



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO PROMOTORA DO *GENE BAT1* EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania guyanensis*
NO ESTADO DO AMAZONAS**

ANA CAROLINE DOS SANTOS CASTRO

MANAUS

2018



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA CAROLINE DOS SANTOS CASTRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO PROMOTORA DO *GENE BAT1* EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *LEISHMANIA*
GUYANENSIS NO ESTADO DO AMAZONAS

Projeto de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C355c Castro, Ana Caroline dos Santos
Caracterização molecular da região promotora do gene BAT1 em
pacientes com Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania*
guyanensis no estado do Amazonas / Ana Caroline dos Santos
Castro. 2018
60 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Pereira de Moura Neto
Coorientador: Rajendranath Ramasawmy
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Bat1. 2. Leishmaniose. 3. Polimorfismo. 4. Tnf. I. Moura Neto,
José Pereira de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Caracterização Molecular da Região Promotora do Gene *Bat1* em Pacientes com Leishmaniose Cutânea Causada por *Leishmania Guyanensis* no Estado do Amazonas”.

DISCENTE: ANA CAROLINE DOS SANTOS CASTRO

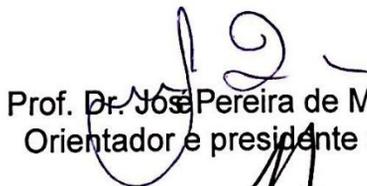
PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 30/07/2018.


Prof. Dr. Tatiane Pereira de Souza
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto
Orientador e presidente da banca


Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa - Membro externo
Membro externo (FIOCRUZ/AM)


Prof. Dr. Luis Andre Morais Mariuba - Membro interno
Membro interno (FIOCRUZ/AM)

*A minha mãe, Rosângela Castro, alicerce da minha vida
e sem ela eu não poderia existir.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me conceder a inteligência necessária para construir esse trabalho.

A minha mãe, Rosângela Castro, pelo amor, carinho e apoio nas minhas decisões e por ser meu alicerce em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto e me ensinar todos os caminhos da Biologia Molecular. Obrigada por sua amizade, dedicação, paciência e suas sábias palavras de tranquilidade nas horas mais difíceis de minha caminhada profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador, Dr. Rajendranath Ramasawmy, pela orientação e parceria na realização deste trabalho.

A toda equipe multidisciplinar da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) que colabora para a construção de todos os projetos do no Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas.

Aos (as) colegas do BIOMOL LAB – UFAM FCF, que compartilham desses momentos de trabalho e dedicação. Juntos somos mais fortes!

A minha prima, Renata Santana, um anjo em meu caminho e que me ajudou a persistir sempre. Obrigada pelo seu exemplo, apoio incondicional, amizade e paciência.

A minha família, sempre presente. Em especial meus irmãos, Gustavo Marques e Luriam Dinelly, e cunhada, Auriane Brandão.

A Stéfani Oliveira, presente desde a graduação, por me escutar e trabalhar comigo em todas as etapas deste e de outros projetos acadêmicos e pessoais.

A Profa. Dr. Keyla Emanuelle Ramos da Silva, pela parceria, conselhos e incentivo.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade e conhecimento adquirido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pesquisa.

Enfim, a todos que colaboraram de forma direta e indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

Meu muito obrigada!

Resumo

A leishmaniose é uma doença tropical infecto-parasitária negligenciada mundialmente, acometendo quase 110 mil indivíduos no Brasil nos últimos 5 anos. Na região do município de Manaus-AM, são registrados a maioria dos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) tendo como principal agente etiológico a *Leishmania guyanensis*. O Transcrito 1 Associado ao HLA-B (BAT1) regula a inflamação modulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias desempenhando um papel protetor em várias desordens imunopatológicas. Dessa forma o objetivo deste estudo foi determinar a influência de polimorfismos existentes na região promotora do gene BAT1 na clínica de pacientes com LC com um modelo de estudo caso-controle. Além disso, concentrações séricas da citocina Fator de Necrose Tumoral (TNF) - alfa, em cada população, foram correlacionadas com os polimorfismos encontrados na tentativa de identificar sub-fenótipos em pacientes com LC com base no estudo de marcadores moleculares no gene BAT1. Para o estudo molecular, foram realizadas amplificações pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional na região promotora do gene BAT1 e estes purificados pela metodologia *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent-ThermoFisher*, com posterior sequenciamento pelo método de terminação descrita por Sanger. Nossos resultados se basearam numa população de 516 indivíduos divididos em 267 casos e 249 controles, dos quais 79,7% e 68,7%, respectivamente, eram do gênero masculino. A faixa etária mais frequente foi de 19 a 39 anos. Os SNPs -22 (rs2239527) e -348 (rs2239528) foram os mais frequentes na população de estudo, incluindo pela primeira vez na literatura, o SNP -277. As frequências encontradas dos SNPs -22 e -348 foram bem semelhantes entre casos (31,15% / 4,28%) e controles (25,78% / 6,91%), respectivamente, não havendo associação destes entre as duas populações. Os níveis séricos de TNF-alfa foram mais elevados nos casos e independente do gênero ($p < 0,001$). Além disso, níveis elevados significativos envolveram os portadores dos SNPs -22 e -348 apenas quando eram casos e não entre pessoas saudáveis. Níveis séricos de TNF foram elevados proporcionalmente na presença dos polimorfismos, e quase duas vezes mais elevados naqueles homozigotos casos ($52,19 \pm 18,43$) do que homozigotos controles ($32,15 \pm 29,74$) ($p < 0,001$). Importante destacar níveis séricos de TNF mais elevados estiveram associados ao SNP -348 ($72,89 \pm 49,33$) em casos do que em -22 ($41,13 \pm 22,16$) no mesmo grupo. Além do mais, quando concomitantemente encontrados na mesma amostra, os SNPs -22 e -348 elevaram ainda mais a expressão dos níveis séricos de TNF. Nossos resultados reforçam o papel do BAT1 a partir de evidências de que a presença do polimorfismo afeta indiretamente a expressão de TNF. Dessa forma acreditamos que isto pode influenciar no desfecho e manifestação clínica do paciente com Leishmaniose, principalmente na apresentação das lesões cutâneas, uma vez que existe uma correlação entre diâmetro da lesão na LC e frequência de produção de citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: Leishmaniose, BAT1, Polimorfismo e TNF.

Abstrat

Leishmaniasis is a globally neglected infectious-parasitic disease, affecting almost 110,000 individuals in Brazil in the last 5 years. In the region of the municipality of Manaus-AM, most cases of Cutaneous Leishmaniasis (LC) are recorded, with *Leishmania guyanensis* as the main etiological agent. HLA-B Associated Transcript 1 (BAT1) regulates inflammation by modulating the expression of pro-inflammatory cytokines by playing a protective role in various immunopathological disorders. Thus, the objective of this study was to determine the influence of existing polymorphisms in the promoter region of the BAT1 gene in the clinical setting of patients with LC with a case-control study model. In addition, serum concentrations of the cytokine Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha in each population were correlated with the polymorphisms found in the attempt to identify sub-phenotypes in patients with LC based on the study of molecular markers in the BAT1 gene. For the molecular study, amplifications were performed using the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) technique in the promoter region of the BAT1 gene and were purified by the ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent-Thermofisher methodology, with subsequent sequencing by the described termination method by Sanger. Our results were based on a population of 516 individuals divided into 267 cases and 249 controls, of which 79.7% and 68.7%, respectively, were male. The most frequent age group was 19 to 39 years. SNPs -22 (rs2239527) and -348 (rs2239528) were the most frequent in the study population, including for the first time in the literature, SNP-277. The frequencies found for SNPs -22 and -348 were very similar between cases (31.15% / 4.28%) and controls (25.78% / 6.91%), respectively, with no association between these two populations. Serum TNF-alpha levels were higher in cases and gender independent ($p < 0.001$). In addition, significant elevated levels involved the carriers of SNPs -22 and -348 only when they were cases rather than between healthy people. Serum TNF levels were elevated proportionally in the presence of polymorphisms, and almost twice as high in those homozygous cases (52.19 ± 18.43) than controls (32.15 ± 29.74) ($p < 0.001$). Importantly, higher serum TNF levels were associated with SNP -348 (72.89 ± 49.33) in cases than in -22 (41.13 ± 22.16) in the same group. In addition, when concomitantly found in the same sample, the -22 and -348 SNPs further increased the expression of serum TNF levels. Our results reinforce the role of BAT1 from evidence that the presence of polymorphism indirectly affects TNF expression. Thus, we believe that this may influence the outcome and clinical manifestation of the patient with Leishmaniasis, especially in the presentation of cutaneous lesions, since there is a correlation between the diameter of the lesion in the LC and the frequency of production of inflammatory cytokines.

Keywords: Leishmaniasis, BAT1, Polymorphism and TNF.

Lista de Siglas e Abreviaturas

% - Por Cento

°C – Grau(s) Celsius

®- Marca registrada

BAT1 - *HLA-B Associated Transcript 1*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

DATASUS - Departamento de Informática do SUS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ddNTPs - dideoxynucleosídeostriphosphatados

FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

HLA - Human Leukocyte Antigen

IC - Intervalo de confiança

IFN- γ - Interferon-gama

IL - Interleucina

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LD - Leishmaniose Disseminada

LM- Leishmaniose Mucosa

LPG - Lipofosfoglicano(s)

MHC - Complexo de Histocompatibilidade Principal Humano

mRNA– RNA Mensageiro

n – Número Amostral

NO - Óxido Nítrico

OMS -Organização Mundial da Saúde

OR – OddsRatio

p – Valor-p

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

SNPs- Polimorfismos de Unico Nucleotídeo

sp- Espécie

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Th - T helper

μg- Microgramas

μL- Microlitros

V. - Vianna

χ² - Teste Qui-quadrado

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Casos confirmados por Região/UF de notificação e Ano Diagnóstico de LTA	18
Tabela 2 - Casos Novos e Taxa de Incidência/100.000 habitantes de LTA em Manaus no período de 2006 a 2012	19
Tabela 3 - Caracterização da população do estudo.....	35
Tabela 4 – Correlação entre os genótipos do SNP -22 e níveis séricos de TNF-alfa por população do estudo e gênero.....	39
Tabela 5 - Correlação entre os genótipos do SNP -348 e níveis séricos de TNF-alfa por população do estudo e gênero.....	40
Tabela 6 - Frequência genotípica da combinação de ambos os SNPS – 22 e – 348 para casos e controle; média e desvio padrão (DP) de TNF-alfa por genótipo	43

Lista de Figuras

Figura 1 - Ciclo de transmissão da leishmaniose	16
Figura 2 - Endemicidade mundial da LC em 2013.....	17
Figura 3 - A organização das regiões das classes I, II e III do MHC humano, com as distâncias expressas em milhares de pares de bases (kpb).....	22
Figura 4 - Estrutura molecular da região de MHC de 435 kb centromérica de HLA-B. Segmento genômico definido por uma série de cosmídeos mostrados na parte inferior. Linha superior dá a escala (em quilobases). Caixas fechadas referem-se a genes. As setas mostram a direção da transcrição dos genes. Mapeados por meio das enzimas de restrição <i>BssHIII</i> , <i>Sac II</i> , <i>Sal I</i> , <i>Cla I</i> , <i>Xho I</i> , <i>Kpn I</i> , <i>Xba I</i> e <i>BamHI</i>	25
Figura 5 - Fluxograma de Atividades	30
Figura 6 - Eletroferogramas demonstrando os polimorfismos -210 (A) -245 (B) -223 (C) e -277 (D) na Região Promotora do gene BAT1.	37
Figura 7 – Eletroferogramas demonstrando os polimorfismos -22 (A – Normal; B – Heterozigoto e C – Homozigoto) e -348 (D – Normal e E – Heterozigoto) da Região Promotora do gene BAT1.....	38
Figura 8 – Níveis de TNF associados aos genótipos para o SNP -22 em casos (A) e controles (B).....	41
Figura 9 - Níveis de TNF associados entre genótipos para o SNP - 22 no gene BAT1 em casos e controles (Ctrl).....	41
Figura 10 – Níveis de TNF associado aos genótipos estratificados por gênero (MAS – Masculino e FEM – Feminino) entre os grupos para o SNP -22.....	42
Figura 11 - Níveis de TNF associado aos genótipos para o SNP -348 na população caso (A) e controle (B).....	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	15
2.1.1	Ciclo de Transmissão	15
2.1.2	Epidemiologia da LTA.....	17
2.1.3	Imunopatogênese da Leishmaniose.....	20
2.2	Gene Transcrito 1 Associado a HLA-B do inglês HLA-B Associated Transcript 1(BAT1)	24
3.	OBJETIVO.....	27
3.1.	Objetivo Geral.....	27
3.2.	Objetivos Específicos.....	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.	Tipo de Estudo	28
4.2.	Aspectos Éticos	28
4.3.	Áreas de Estudo.....	28
4.4.	Amostragem	29
4.5.	Critérios de Inclusão e Não Inclusão	29
4.6.	Fluxograma de Atividades	30
4.7.	Coleta de Material Biológico	30
4.8.	Extração de DNA	31
4.9.	Caracterizações do Agente Etiológico	31
4.10.	Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
4.11.	Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados para BAT1	32
4.12.	Dosagem de citocina	33
4.13.	Análises Estatísticas	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1.	População de Estudo	35
5.2.	Polimorfismos da Região Promotora BAT1	36
5.3.	Associação entre os níveis séricos de TNF-alfa e polimorfismo da região promotora do gene BAT1.....	38
6.	CONCLUSÕES	45
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46

ANEXOS	52
ANEXO A	52
ANEXO B	59

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antropozoonose considerada como um grande problema de saúde pública, pois representa uma doença com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (BRASIL, 2007). Devido a sua ampla distribuição geográfica, aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de transmissão com incidência de 2,5 milhões de casos ao ano dentre as diferentes formas clínicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A leishmaniose é uma doença infecciosa bem estudada exibindo uma variedade de sintomas com características imunológicas bem definidas. A susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas pode ser influenciada pela variação genética e heterogeneidade das populações humanas, bem como diferenças no estilo de vida e número de exposição a infecções (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006; MOMENI; AMINJAVAHERI, 1994).

As análises genéticas em seres humanos com doenças infecciosas e/ou inflamatórias envolvem principalmente a genotipagem de genes candidatos, geralmente escolhidos com base em critérios imunológicos, e estudos de associações caso-controle e/ou em associação familiar (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

Estudos já demonstraram correlações em genes que codificam moléculas de HLA de classe I e II na susceptibilidade a *Leishmania guyanensis* e *L. braziliensis*. Dessa forma, a determinação de polimorfismo em genes do sistema imunológico tem sido testada em estudos de genes de interesse (BARBIER et al., 1987). Além disso, não está claro a contribuição desses genes de interesse para a variação na susceptibilidade ou resistência à leishmaniose e à heterogeneidade dos sintomas da doença. Contudo, os efeitos típicos das variantes que foram identificadas indicam que representam apenas uma parte de uma extensa herança poligênica, com vários ou muitos outros genes ainda por identificar (CABRERA et al., 1995; CONVIT et al., 1993; RAMASAWMY et al., 2010).

O progresso na identificação de genes envolvidos na susceptibilidade à leishmaniose em seres humanos é típico das tentativas de compreender a base genética das doenças poligênicas (COTTON, 2017).

Dessa forma o objetivo dessa dissertação foi determinar a influencia de polimorfismos em toda a região promotora do gene Transcrito 1 Associado à HLA-B (BAT1) na clinica de pacientes com leishmaniose cutânea infectados por *L. (Viannia) guyanensis* utilizando um modelo de estudo caso-controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose é uma doença tropical infecto-parasitária negligenciada mundialmente. Origina-se a partir de várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A diversidade clínica, geográfica e biológica desse gênero depende da espécie envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro. Os parasitas clinicamente importantes são do subgênero *Viannia* e *Leishmania*, encontrados em diversas localidades no mundo (AKHOUNDI et al., 2016; GONTIJO; RIBEIRO, 2003).

A LTA é transmitida ao ser humano por meio da picada de fêmeas de dípteros infectadas, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A diversidade clínica dessa patologia inclui infecções assintomáticas e sintomáticas que variam de úlceras localizadas a infecções fatais (GONTIJO; RIBEIRO, 2003).

Clinicamente se apresenta sob quatro formas distintas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucosa (LM), Leishmaniose Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). No nordeste brasileiro a LC, LM e a LD são ocasionadas, principalmente, pela *Leishmania braziliensis*; enquanto que a LD, pela *Leishmania amazonensis* (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005).

A LC aparece quando os parasitas permanecem na pele causando sintomas localizados no sítio das picadas do inseto vetor. As infecções sistêmicas causadas pela Leishmaniose Visceral (LV) ocorrem quando os parasitas se espalham para outros órgãos, em particular para o fígado e baço, onde destroem células imunes, sendo fatal se não for adequadamente tratada (COTTON, 2017).

2.1.1 Ciclo de Transmissão

Apesar da transmissão de *Leishmania* spp ser zoonótica, as modificações ambientais provocadas pelo homem levaram a doença a ser adquirida em vários contextos ecológicos, incluindo assentamentos estabelecidos adjacentes à floresta primária, cultivo em larga escala de culturas agrícolas e bairros marginais das cidades (REITHINGER et al., 2007).

Dessa forma, o ciclo de transmissão da LTA varia de acordo com a região geográfica e envolve uma variedade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiro (BRASIL, 2007).

Na região amazônica, sete espécies de *Leishmania* foram identificadas como causadoras de LTA. Seis do subgênero *Viannia*: *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e *L. lindenbergi*; e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania amazonensis*. No entanto, foram isolados de humanos somente *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. braziliensis*, e *L. amazonensis*, sendo a *L. guyanensis* a mais predominante (GUERRA et al., 2006).

O ciclo biológico da Leishmaniose consiste em dois estágios de desenvolvimento. A transmissão ocorre quando o flebotomíneo (fêmea) infectado realiza o repasto sanguíneo no indivíduo sadio inoculando a forma promastigota metaciclíca, forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Após a internalização do protozoário pelos macrófagos, as promastigotas sofrem diferenciação para a forma amastigota, multiplicando-se por divisão binária, a qual rompe a parede do macrófago para sua liberação ao meio extracelular, ficando disponível para ser fagocitado por outros macrófagos e repetir o mesmo ciclo (Figura 1) (CUNNINGHAM, 2002; NEVES et al., 2011).

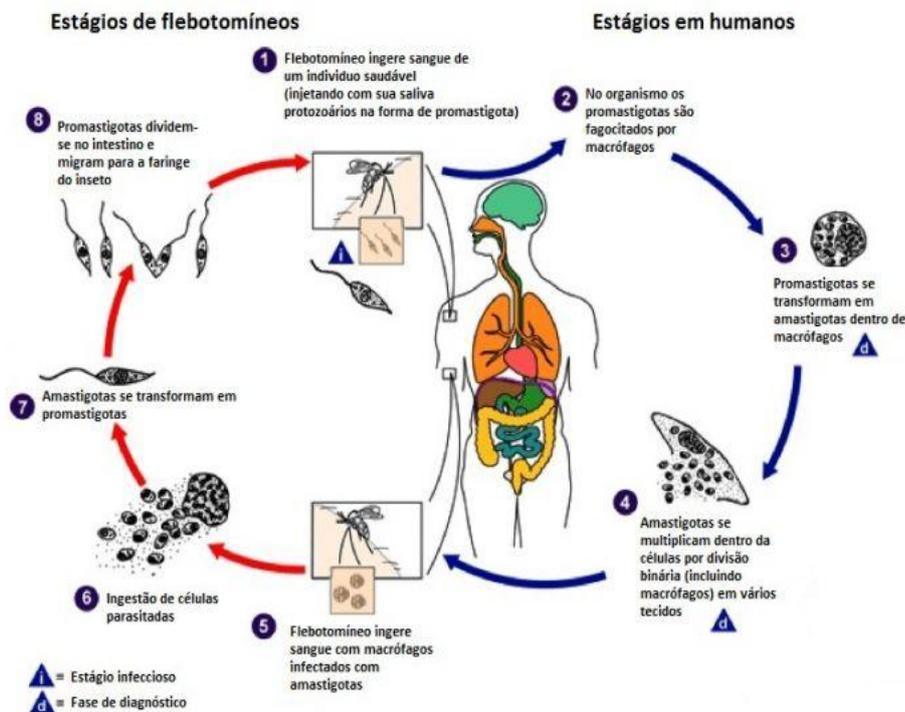


Figura 1 - Ciclo de transmissão da leishmaniose
 FONTE: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

As formas promastigotas e amastigotas são encontradas no tubo digestivo do flebotomíneo, enquanto que nas células do sistema fagocitário mononuclear do vertebrado,

principalmente macrófagos residentes na pele, somente a forma amastigota é encontrada (NEVES et al., 2011).

O segundo estágio ocorre quando um novo repasto sanguíneo é realizado e as formas amastigotas, presente no intestino do hospedeiro invertebrado, sofre diferenciação celular (metaciclôgênese), assumindo então a forma promastigota metaciclôica. As promastigotas dirigem-se à parte anterior do aparelho digestório do inseto (esôfago, faringe e probóscida) tornando-se aptas para serem transmitidas no próximo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002; NEVES et al., 2011).

2.1.2 Epidemiologia da LTA

De acordo com o Ministério da Saúde (2007), a LTA é considerada como um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual entre 1 a 1,5 milhões de casos (Figura 2).

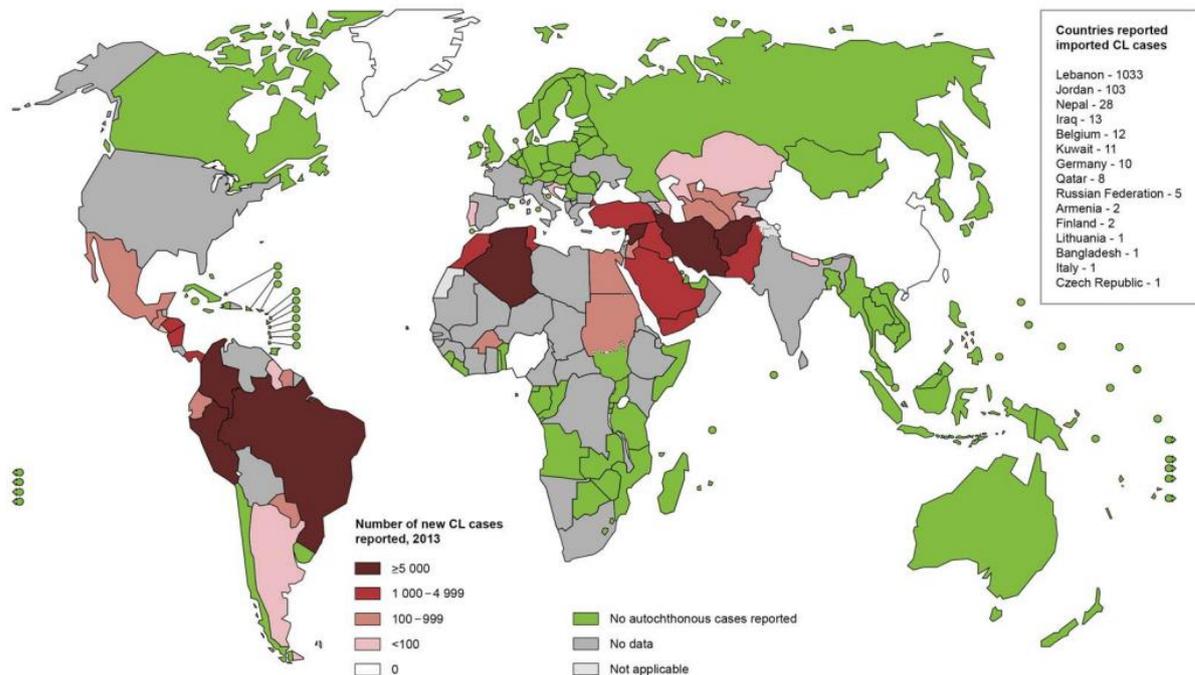


Figura 2 - Endemicidade mundial da LC em 2013
FONTE: WHO, 2013

Segundo estudos realizados por Alvar e Colaboradores(2012) em 98 países, 3 territórios e em 5 continentes, de 2007 a 2010, mais de 58.000 casos oficiais de LV e 220.000 casos de LC por ano foram registrados. Atualmente ainda é considerada pela OMS, uma das

seis mais importantes doenças infecciosas transmitidas por insetos, devido principalmente ao seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades.

Na América Latina, 62 mil novos casos são registrados a cada ano, sendo endêmicos em 18 países. Nas duas últimas décadas, apesar dos programas de prevenção, a incidência de leishmaniose nas Américas continua sendo um problema de saúde pública (LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2010).

No Brasil, é uma das infecções dermatológicas mais importantes devido à sua magnitude, risco de ocorrência de deformidades e pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (OLIVEIRA; FELICIANO; BRAGA, 2012).

De acordo com dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), entre os anos de 2011 e 2015, foram registrados quase 110 mil casos de LTA no Brasil. A Região Sul apresentou o menor número de casos registrados e a Região Norte, o maior (tabela 1).

Tabela 1 - Casos confirmados por Região/UF de notificação e Ano Diagnóstico de LTA

Região/UF de notificação	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Região Norte	9202	10846	8971	11078	9278	49375
. Rondônia	733	1243	1279	1251	1087	5593
. Acre	978	1223	1026	1160	1105	5492
. Amazonas	2377	2359	1542	1925	1705	9908
. Roraima	231	468	542	492	502	2235
. Pará	3861	4242	3191	4433	3707	19434
. Amapá	578	798	837	1107	600	3920
. Tocantins	444	513	554	710	572	2793
Região Nordeste	8454	8756	5697	5380	5417	33704
Região Sudeste	2354	1588	1346	1721	1905	8914
Região Sul	374	467	342	423	523	2129
Região Centro-Oeste	2479	3401	3181	3269	3064	15394
Total	22863	25058	19537	21871	20187	109516

FONTE: DATASUS, 2017.

Na região amazônica, a LC é responsável por quase a metade dos casos notificados no Brasil. A *L. guyanensis* e *L. braziliensis* são as espécies mais prevalentes na região, sendo a primeira altamente endêmica ao norte do rio Amazonas. Devido a importância epidemiológica de *L. guyanensis*, estudos em diversas áreas têm sido realizados para compreender a patogênese de LC causada por *L. guyanensis* (MATTA et al., 2009).

No Estado do Amazonas, na região do município de Manaus, é registrada a maioria dos casos de LTA, tendo como principal agente etiológico a *L. guyanensis*, o que resulta em pacientes com forma clínica cutânea (BARBOSA et al., 2008; ROMERO et al., 2002).

De acordo com Guerra e Colaboradores (2007) no período de 1985 a 1999, a região norte apresentou uma frequência 61.339 de casos com taxa de incidência entre 114,8 a 163,5/100.000 habitantes. No Amazonas, entre 1999 a 2003, foram registrados 12.005 casos, apresentando taxas médias de incidência de 86,77, sendo que em 2003 a taxa foi de 121,03 com 3.174 casos, com 60,18% deles no Município de Manaus.

Dados publicados pelo Ministério da Saúde sobre os Indicadores e Dados Básicos - Indicadores de Morbidade, na capital, no período de 2006 a 2012, cerca de 4.270 novos casos foram registrados com taxa média de incidência de 34,53 ao ano. Sendo que o ano de 2007 e 2010 apresentaram os maiores e menores números de casos novos de incidência registrados, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2 - Casos Novos e Taxa de Incidência/100.000 habitantes de LTA em Manaus no período de 2006 a 2012

Indicadores/Ano	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Casos Novos	597	931	540	450	281	820	651	4270
Taxa de Incidência*	35,36	53,75	31,60	25,88	15,59	44,75	34,97	

*100.000 Habitantes

FONTE: TABNET, 2012.

A Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), até 2007, registrou aproximadamente 47,5% dos casos de leishmaniose do Estado do Amazonas, advindos principalmente do Município de Manaus, particularmente das rodovias AM-010 (que interliga Manaus aos municípios de Rio Preto da Eva e Itacoatiara) e BR-174 (que liga Manaus ao município de Presidente Figueiredo (Amazonas) e ao Estado de Roraima) (GUERRA et al., 2007).

Dados publicados pelo Sistema de Informações Operacionais e Epidemiológicas – VigiWeb da FMT-HVD, em média, 678 casos por ano foram notificados nos últimos seis anos, com maior e menor registro em 2011 e 2016, respectivamente (gráfico 1).

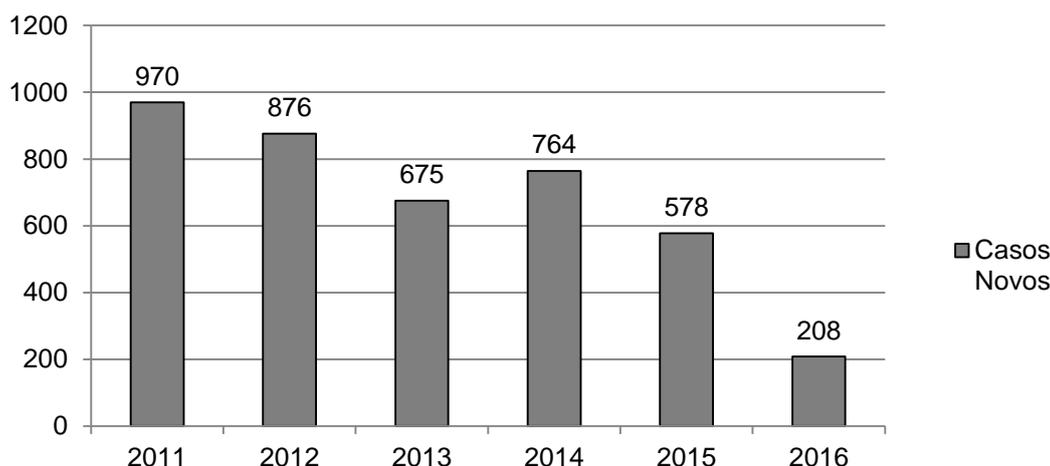


Gráfico 1 - Casos Novos notificados de LTA registrados na FMT-HVD, de 2011 a 2016
 FONTE: FMT-HVD, 2017.

2.1.3 Imunopatogênese da *Leishmaniose*

O sistema imune é fundamental na defesa contra agentes infecciosos e constitui o principal impedimento para a ocorrência na disseminação de infecções (MACHADO et al., 2004). O curso da infecção e apresentação clínica da LTA será de acordo com o tipo de resposta imune que o indivíduo irá construir (PINHEIRO, 2004).

A resposta imunológica à infecção por *Leishmania* envolve o desempenho de citocinas, das moléculas co-estimulatórias, da saliva do flebótomo e fatores genéticos do hospedeiro (REIS et al., 2007).

O primeiro mecanismo para a cura ou a resistência à infecção por *Leishmania* está associado à ativação de macrófagos, resultante da ativação induzida por citocinas (ex., TNF-alfa e IFN- gama), com produção de radicais livres (síntese de derivados do O₂ a exemplo do óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂)), levando à destruição dos parasitas intracelulares (ANTONELLI et al., 2004).

Outro mecanismo de defesa se dá através da estimulação de células T e está relacionada com o nível de expansão de células T Auxiliares do tipo 1 (Th1) e Th2 para produzir linfocinas (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005; PIRMEZ et al., 1993).

A resposta contendo Th1 resulta em doença aguda proporcionando resposta imune eficaz específica ao parasita caracterizadas pela secreção de Interleucina 2 (IL-2), Interferon (IFN) gama e Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa; enquanto que Células T Auxiliares do tipo 2 (Th2) produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 aumentando as respostas humorais e inibindo respostas imunes mediadas por células, resultando em infecção

disseminada (CUNNINGHAM, 2002; SILVEIRA et al., 2008). Porém há evidências que respostas do tipo Th1 exacerbadas foram associadas à forma clínica mucosa da leishmaniose.

A defesa contra agentes intracelulares, mediada por células T CD8+, é extremamente efetiva, pois exerce sua função através da citotoxicidade mediada por essas células ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares (JANEWAY, 2001).

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LC secretam altos níveis de IFN-gama e TNF-alfa e baixos níveis de IL-5 e IL-10, sendo a célula CD4+ o tipo celular que contribui com a maior parte da produção de IFN-gama tanto no sangue periférico quanto a nível tecidual, embora haja participação de células CD8+ na produção dessas citocinas. Na lesão de pacientes com LC, é observada uma predominância de RNA mensageiro de citocinas Th1 como a IL-2, além de IFN-gama e TNF-alfa (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005).

A maioria dos parasitos da *Leishmania* também é destruída pela ação lítica do complemento, eosinófilos e polimorfonucleares (como neutrófilos) recrutados para o local. Entretanto, as formas promastigotas metacíclicas apresentam, na sua membrana citoplasmática, moléculas (lipofosfoglicanos [LPG] e glicoproteínas [principalmente gp63]) que impedem a ação lítica do complemento, facilitam a adesão e fagocitose pelo macrófago; e promovem a fixação do componente C3 do complemento ligando-se aos receptores CR3 e CR1, presentes na membrana dos macrófagos (MOSSER; WEDGWOOD; EDELSON, 1985; PUENTES et al., 1988, 1990).

Estudos experimentais em animais e humanos têm demonstrado que a resposta imunogenética também é muito importante na evolução da patogênese da LTA bem como fundamental para controle da infecção (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006; PEELMAN et al., 1995).

Análises imunogenéticas sobre a suscetibilidade a doenças, baseada principalmente no estudo do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), têm influenciado cada vez mais a prática clínica, pois afeta a seleção das células T, indução a tolerância, produção de anticorpos, imunidade mediada pelas células T, respostas inflamatórias e diversos outros fatores ligados ao sistema imune e seu funcionamento (MAGALHÃES; BÖHLKE; NEUBARTH, 2004).

O MHC (Figura 3), por sua vez, é composto por um conjunto de genes altamente polimórficos, denominado complexo HLA (*Human Leukocyte Antigen*), e abrange mais de

120 genes funcionais, dos quais cerca de 20% estão associados à imunidade (CRUVINEL et al., 2010).

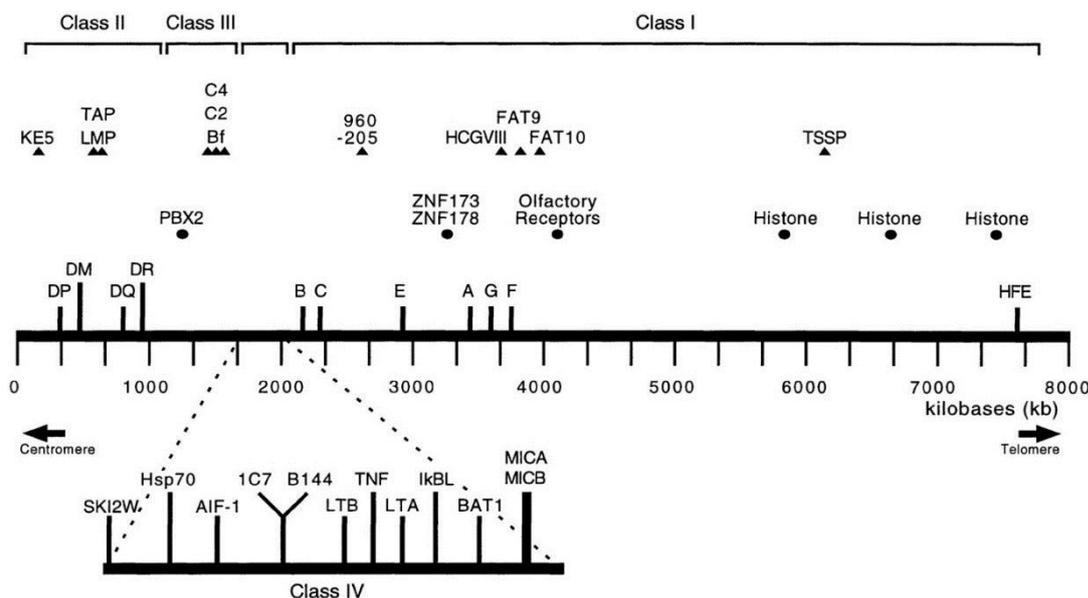


Figura 3 - A organização das regiões das classes I, II e III do MHC humano, com as distâncias expressas em milhares de pares de bases (kpb)

FONTE: GRUEN; WEISSMAN, 2001

Diversos genes que são codificados na extremidade telomérica da região de Classe III do MHC (entre os genes de Classe I e II, especificamente Bf, C2 e C4) parecem estar envolvidos tanto em respostas imunes inflamatórias globais como específicas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989; SPIES et al., 1989).

Ao contrário das regiões MHC classe I e II, altamente polimórficas, a região III apresenta variações de sequência que são típicas do genoma como um todo. Marcadores polimórficos na região da classe III do MHC podem facilitar a identificação de *loci* genéticos envolvidos na susceptibilidade a numerosas doenças. (XIE et al., 2003).

De acordo com Oliveira (2008) genes polimórficos próximos a junção da região de MHC classe I, localizados na região de classe III, tem sido estudados como *loci* secundários para o desenvolvimento de doenças relacionadas à imunidade, dentre os quais se destacam o NF-kappa-B inibitor-like protein 1 (NKBIL1), *HLA-B Associated Transcript 1* (BAT1), TNF-alfa e Linfotoxina alfa (LT-alfa).

A função do gene BAT1 ainda é desconhecida na leishmaniose. Uma investigação mais aprofundada determinará se a família desse gene representa uma família de genes com estruturas comuns, funções ou ambos, assim como os genes de classe I, II e III do MHC.

2.1.4 Polimorfismos Em Leishmaniose

A genética é uma ferramenta importante para compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas humanas. Nos últimos 20 anos, inúmeros estudos vêm avaliando polimorfismos, aos quais tem se revelado biomarcadores relevantes para o entendimento da patogênese de algumas doenças (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017)

Um extenso número de polimorfismos tem sido identificado na região reguladora dos genes, particularmente do sistema imunológico, sugerindo que esse tipo de variação é funcional e evolutivamente importante na resposta clínica de diversas patologias (MITCHISON, 2000).

Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) são definidos como *loci* com alelos que sofrem variação de apenas de um único nucleotídeo distribuídos por todo o genoma e podem ser considerados como marcadores genéticos (DE ARAUJO et al., 2015)

Os SNPs são mais comuns do que outros tipos de polimorfismos e ocorrem a uma frequência de aproximadamente 1 em 1000 pares de bases em todo o genoma (região promotora, sequências de codificação e sequências de introns). Essas simples mudanças na sequência de DNA, a maioria das quais provavelmente estão localizadas em espaçadores intergênicos, são consideradas estáveis e não deletérias para os organismos. SNPs são bialélicos e apresentam uma baixa de mutação (SHASTRY, 2002).

Kamali-Sarvestani e Colaboradores (2006) avaliaram a correlação entre os polimorfismos funcionais nos genes de citocinas relacionadas a Th1 e Th2 em pacientes iraquianos com leishmaniose. Seus resultados sugeriram que variantes genéticas funcionais na região promotora da IL-4 (C/T) podem influenciar o risco de desenvolver LC, enquanto o polimorfismo no íntron do gene IFN-gama (A/T) pode influenciar a progressão da doença em direção à LC crônica.

Um estudo de coorte retrospectiva realizado por Mera-Ramírez et al., (2017) foi realizado para determinar a frequência de SNPs nos genes TNF-alfa, IL-10 e TLR4 em paciente com Leishmaniose, causada *L. panamensis*, em uma área endêmica na Colômbia. O SNP no alelo A de TNF-alfa em -308 (G/A) foi encontrado mais frequentemente em indivíduos com infecção assintomática enquanto o SNP no genótipo CC da IL-10 em -819 (C/T) foi mais frequente em pacientes com CL (34% vs 27% em indivíduos assintomáticos); e não foram encontradas diferenças nas frequências de alelos para SNPs TLR4 entre os grupos.

A genotipagem por PCR-RFLP em 631 pacientes com LC causada por *L. guyanensis* comparada a 530 indivíduos sem história de Leishmaniose, para polimorfismos rs5743899 e rs3750920 no gene TOLLIP (Proteína de Interação com Toll), mostraram que os alelos G e T dos rs5743899 e rs3750920 foram mais comuns em pacientes com LC do que em indivíduos saudáveis (DE ARAUJO et al., 2015).

Diante disso, a associação entre o poder de resistência ou suscetibilidade, o SNP em uma determinada região de um gene, seu papel na resposta imune e o desfecho clínico, está primariamente relacionada ao que cada polimorfismo pode ter de efeito sobre a expressão ou função da proteína sintetizada (OLIVEIRA, 2008).

2.2 Gene Transcrito 1 Associado a HLA-B do inglês *HLA-B Associated Transcript 1* (BAT1)

O gene BAT1 está situado no MHC de classe III, no braço curto do cromossomo humano 6, aproximadamente 40 kb telomérico para o gene TNF-alfa e próximo ao gene NFKBIL1 (do inglês *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1*) (SPIES et al., 1989).

A proteína nuclear *HLA-B Associated Transcript 1* (BAT1), codificada pelo gene BAT1, pertence a família DEAD [Asp-Glu-Ala-Asp]-Box sendo definida como uma RNA Helicase encontrada principalmente em células eucarióticas, particularmente em macrófagos e hepatócitos (OLIVEIRA, 2008; RAMASAWMY et al., 2006).

Essa helicase ATP dependente medeia à hidrólise de ATP durante o processo de “*splicing*” do pré-mRNA sendo um fator essencial de *splicing* necessário para a associação da pequena ribonucleoproteína nuclear U2 com pré-mRNA. Também desempenha um papel importante na exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma (PRICE et al., 2004).

Spies e Colaboradores (1989b) mapearam os transcritos associados a HLA-B (BATs) em diferentes locais dentro de uma região de 160 kb que inclui os genes para TNF-alfa e TNF-beta. A presença dos genes BAT1 e BAT5 na vizinhança de HLA-B levanta a questão de qual gene nesta região determina susceptibilidade a doenças. Dois transcritos, um tendo cerca de 1,7 e outro com 6 kb foram encontrados. Estes "transcritos associados a HLA-B" 1e 2 (BAT1 e BAT2) foram demonstrados em todos as cinco linhagens de células utilizadas no estudo (Figura 4).



Figura 4 - Estrutura molecular da região de MHC de 435 kb centromérica de HLA-B. Segmento genômico definido por uma série de cosmídeos mostrados na parte inferior. Linha superior dá a escala (em quilobases). Caixas fechadas referem-se a genes. As setas mostram a direção da transcrição dos genes. Mapeados por meio das enzimas de restrição *BssHII*, *Sac II*, *Sal I*, *Cla I*, *Xho I*, *Kpn I*, *Xba I* e *BamHI*

FONTE: SPIES, 1989

O BAT1 pode regular negativamente a inflamação modulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1 e IL-6, sugerindo que ele desempenha um papel protetor em várias desordens imunopatológicas (ALLCOCK; WILLIAMS; PRICE, 2001).

Wong e colaboradores (2003) descreveram dez SNPs na região promotora proximal do BAT1 em linhas de células B transformadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Nesse estudo, os autores sugerem que o SNP localizado nas posições -22 e -348 pb de BAT1 podem afetar a transcrição e, portanto, susceptível de modificar a expressão da proteína BAT1 e, consequentemente, indiretamente a expressão de TNF-alfa.

Uma mutação na região de -348 no gene BAT1 foi descrita associada à suscetibilidade artrite reumatoide (AR), sugerindo uma ação na regulação do TNF-alfa e modificações na resposta inflamatória observada nestes pacientes (QUIÑONES-LOMBRAÑA et al., 2008).

Ramasawmy e colaboradores (2006) demonstraram que os polimorfismos nos dois SNPs - 22C e -348C no gene BAT1 no grupo de pacientes são fatores de risco para o desenvolvimento de Cardiomiopatia Chagásica Crônica na população brasileira.

Os estudos de Mendonca e colaboradores (2014) sugeriram que o alelo -22 (C/G) do BAT1 é um fator de risco para a complicação de malária por *Plasmodium vivax*, e diferentes haplótipos influenciam a clínica da doença, alterando os níveis plasmáticos de TNF-alfa.

Foram descritos que os polimorfismos -22 (C/G) e -348 (C/T) na região promotora do BAT1 afetaram a atividade transcricional e a ligação de fatores de transcrição nucleares tais como os oligonucleótidos YY1 e Oct1 em relação ao local de início de transcrição de DDX39B (ALLCOCK; WILLIAMS; PRICE, 2001; MENDONCA et al., 2014).

Contudo, ainda hoje não se tem descrito na literatura possível influência de polimorfismos na região promotora do gene BAT1 relacionado a susceptibilidade ou a resistência a leishmanioses. O que se pode verificar é que este gene tem papel fundamental na inflamação de diversas patologias infecciosas e não infecciosas citadas anteriormente. É possível que polimorfismos, na região promotora, expliquem variações nas respostas dos indivíduos ao parasita, resultando em uma resposta imune diferenciada e consequente diversidade de formas clínicas.

Sendo assim, sugere-se que a presença de polimorfismos no gene BAT1 altera a clínica de pacientes com Leishmaniose Cutânea, causada por *L. guyanensis*, por este gene regular a resposta imune afetando a atividade transcricional e a ligação de fatores nucleares.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar molecularmente a região promotora do gene BAT1 de pacientes com Leishmaniose Cutânea infectados por *L. guyanensis* no Estado do Amazonas.

3.2. Objetivos Especificos

- I. Descrever os dados sócios demográficos da população deste estudo, recrutados na FMT_HVD;
- II. Determinar e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos investigados no gene BAT1 em grupos controle e casos de Leshmaniose;
- III. Correlacionar as concentrações séricas de TNF-alfa com os polimorfismos encontrados nos dois grupos amostrais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Tipo de Estudo

O modelo de estudo se baseou em um estudo caso-controle utilizando ferramentas e técnicas da biologia molecular para análise de frequências alélicas e genotípicas com possível associação a susceptibilidade ou resistência em indivíduos com LC causada pela *L. guyanensis*.

4.2. Aspectos Éticos

Este estudo é parte integrante de um projeto maior intitulado “Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMT-HVD, sob o número do CAAE: 09995212.0.0000.0005.

Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devidamente aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) pertinente. O voluntário menor de idade apresentou seu formulário assinado por um dos pais de guarda legal. O voluntário não alfabetizado contou com auxílio da equipe de pesquisadores para ler e explicar o TCLE bem como sua impressão digital a ser coletada.

4.3. Áreas de Estudo

A população do estudo reside em regiões endêmicas para leishmaniose, localizadas nas proximidades do município de Manaus, especificamente na rodovia AM-010, que liga Manaus ao município de Itacoatiara, e BR-174, que liga Manaus a Boa Vista, capital do estado de Roraima. Neste percurso encontram-se o Ramal do Pau-Rosa, Ramal da Cooperativa e seus 18 vicinais como o Km 21 da BR-174, o Ramal Água Branca I e II no Km 32 e 35 respectivamente e Ramal do Leão localizado no Km 37 da AM-010.

Estas regiões são consideradas como endêmicas por serem áreas de floresta tropical que, ao longo dos anos sofreram desmatamento, dando lugar a assentamentos populacionais nos arredores das áreas de mata. A atividade agropecuária e seu tipo de moradia, localizados próximo às áreas de floresta, tornam essa população altamente exposta à infecção por *Leishmania*.

4.4. Amostragem

O recrutamento dos participantes do nosso estudo teve início no ano de 2014 e ainda está em andamento.

O Grupo Caso foi composto por pacientes atendidos no ambulatório de Leishmaniose da FMT-HVD, com “n” de 267 pacientes com diagnóstico confirmado de LC causada por *L. guyanensis*. O Grupo Controle foi também composto por “n” de 249 indivíduos sem sinal ou histórico de leishmaniose, e ambos os grupos não possuíam nenhum grau de parentesco.

O Grupo Caso foi recrutado por demanda espontânea do ambulatório na FMT-HVD, após realização de exame direto e caracterização do agente etiológico para a confirmação da doença, os pacientes foram encaminhados à consulta médica e convidados a participar do estudo, mediante aplicação de questionário (Anexo B) e TCLE (Anexo A), para os que concordarem com os termos do projeto. Participantes do Grupo Controle constituíam moradores das mesmas áreas de onde foram provenientes os pacientes do Grupo Caso, regiões consideradas endêmicas para leishmaniose, o qual foi entrevistado com imediata aplicação do mesmo questionário e TCLE utilizado no Grupo Caso.

4.5. Critérios de Inclusão e Não Inclusão

Como critérios de inclusão, para ambos os grupos, foi necessário que o participante da pesquisa apresentasse entre os 12 a 65 anos de idade e ser natural do Estado do Amazonas de ambos os gêneros com lesão cutânea característica de Leishmaniose. Para o Grupo Caso utilizou-se da confirmação do diagnóstico de LC por meio do exame direto e confirmação da espécie, enquanto que para o Grupo Controle o participante obrigatoriamente deverá ser morador da área endêmica por 10 anos ou mais, e não apresentar sinais ou histórico da doença.

Os critérios de não inclusão: pacientes que apresentarem sorologia positiva para HIV, gestante e militar.

4.6. Fluxograma de Atividades

Foi elaborado um fluxograma (Figura 5) das atividades desde o início, com entrevistas aos indivíduos tanto grupo caso como o grupo controle, até o processamento dos dados com a análise estatística.

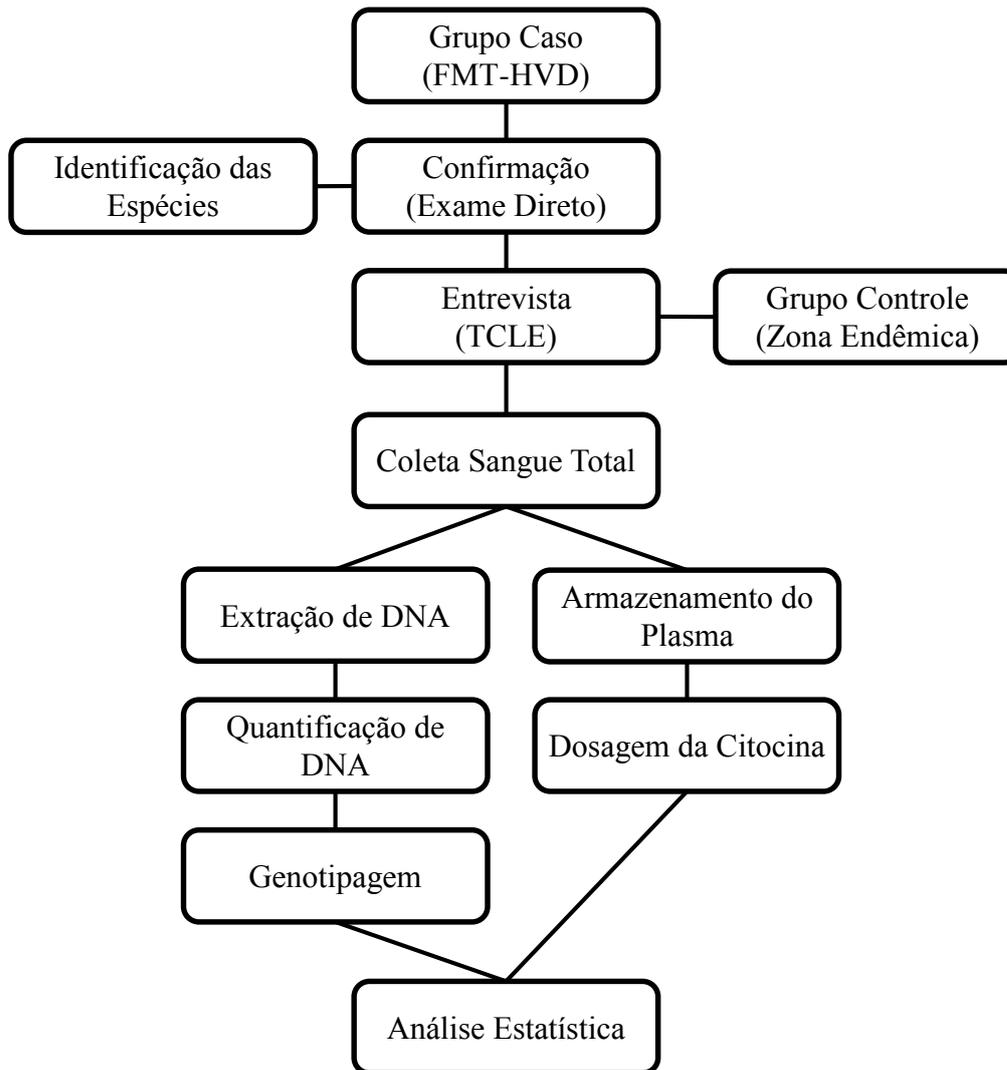


Figura 5 - Fluxograma de Atividades

4.7. Coleta de Material Biológico

Todos os participantes da pesquisa foram submetidos a uma punção venosa para coleta de 5mL de sangue periférico em tubo tipo Vacutainer® contendo anti-coagulante EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético). Após coletadas, as amostras estão sendo

armazenadas no gelo para preservação das citocinas no Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas (LPDE) da FMT-HVD.

4.8. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µL de sangue periférico, utilizando-se o *Kit GFX™* Kit de purificação de DNA genômico (*Amersham Pharmacia Biotech-CA*), seguindo-se as recomendações do fabricante. Uma vez extraído, o DNA foi quantificado e sua concentração e pureza determinada por espectrofotômetro de microvolume em comprimento de onda de 260 e 280nm através do *NanoDrop ND-2000 (Termo Scientific,USA)*, a partir de 1µL de DNA.

4.9. Caracterização do Agente Etiológico

A caracterização da espécie foi realizada por meio de sequenciamento no LPDE-FMT. Para a metodologia de sequenciamento gênico foi preparado um volume final da reação de 10µL, formada por 0,15µl *BigDye*, 2,0µL Tampão 5X, 0,8 µL H₂O, 3,0µL de *Primer* e 4,05µL de *amplicon* da PCR.

A análise para identificação das cepas foi realizada utilizando-se os primers L hsp70 senso (5' GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA 3') e L hsp70 anti-senso (5' CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC 3'), para o PCR. A termociclagem segue-se com 94°C por 1 minuto, seguido de 20 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos, seguido de mais 15 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 3 minutos. O sequenciamento propriamente dito foi realizado no sequenciador automatizado *ABI 3130XLDNA Sequencer (Applied Biosystems)* e alinhamento das sequências editadas com as sequencias de referência do *GenBank* para a identificação das espécies.

4.10. Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o estudo molecular da Região Promotora do gene BAT1 foi realizada a amplificação pela técnica de PCR utilizando-se os primers BAT1 *Forward* (5' CGG ATT GTA GCG AAG GCC AAA GC 3') e BAT1 *Reverse* (5'CCT CAG GTC ACC TTC ACT ACC 3'). Para a amplificação com volume final de 50 µl, foram adicionados 50 ng de DNA genômico, 2,5µl Tampão de Taq polimerase (500 mM/L KCl e 100 M/L Tris-HCL, pH 8.3),

1,2 µl MgCl₂ 2.0 mmol/L, 2,0 µl dNTP 40 µmol/L, 1 µL de Primer F e R e 1,5 U de Taq polimerase. As condições de termociclagem foram a seguinte: 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 60 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C e etapa final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram então purificados pela metodologia *Exo SAP-IT™ PCR Product Cleanup Affymetrix-USB* (segundo protocolo do fabricante) para realização do sequenciamento gênico.

4.11. Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados para BAT1

O sequenciamento gênico foi realizado pelo método de SANGER (SANGER et al., 1977), utilizando os dideoxynucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), que quando incorporados a fita de DNA sintetizada proporcionam paradas aleatórias na polimerização.

O equipamento ABI 3130XL DNA *Sequencer* foi utilizado para o sequenciamento empregando o protocolo do *Big Dye® Terminator v3.1* usando o polímero *POP-7™*. Para a reação de sequenciamento, foi empregado o produto de PCR purificado com concentrações de 10-40 ng, utilizando os mesmos iniciadores da PCR, em concentrações molares recomendadas pela *Applied Biosystems*.

A reação de sequenciamento foi realizada em placas de fundo V (*MicroAmp 96-well Reaction Plate - Applied Biosystems*), utilizando-se 0,15 ul de Big Dye Terminator, 0,3 ul de primer (oligonucleotídeos sintéticos) (1,5 pmol), 2 ul de tampão (Tris-Cl 200 mM pH 9,0; 5 mM MgCl₂), 40 ng de DNA e 2,55 ul de H₂O (Ultra Pura – Gibco) em um total de 10 ul.

As reações foram incubadas em termociclador (GENETIC ANALYZER 3130®), submetidas a temperatura inicial de 95 °C durante 1 minuto, seguida por 30 ciclos de 95°C por 10 segundos; 55°C por 15 segundos, e 60°C por 2 minutos.

Após a amplificação, para cada poço contendo 5 ul de reação foram adicionados 2 ul de EDTA (125mM)/Acetado de Sódio (3M) e 25 ul de etanol 100% gelado, que foram homogeneizados no vortex. Após homogeneização, a reação foi incubada por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após incubação, centrifugou-se por 45 minutos a 2000 RCF à 4°C, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se spin invertido até 180 RCF por 1 minuto. Após esta etapa, adicionou-se 35 ul de etanol a 70% seguido pela centrifugação por 15 minutos a 1650 RCF à 4°C. Em seguida desprezou-se o sobrenadante e realizou-se o spin invertido até 180 RCF por 1 minuto. Incubou-se a a placa a 60°C por 10

minutos para evaporar o Etanol. Após esta fase, acrescentou-se 10 ul de *Hi-Di™ Formamide* - *Applied Biosystems* antes de serem colocadas no sequenciador.

Eletroferogramas de alguns produtos sequenciados são demonstrados nas Figuras 06 e 07.

4.12. Dosagem de citocina

Os níveis de TNF-alfa foram dosados a partir de soro de pacientes e controles coletados com utilização de um kit *Bio-PlexPro™ Human Cytokine 27-Plex Assay* de imunoenensaio multiplexado com microesferas em um analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio) de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem da citocina foi realizada em duplicata e em microplacas de 96 poços contendo microesferas revestidas por anticorpos monoclonais contra diferentes respectivos alvos. Os dados foram apresentados pela média e desvio padrão, utilizados para fins da análise estatística.

4.13. Análises Estatísticas

Os alelos e genótipos dos polimorfismos estudados foram obtidos por contagem direta e a comparação dos diferentes genótipos e alelos, entre os casos e os controles, realizou-se pelo teste Qui-quadrado (χ^2) e oddsratio (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC). Para análise de associação entre os SNPs e os níveis séricas de TNF-alfa utilizou-se o teste ANOVA com Mann-Whitney para significância do teste. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (GraphPad Prism v. 5.0).

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação os testes paramétricos ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis foram utilizados. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando se é provável haver uma diferença entre as médias dos valores, busca-se dentre as médias apresentadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou *post-hoc*). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado, devidamente corrigido pelos testes de Mantel-

Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a 4, foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. População de Estudo

A população do estudo baseou-se num total de 516 indivíduos, divididos em 267 pacientes com LC (casos), subdivididos em 79,7% do gênero masculino; e 249 indivíduos saudáveis (controles), sendo 68,7% do gênero masculino. A faixa etária entre 19 a 39 anos foi a mais prevalente em ambos os grupos do estudo (tabela 3).

A maior população de pacientes do nosso estudo com confirmação de LC foi proveniente da estrada AM-010 e seus ramais (Ramal ZF, Ramal do Banco e Ramal do cafezal), seguido da estrada BR-174, com maior prevalência de casos na região do Pau Rosa. Os participantes também eram oriundos de outras regiões, como o Tarumã, Santa Etelvina, Ramal do Brasileirinho, Puraquequara e localizações próximas.

Ressaltamos que estes locais foram escolhidos devido a outros trabalhos anteriores do grupo de pesquisa já demonstrarem frequência elevada de casos confirmados de leishmaniose nessa área.

Tabela 3 - Caracterização da população do estudo

	Casos (%)	Controles (%)
N	267	249
Gênero		
Masculino	213 (79,7)	171 (68,7)
Feminino	54 (20,3)	78 (31,3)
Faixa Etária		
6 a 18	30 (11,8)	22 (8,9)
19 a 39	130 (51,2)	92 (37,2)
40 a 60	81 (31,9)	88 (35,6)
61 a 85	13 (5,1)	45 (18,2)

A frequência mais elevada do gênero masculino encontrada em nosso estudo corrobora com outras pesquisas na literatura (GUERRA et al., 2006; MURBACK et al., 2011; OLIVEIRA; FELICIANO; BRAGA, 2012). Vale salientar que no estudo de Guerra e colaboradores (2015) na mesma população, diferente do nosso estudo, a faixa etária mais

frequente foi de 21 a 30 anos de idade. Entendemos que a faixa etária e o gênero masculino são predominantemente acometidos devido as atividades ocupacionais exercidas, sendo mais expostos aos fatores de risco, o que justifica inclusive aumento à susceptibilidade a doença, e sua incidência maior em homens.

Acreditamos que a frequência encontrada de LC nos casos em menores de 18 anos (1,8%), idosos (5,1%) e mulheres (20,3%) justifica-se pela dependência destes estarem mais domiciliados do que outras faixas etárias, o que também foi mencionado em outros estudos (ROCHA et al., 2015; SILVA et al., 2014).

5.2. Polimorfismos da Região Promotora BAT1

Como era de se esperar, diversos polimorfismos foram encontrados em nosso estudo, no entanto, a maioria apresentou-se com baixas frequências (0,37% para -277, 1,5% para o -210, 2,3% para -245 e 3,4% para -223) (Figura 6) não sendo possível realizar análises de associação entre casos-controles, bem como com os níveis séricos de TNF. Além disso, coincidentemente para alguns pacientes portadores destes SNPs não foi possível dosar o TNF, incluindo o SNP -223, que apesar dos 3,4%, poucos tiveram seus níveis séricos dosados.

Wong e colaboradores (2003) revelaram cinco SNPs nos primeiros 500 pb da região promotora do BAT1 em haplótipos ancestrais de origem caucasiana, dentre os quais, os mesmos SNPs que encontramos nesse estudo. Destacamos que foi demonstrado pela primeira vez na literatura, o encontro do SNP -277 em uma amostra de um indivíduo portador de LC (Figura 7D).

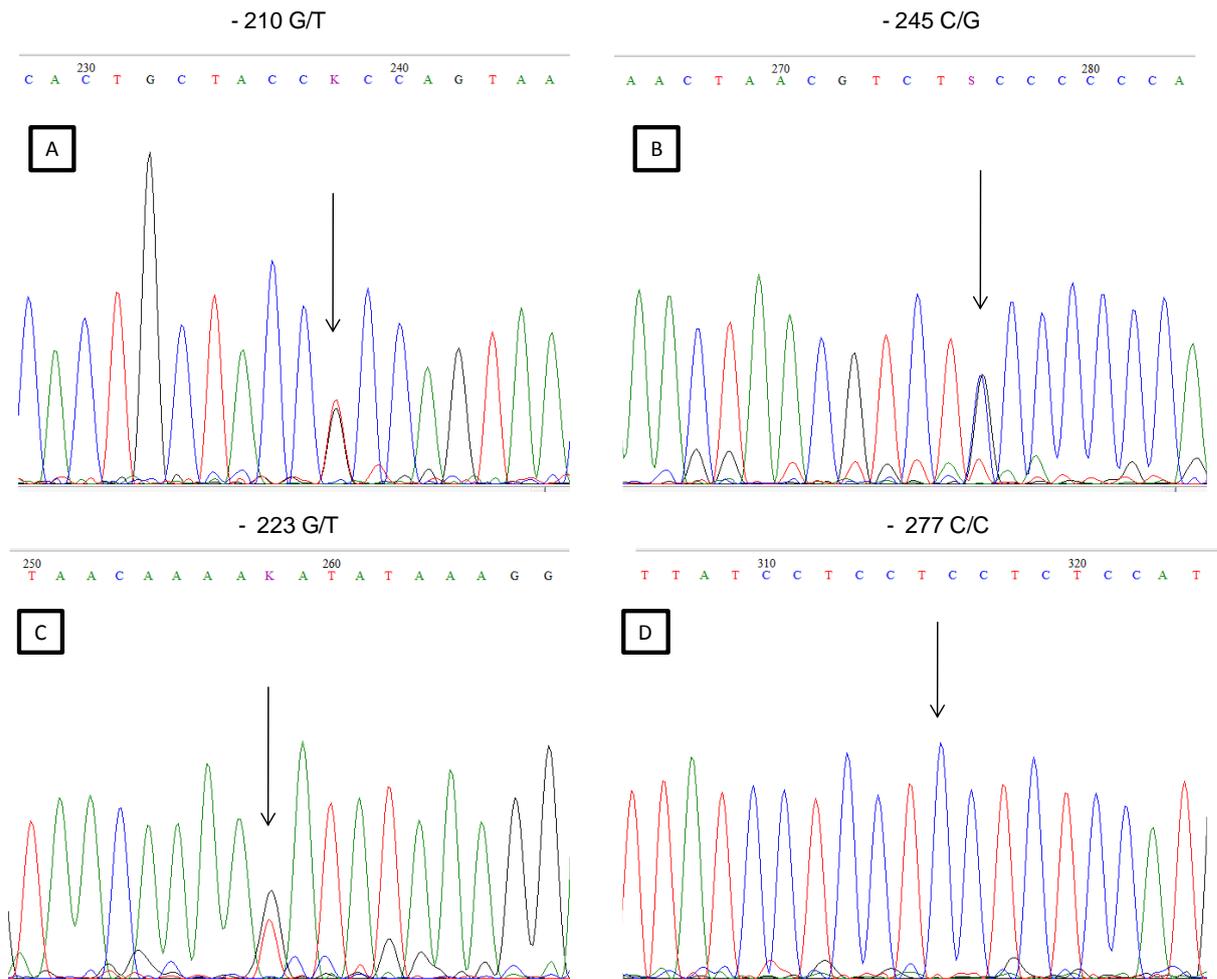


Figura 6 - Eletroferogramas demonstrando os polimorfismos -210 (A) -245 (B) -223 (C) e -277 (D) na Região Promotora do gene BAT1.

Todavia, os SNPs -22 (rs2239527) e -348 (rs2239528) (figura 7) foram os mais frequentes na população de estudo, dos quais somente estes foram possíveis associar aos níveis séricos de TNF.

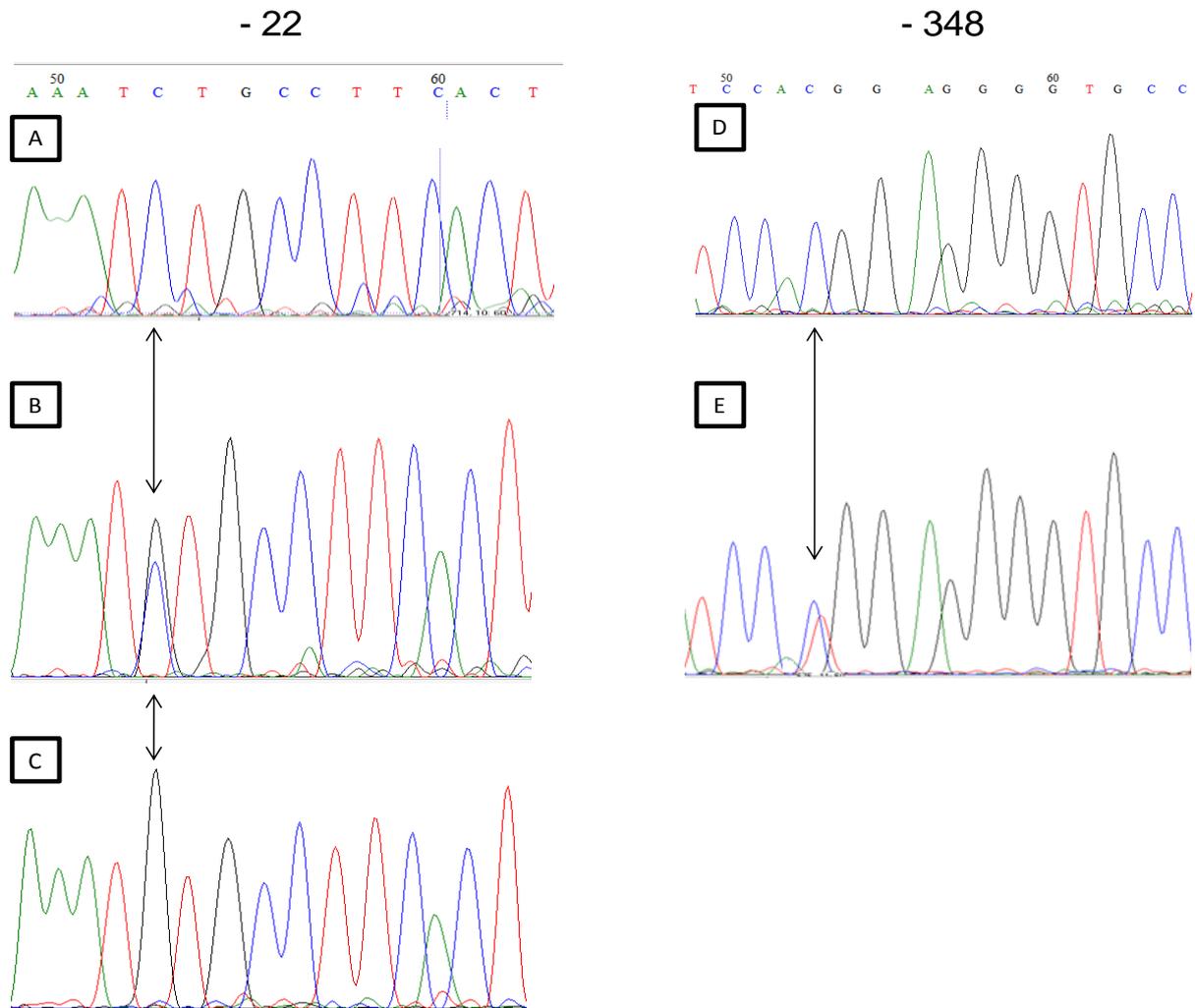


Figura 7 – Eletroferogramas demonstrando os polimorfismos -22 (A – Alelo CC; B – Alelo CG e C – Alelo GG) e -348 (D – Alelo CC e E – Alelo CT) da Região Promotora do gene BAT1.

As frequências encontradas dos SNPs -22 e -348 foram bem semelhantes entre casos (31,15% / 4,28%) e controles (25,78% / 6,91%), respectivamente. Análises entre casos e controles demonstraram não haver associação destes SNPs entre as duas populações.

5.3. Associação entre os níveis séricos de TNF-alfa e polimorfismo da região promotora do gene BAT1

As tabelas 4 e 5 demonstram as médias/desvio padrão (DP) dos níveis séricos de TNF-alfa entre os gêneros dos casos e dos controles, apresentando-se mais elevados nos casos do que controle ($p < 0,001$), independente do gênero ($p < 0,001$).

Na literatura, poucos trabalhos evidenciaram níveis séricos de TNF entre pacientes com leishmaniose e controles. Covas (2010) e Kerr (2016) revelaram concentrações séricas de

TNF menores em controles do que pacientes com Leishmaniose. Destacamos dois trabalhos que demonstraram níveis séricos elevados de TNF associados a dois SNPs da região promotora do gene BAT1 (-22 e -348) de pacientes portadores de malária (CONCEIÇÃO, 2016) e tuberculose (MENDONCA et al., 2014) e a doença de chagas (ALVARADO-ARNEZ et al., 2018).

Enfatizamos que nossos resultados também demonstraram associações significativas de níveis elevados de TNF envolvendo os portadores dos SNPs -22 e -348, porém, somente entre portadores de LC e não entre pessoas saudáveis, sendo este o primeiro trabalho a realizar esta associação.

Tabela 4 – Correlação entre os genótipos do SNP -22 e níveis séricos de TNF-alfa por população do estudo e gênero.

GRUPO	GENÓTIPO	N (%)	MÉDIA ± DP (pg/ml)	<i>p-value</i>	
CASOS	CC	176 (68,5)	21,32 ± 19,33	<0,001	
	CG	58 (22,6)	36,74 ± 22,11		
	GG	23 (8,9)	52,19 ± 18,43		
	Total	257	27,56 ± 22,23		
	CG+GG	81 (31,5)	41,13 ± 22,16		
	MAS	CC	138 (68)	21,05 ± 18,22	<0,001
		CG	46 (22,7)	36,99 ± 24,72	
		GG	19 (9,3)	50,77 ± 19,64	
		CG+GG	65 (32)	41,02 ± 24,04	
		FEM	CC	37 (69,8)	
CG	12 (22,6)		35,75 ± 5,76		
GG	4 (7,6)		58,95 ± 10,10		
CG+GG	16 (30,2)		41,55 ± 12,34		
CONTROLES	CC	118 (74,2)	17,15 ± 18,63	0,104	
	CG	32 (20,2)	19,77 ± 24,34		
	GG	9 (5,6)	32,15 ± 29,74		
	Total	159	18,53 ± 20,74		
	CG+GG	41 (25,8)	22,49 ± 25,75		

MAS	CC	68 (71,6)	17,41 ± 19,51	0,114
	CG	19 (20)	22,73 ± 28,50	
	GG	8 (8,4)	34,42 ± 30,95	
	CG+GG	27 (28,4)	26,19 ± 29,15	
FEM	CC	50 (78,1)	16,78 ± 17,54	0,960
	CG	13 (20,3)	15,45 ± 16,69	
	GG	1 (1,6)	13,930*	
	CG+GG	14 (21,9)	15,35 ± 16,04	

*Não foi possível definir o DP para esse dado.

Tabela 5 - Correlação entre os genótipos do SNP -348 e níveis séricos de TNF-alfa por população do estudo e gênero.

GRUPO	GENÓTIPO	N (%)	MÉDIA ± DP (pg/ml)	p-value	
CASOS	CC	246 (95,7)	25,58 ± 17,90	<0,001	
	CT	11 (4,3)	72,89 ± 49,33		
	Total	257	27,56 ± 22,23		
	MAS	CC	192 (94,6)		24,81 ± 16,46
CT		11 (5,4)	72,89 ± 49,33		
CONTROLES	CC	148 (93,1)	17,59 ± 18,95	0,036	
	CT	11 (6,9)	31,09 ± 36,54		
	Total	159	18,52 ± 20,74		
	MAS	CC	88 (92,6)	18,93 ± 20,67	0,140
		CT	7 (7,4)	32,20 ± 42,37	
	FEM	CC	60 (93,7)	15,62 ± 16,04	0,126
CT		4 (6,3)	29,16 ± 29,21		

Verificamos que independentemente de ter leishmaniose ou não, os níveis séricos de TNF estiveram elevados proporcionalmente na presença do alelo G, ou seja, a presença de alelos GG tiveram níveis mais elevados que CG e estes mais que os CC. Entretanto, enfatizamos que os níveis de TNF foram quase duas vezes mais elevados nos genótipos GG casos (52,19 ± 18,43) do que controles (32,15 ± 29,74) (p<0,001) (Tabela 4 e Figuras 8 e 9).

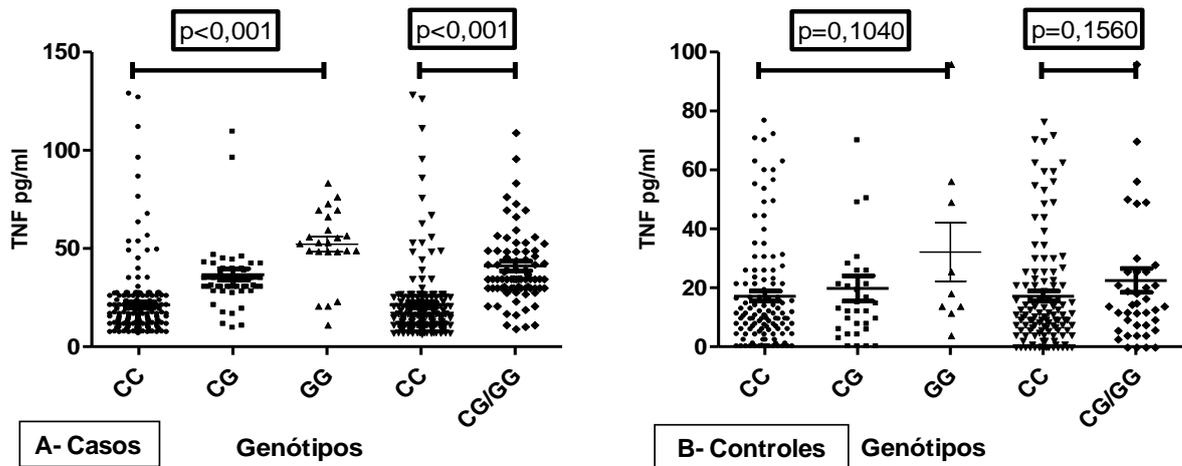


Figura 8 – Níveis séricos de TNF associados aos genótipos para o SNP -22 em casos (A) e controles (B)

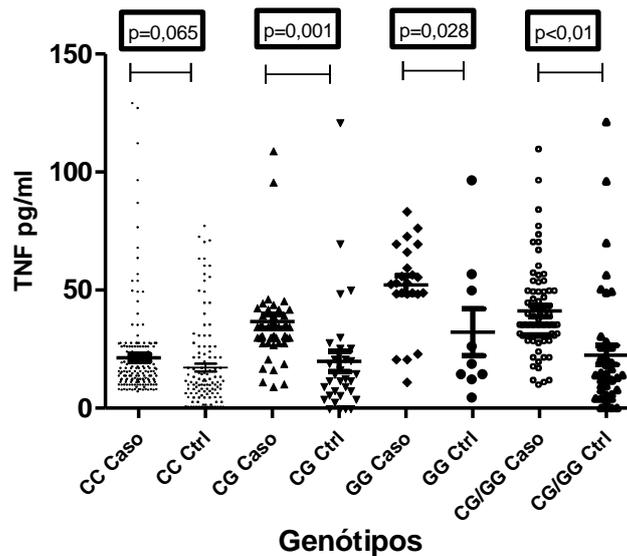


Figura 9 - Níveis séricos de TNF associados aos genótipos caso e controle (Ctrl) para o SNP - 22

Um resultado interessante encontrado foi a associação significativa do gênero entre os portadores do alelo G no SPN -22 e níveis séricos de TNF nos casos, mas não nos controles (figura 10). Acreditamos que pacientes do gênero masculino podem possuir maior suscetibilidade a leishmaniose e desta forma apresentar maior carga parasitária com consequente maior estado inflamatório com expressão de níveis mais elevados de citocinas inflamatórias como IL-10 e a própria TNF que estão correlacionados à gravidade da doença (GAUR DIXIT et al., 2018; TRAVI et al., 2002).

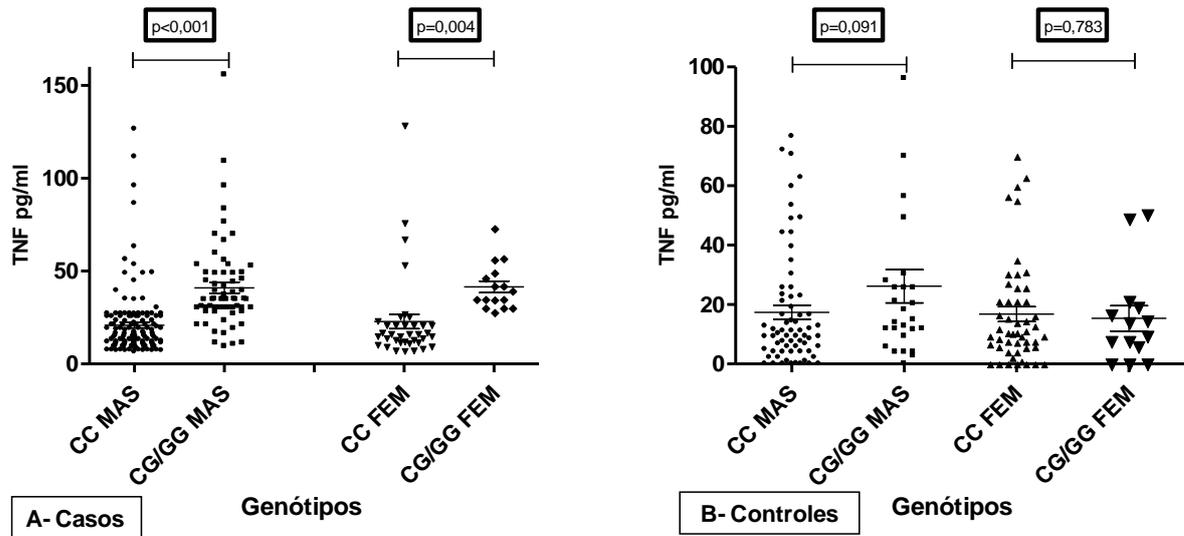


Figura 10 – Níveis séricos de TNF associado aos genótipos estratificados por gênero (MAS – Masculino e FEM – Feminino) entre casos (A) e controle (B) para o SNP -22

As análises de associações para o polimorfismo -348 foram somente realizadas entre os genótipos CC e CT, uma vez que não foi encontrada nenhuma amostra positiva para o genótipo TT. Importante destacar que para esse polimorfismo foram encontrados os mais elevados níveis séricos de TNF ($72,89 \pm 49,33$) em casos do que em -22 ($41,13 \pm 22,16$) no mesmo grupo (Tabela 4 e 5). Lembramos que apesar do número pequeno de amostras positivas, associações significativas foram demonstradas tanto para casos como para controles, fundamentado no mesmo entendimento que tivemos para os genótipos -22.

Ramasawmy e colaboradores (2006) sugeriram que o alelo de risco -348 T, quando comparado ao alelo -22 G, leva a uma elevada redução na transcrição de BAT1 contribuindo para uma intensa produção de citocinas pro inflamatórias. Nossos resultados respaldam esta fundamentação.

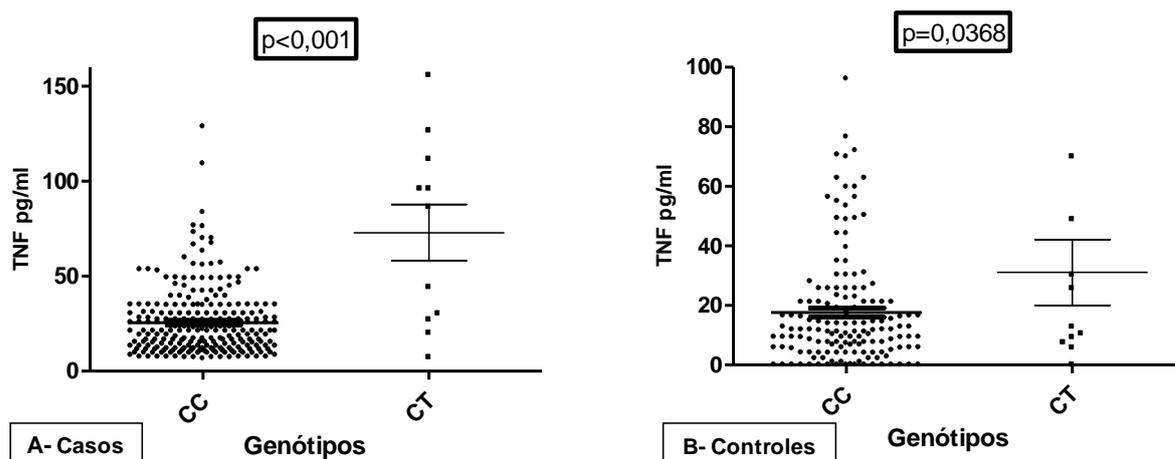


Figura 11 - Níveis de TNF associado aos genótipos para o SNP -348 na população caso (A) e controle (B)

Indagamos que ambos os genótipos -22 e -348 estão associados com o aumento nos níveis séricos de TNF independente se o individuo é portador de alguma inflamação. Entretanto, estes níveis foram bem mais elevados nos casos do que controles (Tabela 6).

Fundamentado nos achados separadamente demonstrados para cada genótipo, constatamos que o sinergismo entre eles elevaria ainda mais a expressão dos níveis séricos de TNF. A tabela 6 demonstra exatamente este argumento, onde níveis séricos de TNF estão mais elevados em portadores de dos alelos G (SNP -22) e T (SNP -348), concomitantemente (Tabela 6), contudo, bem mais elevados nos casos.

Tabela 6 - Frequência genotípica da combinação de ambos os SNPS – 22 e – 348 para casos e controle; média e desvio padrão (DP) de TNF-alfa por genótipo

GRUPOS	GENÓTIPO	N (%)	MÉDIA ± DP (pg/ml)	*p-value
CASOS	-22 (CC)/-348 (CC)	169 (97,7)	19,392 ± 14,529	<0,001
	-22 (CG+GG)/-348 (CT+TT)	4 (2,3)	81,605 ± 56,984	
	Total	173 (100)	20,830 ± 18,728	
CONTROLES	-22 (CC)/-348 (CC)	110 (97,4)	16,501 ± 18,218	0,018
	-22 (CG+GG)/-348 (CT+TT)	3 (2,6)	44,660 ± 66,543	
	Total	113 (100)	17,249 ± 20,561	

*Fisher test

Variantes no gene BAT1 alteram a ligação dos fatores de transcrição (YY1 e Oct1) afetando a transcrição desse gene com efeito sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ALLCOCK; WILLIAMS; PRICE, 2001; HORTON et al., 2008).

Nossos resultados reforçam o papel do BAT1 a partir de evidências de que a presença do polimorfismo afeta indiretamente a expressão de TNF. Dessa forma acreditamos que isto pode influenciar no desfecho e manifestação clínica do paciente com Leishmaniose, principalmente na apresentação das lesões cutâneas, uma vez que existe uma correlação entre diâmetro da lesão na LC e a frequência de produção de citocinas inflamatórias (ANTONELLI et al., 2004).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados gerados neste estudo pode-se concluir que:

- A incidência mais elevada de leishmaniose foi no gênero masculino entre 19 a 39 anos de idade;
- Não foi encontrada associação dos genótipos e a susceptibilidade a leishmaniose nessa população;
- Alelos G (-22) e T (-348) estiveram associados a níveis mais elevados de TNF, principalmente em casos e independente do gênero;
- Alelo T (-248) apresentaram os maiores níveis para TNF do que -22 (G).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALLCOCK, R. J. N.; WILLIAMS, J. H.; PRICE, P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. **Genes to Cells**, v. 6, n. 5, p. 487–494, 2001.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVARADO-ARNEZ, L. E. et al. Single nucleotide polymorphisms of cytokine-related genes and association with clinical outcome in a Chagas disease case-control study from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, p. 1–12, 2018.
- ANTONELLI, L. R. V et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–348, 2004.
- BARBIER, D. et al. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. **Tissue Antigens**, v. 30, n. 2, p. 63–67, 1987.
- BARBOSA, M. D. G. V. et al. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazona. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 485–491, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- CABRERA, M. et al. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. November, p. 1259–1264, 1995.
- CARVALHO, L. P.; PASSOS, S. T.; JESUS, A. R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 1, p. 57–65, 2005.
- CONCEIÇÃO, E. L. **Avaliação de fatores genéticos e imunológicos relacionados à imunopatogênese da tuberculose e co-infecção TB-HIV**. 2016: Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador., 2016.
- CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 444–448, 1993.

COTTON, J. A. The Expanding World of Human Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. xx, n. yy, p. 4–7, 2017.

COVAS, C. DE J. F. **Estudo da influência de polimorfismos nos genes IL-10, IL-12, MIF e TNF na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar americana**. [s.l.] 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

CRUVINEL, W. DE M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132–141, 2002.

DATASUS. **Departamento de Informática do SUS. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 10 abril de 2017.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

DE ARAUJO, F. J. et al. Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by leishmania guyanensis in the amazonas state of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2015.

FMT-HVD. **Doenças e Agravos**. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg/Doencas_e_Agravoslist.asp>. Acesso em: 16 maio. 2017.

GAUR DIXIT, U. et al. Epidemiological and Experimental Evidence for Sex-Dependent Differences in the Outcome of Leishmania infantum Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 142–145, 10 jan. 2018.

GONTIJO, B. C.; RIBEIRO, M. DE L. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GRUEN, J. R.; WEISSMAN, S. M. Human MHC class III and IV genes and disease associations. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, n. March, p. 960–972, 2001.

GUERRA, J. A. D. O. et al. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, v. 22, n. 11, p. 2319–2327, 2006.

GUERRA, J. A. D. O. et al. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 9, p. 2215–2223, 2007.

GUERRA, J. A. O. et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of amazonas: What have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.

48, n. December 2013, p. 12–19, 2015.

HORTON, R. et al. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: The MHC Haplotype Project. **Immunogenetics**, v. 60, n. 1, p. 1–18, 2008.

JANEWAY, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 13, p. 1167–1171, 2001.

KAMALI-SARVESTANI, E. et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. **Cytokine**, v. 35, n. 3–4, p. 159–165, 2006.

KERR, H. K. A. **Variantes de TNFA em pacientes com leishmaniose cutânea causada por Leishmania guyanensis no estado do Amazonas**. [s.l.] 2016. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2016.

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 4, p. 294–305, 2006.

LÓPEZ-JARAMILLO, P. et al. A controlled, randomized-blinded clinical trial to assess the efficacy of a nitric oxide releasing patch in the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (V.) panamensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 97–101, 2010.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MAGALHÃES, P. S. C. DE; BÖHLKE, M.; NEUBARTH, F. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. **Revista Medicina UCPEL**, v. 2, n. 1, p. 54–59, 2004.

MATTA, N. E. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon highland. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 339–344, 2009.

MENDONÇA, V. R. R. et al. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria journal**, v. 13, p. 278, 2014.

MERA-RAMÍREZ, A. et al. Screening of TNF α , IL-10 and TLR4 single nucleotide polymorphisms in individuals with asymptomatic and chronic cutaneous leishmaniasis in Colombia: a pilot study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 177, 2017.

MITCHISON, N. A. Polymorphism in regulatory gene sequences. **Genome Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2000.

MOMENI, A. Z.; AMINJAVAHERI, M. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. **International Journal of Dermatology**, v. 33, n. 4, p. 260–265, 1994.

MOSSER, D. M.; WEDGWOOD, J. F.; EDELSON, P. J. Leishmania amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 6, p. 4128 LP-4131, 1 jun. 1985.

MURBACK, N. D. N. et al. Leishmaniose tegumentar americana: Estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55–63, 2011.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 498, 2011.

OLIVEIRA, D. A. DOS S.; FELICIANO, M.; BRAGA, P. E. T. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana na serra da meruoca, ceará, no período de 2001 a 2012. **SANARE**, v. 13, n. 2, p. 36–41, 2012.

OLIVEIRA, L. C. **Estudo do polimorfismo genético na hepatite auto-imune na infância: busca de genes e haplótipos de suscetibilidade**. 2008: Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PEELMAN, L. J. et al. The BAT1 gene in the MHC encodes an evolutionarily conserved putative nuclear RNA helicase of the DEAD family. **Genomics**, v. 26, n. 2, p. 210–218, 1995.

PINHEIRO, R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos , tratamento e profilaxia. **Informa**, v. 16, p. 79–82, 2004.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1390–1395, 1993.

PRICE, P. et al. Polymorphisms at positions -22 and -348 in the promoter of the BAT1 gene affect transcription and the binding of nuclear factors. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 9, p. 967–974, 2004.

PUENTES, S. M. et al. Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 3, p. 887–902, 1988.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4311 LP-4316, 15 dez. 1990.

QUIÑONES-LOMBRAÑA, A. et al. BAT1 promoter polymorphism is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. 741 LP-744, 1 maio 2008.

RAMASAWMY, R. et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 10, p. 1394–9, 2006.

RAMASAWMY, R. et al. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 5, p. 607–613, 2010.

REIS, L. D. C. et al. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

ROCHA, T. J. M. et al. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 4, p. 49–54, 2015.

ROMERO, G. A. S. et al. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Tropica**, v. 82, n. 1, p. 25–29, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHASTRY, B. S. SNP alleles in human disease and evolution. **Journal of human genetics**, v. 47, n. 11, p. 561–566, 2002.

SILVA, P. L. NO. DA et al. Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana no Norte de Minas Gerais. **Revista Norte Mineira de Enfermagem**, v. 2, n. 1, p. 43–50, 2014.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com nfase à doença causada por *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* e *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2008.

SPIES, T. et al. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. **Science**, v. 243, n. 4888, p. 214–217, 1989.

THOMAS SPIES, GEORGE BLANCK, MAUREEN BRESNAHAN, J. S. AND J. L. S. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. **Science**, 1989.

TRAVI, B. L. et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica : Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.

WHO. **World Health Organization. Epidemiological situation. 2017. Disponível: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 abril de 2017. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 abr. 2017.**

WONG, A. M. L. et al. Alleles of the proximal promoter of BAT1, a putative anti-inflammatory gene adjacent to the TNF cluster, reduce transcription on a disease-associated MHC haplotype. **Genes to Cells**, v. 8, n. 4, p. 403–412, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Información general: Leishmaniasis**.

XIE, T. et al. Analysis of the Gene-Dense Major Histocompatibility Complex Class III Region and Its Comparison to Mouse Analysis of the Gene-Dense Major Histocompatibility Complex Class III Region and Its Comparison to Mouse. **Genome research**, p. 2621–2636, 2003.

ANEXOS**ANEXO A**

Número do Prontuário _____ Número da Ficha _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E NA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UMA POPULAÇÃO CASO-CONTROLE DE MANAUS, AMAZONAS.

Introdução: Você está sendo convidado para participar do projeto de pesquisa citado acima. Este estudo será coordenado pelo Dr. Rajendranath RAMASAWMY pesquisador visitante sênior e professor permanente do programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas da UEA/FMT-HVD. Antes de tomar qualquer decisão, é importante que você leia e compreenda as seguintes explicações sobre o procedimento proposto. Esta declaração descreve o objetivo, procedimento, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

Justificativa: Leishmaniose tegumentar ou ferida braba é uma doença causada por um pequeno parasita que fica na pele, mas existem diferentes espécies de parasito que podem causar a mesma doença, assim sendo, é importante saber qual o tipo de parasito que pode estar causando sua doença, ou se você não teve essa doença queremos saber se você tem mais possibilidade de contraí-la de que outra pessoa. Dessa forma, queremos que você participe deste estudo permitindo que seja retirada uma pequena amostra de sangue da sua veia pra fazermos testes que vão nos dizer se você tem mais chance de ter leishmaniose causada pela parasita *Leishmania guyanensis* do que outra pessoa. Caso você tenha essa doença queremos saber se você tem no seu organismo (na parte genética) capacidade de boa cicatrização, após ter sido tratado com um medicamento específico para essa doença.

Métodos: Caso você concordar em participar desse estudo, você será submetido a um exame médico, e uma coleta de 5 mL de sangue do seu antebraço, com uma agulha nova

descartável, após a assepsia local (limpeza). Se o médico suspeitar que você tenha leishmaniose, você poderá ser submetido ainda a uma coleta para biópsia de pele realizada por um dos médicos (Dr. Jorge Guerra ou Dra Anette Talhari) integrantes da equipe. Os indivíduos não afetados por leishmaniose e sem histórico de leishmaniose, que procurem o ambulatório de dermatologia da FMT-HVD, serão selecionados para e, caso aceitem participar, comporão o grupo controle. Os indivíduos que, depois de examinados pelo dermatologista, forem caracterizados como não afetados por leishmaniose, e que não apresentarem história de infecções crônicas, inflamação e doenças auto-imunes, serão considerados candidatos. A biópsia será utilizada para identificação do parasita que está causando sua doença. A biópsia é um procedimento no qual se colhe uma pequena quantidade de pele, isto é, uma amostra, de tecido ou células, para posterior estudo em laboratório. A grande maioria dos pequenos procedimentos de biópsia é muito segura, tendo apenas um pequeno risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Ela é feita após anestesia local na borda local da ferida e depois de isso retirar um pequeno pedaço de pele com auxílio de instrumento cortante esterilizado chamado de punch. A amostra de sangue servirá para saber o que queremos através de testes realizados no laboratório, além disso, com sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos participantes do estudo para comparar o resultado dos testes feitos em seu sangue e a resposta de seu tratamento.

1) Local do estudo

Os procedimentos descritos acima serão realizados no ambulatório de Dermatologia (avaliação clínica e biópsia) sob a responsabilidade do Dr. Jorge Guerra ou Dra. Anette Talhari, médicos integrantes da equipe de pesquisa e nos laboratórios da FMT-HVD sob a responsabilidade do Dr. Rajendranath Ramasawmy.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Número do Prontuário _____

Número da Ficha _____

2) Permissão para estocagem

Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem (guarda ou armazenamento) de sua amostra de biópsia, soro e de DNA na FMT-HVD sob a responsabilidade do Dr. Rajendranath Ramasawmy de acordo com a resolução CNS N°441 de 12 de maio de 2011 e da

portaria N°00212/2012-GDP/FMT-HVD. Se assinar esse termo de consentimento, você está autorizando estocagem de longo prazo das amostras para estudos futuros. Isso evitará procedimentos como nova coleta de sangue bem como a diminuição de recursos financeiros para novos procedimentos.

A sua amostra de DNA será mantida indefinidamente. Isto significa que a sua amostra não será destruída após um determinado período de tempo, mas sim será estocada pelo tempo que ela durar. Amostras estocadas serão usadas exclusivamente para fins de pesquisas e poderão ser utilizadas para outros estudos a respeito da susceptibilidade à leishmaniose. O uso de sua amostra estocada terá como condição uma nova avaliação e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética pertinente. Sua permissão será solicitada. Se você concorda, você será pedir de assinar um novo TCLE com as justificativas e especificidades.

3) Risco físico para saúde/desconfortos

Os riscos físicos para a saúde na participação deste estudo são limitados ao procedimento de biópsia e coleta de sangue, ambos de rotina nos laboratórios clínicos. Em ambos os casos, você poderá sentir um desconforto temporário devido à introdução da agulha. A grande maioria dos procedimentos de biópsia é muito segura, tendo apenas um risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Ela é feita após anestesia local na borda local da ferida e depois de isso retirar um pequeno pedaço de pele com auxílio de instrumento cortante esterilizado chamado de punch. Durante a realização de biópsia, pode ocorrer pequeno sangramento que acostuma regredir em seguida. Pode também acontecer infecção se não houver cuidado de limpeza durante e depois desse procedimento. De qualquer maneira, você receberá uma pomada de antibiótico para evitar infecção. Entretanto, caso você tenha febre ou dor, "inchaço" (edema), rubor ou sangramento no local de biópsia deve procurar a equipe da pesquisa (Dr. Jorge Guerra ou DraAnetteTalhari). Existe também a possibilidade de risco de perda da confidencialidade tal como outras pessoas poderiam ter acesso aos seus dados e identificá-lo. Entretanto, serão tomados cuidados especiais para que isso não aconteça pois, sua identificação será feita por meio códigos. O seu nome não estará visível nos frascos contendo as amostras biológicas, elas serão codificadas para evitar o risco de perda da confidencialidade.

4) Indenização e compensação por danos

Se você desenvolver uma infecção localizada devido ao procedimento de coleta de sangue ou biópsia, você será assistido pelo Dr. Jorge Guerra ou a DraAnetteTalhari, médicos

integrantes da equipe de pesquisa no FMT-HVD. O custo desse tratamento será totalmente coberto pelo projeto. Qualquer dano decorrente de sua participação somente neste estudo referente a qualquer procedimento relacionado, você será assistido na FMT-HDV e terá direito a indenizações ou ressarcimentos em casos de danos decorrentes de sua participação no estudo.

5) Desligamento

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios os quais você tenha direito.

Se você estiver afetado pela leishmaniose, acesso a procedimentos médicos para diagnósticos e tratamento da doença será providenciado mesmo que não queira participar deste estudo.

Se você não estiver afetado pela leishmaniose, você está sendo convidado a participar do estudo como parte do grupo controle ou como familiar do afetado. Neste caso, sua decisão de participar ou não, ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos médicos para diagnóstico ou tratamento da leishmaniose que você possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos médicos necessários a algum familiar ou contato afetado pela leishmaniose.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Número do prontuário:_____ Número da Ficha:_____

6) Custo para os participantes

No caso de você decidir participar do estudo, você não terá nenhum custo. Custos com testes laboratoriais e análises de suas amostras na pesquisa serão cobertos pelo estudo.

7) Benefícios

Em longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência à leishmaniose e seu tratamento, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos

científicos adicionais sejam alcançados, com conseqüente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela leishmaniose.

8) Reembolso

Já que não haverá gastos adicionais de transporte e alimentação devido a sua participação no estudo, você não será reembolsado por participar deste estudo.

9) Exclusividade de uso de material genético e biológico

Amostras de DNA serão utilizadas apenas para pesquisa de susceptibilidade à leishmaniose. Todos os resultados obtidos no estudo, após análise do conjunto completo dos dados, serão publicados em artigos científicos. É importante reafirmar que o alvo de nossos estudos é a identificação do fator de risco genético à leishmaniose e contribuição no entendimento do mecanismo da doença.

10) Confidencialidade dos dados

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. Nenhuma informação genética individual será tornada pública. As informações serão codificadas e mantidas em local protegidas o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para os arquivos de computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida. Você tenha direito de conhecer os resultados dos testes laboratoriais que serão realizados. Os resultados da pesquisa em nenhum momento irão interferir no tratamento já preconizado.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E NA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UMA POPULAÇÃO CASO-CONTROLE DE MANAUS, AMAZONAS.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Se você tiver qualquer dúvida no futuro sobre sua participação neste estudo, você pode e deve utilizar os seguintes meios de contato com os pesquisadores responsáveis:

Dra Anette TALHARI	(92) 2127 3429	anette@dermatologiatalhari.com.br
Dr Jorge GUERRA	(92) 2127 3429	jguerra291@gmail.com
Dr Rajendranath RAMASAWMY	(92) 2127 3447	mailto:ramasawm@gmail.com

Para quaisquer informações, fica disponibilizado o endereço do CEP/FMT-HVD, sito à Av. Pedro Teixeira nº25 Dom Pedro I, Cep 69040-000, Manaus-AM, que funciona de 2ª a 6ª feira, das 08:00 às 14:00 horas, telefone (92)2127-3572, e-mail: CEP@fmt.am.gov.br

Consentimento

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento em participar do estudo, até que eu decida o contrário.

_____	_____
Assinatura ou impressão digital do voluntário	Nome completo e nº do prontuário

_____	_____
Assinatura do entrevistador	Nome do entrevistador

_____	_____
Assinatura testemunha 1	Assinatura testemunha 2

Data: ____/____/____



Eu, Rajendranath Ramasawmy, coordenador do projeto intitulado: “*Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea em uma população caso-controle de Manaus, Amazonas*”, manifesto perante a CEP da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado, o meu compromisso que o projeto terá início após a aprovação pelo CEP e terá duração de 36 meses.

Assinatura

Nome: Rajendranath Ramasawmy

CPF: 230660558-09

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, Rajendranath Ramasawmy, coordenador do projeto intitulado: “*Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea em uma população caso-controle de Manaus, Amazonas*”, manifesto perante a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado, o meu compromisso de uso e metodologia de identificação que assegure o sigilo e garanta respeito e confidencialidade dos indivíduos envolvidos na pesquisa supracitados, bem como assegurar que o sistema de identificação, utilizado garanta a recuperação de informações dos indivíduos pesquisados, visando possível necessidade de fornecimento de informações de interesse ou para obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa.

Autorizo a instituição a avaliar com prioridade absoluta os meus atos a partir do momento em que haja dúvida sobre as amostras biológicas a serem armazenadas.

Concordo expressamente com as propostas deste termo, pelo que subscrevo-me.

Assinatura

Nome: RajendranathRamasawmy

CPF: 230660558-09

Local: Manaus Data: 30 de Outubro de 2012

ANEXO B

Projeto Imunogenética da Leishmaniose

Identificação do voluntário:

1. Nome: _____
2. Gênero: Masc()Fem ()
3. D/N___/___/_____
4. Idade:_____
5. Etnia: Branco: (); Misto (); Índio: ()
Outro(qual):_____
6. Tipo e local de trabalho:_____

Dados para contato:

1. Telefone:_____
2. Endereço:_____
3. Referência:_____
4. Tempo de Residência:_____
5. Histórico de Residência (onde já morou e por quanto tempo):_____

Dados Clínicos:

1. Já teve leishmaniose ? Sim () Não ()
 - a) Se Sim (grupo caso):
 - i) Caso ativo ou histórico? Ativo () Histórico ()
 - ii) Teve mais de uma vez (se sim, responder iii a viii para cada episódio): Sim () Não ()
 - iii) Data de diagnóstico:___/___/_____
 - iv) Forma clínica: cutânea () Mucosa ()
 - v) Local de provável infecção:_____
 - vi) Tratamento:_____
 - vii) Reposta ao tratamento: Sim () Não ()
 - viii)Se caso histórico: Sim () Não ()
 - b)Se não (grupo controle) - confirmado por ausência de cicatriz

2. Já teve malária? Sim () Não ()

a) Se Sim quantas: _____

3. Já teve outras doenças ? _____

4. Prontuário da FMT-HVD: _____