um procedimento computacional para determinar a integridade de RNA total, expresso em valor de RIN (RNA Integrity Number). Foram aproveitadas as amostras com integridade RIN maior que 5.(Schroeder *et al.*, 2006).

Fig. 6. Análise de amostras de RNA pelo sistema Bioanalyzer.

1.3. Detecção dos genes diferencialmente expressos pelo sistema *Oligo GEArray® HyTube System, SuperArray (SABiosciences)*.

Para a análise de expressão gênica, utilizamos o sistema de *microarray* da empresa SuperArray (www.superarray.com), que utiliza membranas de nylon contendo as seqüências (oligonucleotídeos) de genes alvos (Fig. 7).

A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o kit True Labelling AMP 2.0, utilizando oligo-dT, contendo uma seqüência para T7 RNA polimerase na extremidade 5'.

Foi feita a síntese da segunda fita de cDNA. Este cDNA serve de molde para reação com a T7 RNA polimerase, que produz cópias de RNA

complementar (cRNA), utilizando nucleotídeos marcados com biotina (dUTP-biotina). Por este método, produz-se uma amplificação linear de aproximadamente 400 vezes a quantidade de RNA mensageiro inicial.

Deve-se obter uma recuperação mínima de 2,5 µg de cRNA. Posteriormente, deverá ser feita a etapa de purificação deste cRNA, com o kit cRNA “CleanUp” (GA-012) para a retirada de eventuais contaminantes da reação.

O cRNA foi novamente dosado, e cerca de 4 µg de cRNA de cada amostra foi hibridizado nas membranas de nylon com tampões otimizados do próprio kit (Oligo GEMatrix Hybridization). Após a hibridação durante uma noite, as membranas foram lavadas para remoção das seqüências-alvo não hibridizadas. Depois da lavagem, as membranas foram tratadas com 2 ml de solução de bloqueio (GEMatrix Blocking Solution Oligo GEMatrix System, Superarray Inc., Frederick, MD, USA) por 40 min. Em seguida, cada membrana foi incubada com estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina na proporção de 1:8000, por 10 minutos, sob rotação contínua a 25 rpm. A estreptavidina apresenta alta afinidade natural pela biotina ligando-se, portanto, ao UTP biotinilado incorporado no cRNA. Por fim, a membrana foi incubada por 5 minutos com um substrato da fosfatase alcalina quimioluminescente que, ao ser degradado, produz luminescência, cujo sinal pode ser lido por radioautografia (Raio-X) ou sistema de foto-documentação, que possa relevar as imagens, como câmeras do tipo CCD – “*Charged Coupled Device*” (a câmara CCD tem um sinal de saída linear sobre uma faixa de intensidade muito maior do que a

câmara de tubo, com menor distorção geométrica, e sua eficiência quântica pode chegar a 80%). Optou-se por detectar a luminescência por câmera CCD-star, gentilmente emprestada pela Dra. Estela Bevilacqua (ICB-USP - Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento).

As imagens geradas na câmera CCD-Star apresentaram melhores resultados quando comparados com as imagens geradas por radioautografia, apesar da imagem ser adquirida em um tempo bem maior (18 minutos, no caso da radioautografia, a imagem fica exposta no máximo por 3 minutos), apresenta melhores resultados, devido sua maior sensibilidade e precisão para a detecção de imagens geradas por quimioluminescência.

Para a detecção dos alvos hibridizados nas membranas de nylon biotiniladas, usou-se o Kit *Chemiluminescent Detection* (D-01).

Todas as reações foram realizadas seguindo as orientações do fabricante.

Fig. 7: Esquema da técnica de microarray, extração de RNA, transcrição de cDNA, transformação em cRNA, hibridização da membranas.

Membrana “*Human Chemokines and receptors*” (OHS-0220):

A membrana utilizada nesta primeira fase de padronização contém 112 genes (ver lista - anexo 3) que codificam quimiocinas e seus receptores e genes relacionados.

Aproximadamente 5% dos genes correspondem a seqüências de genes “housekeeping” (controle interno), que servem como controles internos da reação e como elementos de comparação entre membranas diferentes.

1.4 Análise dos resultados da hibridização com a membrana

O sinal quimioluminescente gerado é capturado pela câmera CCD e a imagem armazenada em formato TIFF ou JPEG (Fig.8). Os dados gerados são analisados pelo software GEArray Expression Analysis Suite, onde a intensidade de um *spot* é determinada pela média dos “pixels” daquele subtraído de 2 vezes o valor da mediana do “background”.

Todas as membranas contêm um oligonucleotídeo biotinilado com uma sequência artificial que serve como o controle da reação. As membranas também contêm um local específico de genes “*housekeeping*”, os quais usualmente devem ter um nível basal de expressão determinado pelo fabricante.

Os dados gerados pelo software são convertidos em planilhas do Excel.

Fig. 8: Esquema das seqüências de genes de controle interno das membranas.

Conseguimos padronizar três membranas de amostras de controles, com três concentrações diferentes de cRNA para hibridizar a membrana. Obteve-se ótima revelação nas três concentrações utilizadas (Fig. 9 e 10).

Fig.9: Foto direta das membranas de microarrays geradas pela câmera CCD./ M1: reação com 8µg de cRNA; M2: reação com 5µg de cRNA; M3: reação com 2,5µg de cRNA.

Fig.10 : Foto invertida das membranas de microarrays geradas pela câmera CCD./ M1: reação com 8µg de cRNA; M2: reação com 5µg de cRNA; M3: reação com 2,5µg de cRNA.

ANEXO C: Tabela com dados clínicos dos Pacientes LV: (Costa, 2009)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1242	F	PI	25/08/1964	Leucemia aguda	1	0	0	0	1	0	0	36	0		0
1243	0	MA	07/10/2001	LV	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1244	0	PI	12/12/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	16	13	0	0
1245	0	MA	17/06/2004	LV + sangramento	1	0	0	0	1	0	0	190	125	0	0
1249	0	MA	07/12/1968	LV	0	0	0	0	1	0	0	87	65	0	0
1250	0	MA	27/08/1970	LV	0	0	0	0	1	0	0	87	54	0	0
1251	0	MA	28/12/1977	LV	0	0	0	0	1	0	0	87	65	0	0
1255	F	MA	31/10/1986	LV + pancreatite glucantime. Óbito	1	0	0	0	1	0	0	87	56	0	0
1256	0	MA	01/12/1973	LV	0	0	0	0	1	0	0	80	56	0	0
1259	F	PI	15/08/1995	LV + sangramento	0	0	0	0	1	0	1	83	59	0	0
1260	0	PI	18/08/1977	LV + Aids	0	0	0	0	1	0	0	80	40	0	0
1261	F	MA	25/12/2005	LV + infecção	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1263	0	PI	20/07/1986	LV + sangramento	0	0	1	0	1	0	0	190 0	125 0	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1264	F	MA	02/07/2002	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	48	40	0	0
1265	F	MA	22/01/2004	LV	0	0	0	0	1	0	0	40	28	0	0
1268	F	PI	06/07/1980	LV + sangramento + infecção. Óbito	1	0	1	0	1	0	0	40	36	0	0
1269	F	MA	12/07/2005	LV + sangramento + infecção. Óbito	0	0	1	1	1	1	1	260	210	0	0
1271	F	PI	12/04/1967	LV + sangramento	0	0	0	0	1	0	0	190	74	0	0
1272	F	PI	14/02/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	190	150	0	0
1273	0	PI	02/02/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	24	17	0	0
1274	F	PI	20/10/2002	LV	1	0	0	0	1	0	0			0	0
1275	F	PI	03/08/2002	LV + sangramento	1	0	0	0	1	0	1	87	65	0	0
1277	F	MA	15/01/2006	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	120	80	1	0
1279	0	PI	08/08/2005	LV	0	0	0	0	1	0	0	87	54	0	0
1282	F	MA	31/12/2004	LV	1	0	0	0	1	0	0	120	74	0	0
1283	0	PI	07/05/2004	LV	1	0	0	0	1	0	0	140	80	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	sepse	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1285	0	MA	11/07/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	140	80	0	0
1286	0	PI	04/04/1977	LV + sangramento + Aids	0	0	0	0	0	0	0	87	56	0	0
1287	F	MA	25/03/2002	LV	0	0	0	0	1	0	0	40	32	0	0
1288	0	MA	19/08/1997	LV reativada	1	0	0	1	1	0	0	69	58	0	0
1289	F	PI	27/11/2000	LV reativada	1	0	0	0	1	0	0	22	15	0	0
1290	0	MA	23/01/1987	LV + infecção	1	0	1	0	1	0	0	190	93	0	0
1291	0	PI	07/08/2004	LV	1	0	0	0	1	0	0	26	19	0	0
1292	F	PI	08/04/2002	LV	1	0	0	0	1	0	0	59	38	0	0
1298	F	MA	27/01/2003	LV	1	0	0	0	1	0	0	190	56	0	0
1299	F	MA	10/02/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	57	44	0	0
1300	F	MA	02/12/2005	LV	0	0	0	0	1	0	0			0	0
1303	F	PI	05/05/2005	LV + sangramento + infecção	1	1	0	1	1	0	1	26	19	0	0
1305	0	PI	07/08/2005	LV	1	0	0	1	1	0	0	27	35	0	0
1307	0	MA	29/06/1998	LV	0	0	0	0	1	0	0	26	19	0	0
1308	0	MA	04/10/1994	LV	0	0	1	0	1	0	0	610	202	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1310	0	PI	12/08/2004	LV	0	0	0	0	1	0	0	80	54	0	0
1311	0	MA	10/07/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	40	32	0	0
1312	0	PI	15/07/2003	LV	1	1	0	0	1	0	0	190	93	0	0
1317	F	PI	30/01/2006	LV	1	0	1	0	1	0	0	140	80	0	0
1319	F	MA	08/09/2002	LV	0	0	0	0	1	0	0			0	0
1320	0	MA	12/08/1963	LV	0	0	0	0	1	0	0	190	110	0	0
1321	F	PI	31/12/1999	LV	0	0	0	0	1	0	0	35	23	0	0
1323	F	PI	06/12/2005	LV + infecção	0	0	0	0	1	0	0	96	65	0	0
1324	0	PI	29/04/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	190	98	0	0
1325	F	MA	30/08/2003	LV	1	0	0	0	1	0	0	190	110	0	0
1326	F	MA	17/10/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	120	80	0	0
1328	F	MA	23/06/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	120	80	0	0
1330	0	MA	08/07/2005	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	28	19	0	0
1335	F	MA	27/03/2004	LV + infecção	1	1	0	1	0	0	0	40	40	0	0
1336	0	MA	12/03/2005	LV	0	0	0	0		0	0	57	40	0	0
1338	F	MA	12/04/2006	LV	1	0	0	0	1	0	0	190	93	0	0
1344	0	PI	16/11/2005	LV + sangramentos . Óbito	1	0	0	0	1	0	0	26	17	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstico o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1345	0	PI	01/09/1991	LV	0	0	0	0	0			40	36		0
1347	0	PI	22/03/1997	LV	0	0	0	0	1	0	0	82	39	0	0
1349	0	MA	21/12/1962	LV + sangramento + Aids	0	0	0	0	1	0	0	16	13	0	0
1350	0	PI	20/08/1986	LV	1	0	0	0	1	0	0	32	26	0	0
1351	0	PI	15/06/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	40	20	0	0
1355	0	PI	16/05/2001	LV	1	0	0	0	1	0	0	55	40	0	0
1356	0	PI	08/04/1986	LV + sangramento	0	0	0	0	1	0	0	72	52	0	0
1359	0	MA	12/09/1980	LV	1	0	0		1	0	0	40	38	0	0
1361	0	MA	02/01/2004	LV	0	0	0	0	1	0	0	55	32	0	0
1363	0	MA	06/01/1999	LV	1	0	0	0	1	0	0	39	21	0	
1364	0	PI	03/05/1996	LV	1	0	0	0	1	0	0	190	98	0	0
1365	0	MA	25/11/2004	LV + sangramento + infecção	1	1	1	1	1	0	1	190	80	0	0
1366	0	PI	10/03/1959	LV	0	0	0	0	1	0	0	65	43	0	0
1367	F	PI	03/12/2004	LV + sangramento	1	0	0	0	1	0	0	59	40	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	sepse	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1368	F	PI	27/07/1992	LV	1	0	1	0	1	0	0	190	98	0	0
1370	F	PI	09/07/2005	LV + sangramento	1	0	0	0	1	0	0	120	150	0	0
1382	0	PI	21/06/1989	LV + sangramento + infecção. Óbito	1	1	0	1	1	1	1	550	360	0	0
1389	0		09/12/2001	LV	1	0	0	0	1	0	0	43	40	0	0
1400	0	MA	30/12/2005	LV + sangramento + infecção. Óbito	1	1	0	1	1	1	1			0	0
1401	0	PI	14/12/2004	LV	1	0	0	0	1	0	0	20	17	0	0
1412	0	PI	26/03/1983	LV + sangramento + Aids	0	0	0	0	1	0	0	55	38	0	0
1414	0	MA	20/04/2005	LV	0	0	0	0	1	0	0	26	13	0	0
1416	F	PI	02/07/1968	LV + Aids	0	0	0	0	0	0	0	28	22	0	0
1417	0	PI	24/03/2003	LV	1	0	0	0	1	0	0	80	56	0	1
1420	0	MA	27/10/1967	LV	1	0	0	0	1	0	0	16	10	0	0
1421	F	MA	04/06/1979	LV	1	0	0	0	1	0	0	187	83	0	0
1424	F	PI	03/01/2006	LV	1	0	0	0	1	0	0	55	40	0	0
1426	0	PI	10/08/1981	LV	0	0	0	0	1	0	0			0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstico o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1429	0	PI	25/02/1957	LV	1	0	0	0	1	0	0	40	32	0	0
1430	0	MA	15/09/1968	LV + Aids	0	0	0	0	1	0	0			0	0
1431	0	PI	24/04/1989	LV	1	1	0	0	1	0	0	18	13	0	0
1432	0	PI	07/10/2005	LV + infecção	0	0	0	0	1	0	0			0	0
1439	0	MA	02/08/1998	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	240	130	0	0
1441	F	PI	07/12/1991	LV + sangramento	0	1	0	0	1	0	0	57	49	0	0
1444	0	MA	02/12/2001	LV + sangramento	1	0	0	0	1	0	0	87	54	1	0
1447	0	MA	15/05/2004	LV	1	1	0	0	1	0	0			0	0
1448	0	PI	23/03/2000	LV	0	0	1	0	1	0	0	32	23	0	0
1453	0	PI	12/05/1955	LV	1	0	0	1	1	0	0	80	74	0	0
1454	0	MA	10/02/1989	LV	0	0	0	0	1	0	0	35	32	0	0
1455	F	PI	26/09/2005	LV + infecção	0	0	0	0	1			57	65		0
1458	0	PI	27/07/2005	LV + sangramento + infecção	1	1	0	0		1	1	400	260	0	0
1459	F	MA	01/10/2004	LV	1	0	0	0	1	0	0			0	0
1464	F	MA	30/04/1986	LV	1	0	0	0	1	0	0	350	230	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	sepse	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1466	F	PI	17/09/1991	LV + sangramento	0	0	1	0	1	0	1	39	32	0	0
1469	0	PI	16/02/2002	LV reativada	1	0	0	0	1	0	0			0	0
1470	F	MA	15/09/2005	LV	0	0	0	0	1	0	0	35	23	0	0
1477	0	PI	25/04/2005	LV + infecção	1	1	0	1	1	0	0	43	36	0	0
1478	0	MA	17/12/2000	LV	1	1	0	1	1	0	0	16	9	0	0
1481	0	PI	21/11/2003	LV + sangramento + infecção	0	0	0	1	1	1	0	35	26	0	0
1485	F	PI	14/03/2005	LV	0	0	0	0	1	0	0	190	93	0	0
1495	0	PI	28/07/1974	LV + sangramento + infecção + Aids. Óbito	0	0	0	1	1	1	1	39	26	1	0
1496	0	PI	30/11/2002	LV	1	0	0	0	1	0	0	44	32	0	0
1497	0	MA	12/04/2005	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0			0	0
1498	0	MA	28/08/2004	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	28	23	0	0
1503	0	MA	16/03/2002	LV	1	0	0	0	1	0	0			0	0
1504	F	MA	26/07/2005	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	28	21	0	0
1506	F	MA	16/01/2006	LV + infecção	0	0	0	0	1	0	0	120	74	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstic o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	sepse	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1507	0	PI	08/07/1994	LV	1	0	0	0	1	0	0	35	23	0	0
1508	0	MA	14/09/2002	LV + infecção	1	0	1	0	1	0	0	48	36	0	0
1517	0	PI	29/05/1976	LV	0	0	0	0	1	0	0	22	15	0	0
1518	0	PI	21/07/2000	LV	1	0	0	0	1	0	0	28	23	0	0
1520	0	PI	12/12/2004	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	26	17	0	0
1522	F	MA	19/09/1999	LV	1	1	0	0	1			28	23		0
1523	0	MA	09/05/1998	LV	1	0	0	0	1	0	0	35	23	0	0
1525	0	MA	19/08/1997	LV reativada	1	0	0	1	1	0	0	69	58	0	0
1530	0	MA	10/11/1999	LV + sangramento	1	1	0	0	1	0	0	40	36	0	0
1533	0	MA	29/07/2004	LV	1	0	0	0	1	0	0	22	17	0	0
1534	0	PI	31/10/2000	LV	1	0	0	0	1	0	0	40	27	0	0
1536	F	PI	28/12/2005	LV + infecção	1	1	0	0	1	1	0	40	29	0	0
1537	0	PI	17/10/2005	LV + sangramento + infecção	1	0	0	0	1	0	0	59	38	0	0
1539	0	MA	15/08/2005	LV	1	1	0	0	1	0	0	59	32	0	0
1543	0	PI	23/03/2003	LV	1	0	0	0	1	0	0	108	98	0	0
1546	0	PI	05/01/1968	LV	0	0	0	0	0	0	0	87	54	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstico o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1550	F	PI	18/02/2006	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	87	56	0	0
1552	F	MA	16/11/2004	LV + infecção	1	0	0	0	1	0	0	40	36	0	0
1555	0	PI	08/02/1973	LV + Aids	0	0	0	0	1	0	0	28	17	0	0
1557	F	MA	14/06/2005	LV	1	0	0	0	2	0	0			0	0
1560	F	MA	27/05/2001	LV	0	0	0	0	1	0	0	26	19	0	0
1565	0	MA	20/08/1988	LV	0	1	0		1	0	0	74	55	0	0
1572	0	PI	19/09/1991	LV	1	0	0	0	1	0	0	590	490	0	0
1585	0	PI	15/03/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	59	32	0	0
1588	0	PI	18/08/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	16	19	0	0
1590	0	PI	31/08/1980	LV	0	0	0	0	1	0	0	190	150	0	0
1591	0	MA	04/12/1956	LV + Aids	0	0	0	0	1	0	0	40	36	0	0
1594	0	MA	31/08/2005	LV	1	1	0	0	1	0	0	48	13	0	0
1595	0	MA	06/05/2005	LV	1	0	0	0	1	0	0	63	36	0	0
1596	0	MA	23/09/1978	LV	1	0	0	0	1	0	0	55	35	0	0
1597	F	PI	05/02/1972	LV + sangramento + infecção	1	1	1	0	1	1	1	190	150	0	0
1598	F	MA	20/11/1981	LV + sangramento	1	1	0	0	0	0	0	20	7	0	0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstico o médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	sepse	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1600	0	PI	26/10/1989	LV	0	0	0	0	1	0	0	40	32	0	0
1601	F	MA	22/10/2005	LV + sangramento + infecção	1	0	0	0	1	1	0			0	0
1602	F	MA	17/07/1995	LV	0	0	0	0	1	0	0	14	13	0	0
1603	F	PI	26/10/1974	LV	1	0	0	0	0	0	0	63	60	0	0
1617	0	PI	23/03/2005	LV	1	1	0	0	1	0	0	63	32	0	0
1618	0	MA	25/08/2000	LV + sangramento	1	0	1	0	1			960	740		0
1619	F	MA	21/05/1985	LV	1	1	1	0	1	0	0	26	23	0	0
1620	0	PI	12/06/1959	LV	1	0	0	0	1	0	0	26	23	0	0
1623	0	PI	10/09/1940	LTA + sepsis. Óbito	0	0	0	0	0	1					0

(continua)

(continuação)

Paciente	sexo	uf	nasc	diagnóstico médico assistente	abdome	edema	icterícia	dispneia	espleno	seps	hemorragi a	ast	alt	ira	baço
1624	F	MA	08/07/2005	LV + sangramento + infecção	1	1	0	0	1	1	0	48	49	0	0
1628	M	MA	09/11/2005	LV reativada	1	0	0	0	1	0	0	25	21	0	0
1629	F	PI	16/07/1998	LV	1	0	0	0	1	0	0	57	44	0	0

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1242	?		?			1	NF	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1243	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1244	GG	2	CT	1	CC	1	NF	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1245	GG	2	CT	1	CT	1	NF	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1249	GG	2	CC	2	CT	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1250	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1251	GG	2	CT	1	CC	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1255	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1256	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1259	?		CT	1	CC	1	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1260	?		CT	1	CT	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1261	GG	2	CT	1	TT	2	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1263	GG	2	CC	2	CC	1	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1264	GG	2	CT	1	TT	2	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1265	GG	2	CT	1	TT	2	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1268	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1269	GG	2	TT	1	CC	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1271	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1272	GG	2	CC	2		1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1273	GG	2	CT	1	TT	2	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1274	GG	2	CC	2	TT	2	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1275	GG	2	CC	2	TT	2	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1277	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1279	GG	2	CC	2	TT	2	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1282	GG	2	CT	1	CT	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1283	GG	2	CT	1		1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1285	GG	2	TT	1		1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1286	GG	2	?			1	NF	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1287	GG	2	?			1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1288	GG	2	CC	2		1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1289	GG	2	CT	1		1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1290	?		TT	1		1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1291	?		?			1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1292	GG	2	CC	2	TT	2	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1298	CC	1	CT	1	CT	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1299	?		?			1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1300	GG	2	CT	1	CT	1	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1303	GC	1	TT	1	CC	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1305	GC	1	CT	1	CT	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1307	GG	2	TT	1	CC	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1308	GG	2	CT	1	CT	1	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1310	GG	2	CT	1	CC	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1311	CC	1	CT	1	CT	1	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1312	GG	2	CT	1	CT	1	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1317	GC	1	CC	2	TT	2	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1319	GC	1	TT	1	CC	1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1320	GG	2	CC	2		1	TA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1321	GC	1	CT	1		1	TA	1	17,5	Normal	43,75	Alterado	219,491	Alterado
1323	?		TT	1		1	NF	1	17	Normal	40	Alterado	250,664	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1324	GG	2	CC	2	TT	2	TA	1	23,5	Normal	650	Alterado	368,312	Alterado
1325	GC	1	CC	2	TT	2	TA	1	23	Normal	293,75	Alterado	127,875	Alterado
1326	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	60	Alterado	192,5	Alterado	989,941	Alterado
1328	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	25,5	Alterado	128,75	Alterado	3261,385	Alterado
1330	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	41	Alterado	132,5	Alterado	50,381	Alterado
1335	GG	2	CT	1	CC	1	AA	1	65	Alterado	58,75	Alterado	231,172	Alterado
1336	GG	2	CC	2	CC	1	NF	1	27,5	Alterado	37,5	Alterado	200,882	Alterado
1338	GG	2	CC	2	TT	2	TT	2	25,5	Alterado	92,5	Alterado	80,72	Alterado
1344	GC	1	CC	2	TT	2	AA	1	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1345	GG	2	CT	1	CT	1	AA	1	54,5	Alterado	218,75	Alterado	46,043	Alterado
1347	GG	2	CT	1		1	AA	1	33	Alterado	41,25	Alterado	87,098	Alterado
1349	CC	1	CT	1	CT	1	AA	1	11,5	Normal	36,25	Alterado	96,015	Alterado
1350	GC	1	CT	1	CT	1	TT	2	13,5	Normal	138,75	Alterado	41,423	Alterado
1351	GG	2	?			1	NF	1	23	Normal	81,25	Alterado	256,446	Alterado
1355	GG	2	CT	1	CC	1	TA	1	38	Alterado	208,75	Alterado	1411,373	Alterado
1356	?		CT	1	CT	1	TA	1	15,5	Normal	118,75	Alterado	904,585	Alterado
1359	CC	1	CT	1	CT	1	AA	1	20,5	Normal	43,75	Alterado	76,035	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1361	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	19,5	Normal	33,75	Alterado	69,235	Alterado
1363	GC	1	CC	2	CT	1	AA	1	45	Alterado	57,5	Alterado	37,222	Alterado
1364	?		?			1	NF	1	32,5	Alterado	68,75	Alterado	71,208	Alterado
1365	?		TT	1	CC	1	NF	1	24,5	Normal	111,25	Alterado	422,156	Alterado
1366	GG	2	CT	1		1	NF	1	151	Alterado	343,75	Alterado	385,126	Alterado
1367	?		CT	1		1	NF	1	25,5	Alterado	32,5	Alterado	276,854	Alterado
1368	GG	2	CT	1	CT	1	AA	1	53	Alterado	231,25	Alterado	197,438	Alterado
1370	GG	2	CT	1		1	TT	2	60	Alterado	140	Alterado	561,784	Alterado
1382	GG	2	CT	1	CT	1	TT	2	97	Alterado	195	Alterado	13,75	Normal
1389	GG	2	CC	2	TT	2	TT	2	0	Nao	0	Nao	0	Nao
1400	GG	2	CT	1	TT	2	TA	1	50,5	Alterado	110	Alterado	11,95	Normal
1401	GG	2	CT	1	TT	2	TA	1	21	Normal	158,75	Alterado	44,553	Alterado
1412	GG	2	CC	2		1	AA	1	285	Alterado	210	Alterado	202,998	Alterado
1414	GC	1	CT	1	CT	1	TA	1	43	Alterado	2910	Alterado	2613,821	Alterado
1416	GG	2	CC	2	TT	2	TT	2	59	Alterado	178,75	Alterado	821,864	Alterado
1417	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	18	Normal	57,5	Alterado	55,14	Alterado
1420	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	7	Normal	17,5	Normal	76,416	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1421	GG	2	CT	1	CT	1	TT	2	95,5	Alterado	126,25	Alterado	145,641	Alterado
1423	GG	2	TT	1	CC	1	TT	2	10	Normal	25	Normal	55,411	Alterado
1424	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	20	Normal	106,25	Alterado	46,835	Alterado
1426	?		?			1	?		33	Alterado	93,75	Alterado	34,602	Alterado
1429	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	77	Alterado	167,5	Alterado	69,329	Alterado
1430	GG	2	CC	2	CT	1	TA	1	19,5	Normal	55	Alterado	35,444	Alterado
1431	?		?			1	NF	1	16	Normal	31,25	Alterado	79,856	Alterado
1432	GG	2	TT	1	CC	1	TT	2	19	Normal	68,75	Alterado	46,659	Alterado
1439	?		TT	1		1	NF	1	42	Alterado	495	Alterado	2164,118	Alterado
1441	GG	2	CT	1	CT	1	NF	1	25	Normal	72,5	Alterado	209,705	Alterado
1444	GC	1	CC	2	TT	2	AA	1	64,5	Alterado	88,75	Alterado	43,767	Alterado
1447	GG	2	TT	1	CC	1	AA	1	10	Normal	566,25	Alterado	446,355	Alterado
1448	?		CT	1		1	NF	1	17,5	Normal	101,25	Alterado	45,429	Alterado
1453	GG	2	CT	1		1	TA	1	70,5	Alterado	105	Alterado	62,078	Alterado
1454	GC	1	TT	1	CC	1	TA	1	8,5	Normal	31,25	Alterado	80,912	Alterado
1455	GG	2	CT	1	CT	1	NF	1	40	Alterado	230	Alterado	86,418	Alterado
1458	GC	1	CC	2	TT	2	TA	1	123,5	Alterado	588,75	Alterado	31,597	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1459	GG	2	CT	1	CT	1	TA	1	20,5	Normal	221,25	Alterado	687,244	Alterado
1464	GC	1	CC	2	TT	2	NF	1	22,5	Normal	60	Alterado	238,479	Alterado
1466	GC	1	CT	1	CT	1	TT	2	23	Normal	1040	Alterado	260,391	Alterado
1469	GG	2	CC	2	TT	2	TT	2	28,5	Alterado	27,5	Alterado	46,395	Alterado
1470	GG	0	?			1	NF	1	29,5	Alterado	67,5	Alterado	52,528	Alterado
1477	GG	0	CT	1	CC	1	NF	1	38	Alterado	76,25	Alterado	52,079	Alterado
1478	GC	1	CT	1	CT	1	TA	1	15,5	Normal	102,5	Alterado	905,453	Alterado
1481	GG	0	CT	1	CT	1	TT	2	88	Alterado	75	Alterado	64,295	Alterado
1485	GG	0	CC	2	TT	2	TT	2	55,5	Alterado	93,75	Alterado	59,232	Alterado
1495	GG	0	CT	1	CT	1	AA	1	16	Normal	42,5	Alterado	77,655	Alterado
1496	GG	0	CT	1		1	TT	2	269,5	Alterado	211,25	Alterado	57,499	Alterado
1497	GG	0	TT	1	CC	1	TT	2	43,5	Alterado	133,75	Alterado	29,046	Alterado
1498	GG	0	TT	1		1	NF	1	51,5	Alterado	200	Alterado	181,348	Alterado
1503	GG	0	?			1	TA	1	21	Normal	316,25	Alterado	85,642	Alterado
1504		1	CC	2		1	TA	1	23,5	Normal	72,5	Alterado	44,64	Alterado
1506	GG	0	CC	2	TT	2	TA	1	196	Alterado	317,5	Alterado	55,592	Alterado
1507	GC	1	CC	2	CT	1	TA	1	49,5	Alterado	96,25	Alterado	139,957	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1508	GG	0	CC	2	TT	2	TA	1	54,5	Alterado	100	Alterado	21,062	Normal
1517	GG	0	TT	1	CC	1	TT	2	101	Alterado	187,5	Alterado	50,559	Alterado
1518	GG	0	CT	1	CT	1	TT	2	167,5	Alterado	165	Alterado	47,364	Alterado
1520	GG	0	CC	2	CT	1	TT	2	55,5	Alterado	40	Alterado	31,597	Alterado
1522	GG	0	CT	1	CT	1	TT	2	15,5	Normal	40	Alterado	554,634	Alterado
1523	GG	0	CT	1		1	TT	2	8,5	Normal	35	Alterado	128,185	Alterado
1525	GG	0	CC	2	TT	2	TT	2	19,5	Normal	70	Alterado	78,707	Alterado
1530	GG	0	CT	1	CC	1	TA	1	38,5	Alterado	110	Alterado	218,137	Alterado
1533	GG	0	CC	2	TT	2	AA	1	1424	Alterado	1020	Alterado	82,163	Alterado
1534	GG	0	CC	2	TT	2	TT	2	28	Alterado	75	Alterado	46,307	Alterado
1536	GC	1	CT	1	CT	1	AA	1	202,5	Alterado	242,5	Alterado	36,797	Alterado
1537	GG	0	CT	1	CT	1	TT	2	23	Normal	107,5	Alterado	14,481	Normal
1539	GG	0	CT	1	CC	1	AA	1	121,5	Alterado	111,25	Alterado	57,676	Alterado
1543	GC	1	CC	2	CT	1	TA	1	39	Alterado	85	Alterado	408,458	Alterado
1546	GG	0	CT	1	CT	1	AA	1	14,5	Normal	33,75	Alterado	20,639	Normal
1550	GC	1	CT	1	CT	1	TA	1	16	Normal	102,5	Alterado	445,491	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1552	GG	0	CT	1	CT	1	TA	1	96,5	Alterado	102,5	Alterado	87,706	Alterado
1555	?		CC	2	TT	2	NF	1	14,5	Normal	96,25	Alterado	26,076	Alterado
1557	GG	0	CC	2	CC	1	TA	1	17	Normal	61,25	Alterado	10,823	Normal
1560	GC	1	CC	2	CC	1	TA	1	14,5	Normal	63,75	Alterado	12,971	Normal
1565	GC	1	CC	2		1	TA	1	7,5	Normal	77,5	Alterado	11,552	Normal
1572	GG	0	CT	1	CT	1	AA	1	16	Normal	88,75	Alterado	21,519	Normal
1585	GC	1	CT	1	CT	1	TA	1	11	Normal	26,25	Alterado	41,909	Alterado
1588	GG	0	CT	1	CT	1	TT	2	50,5	Alterado	103,75	Alterado	156,027	Alterado
1590	GG	0	CT	1	CT	1	TA	1	36,5	Alterado	101,25	Alterado	5998,845	Alterado
1591	GG	0	CT	1	CT	1	TT	2	19	Normal	58,75	Alterado	215,713	Alterado
1594	GG	0	CC	2	CT	1	TA	1	27	Alterado	103,75	Alterado	183,932	Alterado
1595	?		CT	1	CT	1	TA	1	25	Normal	62,5	Alterado	22,063	Normal
1596	GG	0	CT	1	CT	1	TA	1	22,5	Normal	47,5	Alterado	15,118	Normal
1597	GC	1	CT	1	CT	1	TA	1	98,5	Alterado	153,75	Alterado	27,202	Alterado
1598	GC	1	CT	1	CT	1	TT	2	34,5	Alterado	58,75	Alterado	12,909	Normal
1600	?		?			1	NF	1	20,5	Normal	52,5	Alterado	29,838	Alterado
1601	GC	1	CT	1	CT	1	TA	1	33,5	Alterado	102,5	Alterado	395,535	Alterado

(continua)

(continuação)

Paciente	IL6-174	IL6-174_0_1	TGFbeta-509	TGFbeta-509_0_1	TGFbeta-869	TGFbeta-869_0_1	IL8-251	IL8-251_0_1	IL 6 pg/mL	Analise IL-6	IL-8 pg/mL	Analise IL-8	TGF Beta	Analise TGF Beta
1602	GG	0	CC	2	CC	1	AA	1	10,5	Normal	27,5	Alterado	27,556	Alterado
1603	GG	0	CT	1	CT	1	AA	1	49	Alterado	105	Alterado	95,947	Alterado
1617	GG	0	TT	1	TT	2	AA	1	99	Alterado	143,75	Alterado	574,961	Alterado
1618	GG	0	CT	1	CT	1	AA	1	25,5	Alterado	1467,5	Alterado	352,976	Alterado
1619	?		CC	2		1	TT	2	36,5	Alterado	126,25	Alterado	35,008	Alterado
1620	?		?			1	NF	1	44,5	Alterado	325	Alterado	18,502	Normal
1623	GC	1	CC	2	TT	2	TA	1	27,5	Alterado	58,75	Alterado	29,838	Alterado
1624	GG	0	TT	1	CC	1	AA	1	52	Alterado	190	Alterado	20,168	Normal
1628	GG	0	TT	1	CC	1	AA	1	35	Alterado	62,5	Alterado	23,571	Normal
1629	GG	0	CT	1	CT	1	TA	1	51	Alterado	302,5	Alterado	46,057	Alterado

Códigos: cluna Sexo: F: Feminino/ 0: Masculino/ 0: Não analisado/ 1: Presença/ 2: Ausência/ AST: ALT:

UF: Naturalidade/Nasc.: Data de Nascimento

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ansari, N. A., *et al.* Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. Clin Immunol, v.119, n.3, Jun, p.339-45. 2006.

Ansari, N. A., *et al.* Circulating nitric oxide and C-reactive protein levels in Indian kala azar patients: correlation with clinical outcome. Clin Immunol, v.122, n.3, Mar, p.343-8. 2007.

Barral-Netto, M., *et al.* Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. Science, v.257, n.5069, Jul, p.545-8. 1992.

Bern, C., *et al.* Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis, v.43, n.7, Oct 1, p.917-24. 2006.

Bern, C., *et al.* Loss of leishmanin skin test antigen sensitivity and potency in a longitudinal study of visceral leishmaniasis in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg, v.75, n.4, Oct, p.744-8. 2006.

Blackwell, J. M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. Parasitology, v.112 Suppl, p.S67-74. 1996.

Blackwell, J. M. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. Int J Parasitol, v.28, n.1, Jan, p.21-8. 1998.

Blackwell, J. M., *et al.* Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. Parasite Immunol, v.31, n.5, May, p.254-66. 2009.

Blobe, G. C., *et al.* Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med, v.342, n.18, May 4, p.1350-8. 2000.

Bogdan, C. e C. Nathan. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. Ann N Y Acad Sci, v.685, Jun 23, p.713-39. 1993.

Bucheton, B., *et al.* A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. Am J Hum Genet, v.73, n.5, Nov, p.1052-60. 2003.

Bucheton, B., *et al.* Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. Genes Immun, v.4, n.2, Mar, p.104-9. 2003.

Caldas, A., *et al.* Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. BMC Infect Dis, v.5, p.113. 2005.

Castellucci, L., *et al.* IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. J Infect Dis, v.194, n.4, Aug, p.519-27. 2006.

Christiansen, L., *et al.* Modest implication of interleukin-6 promoter polymorphisms in longevity. Mech Ageing Dev, v.125, n.5, May, p.391-5. 2004.

Costa, D. L. FATORES DE PROGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte.. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 134 p.

Crescente, J. A., *et al.* A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.103, n.12, Dec, p.1250-6. 2009.

Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.95, n.3, May-Jun, p.239-43. 2001.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.

Dunning, A. M., *et al.* A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. Cancer Res, v.63, n.10, May 15, p.2610-5. 2003.

Etges, R., *et al.* The major surface protein of Leishmania promastigotes is a protease. J Biol Chem, v.261, n.20, Jul 15, p.9098-101. 1986a.

Etges, R., *et al.* The major surface protein of Leishmania promastigotes is anchored in the membrane by a myristic acid-labeled phospholipid. Embo J, v.5, n.3, Mar, p.597-601. 1986b.

Ettinger, N. A., *et al.* Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with Leishmania chagasi. Ann Hum Genet, v.73, n.Pt 3, May, p.304-13. 2009.

Fishman, D., *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest, v.102, n.7, Oct, p.1369-76. 1998.

Fmtam, F. D. M. T. A. Diagnóstico da Leishmaniose através da Reação Intradérmica de Montenegro.
. Manaus. 2010: Diagnóstico da Leishmaniose p. 2010.

Gantt, K. R., *et al.* Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. J Immunol, v.170, n.5, Mar 1, p.2613-20. 2003.

Gatti, L. L., *et al.* Interleukin-6 polymorphisms, Helicobacter pylori infection in adult Brazilian patients with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. Arch Med Res, v.38, n.5, Jul, p.551-5. 2007.

Gatti, S., *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. Ann Trop Med Parasitol, v.98, n.7, Oct, p.667-76. 2004.

Grainger, D. J., *et al.* Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. Hum Mol Genet, v.8, n.1, Jan, p.93-7. 1999.

Guerbouj, S., *et al.* Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? Parasitology, v.122 Pt 1, Jan, p.25-35. 2001.

Heinrich, P. C., *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J, v.374, n.Pt 1, Aug 15, p.1-20. 2003.

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. Lancet, v.354, n.9185, Oct 2, p.1191-9. 1999.

Hoffmann, S. C., *et al.* Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. Am J Transplant, v.2, n.6, Jul, p.560-7. 2002.

Hull, J., *et al.* Haplotype mapping of the bronchiolitis susceptibility locus near IL8. Hum Genet, v.114, n.3, Feb, p.272-9. 2004.

Imagens, G. Ciclo evolutivo da Leishmaniose Visceral. 2010: Figura retirada do site p. 2010.

Jamieson, S. E., *et al.* Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. Genes Immun, v.8, n.1, Jan, p.84-90. 2007.

Jeronimo, S. M., *et al.* Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. J Infect Dis, v.196, n.8, Oct 15, p.1261-9. 2007.

Jeronimo, S. M., *et al.* Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. Genes Immun, v.8, n.7, Oct, p.539-51. 2007.

Jeronimo, S. M., *et al.* Natural history of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. Clin Infect Dis, v.30, n.3, Mar, p.608-9. 2000.

Joshi, P. B., *et al.* Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. Mol Biochem Parasitol, v.120, n.1, Mar, p.33-40. 2002.

Kamimura, D., *et al.* IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.149, p.1-38. 2003.

Karplus, T. M., *et al.* Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of Leishmania chagasi infection. Infect Immun, v.70, n.12, Dec, p.6919-25. 2002.

Kaye, P. M., *et al.* Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. Eur J Immunol, v.24, n.11, Nov, p.2850-4. 1994.

Kaye, P. M., *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev, v.201, Oct, p.239-53. 2004.

Killick-Kendrick, R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp, v.65 Suppl 1, p.37-42. 1990.

La Placa, M., *et al.* Complement fixation and intradermal skin test with partially purified "proteic" and "polysaccharidic" antigens from Leishmania donovani. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.69, n.4, p.396-8. 1975.

Lainson, R., *et al.* Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.82, n.3, p.421-4.

Li, Y. Y., *et al.* Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line. Hum Immunol, v.70, n.3, Mar, p.151-8. 2009.

Lurje, G., *et al.* Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. Ann Oncol, v.19, n.10, Oct, p.1734-41. 2008.

Mak, J. C., *et al.* Elevated plasma TGF-beta1 levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med, v.103, n.7, Jul, p.1083-9. 2009.

Mak, J. C., *et al.* Genetic polymorphisms and plasma levels of transforming growth factor-beta(1) in Chinese patients with tuberculosis in Hong Kong. Cytokine, v.40, n.3, Dec, p.177-82. 2007.

Malla, N. e R. C. Mahajan. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. Indian J Med Res, v.123, n.3, Mar, p.267-74. 2006.

Manson-Bahr, P. E. The leishmanin test and immunity in kala azar. East Afr Med J, v.38, Apr, p.165-7. 1961.

Mcconville, M. J. e E. Handman. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. Int J Parasitol, v.37, n.10, Aug, p.1047-51. 2007.

Mohamed, H. S., *et al.* Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. Genes Immun, v.4, n.5, Jul, p.351-5. 2003.

Monno, R., *et al.* Recombinant K39 immunochromatographic test for diagnosis of human leishmaniasis. Future Microbiol, v.4, n.2, Mar, p.159-70. 2009.

Ms, M. D. S. Leishmaniose Visceral. Brasilia. 2010

Murray, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. Am J Trop Med Hyg, v.71, n.6, Dec, p.787-94. 2004.

Murray, H. W., *et al.* Advances in leishmaniasis. Lancet, v.366, n.9496, p.1561-77.

Murray, H. W., *et al.* Advances in leishmaniasis. Lancet, v.366, n.9496, Oct 29-Nov 4, p.1561-77. 2005.

Omer, F. M., *et al.* Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? Parasitol Today, v.16, n.1, Jan, p.18-23. 2000.

Ozerdem, D., *et al.* Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. Parasitol Res, Oct 27. 2009.

Pampiglione, S., *et al.* Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.69, n.1, p.60-8. 1975.

Peacock, C. S., *et al.* Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. Genes Immun, v.3, n.6, Sep, p.350-8. 2002.

Pearson, R. D. e A. Q. Sousa. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis, v.22, n.1, Jan, p.1-13. 1996.

Pellegrino, J., *et al.* Muco-cutaneous leishmaniasis: intradermal test with a promastigote suspension and a crude extract from *Leishmania braziliensis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.19, n.6, Nov-Dec, p.393-6. 1977.

Peruhype-Magalhães, V., *et al.* Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clin Exp Immunol, v.146, n.1, Oct, p.124-32. 2006.

Pitta, M. G., *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. J Clin Invest, v.119, n.8, Aug, p.2379-87. 2009.

Reed, S. G., *et al.* Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.35, n.1, Jan, p.79-85. 1986.

Ritmeijer, K., *et al.* A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. Clin Infect Dis, v.43, n.3, Aug 1, p.357-64. 2006.

Rivera-Chavez, F. A., *et al.* Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. Shock, v.20, n.3, Sep, p.218-23. 2003.

Roberts, M. T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Br Med Bull, v.75-76, p.115-30. 2005.

Rodrigues, V., Jr., *et al.* Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Infect Immun, v.66, n.3, Mar, p.1233-6. 1998.

Sacks, D. e S. Kamhawi. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol, v.55, p.453-83. 2001.

Saha, S., *et al.* IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. J Immunol, v.179, n.8, Oct 15, p.5592-603. 2007.

Schroeder, A., *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol, v.7, p.3. 2006.

Sharma, U. e S. Singh. Immunobiology of leishmaniasis. Indian J Exp Biol, v.47, n.6, Jun, p.412-23. 2009.

Shrivastava, A. e K. Calame. An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. Nucleic Acids Res, v.22, n.24, Dec 11, p.5151-5. 1994.

Singh, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res, v.123, n.3, Mar, p.311-30. 2006.

Späth, G. F., *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.16, Aug, p.9258-63. 2000.

Stata. Stata 8.2 2010: Software p.

Stephens, M., *et al.* A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet, v.68, n.4, Apr, p.978-89. 2001.

Sundar, S., *et al.* Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. Clin Infect Dis, v.35, n.5, Sep 1, p.581-6. 2002.

Terry, C. F., *et al.* Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem, v.275, n.24, Jun, p.18138-44. 2000.

Tripathi, P., *et al.* Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. FEMS Immunol Med Microbiol, v.51, n.2, Nov, p.229-42. 2007.

V.2.1.30, P. A. S. S. C. Power and sample size calculations. 2010.

Van Der Poll, T., *et al.* Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. Clin Immunol Immunopathol, v.77, n.1, Oct, p.111-4. 1995.

Van Zandbergen, G., *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol, v.173, n.11, Dec, p.6521-5. 2004.

Visentainer, J. E., *et al.* TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. Int J Immunogenet, v.35, n.4-5, Aug, p.287-93. 2008.

Who, O. M. D. S.-. Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral. . 2010 2003.

Wilson, M. E., *et al.* Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. Microb Pathog, v.38, n.4, Apr, p.147-60. 2005.

Wong, T. Y., *et al.* Association of transforming growth factor-beta (TGF-beta) T869C (Leu 10Pro) gene polymorphisms with type 2 diabetic nephropathy in Chinese. Kidney Int, v.63, n.5, May, p.1831-5. 2003.

APÉNDICE

Lista Dos grupos de genes codificados pela Membrana
Human Chemokine and Receptors