



**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
BAHIA**



**Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO EM GENES  
ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CURA DE LESÕES  
E O DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

**Lucas Frederico de Almeida**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2012**

F8729 Frederico de Almeida, Lucas

Estudo do polimorfismo em genes envolvidos no processo de cura de lesões e o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar americana/Lucas Frederico de Almeida – Salvador: L. Frederico de Almeida, 2012.

IX, 119p.: il.

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunogenética de Doenças Infecciosas.

1. Leishmaniose; 2. Polimorfismo genético; 3. TGF- $\beta$ ; 4. Cura de lesão. I. Título.

CDU: 616.993.161:575



**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
BAHIA**

**Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde**



**ESTUDO DO POLIMORFISMO EM GENES ENVOLVIDOS NO  
PROCESSO DE CURA DE LESÕES E O DESENVOLVIMENTO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**Lucas Frederico de Almeida**

**Professor-orientador: Léa Castellucci**

**Dissertação apresentada ao Colegiado do  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal da Bahia,  
como pré-requisito obrigatório para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciências da  
Saúde, da área de concentração em  
Imunogenética de Doenças Infecciosas**

**Salvador (Bahia), 2012**

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- *National Institute of Health* NIH Grant AI-30639
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### Membros titulares:

- Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima, Professora Adjunta de Genética Humana, Instituto de Biologia, UFBA.
- Lucas Pedreira de Carvalho, Professor de Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, e Professor do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UFBA.
- Nicolaus Albert Borges Schriefer, Professor Adjunto de Parasitologia, UFBA, e Professor do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UFBA.

### Membros suplentes:

- Léa Castellucci (Professor-orientador), Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UFBA.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade”.

(Carlos Drummond de Andrade)

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Silvio e Conceição, às minhas irmãs,  
Tatiana e Mirela, e aos meus  
sobrinhos, Clarisse e Eduardo.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A Léa Castellucci, minha gratidão e amizade, pelo exemplo de pesquisadora, líder, orientadora e amiga, sempre estimulando e respeitando os limites do outro. Minha profunda admiração por seu vasto conhecimento, inteligência e rapidez de pensamento. Disponha da minha amizade sincera. Meu eterno agradecimento.



## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edgar Carvalho, pela confiança e por ter-me aberto as portas do Serviço de Imunologia.

A Ednaldo Lago, companheiro essencial na área endêmica, pela solicitude com que pude contar durante a realização deste trabalho.

A equipe médica que dá suporte clínico na área endêmica. Gostaria de registrar o nome de Luiz Henrique Guimarães, pela amizade e proximidade.

A toda equipe do Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos, de maneira especial, Joyce Oliveira e Andréa Magalhães, pelo carinho e convivência diária.

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra, por atenderem às solicitações do nosso grupo de maneira tão colaborativa.

Aos pacientes da área endêmica, por nos receberem em seus lares e colaborarem com a nossa pesquisa de forma tão generosa.

A todos, meus sinceros agradecimentos, certo que esse contato, esse apoio, essa rede humana formada, profissional e emocional, foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, assim como, para o meu desenvolvimento pessoal.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
<b>I. RESUMO</b>	<b>14</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
II. 1. Principal	15
II. 2. Secundários	15
<b>III. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>IV. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
IV. 1. Epidemiologia e aspectos clínicos	18
IV. 2. Imunopatogênese da leishmaniose	22
IV. 3. Modelo experimental murino para leishmaniose	27
IV. 4. Fatores genéticos na leishmaniose	31
IV. 5. Via de sinalização de TGF- $\beta$	35
<b>V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
V. 1. Área de estudo	39
V. 2. Definição de casos	40
V. 2.1. Leishmaniose cutânea	40
V. 2.2. Leishmaniose mucosa	40
V. 3. Desenho do estudo	41
V. 3.1. Fluxograma ilustrativo do estudo	43
V. 4. Extração de DNA	44

V. 5. Genotipagem	45
V. 6. Análise estatística	48
V. 7. Aspectos éticos da pesquisa	48
<b>VI. ARTIGO</b>	<b>49</b>
<b>VII. RESULTADOS GERAIS</b>	<b>61</b>
VII. 1. Análise da distribuição das frequências gênicas na população estudada	61
VII. 2. Análise de associação entre os genes avaliados e o fenótipo leishmaniose cutânea (LC)	64
VII. 3. Análise de associação entre os genes avaliados e o fenótipo leishmaniose mucosa (LM)	66
VII. 4. Análise de associação entre os genes avaliados e o fenótipo leishmaniose <i>per se</i>	67
VII. 5. Avaliação do desequilíbrio de ligação entre os marcadores dos genes estudados na população de Corte de Pedra	69
VII. 6. Avaliação da possível interatividade entre os genes estudados	73
<b>VIII. DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO</b>	<b>81</b>
<b>X. CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
<b>XI. SUMMARY</b>	<b>84</b>
<b>XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>
<b>XIII. ANEXOS</b>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos de leishmaniose tegumentar atendidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, Bahia, entre 2006 e 2011	21
Tabela 2: Características da amostra coletada	42
Tabela 3: Informações dos marcadores polimórficos genotipados para <i>TGFBI</i> , <i>TGFBR1</i> , <i>TGFBR2</i> , <i>CTGF</i> , <i>SMAD2</i> e <i>FLII</i>	46
Tabela 4: Frequências alélicas dos marcadores do gene <i>TGFBI</i> na população de Corte de Pedra, Bahia	61
Tabela 5: Frequências alélicas dos marcadores do gene <i>TGFBR1</i> na população de Corte de Pedra, Bahia	62
Tabela 6: Frequências alélicas dos marcadores do gene <i>TGFBR2</i> na população de Corte de Pedra, Bahia	62
Tabela 7: Frequências alélicas dos marcadores do gene <i>CTGF</i> na população de Corte de Pedra, Bahia	62
Tabela 8: Frequências alélicas dos marcadores do gene <i>SMAD2</i> na população de Corte de Pedra, Bahia	63
Tabela 9: Frequências alélicas dos marcadores do gene <i>FLII</i> na população de Corte de Pedra, Bahia	63
Tabela 10: Resultados da análise de associação entre os genes <i>TGFBR2</i> , <i>SMAD2</i> e <i>CTGF</i> e o fenótipo LC	65
Tabela 11: Resultados da análise de regressão logística condicional robusta entre o gene <i>FLII</i> e o fenótipo LC	66
Tabela 12: Resultados da análise de associação entre os genes <i>TGFBR2</i> , <i>SMAD2</i> e <i>CTGF</i> e o fenótipo leishmaniose <i>per se</i>	68
Tabela 13: Resultados da análise de regressão logística condicional robusta entre o gene <i>FLII</i> e o fenótipo leishmaniose <i>per se</i>	68
Tabela 14: Resultados da análise de regressão logística incondicional inter-locus	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização do gene da citocina TGF- $\beta$	38
Figura 2: Fluxograma ilustrativo do estudo	43
Figura 3: Imagem ilustrativa de uma placa de genotipagem para o SNP rs1800469 do gene <i>TGFB1</i>	47
Figura 4: mapas dos padrões de desequilíbrio de ligação entre os SNPs dos genes <i>TGFB1</i> e <i>TGFBR1</i>	70
Figura 5: Mapa do padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene <i>TGFBR2</i>	71
Figura 6: Mapas dos padrões de desequilíbrio de ligação entre os SNPs dos genes <i>CTGF</i> e <i>FLII</i>	71
Figura 7: Mapa do padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene <i>SMAD2</i>	72

## I. RESUMO

Após a infecção por *Leishmania braziliensis*, a maioria dos indivíduos desenvolve a leishmaniose cutânea (LC) e um pequeno percentual, as formas mucosa (LM) e disseminada (LD). No camundongo, o mapeamento de regiões gênicas ligadas ao controle da LC causada por *Leishmania major* demonstrou que genes de ação no reparo tecidual estão associados com cura mais rápida das lesões em animais resistentes. Este trabalho tem como objetivo avaliar o polimorfismo de genes da via da ativação da citocina TGF- $\beta$ , trabalhando com a hipótese de que genes associados com cura de lesão, mapeados em camundongo, poderiam ser também importantes biomarcadores de doença humana causada por *L. braziliensis*. Este foi um estudo de associação utilizando modelo familiar. Genotipamos amostras de 225 famílias selecionadas a partir de fichas clínicas do Posto de Saúde de Corte de Pedra – Bahia, área endêmica de *L. braziliensis*. Foram escolhidos vinte marcadores de seis genes, *TGFBI*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *CTGF*, *SMAD2* e *FLII*. Através de análise de regressão logística condicional, o presente estudo demonstrou uma associação entre a LC e o fenótipo leishmaniose *per se* (LC e LM) e os genes *FLII*, *CTGF* e *SMAD2*. A associação observada para o gene *FLII* segue o mapeamento genético e funcional de genes do cromossomo 9 murino, que identificou *Fli1* como novo candidato influenciando resistência a *L. major*. Adicionalmente, nossos dados sugerem que polimorfismos nos genes *CTGF* e *SMAD2* são fatores de risco para a LC e, portanto, a regulação fisiológica dos processos de cicatrização é importante na cura de lesões de leishmaniose. Estudos adicionais serão importantes para determinar o real papel de genes destas importantes vias, incluindo a regulação de *FLII* e *CTGF* durante a evolução natural da doença. Isso incluiria analisar os níveis de expressão destes genes em biópsias de tecido de indivíduos infectados por *L. braziliensis* para avaliar seu potencial como alvo terapêutico. Os resultados deste estudo reforçam o potencial papel de genes associados com a cicatrização das lesões na LC, e sugerem que uma análise mais ampla das vias envolvidas neste tipo de resposta pode contribuir para um melhor entendimento da patogênese da doença.

**Palavras-chave:** leishmaniose, polimorfismo genético, TGF- $\beta$ , cura de lesão

## II. OBJETIVOS

### II. 1. PRINCIPAL

Estudar o papel do polimorfismo em genes envolvidos no processo de cura de lesões e reparo tecidual no desenvolvimento de leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa em uma população da Bahia.

### II. 2. SECUNDÁRIOS

1. Avaliar o polimorfismo nos genes *TGFB1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *CTGF*, *SMAD2* e *FLII* e a sua possível associação com desenvolvimento de leishmaniose tegumentar (nas formas cutânea e mucosa da doença);
2. Analisar o grau de desequilíbrio de ligação entre os marcadores dos genes *TGFB1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *CTGF*, *SMAD2* e *FLII* testados na população estudada.
3. Determinar a possível interatividade entre os genes *TGFB1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *CTGF*, *SMAD2* e *FLII*.

### III. INTRODUÇÃO

A resolução de uma doença infecciosa requer um controle preciso do delicado balanço imunológico entre a eliminação do organismo invasor e a autodestruição do tecido invadido. A leishmaniose é um excelente exemplo da complexa interação entre hospedeiro e parasita. Diferentes espécies de *Leishmania* causam diferentes formas clínicas e a gravidade da doença causada por qualquer parasita pode variar bastante entre os indivíduos (Convit *et al.*, 1972; Bradley, 1974). Desse modo, a leishmaniose apresenta um largo espectro clínico, o qual pode sofrer a influencia de um grande número de variáveis que determinam o fenótipo observado. Uma série de estudos genéticos (Cabrera *et al.*, 1995; Castellucci *et al.*, 2006; Salhi *et al.*, 2008; Castellucci *et al.*, 2010; Ramasawmy *et al.*, 2010) identificou vários genes candidatos (*TNFA*, *IL6*, *IL10*, *SLC11A1*, *CXCR1*, *MCPI*), cujas respostas pró e antiinflamatórias são críticas na regulação do desfecho das formas clínicas observadas na infecção por *L. braziliensis* em humanos. No camundongo, o mapeamento de regiões gênicas ligadas ao controle da leishmaniose cutânea (LC) causada por *Leishmania major* demonstrou um controle genético complexo (Mock *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1993; Beebe *et al.*, 1997; Lipoldová *et al.*, 2000; Havelková *et al.*, 2006; Sakthianandeswaren *et al.*, 2009), entre os quais um papel particular para genes de ação no reparo e cura de lesões (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005), mostrando que a habilidade em curar a LC em camundongos resistentes se correlacionou com a deposição de feixes de colágeno mais abundantes e ausência de células inflamatórias. Por outro lado, em camundongos susceptíveis, o processo cicatricial foi correlacionado com larga população de células inflamatórias agudas e deposição de colágeno esparsa e desordenada (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005). Este trabalho tem como objetivo avaliar o polimorfismo de genes participantes da via de ativação da citocina TGF- $\beta$ , trabalhando com a hipótese de que genes associados com cura de lesão, mapeados



em camundongo, poderiam também ser importantes biomarcadores de doença humana causada por *L. braziliensis*. Esta é uma linha de pesquisa importante, pois pode fornecer novos esclarecimentos sobre a patogênese da doença e gerar dados preliminares para novos estudos que esclarecerão a funcionalidade destes genes.

## IV. REVISÃO DA LITERATURA

### IV. 1. EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE

Por muitos anos, o impacto na saúde pública e o impacto sócio-econômico da leishmaniose foram ignorados. O estigma social associado com as cicatrizes desfigurantes e deformidades causadas pela leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose dermal pós-calazar (LDPC), e a morte causada pela leishmaniose visceral (LV) prejudicou o desenvolvimento econômico e trouxe enormes dificuldades para os países em desenvolvimento atingidos pela doença. A leishmaniose é uma doença considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento, sendo estimada uma ocorrência de dois milhões de novos casos por ano, sendo 1,5 milhão de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral (WHO, 2011). Além disso, ao longo dos últimos dez anos, o número de casos aumentou drasticamente, e a distribuição geográfica das regiões endêmicas tem se expandido consideravelmente devido à urbanização e à imigração de indivíduos não-imunes para áreas endêmicas. Adicionalmente, co-infecções *Leishmania*-HIV se tornaram um problema grave, especialmente na Europa e América do Sul, devido à propagação do HIV em áreas endêmicas de leishmaniose, o que tem mudado a epidemiologia da LV, uma vez que o HIV aumenta o risco de desenvolver esta forma da doença (Alvar *et al.*, 2008).

A infecção por *Leishmania spp.* resulta em um amplo espectro clínico que pode ser classificado em duas formas principais: a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a leishmaniose visceral (LV). Dentro das manifestações da LTA, observamos as formas LC, LM,

leishmaniose disseminada e leishmaniose difusa. A LC começa como uma pápula no local da picada do mosquito e se desenvolve em um nódulo duro ou uma úlcera aberta infiltrada que pode ou não sofrer cura espontânea (Murray *et al.*, 2005). A LM se desenvolve como uma complicação da LC, com parasitas disseminando através do sistema linfático para colonizar o trato das mucosas. Pacientes com LM sofrem com ulcerações destrutivas da mucosa, que podem deixá-los permanentemente desfigurados e propensos a comprometimento respiratório, infecções bacterianas secundárias e desnutrição. Ao contrário da maioria das lesões de LC, as lesões de LM não sofrem cura espontânea (Murray *et al.*, 2005).

A leishmaniose disseminada é uma forma emergente da doença causada pela infecção por *L. braziliensis*, que se distingue por suas características clínicas e imunológicas exclusivas (Costa *et al.*, 1986; Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). Esta forma da doença é caracterizada pela presença de um grande número de lesões cutâneas que abrange mais de uma área do corpo do paciente, tipos variados de lesões na pele e uma alta frequência de envolvimento mucoso (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). O paciente tende a apresentar uma lesão única inicial, geralmente nas extremidades, seguida da disseminação que pode envolver todo o corpo, por vezes, associada com febre e calafrios. A importância da leishmaniose disseminada é delineada pela gravidade da doença, terapêutica desafiadora e aumento da prevalência. Enquanto em 1986 apenas 0,2% dos casos de infecção por *L. braziliensis* desenvolveu leishmaniose disseminada, em 2000 este número subiu para 2% (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002).

A leishmaniose difusa é uma forma relativamente rara da doença e foi descrita inicialmente na Venezuela (Convit & Lapenta, 1946) como uma forma grotesca de LC, tendo as seguintes características: lesões

nodulares disseminadas por todo corpo e ricas em amastigotas, com teste de Montenegro negativo e freqüente incapacidade de responder ao tratamento convencional com antimônio. No Brasil, a *Leishmania (L.) amazonensis* é considerada a única espécie causadora de leishmaniose difusa (Lainson, 1983; Silveira *et al.*, 1997; Lainson & Shaw, 1998). Esta forma da doença é clinicamente caracterizada por uma infiltração difusa da pele, onde aparece um grande número de nódulos, pápulas, tubérculos e placas infiltradas que raramente sofrem ulceração. Nos casos mais antigos da doença, lesões disseminadas podem cobrir grande parte do corpo, mas aparecem predominantemente nas extremidades e raramente envolvem a membrana mucosa nasofaríngeal (Convit *et al.*, 1972; Convit *et al.*, 1993; Barral *et al.*, 1995).

A LV, também conhecida como Calazar, é a forma mais grave da doença. Apesar da maioria das infecções com espécies de *Leishmania* visceralizantes ser assintomática, a taxa de letalidade de LV sintomática é de 100% dentro de dois anos de infecção, se não for tratada. A LV é uma doença sistêmica causada pela disseminação da *Leishmania* para o baço e fígado, que resulta em episódios de febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia (Murray *et al.*, 2005). A LDPC é uma complicação da LV tratada e resulta na presença de múltiplas pápulas ou nódulos hipopigmentados na pele. Pacientes com LDPC são considerados importantes reservatórios potenciais para a leishmaniose antroponótica devido ao elevado número de parasitas em sua pele (Murray *et al.*, 2005; Alvar *et al.*, 2008).

Os estudos sobre a leishmaniose na região sudoeste do Estado da Bahia iniciaram na década de 1970, quando uma unidade de leishmaniose foi criada na região de Três Braços, na cidade de Wenceslau Guimarães (Cuba-Cuba *et al.*, 1985). Estudos realizados na área endêmica de Três Braços mostraram que a leishmaniose mucosa

pode se desenvolver até 264 dias após a lesão cutânea. Entretanto, 7% dos pacientes desenvolveram a forma mucosa da doença após mais de 10 anos da apresentação da lesão cutânea (Marsden *et al.*, 1984). Tanto a leishmaniose cutânea quanto a leishmaniose mucosa predominam em adultos do sexo masculino, porém, em um estudo realizado em Santo Amaro, Bahia, foi observado que crianças de ambos os sexos também têm sido afetadas pela doença (Follador *et al.*, 1999). Atualmente, a maioria dos casos de leishmaniose diagnosticada em 20 municípios é encaminhada ao posto de saúde que foi construído em Corte de Pedra, vila que pertence ao município de Presidente Tancredo Neves, situado a 30 km da região de Três Braços e 280 km da capital Salvador, aproximadamente. Na Tabela 1 abaixo, segue o número de casos de leishmaniose tegumentar atendidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, Bahia, entre os anos de 2006 e 2011.

Tabela 1: Número de casos de leishmaniose tegumentar atendidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, Bahia, entre 2006 e 2011.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011*
Cutânea	819	415	885	1161	1534	867
Mucosa	32	13	28	38	22	13

\*Até 25/11/11

Há cerca de sete anos, o Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia vem estudando a influência de fatores genéticos do hospedeiro na leishmaniose tegumentar na população da área rural de Corte de Pedra, região endêmica para *L. braziliensis* e que registra as maiores taxas de leishmaniose cutânea e mucosa no Estado da Bahia. O grupo mostrou que ocorre agregação familiar da doença nesta área (Castellucci *et al.*,

2005) e que genes da resposta imune estão associados com desenvolvimento de leishmaniose cutânea e mucosa nesta população (Castellucci *et al.*, 2006; Castellucci *et al.*, 2010; Ramasawmy *et al.*, 2010).

#### IV. 2. IMUNOPATOGENESE DA LEISHMANIOSE

A imunidade contra *Leishmania* é mediada tanto através da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos) quanto através da imunidade adaptativa (linfócitos B, linfócitos T e células dendríticas). Os macrófagos desempenham um papel crucial na leishmaniose. Um tratamento bem sucedido de todas as formas da doença depende da eliminação eficaz dos parasitas por macrófagos ativados. Paradoxalmente, a *Leishmania* utiliza sua função fagocítica como estratégia para internalização e replicação dentro dos fagolisossomos (Reiner & Locksley, 1995). A internalização da *Leishmania* pelos macrófagos leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e morte do parasita. Uma atividade subversiva da *Leishmania* neste processo é a inibição da produção de interleucina-12 (IL-12), que é necessária para a atividade dos macrófagos contra o parasita (Ahuja *et al.*, 1999), uma vez que conduz a uma regulação positiva de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico (NO) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

A produção de citocinas resulta no recrutamento de outras células pró-inflamatórias (neutrófilos, mastócitos e macrófagos) para o local da infecção. Em particular, os neutrófilos estão entre as primeiras células recrutadas para o local da infecção e acredita-se que participam na contenção da *Leishmania* na primeira hora de infecção (Belkaid *et al.*, 2000). Os dados publicados sobre a participação dos neutrófilos na

infecção por *Leishmania* são contraditórios, indicando ambas, resistência e exacerbação da doença (Peters & Sacks, 2009). No entanto, foi demonstrado que no contexto da infecção iniciada pela picada de um flebótomo infectado, os neutrófilos são recrutados para o local da infecção e fagocitam os parasitas, um processo que é vital para a progressão da doença (Peters *et al.*, 2008).

Um componente importante que liga as respostas imune e adaptativa são as células dendríticas (CD), que são recrutadas em resposta à produção dos mediadores derivados de mastócitos e liberação de citocinas/quimiocinas por macrófagos e neutrófilos (Reiner & Locksley, 1995). A absorção de amastigotas pelas CD no local da infecção resulta na regulação positiva de IL-12 (Gorak *et al.*, 1998), que é essencial para a eliminação do parasita e para as funções efetoras dos macrófagos (Belkaid *et al.*, 1998). A habilidade das células dendríticas de apresentar os antígenos através das moléculas de MHC classe I e II leva à estimulação das respostas específicas de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Sacks & Noben-Trauth, 2002), e é essencial para a resistência adquirida contra *Leishmania*.

Células T CD4<sup>+</sup> desempenham um importante papel na imunidade contra *Leishmania* e no desfecho da doença. Os primeiros estudos experimentais em modelo murino de leishmaniose tegumentar estabeleceram uma dicotomia clara entre a proteção mediada por uma resposta Th1 e a susceptibilidade à doença mediada pela resposta Th2. Foi mostrado que a falha em montar uma resposta Th1 eficiente contra *Leishmania* é causadora de doença progressiva e falta de resolução da lesão (Scott, 1989). Em camundongos resistentes C57BL/6, a resolução da doença é mediada como consequência da liberação de IFN- $\gamma$  por células Th1 e regulação positiva de óxido nítrico em macrófagos que abrigam parasitas (Bogdan *et al.*, 2000). Por outro lado, a persistência

das lesões em camundongos susceptíveis BALB/c é devida ao tipo de diferenciação Th2 das células T CD4+ e produção de interleucina-4 (IL-4), que suprime a ativação de macrófagos, resultando na sobrevivência do parasita (Scott, 1989).

No entanto, a dicotomia Th1/Th2 tem sido questionada nos últimos anos, uma vez que há evidências de que a resposta inicial de IL-4 pode não ser necessária para promover a susceptibilidade e existe mais complexidade nos mecanismos responsáveis pela imunidade adquirida (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Assim, a dicotomia Th1/Th2 como um indicador de resistência e susceptibilidade pode ser uma generalização e é muito mais complexa do que é conhecido e entendido atualmente. Ao longo dos anos, este paradigma Th1/Th2 de diferenciação de células T helper, que foi introduzido pela primeira vez por Mosmann e Coffman (Mosmann & Coffman, 1989) cerca de 22 anos atrás, ajudou a explicar muitos fenômenos na imunidade adquirida. Recentemente, o paradigma Th1/Th2 foi ampliado, após a descoberta de um terceiro subconjunto de células Th efetoras que produz IL-17 - Th17 - e exibe funções efetoras distintas das células Th1 e Th2. Nos últimos cinco anos, temos assistido a um acúmulo de informações sobre esse novo subconjunto de células T: as citocinas para sua diferenciação e expansão foram identificadas (Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005; Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006; Korn *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007) e os fatores de transcrição que estão envolvidos na sua geração foram elucidados (Ivanov *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007), estabelecendo firmemente as células Th17 como uma linhagem de células T independente em humanos e camundongos. Estudando a produção de IL-17 por linfócitos na leishmaniose tegumentar americana, foi demonstrado que pacientes com LM e LC apresentam maiores concentrações desta citocina quando comparados com controles não infectados. Este dado reforça o papel da



IL-17 na patogênese da reação inflamatória observada na doença (Bacellar *et al.*, 2009).

A produção de citocinas e a atividade citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> também contribuem para a evolução da doença na infecção por *Leishmania*. Inicialmente, acreditava-se que as células T CD8<sup>+</sup> desempenhavam um papel apenas durante a re-infecção (Huber *et al.*, 1998), porém foi demonstrado que estas células são cruciais no controle da infecção primária por direcionar a resposta para o tipo Th1 (Belkaid *et al.*, 2002; Uzonna *et al.*, 2004). Além da produção de citocinas, células T CD8<sup>+</sup> também participam no controle da infecção através de mecanismos citotóxicos, tais como produção de granzima e perforina e vias Fas/FasL, mas esses dados são contraditórios (Ruiz & Becker, 2007). Ainda não se sabe qual é a rota exata de ativação das células T CD8<sup>+</sup> na leishmaniose, uma vez que os parasitas residem em um vacúolo parasitário no interior de macrófagos e não está claro como estas células apresentam o antígeno através das moléculas de MHC classe I (Bertholet *et al.*, 2005; Bertholet *et al.*, 2006). O mecanismo mais provável é a apresentação cruzada, que tem sido bem documentada para macrófagos e células dendríticas (Rodriguez *et al.*, 1999; Houde *et al.*, 2003), mas ainda não foi demonstrada na infecção por *Leishmania*. Portanto, o papel exato das células T CD8<sup>+</sup> na leishmaniose, incluindo os epítomos específicos destas células e suas vias de ativação, ainda deve ser elucidado.

A vasta gama de citocinas e dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune contra *Leishmania* destaca claramente a complexidade da doença (Kedzierski *et al.*, 2009). O modelo murino da leishmaniose, que simula muito dos aspectos da doença humana e de onde deriva a maioria dos conhecimentos atuais sobre a imunopatogênese da doença, também tem sido utilizado como uma

ferramenta para avaliar a eficácia de vacinas. Uma ressalva é o fato de que os mecanismos precisos subjacentes à leishmaniose cutânea humana ainda não são completamente compreendidos, e as respostas necessárias para a proteção através da vacinação não são tão claras como no modelo murino (Gumy *et al.*, 2004). Ao que parece, em humanos, o resultado da doença é influenciado pelo balanço entre as resposta Th1/Th2 e, além disso, é afetado por fatores genéticos do hospedeiro, tamanho do inoculo e a cepa do parasita. Apesar disso, o modelo murino de leishmaniose tem sido extremamente adequado para testar vacinas candidatas.

Deve-se notar que a maioria das infecções por *Leishmania* na população humana permanece em grande parte assintomática (Bañuls *et al.*, 2007). Em áreas endêmicas, a maioria dos indivíduos expostos é capaz de controlar a infecção. Nos casos de LC, 90% curam suas lesões espontaneamente (Murray *et al.*, 2005), e nos casos de LV, a proporção de assintomáticos para sintomáticos varia entre 4:1 e 18:1 (Chappuis *et al.*, 2007). Além disso, menos de 5% dos pacientes infectados com *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis* ou *Leishmania guyanensis* desenvolve LM (Amato *et al.*, 2008), ressaltando assim a presença de mecanismos de resistência inata do hospedeiro.

Estudos em camundongos e humanos têm mostrado que em todas as formas de leishmaniose, fatores do hospedeiro desempenham um importante papel em definir tanto a gravidade da doença como a sua resolução (Cabello *et al.*, 1995; Rogers *et al.*, 2004; Handman *et al.*, 2005). A genética do hospedeiro é de especial interesse, pois grande variabilidade na evolução clínica tem sido observada entre pacientes, mesmo quando as espécies de *Leishmania* infectantes, o estado nutricional e os fatores ambientais são semelhantes (Cabello *et al.*, 1995).

#### IV. 3. O MODELO EXPERIMENTAL MURINO PARA LEISHMANIOSE

Investigações sobre o papel da genética do hospedeiro na patogênese da leishmaniose têm sido lideradas pela utilização do modelo murino. A disponibilidade de linhagens puras, com fisiologia, imunologia e mapas genéticos anotados bem definidos faz deste modelo com camundongos o modelo ideal. Adicionalmente, espécies de *Leishmania* infectantes para os seres humanos causam padrões de doença semelhantes em camundongos, e linhagens puras de camundongos têm mostrado simular naturalmente os fenótipos susceptível, intermediário e resistente observados em humanos (Rogers *et al.*, 2004; Handman *et al.*, 2005; Carrion *et al.*, 2006). Apesar desses benefícios, existem limitações para a aplicabilidade do modelo murino para a doença humana. Em contraste com a ampla variação genética presente na população humana, existe uma variação genética limitada em camundongos. Além disso, não existe um modelo para LM murina e nenhum modelo bom para LV em camundongos, e a via habitual de inoculação do parasita em condições experimentais é subcutânea ou endovenosa com a utilização de seringas, o que é muito diferente da picada do mosquito vetor, principalmente pela ausência da saliva biologicamente ativa do mosquito e pela inoculação de grande quantidade de parasitas (Rogers *et al.*, 2004). Entretanto, o modelo murino oferece a vantagem de estabelecer o efeito do genoma usando linhagens clonadas do parasita e de estudar a resposta do hospedeiro utilizando linhagens isogênicas de camundongos para minimizar os efeitos ambientais. Certo número de genes mediadores da resposta do hospedeiro a doenças infecciosas tem sido identificado, incluindo genes da via IL-12/IFN- $\gamma$ , mediadores de resistência a doenças micobacterianas (Doffinger *et al.*, 2002), e *Slc11a1* (formalmente conhecido como *Nramp1*) (Vidal *et al.*, 1993; Goswani *et al.*, 2001), gene que participa ativamente da formação do fagolisossomo e controla

a infecção por patógenos intracelulares como *Leishmania donovani*, *Salmonella typhimurium* e *Mycobacterium bovis* (Blackwell, 1996).

Adicionalmente, Roberts e colaboradores (1997) realizaram cruzamentos entre camundongos C57BL/6 e BALB/c e descreveram uma ligação entre resistência à infecção por *L. major* e duas regiões cromossômicas: uma no cromossomo 9 e a segunda no locus H2 no cromossomo 17, nomeadas “*leishmania major resistance 2*” (*lmr2*) e *lmr1*, respectivamente. Neste mapeamento, foram utilizadas duas populações F2 independentes de 199 e 271 camundongos, por meio de cruzamentos recíprocos entre fêmeas BALB/c (C) e machos C57BL/6 (B). Mais tarde, em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisa, avaliando uma possível interação entre esses locus, estratificou camundongos F2 por seus genótipos *lmr1* e *lmr2*. Foi demonstrado, não só que *lmr1* e *lmr2* interagem sinergicamente, como foi descrito um novo locus *lmr3*, localizado no cromossomo X cujo efeito depende de um haplótipo específico de *lmr1* (Roberts *et al.*, 1999).

Além do trabalho conduzido sobre a genética da resposta do hospedeiro à infecção por *L. major*, o modelo murino tem fascinado os imunologistas por muito tempo porque uma marcante polarização da resposta imune é observada após o desafio com o parasita *L. major*. Isto levou ao estudo intensivo dos reguladores da resposta polarizada de células T helper Th1/Th2 pelos imunologistas (Locksley *et al.*, 1987; Solbach & Laskay, 2000; Biedermann *et al.*, 2001). Mais recentemente, utilizando animais congênitos para cada um dos três loci de resposta do hospedeiro previamente descritos, *lmr1*, *lmr2* e *lmr3*, mapeados no cruzamento genético entre camundongos C57BL/6 e BALB/c, foi demonstrado o papel destes loci na gravidade da doença. Surpreendentemente, na última fase da infecção, quando a diferença na gravidade da doença entre camundongos parentais e congênitos é mais

anunciada, o perfil de citocinas foi correlacionado com o background genético dos camundongos e não com a gravidade. Isto demonstrou que este três loci mapeados estão agindo por um mecanismo independente do fenótipo Th (Elsó *et al.*, 2004b). Detalhadamente, foram examinadas a histopatologia e a produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  na pele e em linfonodos drenantes em camundongos parentais e congênicos. Apesar da significativa diferença na gravidade da doença entre camundongos parentais e congênicos, não foi encontrada nenhuma diferença durante as primeiras 48 horas nos níveis de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Elsó *et al.*, 2004a). Durante a infecção, este mesmo estudo demonstrou que os níveis de IL-4 estavam correlacionados com o tamanho da lesão, indicando que esta citocina reflete a gravidade da doença, em vez de controlá-la. Considerando este efeito, camundongos B6.C(*Imr1,Imr2*), que têm o background resistente C57BL/6 e alguns intervalos congênicos do BALB/c susceptível, tiveram níveis de citocinas similares aos camundongos parentais C57BL/6, apesar da susceptibilidade aumentada, e camundongos C.B6(*Imr1,Imr2*), que têm background BALB/c e alguns intervalos congênicos C57BL/6, foram similares aos camundongos susceptíveis BALB/c, apesar da resistência aumentada. Em nenhum momento foi encontrada diferença no tipo celular. Estes dados reforçaram a idéia de que os loci *Imr* previamente descritos afetavam a gravidade da doença por um mecanismo independente da resposta convencional de células T helper (Elsó *et al.*, 2004b).

A infecção por muitos microorganismos patogênicos resulta em um extensivo remodelamento do tecido infectado e na produção de granulomas. A esquistossomose tem sido utilizada como modelo para o estudo da biologia do granuloma, com os ovos de *Schistosoma mansoni* estimulando a produção de matriz extracelular e na formação de granulomas de proteção (Olds *et al.*, 1985; Andrade, 1991). A infecção por *Mycobacterium tuberculosis* resulta na produção de granulomas que, simultaneamente, inibem a propagação do microorganismo e oferece um

ambiente seguro para a persistência microbiana. Da mesma forma, muitas espécies de *Leishmania* causam granulomas de pele, resultando em úlceras crônicas e indolentes que, após a cicatrização, são remodeladas em estruturas normais ou tecido cicatricial. Em resposta a uma infecção, as células do hospedeiro remodelam extensivamente o tecido produzindo colágeno e metaloproteinases de matriz (Vaalamo *et al.*, 1999; Majka *et al.*, 2002). Os fibroblastos migram para a região, resultando na destruição da arquitetura normal do tecido e matrizes do tecido conjuntivo são depositadas (Price *et al.*, 2003; Izzo *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). A gravidade da doença muitas vezes depende da capacidade do hospedeiro para formar granulomas; na sua ausência, os microorganismos se propagam resultando na tuberculose ou leishmaniose cutânea difusa.

Há evidências de que fatores como reparação e remodelamento do tecido, assim como uma resposta imune adaptativa vigorosa, estão envolvidos na resolução da infecção (Esterre *et al.*, 1991). O modelo murino de *L. major* tem sido utilizado para explorar a hipótese de que a taxa de cicatrização das úlceras granulomatosas da leishmaniose cutânea contribui significativamente para a resistência inata do hospedeiro, e foi demonstrado que camundongos congênitos para os loci de resposta do hospedeiro que controlam a gravidade da doença (*lmr1* e *lmr2*) diferem na sua resposta de cicatrização para ambas, lesões infecciosas e cirúrgicas, com animais resistentes possuindo uma resposta de cicatrização da lesão mais robusta em ambos os casos (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005). Este estudo mostrou que a resposta de cicatrização é criticamente importante para a cura rápida da leishmaniose cutânea murina causada por *L. major*. Camundongos congênitos para os loci de resistência à leishmaniose, que curaram suas lesões mais rapidamente do que seus pais suscetíveis, também expressaram diferencialmente genes envolvidos na cicatrização e reparação tecidual, tais como *TGFBI* e *CTGF*, depositaram fibras

colágenas mais ordenadas e curaram as feridas de biópsia mais rapidamente. Fibroblastos destes camundongos repararam suas feridas mais rápido *in vitro*, e esse processo foi acelerado por sobrenadantes de macrófagos infectados. Como esses efeitos são independentes da imunidade mediada por células, é provável que a taxa de cicatrização seja um importante componente da imunidade inata envolvida na resistência à leishmaniose cutânea (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005).

#### IV. 4. FATORES GENÉTICOS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Estudos de associação com genes candidatos são freqüentemente utilizados em estudos genéticos da leishmaniose tegumentar humana. Por exemplo, polimorfismos em *IL-4* e *IFN- $\gamma$*  foram associados com susceptibilidade à LC em um grupo iraniano infectado por *L. major*. Diferenças na freqüência do polimorfismo +874A/T no íntron 1 de *IFN- $\gamma$*  e no polimorfismo -590C/T na região promotora de *IL4* foram observados influenciando a progressão da doença e o risco de desenvolver LC, respectivamente (Kamali-Sarvestani *et al.*, 2006). Posteriormente, análise do polimorfismo IL-10 -819C/T localizado na região promotora de *IL10* em indivíduos brasileiros sintomáticos e assintomáticos pra LC causada por *L. braziliensis* demonstrou uma ligação entre o genótipo IL-10 -819C/C, altas concentrações de IL-10 e gravidade das lesões. A IL-10 modula a resposta inflamatória para a eliminação da *Leishmania*, e foi admitida a hipótese da alta produção de IL-10 em carreadores do genótipo C/C promover a sobrevivência da *Leishmania*. Análise funcional das variantes demonstrou ligação alelo-específica de fatores nucleares para esta região polimórfica (Salhi *et al.*, 2008).

A LM desenvolve-se como uma complicação da LC, com disseminação do parasita para as membranas mucosas. Análise de polimorfismos do gene de TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  em pacientes venezuelanos com LM infectados com *L. braziliensis* identificou ligação entre polimorfismos em *TNFA* (-308 G/A na região promotora) e *TNFB* (íntron 2) e a doença. A presença do alelo A para *TNFA* e do alelo 2 para *TNFB* foram associadas com a susceptibilidade para LM (Cabrera et al., 1995).

O grupo de pesquisa do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia vem estudando determinantes genéticos do hospedeiro na leishmaniose tegumentar há cerca de sete anos. Inicialmente, o grupo demonstrou através de estudo epidemiológico envolvendo famílias afetadas e altamente expostas que agregação da doença ocorre na área de Corte de Pedra – Bahia (Castellucci et al., 2005). Avaliação do papel do marcador -174C/G da citocina IL-6 nesta mesma população endêmica para *L. braziliensis*, mostrou uma forte associação entre a presença do alelo C e susceptibilidade para LM. Os genótipos CC e CG foram associados com concentrações reduzidas de IL6 em células estimuladas com antígeno de *Leishmania* (SLA) em estudo populacional de caso-controle e em modelo familiar. Uma baixa produção de IL-6, citocina que modula a resposta imune do tipo Th1, em carreadores do alelo C, nesse caso, foi interpretada como uma capacidade reduzida de equilibrar as respostas Th1 e Th2 e controlar as manifestações patológicas destrutivas associadas com a LM (Castellucci et al., 2006).

Mais recentemente, investigando o papel de genes que regulam a infiltração ou função de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos no sítio da lesão em LC e LM, nosso grupo mostrou associação da doença e o polimorfismo no gene *CXCR1*. Curiosamente,



o alelo C comum apresentou-se associado com LC, enquanto a forma rara, o alelo G foi associado com LM. Adicionalmente, LC também foi associada com uma inserção 3'/deleção em *SLC11A1*, um gene conhecido principalmente por seu papel na regulação da ativação de macrófagos (Castellucci *et al.*, 2010). Em outro estudo, um polimorfismo funcional no promotor da quimiocina CCL2 (MCP-1) foi também associado com LM na mesma população endêmica. Frequências genótípicas foram comparadas entre casos de LM/LC e grupos controle utilizando análise de regressão logística e teste de associação baseado em família (FBAT). Os níveis de CCL2 foram medidos no plasma e macrófagos. Como resultado deste trabalho, foi observado que o genótipo recessivo GG de CCL2-2518 foi mais comum em pacientes com LM e que estes pacientes produziam maiores níveis de CCL2 quando comparados com pacientes com genótipo AA. Estes resultados sugerem que altas concentrações desta quimiocina aumentam risco de desenvolver LM (Ramasawmy *et al.*, 2010).

A leishmaniose é uma doença complexa e é esperado que muitos genes, influenciados por fatores ambientais, afetem a gravidade da doença e seu desfecho. A identificação de fatores genéticos que determinam se o paciente vai desenvolver os sintomas da doença ou não em consequência da infecção com *Leishmania spp.* é crucial para o melhor entendimento da patogênese da leishmaniose e identificação de indivíduos em risco de desenvolver doença severa. Apesar das diferenças entre a doença humana e o modelo murino, muito do conhecimento a partir de estudos em camundongos (especificamente a imunologia e a genética da doença) é aplicável à leishmaniose humana, como o papel da *Slc11a1* na LV e a importância da *IL-10* na susceptibilidade e regulação da resposta de células T-helper (Th1 e Th2) no desfecho da doença (Blackwell *et al.*, 2003; Mansueto *et al.*, 2007; Couper *et al.*, 2008). Adicionalmente, em camundongos, o mapeamento de genes que controlam a LC causada por *L. major*

demonstrou controle genético complexo (Mock *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1993; Beebe *et al.*, 1997; Havelkova *et al.*, 2006; Lipoldova & Demant, 2006; Sakthianandeswaren *et al.*, 2009), juntamente com o papel particular de genes que regulam a cura das lesões (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005). Mapeamento recente realizado em uma região do cromossomo 9, *lmr2*, em camundongos congênicos, identificou o gene *Fli1* (*FLII* em humanos) como um novo candidato que influencia resistência a *L. major* e mecanismos de cura de lesão (Sakthianandeswaren *et al.*, 2010).

Até o momento, a maioria dos genes que foram propostos como candidatos para leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa foi escolhida à luz da resposta imune contra *Leishmania*, tendo em conta os conseqüentes efeitos na regulação das vias Th1/Th2. No entanto, dados mostram evidências de que fatores como reparação e remodelamento tecidual também são importantes na resolução da infecção (Esterre *et al.*, 1991). O estudo de genes envolvidos no processo de cura de lesões pode fornecer uma nova abordagem para estudar outros mecanismos do hospedeiro que podem interferir na resistência e cura. Foi demonstrado que a resposta de reparo tecidual é criticamente importante na rápida cura na leishmaniose cutânea murina causada por *L. major* (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005). Dados anteriores do mesmo grupo forneceram evidências de que a resistência à infecção por *L. major* é independente da resposta de células T helper (Elso *et al.*, 2004b). Em modelo murino, múltiplos loci têm sido implicados na susceptibilidade à infecção, e a despeito do mapeamento de *Fli1*, vários genes subjacentes a estes loci ainda não foram identificados (Sakthianandeswaren *et al.*, 2010).

## VI. 5. A VIA DE SINALIZAÇÃO DE TGF- $\beta$

A cicatrização das feridas começa imediatamente após uma lesão na pele como uma tentativa de fornecer uma barreira protetora contra outros estímulos (Clark, 1996). Em resposta a uma infecção, as células do hospedeiro remodelam seus tecidos através da produção de colágeno e matriz extracelular (Vaalamo *et al.*, 1999; Majka *et al.*, 2002); fibroblastos migram para o tecido destruído e matrizes de tecido conjuntivo são depositadas (Price *et al.*, 2003; Izzo *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). A gravidade da doença geralmente depende da habilidade do hospedeiro em formar granulomas; na sua ausência, o parasita dissemina resultando em tuberculose ou leishmaniose cutânea difusa (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005). Vários parasitas produzem proteases que degradam proteínas da matriz, facilitando o rompimento da barreira cutânea para propagar a infecção (Lira *et al.*, 1997). Quando promastigotas de *Leishmania* são inoculados na pele do hospedeiro, ocorre um afrouxamento da matriz do tecido conjuntivo da derme, permitindo o estabelecimento da infecção.

O controle genético da cura das lesões na leishmaniose envolve várias famílias de fatores de crescimento e transcrição, das quais a sinalização do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) é um exemplo clássico (Singer & Clark, 1999). Estudos têm demonstrado que a sinalização do gene de TGF- $\beta$  está envolvida no processo de cura de lesão regulando a migração celular, proliferação e diferenciação (Yang *et al.*, 2001). O TGF- $\beta$  é uma citocina envolvida em processos inflamatórios, cura de lesão e fibrose e tem sido implicada na reparação e remodelamento dos tecidos devido à sua capacidade de estimular fibronectina, proteoglicanos, síntese de colágeno, proliferação de fibroblastos e angiogênese (Ihn, 2002; Smith *et al.*, 2007). Dados têm mostrado que a aplicação de TGF- $\beta$  exógeno acelera a cura de lesões

agudas (Shah *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997) e a aplicação de TGF- $\beta$  recombinante melhora a cicatrização em modelos animais (Salomon *et al.*, 1990; Beck *et al.*, 1993). O TGF- $\beta$  também induz o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), que modula o crescimento de fibroblastos, síntese de colágeno e secreção de fibronectina e matriz extracelular (Xiao *et al.*, 2006). Sua via de sinalização tem se mostrado importante na regulação do recrutamento de macrófagos durante a inflamação e os eventos de cura de lesão (Boring *et al.*, 1997; Kurihara *et al.*, 1997).

Um ligante de TGF- $\beta$  inicia a sinalização se ligando e reunindo os receptores tipo I (TGFBR1) e tipo II (TGFBR2) na superfície celular. Isso permite o receptor tipo II fosforilar o domínio quinase do receptor tipo I, que então propaga o sinal através da fosforilação das proteínas SMAD (Shi & Massague, 2003). Irregularidade nesta via de sinalização tem sido implicada em diversos transtornos de desenvolvimento e em várias doenças humanas, incluindo o câncer, fibrose e doenças autoimunes (Blobe *et al.*, 2000). Além disso, um estudo recente mostra que em úlcera venosa não cicatrizada a sinalização de TGF- $\beta$  é atenuada pela regulação negativa dos dois receptores de TGF e falha da ativação de SMAD2, resultando na desregulação dos genes alvo de TGF- $\beta$  (Pastar *et al.*, 2010).

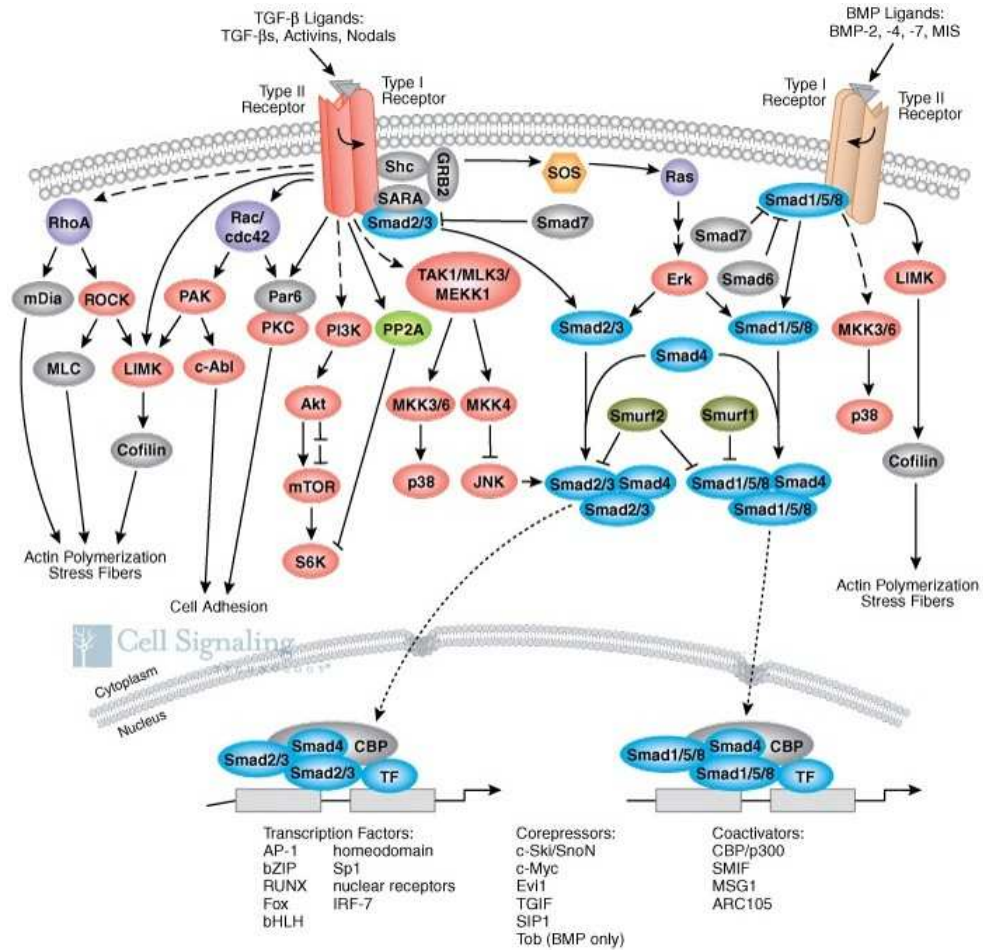
A descoberta das proteínas SMAD tem ajudado bastante a compreensão sobre a sinalização de TGF- $\beta$ . Oito proteínas SMAD são codificadas no genoma humano (Massague, 1998), mas apenas cinco atuam como substrato para os receptores da família de TGF- $\beta$ , entre os quais está SMAD2. Uma vez fosforilada pelos receptores de TGF- $\beta$ , a SMAD2 forma um complexo heteromérico com uma segunda classe de proteínas SMAD, conhecida como Co-SMADs. Esse complexo então é translocado para o núcleo para regular a expressão gênica (Wrana &

Attisano, 2000). A função biológica da SMAD2 na cura de lesão não é conhecida porque camundongos deficientes em SMAD2 são embrionariamente letais (Yagi *et al.*, 1999). Porém, estudos recentes têm sugerido que SMAD2 está intimamente envolvida no processo de cicatrização (Ishida *et al.*, 2004). A superexpressão de SMAD2 afeta a proliferação e diferenciação dos queratinócitos da epiderme. Curiosamente, os níveis endógenos de Co-SMADs são alterados com base na disponibilidade de SMAD2, sugerindo, portanto, uma ação conjunta dessas proteínas na regulação de homeostase ectodérmica mediada pelo TGF- $\beta$ .

Outro importante gene identificado no processo de cura das lesões é o *FLII*. *FLII* é um membro da família de fatores de transcrição Ets, e tem sido demonstrado que este gene desempenha importante papel na hematopoiese, desenvolvimento embrionário e vasculogênese (Truong & Ben-David, 2000). É altamente expresso em células endoteliais vasculares, mas seus genes alvos e seu papel na vasculatura não foram totalmente caracterizados (Hart *et al.*, 2000). O FLII também é um supressor da transcrição de colágeno (Kubo *et al.*, 2003) e estudos recentes têm mostrado que FLII controla a expressão de colágeno através da inibição da expressão de CTGF, e, portanto, pode atuar na via de cicatrização das lesões (Nakerakanti *et al.*, 2006). Este gene tem sido implicado na fibrose patológica observada na esclerose sistêmica (Wang *et al.*, 2006), bem como na fibrillogênese de colágeno na pele de camundongos (Asano *et al.*, 2009). Um estudo recente com linhagens congênicas de camundongos para o loci *lmr2* mostrou que *FLII* é expresso, aproximadamente, 3 vezes menos nos animais com o fenótipo resistente, sugerindo essa regulação negativa como um importante fator para a normal função dos macrófagos contra patógenos e aumento da cura das lesões, correlacionada com a organização e deposição abundante de colágeno e um processo inflamatório mais rápido

comparado com a linhagem susceptível (Sakthianandeswaren *et al.*, 2010).

Figura 1: Via de sinalização do gene da citocina TGF- $\beta$



Extraído de: [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdfs/TGF\\_beta.pdf](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdfs/TGF_beta.pdf)

## V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### V. 1. ÁREA DE ESTUDO

Corte de Pedra, um vilarejo localizado no sudoeste do Estado da Bahia e distante 280 km de Salvador, pertence ao município de Presidente Tancredo Neves. A área endêmica de Corte de Pedra, no entanto, se estende muito além do vilarejo onde está localizado o posto de saúde. Este posto de saúde foi estabelecido na vila de Corte de Pedra em 1980 e, desde então, médicos vinculados ao Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia visitam a área a cada duas semanas, provendo assistência médica para a população da região, acometida pela leishmaniose. O posto também conta com o apoio de quatro agentes de saúde treinados, todos residentes na vila. Eles prestam assistência aos pacientes, visitam as famílias e participam das atividades de pesquisa. Médicos da Universidade, incluindo clínicos, imunologistas, infectologistas, dermatologistas e otorrinolaringologistas viajam quinzenalmente de Salvador até o posto de saúde para prestar atendimento. Assim, o Posto de Saúde se tornou um centro de referência para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar em 20 municípios que estão dentro de uma área de 10.000 km<sup>2</sup>, aproximadamente. Na maioria destes municípios, a principal atividade econômica é a agricultura de subsistência, destacando-se principalmente a cultura cacaueteira e lavouras como cravo, guaraná, banana, café, mandioca, pimenta-do-reino e seringueira.

A área endêmica de Corte de Pedra é, tipicamente, uma região de floresta tropical que ao longo dos anos foi reduzida a pontos isolados de mata secundária e na sua quase total extensão cedeu lugar às atividades agrícolas, fonte de renda para a maioria dos seus habitantes.

Nesse contexto, os hábitos ocupacionais destes indivíduos, que envolve basicamente o trabalho nas fazendas, assim como os hábitos de moradia, pelo fato de muitas casas serem construídas em clareiras na mata, tornaram a população altamente exposta à infecção por *L. braziliensis*, de modo que esta é a região onde são registradas as taxas de incidência da doença mais elevadas no estado.

## **V. 2. DEFINIÇÃO DE CASOS**

### **V. 2.1. Leishmaniose cutânea (LC)**

É definida como a presença de uma lesão ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico é realizado pela detecção do parasito através da cultura do aspirado da lesão, ou pelo achado da lesão típica associado ao teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro) e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar.

### **V. 2.2. Leishmaniose mucosa (LM)**

É definida pela presença de uma lesão mucosa metastática, localizada mais frequentemente no septo nasal ou estendida para o palato, faringe e orofaringe. Quase todos os pacientes com LM tiveram doença cutânea. Por definição, as lesões mucosas não são contíguas com a lesão cutânea primária. O diagnóstico é realizado pelos mesmos métodos utilizados para LC.



### **V. 3. DESENHO DO ESTUDO**

Este foi um estudo de associação utilizando modelo familiar. Foram genotipadas amostras de 225 famílias, contabilizando um total de 778 casos de leishmaniose distribuídos nas formas cutânea e mucosa da doença. As famílias participantes deste projeto foram coletadas em dois tempos distintos. Assim, a população familiar primária foi coletada entre os anos de 2000 e 2004, e a amostra familiar de replicação entre 2008 e 2010. Para a amostra primária, casos índices de LM foram recrutados a partir de fichas clínicas do Posto de Saúde de Corte de Pedra, suas famílias foram visitadas, e amostras de sangue foram coletadas para extração de DNA de todos os casos de LC e LM, assim como membros não afetados disponíveis nas famílias. Este grupo consistiu de 250 casos de LC (128 homens e 122 mulheres) e 87 casos de LM (60 homens e 27 mulheres) distribuídos em 68 famílias de múltiplos casos. Para a amostra de replicação, indivíduos afetados foram selecionados a partir de fichas clínicas do Posto de Saúde de Corte de Pedra, e pais ou irmãos foram recrutados em visitas de acompanhamento às famílias. Este grupo, por sua vez, consistiu de 402 casos de LC (219 homens e 183 mulheres) e 39 casos de LM (24 homens e 15 mulheres) distribuídos em 157 famílias. As características das duas amostras coletadas seguem abaixo na Tabela 2. Isso inclui média de idade e gênero dos sujeitos recrutados no estudo.

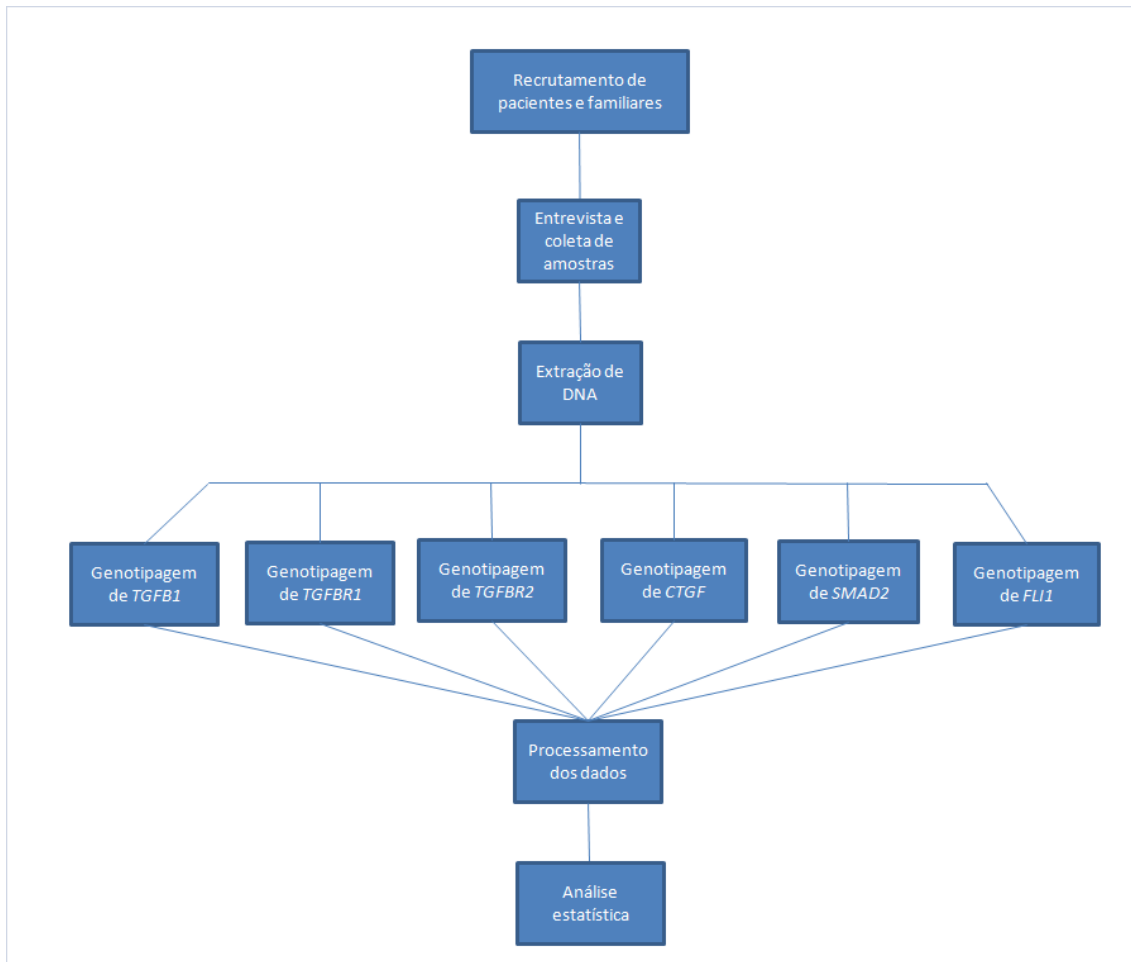
Tabela 2: Características da amostra coletada.

	<i>Amostragem Primária</i>			<i>Amostragem de replicação</i>		
	<i>LC</i>	<i>LM</i>	<i>Leishmaniose per se</i>	<i>LC</i>	<i>LM</i>	<i>Leishmaniose per se</i>
<i>Nº casos</i>	250	87	337	402	39	441
- <i>Homens</i>	128	60	188	219	24	243
- <i>Mulheres</i>	122	27	149	183	15	198
<i>Idade</i>						
- <i>Média</i>	19,1	30,3	24,4	21,5	26,6	21,9
- <i>IC 95%</i>	17,1- 21,1	25,8- 34,7	20,3-24,4	20,1- 22,9	20,7- 32,4	20,6-23,3
<i>Nº famílias</i>	68	-	68	157	-	157
<i>N total nas famílias</i>	767	-	767	764	-	764

A amostra familiar primária foi coletada entre 2000 e 2004; e a amostra familiar de replicação entre 2008 e 2010. Os dados mostram que a condição demográfica e epidemiológica entre os grupos é semelhante.

### V. 3.1. Fluxograma ilustrativo do estudo

Figura 2: Fluxograma ilustrativo do estudo



#### V. 4. EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletados de cada indivíduo, em tubo contendo ACD (ácido citrato dextrose), 10 ml de sangue para a obtenção de DNA genômico (Vacutainer, Becton Dickinson). O DNA genômico foi isolado pelo método de “salting-out” modificado como descrito a seguir: (a) após centrifugação para a remoção do plasma e posterior divisão do volume de sangue restante do tubo Vacutainer em dois tubos de polipropileno de 15 ml, foram adicionados 12 ml de solução de lise de eritrócitos (Sacarose 1,6 M; Triton X-100 5%;  $MgCl_2$  1 M; Tris-HCl pH 7,5 1 M) e, após centrifugação (8.000 x g durante 10 minutos) e remoção do sobrenadante, o mesmo procedimento foi repetido com os dois sedimentos resultantes. Após a lise com tampão de eritrócitos, foi realizada uma lavagem adicionando-se 5 ml de  $dH_2O$  sobre o sedimento de leucócitos (após juntá-los em um só tubo) com centrifugação posterior de 8.000 x g durante 5 minutos para a remoção do sobrenadante; (b) a partir desta etapa, os leucócitos foram lisados pela adição de 160  $\mu$ l de tampão proteinase K 5X (NaCl 5 M; EDTA pH 8,0 0,5 M), 40  $\mu$ l de proteinase K (20 mg/ml) (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies), 40  $\mu$ l de SDS 20% e 300  $\mu$ l de  $dH_2O$ , sendo os tubos então incubados durante a noite a 37°C em banho-maria; (c) em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e deixados à temperatura ambiente até o resfriamento, quando foram adicionados 200  $\mu$ l de NaCl 6 M para a precipitação de proteínas, com posterior centrifugação (13.000 x g durante 20 minutos); e recuperação do sobrenadante para um outro tubo de 1,5 ml; (d) após mais duas novas centrifugações adicionais (13.000 x g durante 10 e 5 minutos, respectivamente) para a remoção de proteínas residuais, o sobrenadante foi dividido em dois tubos de 1,5 ml, adicionando-se a cada um 900  $\mu$ l de etanol 99,5% para a precipitação de DNA. Após esta etapa, o DNA precipitado foi lavado mais uma vez com etanol a 70%; (e) depois que este etanol foi removido e, com as paredes do tubo secas, foi

adicionado ao tubo contendo DNA 200 µl de dH<sub>2</sub>O e a sua concentração e pureza determinadas pela leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (260 nm) e a pureza pela relação DO a 280/260 nm. As amostras foram posteriormente aliquotadas e congeladas a -20°C e -70°C.

## V. 5. GENOTIPAGEM

Os marcadores dos genes selecionados foram escolhidos com base em material disponível na literatura e utilizando a informação sobre suas seqüências em bancos de dados de domínio público como o Ensembl e o projeto HapMap. A genotipagem foi feita pelo método de TaqMan®, tecnologia da Applied Biosystems, que customiza primers e sondas específicos no mesmo ensaio. Este é um ensaio de discriminação alélica por fluorescência, o qual utiliza a atividade exonuclease 5'-3' da enzima polimerase *Thermus aquaticus* (Taq) para clivar sondas duplamente marcadas com corante repórter e aneladas a uma seqüência alvo localizada entre os dois sítios ligantes do primer. Um seqüenciador faz a leitura das placas, e um software específico atribui de forma automatizada a genotipagem das amostras no teste. As informações sobre os marcadores polimórficos genotipados estão apresentados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Informações dos marcadores polimórficos genotipados para *TGFB1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *CTGF*, *SMAD2* e *FLI1*.

<b>Cromossomo</b>	<b>Gene/Marcador</b>	<b>Posição física (pb)</b>	<b>Alelos</b>	<b>Caucasiano MFA</b>	<b>Africano MFA</b>	<b>Localização</b>
Cromossomo 6	CTGF_rs6918698	132314950	G/C	0,412	0,483	Intragênico
	CTGF_rs9493150	132315684	G/C	0,263	0,350	Intragênico
	CTGF_rs2151532	132316673	G/A	0,150	0,100	Intragênico
Cromossomo 18	SMAD2_rs1792658	43636603	C/A	0,216	0,288	Íntron
	SMAD2_rs1631576	43657481	T/C	0,474	0,425	Íntron
Cromossomo 19	TGFB1_rs2241715	46548726	C/A	0,300	0,258	Íntron
	TGFB1_rs1800469	46552136	G/A	0,310	0,220	Intragênico
Cromossomo 9	TGFBR1_rs10760673	100918443	G/A	0,220	0,175	Íntron
	TGFBR1_rs2026811	100919084	C/A	0,225	0,217	Íntron
	TGFBR1_rs334358	100950434	T/G	0,217	0,117	Íntron
	FLI1_rs7930515	128564794	A/C	0,259	0,254	Íntron
	FLI1_rs619521	128578157	T/C	0,483	0,342	Íntron
	FLI1_rs590520	128620132	C/T	0,289	0,395	Íntron
Cromossomo 3	FLI1_rs531894	128628756	T/C	0,375	0,425	Íntron
	TGFBR2_rs6550005	30625068	G/A	0,208	0,476	Íntron
	TGFBR2_rs4955212	30644362	G/A	0,250	0,201	Íntron
	TGFBR2_rs13081020	30662973	T/C	0,317	0,402	Íntron
	TGFBR2_rs1962859	30672913	C/T	0,120	0,202	Íntron
	TGFBR2_rs934328	30707744	G/A	0,292	0,475	Intragênico
	TGFBR2_rs2116142	30692665	G/A	0,339	0,225	Íntron

Informações sobre os marcadores testados, tais como: identificação (rs), posição física, formas alélicas e menor frequência alélica (MFA) em duas populações etnicamente distintas do projeto HapMap e sua posição no gene.

Figura 3: Imagem ilustrativa de uma placa de genotipagem para o SNP rs1800469 do gene *TGFBI*

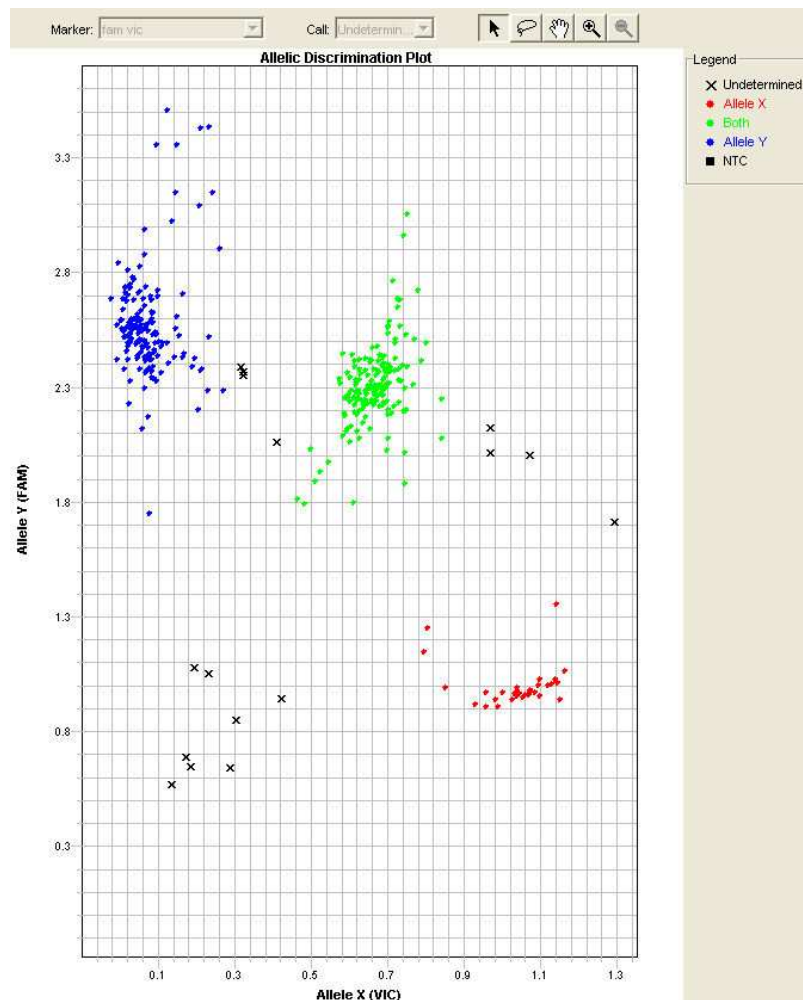


Imagem de uma placa de genotipagem para o gene *TGFBI* rs1800469. Em azul, cada ponto indica indivíduos homocigotos para o alelo 1 (G); em vermelho, homocigotos para o alelo 2 (A); em verde, heterocigotos (G/A). Finalmente, o “x” preto indica indivíduos cuja genotipagem não pode ser assinalada pelo software. Estes dados são convertidos em planilha após análise.

## **V. 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Métodos de associação foram utilizados para analisar os dados. A hipótese nula é que o estado da doença é totalmente independente dos marcadores genotípicos, isto é, não há ligação ou associação devido ao desequilíbrio de ligação observado entre os marcadores e qualquer gene casual não observado que controlaria a doença. Todos os genótipos nas famílias foram checados para correção de inconsistências mendelianas entre indivíduos aparentados através do programa PedCheck®. Teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi realizado antes das análises para exclusão de marcadores fora do equilíbrio. Métodos de associação baseado em famílias, como o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) e análise de regressão logística condicional pelo método de caso-pseudocontrole (Cordell *et al.*, 2004), foram realizados através do programa STATAM™ 9.1. As análises de desequilíbrio de ligação entre os marcadores foram realizadas pelo programa Haploview v. 4.2.

## **V. 7. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA**

Termo de consentimento livre e esclarecido, que conta com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (CEP – 136/07), foi obtido de todos os participantes desta pesquisa (Anexos 1 a 4).



## **VI. ARTIGO 1**

“*FLII* polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil”. *Genes and Immunity* 12: 589-94, 2011.



Published in final edited form as:

*Genes Immun.* 2011 October ; 12(7): 589–594. doi:10.1038/gene.2011.37.

## FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil

L Castellucci<sup>1,2</sup>, SE Jamieson<sup>2,3</sup>, EN Miller<sup>2</sup>, LF de Almeida<sup>1</sup>, J Oliveira<sup>1</sup>, A Magalhães<sup>1</sup>, LH Guimaraes<sup>1</sup>, M Lessa<sup>1</sup>, E Lago<sup>1</sup>, AR de Jesus<sup>1,4,5</sup>, EM Carvalho<sup>1</sup>, and JM Blackwell<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

<sup>2</sup>Department of Medicine, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, UK

<sup>3</sup>Telethon Institute for Child Health Research, Centre for Child Health Research, The University of Western Australia, Subiaco, Western Australia, Australia

<sup>4</sup>Instituto de Investigação em Imunologia, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Brazil

### Abstract

Mapping murine genes controlling cutaneous leishmaniasis (CL) identified FLI1 as a candidate influencing resistance to *L. major* and enhanced wound healing. We examine FLI1 as a gene controlling CL and mucosal leishmaniasis (ML) caused by *L. braziliensis* in humans. Intron 1 single nucleotide polymorphisms tagging promoter and enhancer elements were analysed in 168 nuclear families (250 CL; 87 ML cases) and replicated in 157 families (402 CL; 39 ML cases). Robust case-pseudocontrol logistic regression analysis showed association between allele C (odds ratio (OR) 1.65; 95% confidence interval 1.18–2.29;  $P = 0.003$ ) of FLI1\_rs7930515 and CL in the primary sample that was confirmed (OR 1.60; 95% confidence interval 1.10–2.33;  $P = 0.014$ ) in the replication set (combined  $P = 1.8 \times 10^{-4}$ ). FLI1\_rs7930515 is in linkage disequilibrium with the functional GAn microsatellite in the proximal promoter. Haplotype associations extended across the enhancer, which was not polymorphic. ML associated with inverse haplotypes compared with CL. Wound healing is therefore important in CL, providing potential for therapies modulating FLI1.

© 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved

Correspondence: Dr JM Blackwell, Centre for Child Health Research, University of Western Australia, Institute for Child Health Research, 100 Roberts Road, Subiaco, Western Australia 6008, Australia. jblackwell@icmr.uwa.edu.au.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Information accompanies the paper on *Genes and Immunity* website (<http://www.nature.com/gene>)

**Authors contributions:** LC carried out the field collection and preparation of the samples, performed the genotyping, and participated in the statistical analysis and interpretation of the data. SEJ and ENM trained LC in the laboratory for genotyping techniques, in database entry and use of the genetic database GenIE in Cambridge, and in genetic statistical analysis methods. SEJ cross-checked statistical analyses and carried out additional statistical tests. LFA, JO, AM and LHG participated in the field collection of data, processing of DNA samples and database entry in Brazil. ML is the doctor responsible for confirmation of the ML cases by performing ENT exams. EL participated in the field work by contacting patients and helping sample collection. ARJ trained the field group, initial selection of cases from the health post, assisted with field collection of data and participated in the design of the study. EMC helped conceive the study, initial selection of cases from the health post and provided the logistical support to make the study possible. JMB participated in the design of the study, conceived the specific hypothesis to be tested, made the final interpretation of the data and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Keywords

FLII; cutaneous leishmaniasis; wound healing; genetic susceptibility

Leishmania infection is associated with a broad spectrum of clinical phenotypes and many studies have demonstrated that host genetic factors have a part in determining the outcome of infection (reviewed in refs. 1–4). *L. braziliensis* infection causes cutaneous leishmaniasis (CL) with prolonged time to lesion healing. Pro-inflammatory cytokines, including tumour necrosis factor and interferon- $\gamma$ , and macrophage activation are important in eventual self-healing, but an exaggerated response is associated with mucosal leishmaniasis (ML).<sup>5,6</sup> A number of studies<sup>7–11</sup> have now been published that report on the role of polymorphisms at candidate genes (*TNFA*, *SLC11A1*, *CXCR1*, *IL6*, *IL10*, *MCP1*) associated with pro- and anti-inflammatory responses in regulating clinical disease outcome in *L. braziliensis* infection in humans. These studies have generally been carried out using small sample sizes and without replication in a second sample. Nevertheless, they have been underpinned by functional data<sup>9–11</sup> and/or are supported by previous immunological studies<sup>5,6,12–14</sup> demonstrating the importance of these pathways in determining disease outcome. Two of these studies<sup>8,9</sup> were undertaken using the set of families that we use here as a primary sample set, now strengthened by collection of a new replication sample. Thus far no genome-wide approaches to identify novel genes contributing to clinical outcome in *L. braziliensis* infection have been reported.

One alternative way to identify genes regulating clinical outcome in humans is via a mouse-to-human approach. This has proven quite successful in identifying genes that regulate visceral leishmaniasis in humans.<sup>1</sup> In the mouse, genome-wide linkage mapping of genes controlling CL caused by *L. major* has demonstrated complex genetic control,<sup>3,4,15–18</sup> among which a particular role for wound healing genes has been proposed.<sup>19</sup> Recent fine mapping in the region of chromosome 9 in mice (chromosome 11q24 in humans) has identified *Fli1* (Friend leukaemia virus integration 1; *FLII* in humans) as a novel candidate influencing both resistance to *L. major* and enhanced wound-healing responses.<sup>20</sup> We also recently reported<sup>8</sup> associations between CL caused by *L. braziliensis* infection in humans and polymorphisms at *CXCR1/SLC11A1*, which we interpreted in relation to their roles in regulating polymorphonuclear neutrophils, macrophages and/or dendritic cells in wound-healing responses. Here we report on primary and replication family-based genetic association studies that support a role for polymorphism at *FLII* in determining susceptibility to CL caused by *L. braziliensis* in Brazil.

To undertake our study, we selected four single nucleotide polymorphisms (SNPs; Table 1) that tagged the first two of four major linkage disequilibrium blocks in the large (>50 kb) intron 1 of the *FLII* gene (Figure 1a). The SNPs selected also tagged the proximal promoter region that contains a functional GAn microsatellite,<sup>21</sup> as well as the CpG island that spans the proximal promoter region and the 5' region of intron 1 (Figure 1a). We focused on this region extending into intron 1 of *FLII* because a previous study<sup>22</sup> had demonstrated a functional ETS/ETS/GATA (E-twenty six family of transcription factors;<sup>23</sup> GATA family of transcription factors that bind to the sequence GATA<sup>24</sup>) enhancer element residing in this intron (Figure 1a). *FLII* is itself a member of the ERG sub-family of ETS transcription factors.<sup>23</sup> The 4 tag-SNPs (Table 1) had minor allele frequencies >0.1 in the HapMap populations representative of the three major ethnicities (Caucasian, African and Asian) that contribute to this population in Brazil.

Initially we genotyped these SNPs in 168 nuclear families (Table 2) used in our previous studies<sup>8,9</sup> that contain 250 CL cases and 87 ML cases collected in the area of Corte de

Pedra, Bahia, Brazil, where *L. braziliensis* is endemic. Using robust case-pseudocontrol conditional logistic regression analysis (Table 3), we demonstrated association between the common allele C (odds ratio (OR) 1.64;  $P = 0.003$ ) at SNP rs7930515 and risk of CL, which was replicated (OR 1.60;  $P = 0.014$ ) in a second sample (Table 2) of 402 CL cases in 157 nuclear families (combined OR 1.62;  $P = 1.8 \times 10^{-4}$ ; Table 3) collected in the same region of Corte de Pedra. Application of a Bonferroni correction for four independent SNPs provides a significance cutoff of  $P \leq 0.013$  (that is,  $P = 0.05/4$ ), which is achieved at rs7930515 in primary and combined samples. Power to detect association with ML disease in our study is limited by sample size. Single point association analysis undertaken in TRANSMIT (<http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/transmit.txt>) (Figure 2) using the combined primary and replication samples was suggestive of association at this SNP for ML. This showed overtransmission of the minor allele A at SNP rs7930515, consistent with the observation that analysis of CL and ML cases together as leishmaniasis *per se* showed reduced significance compared with analysis of cases with a long history of CL only disease. Haplotype analysis in TRANSMIT (Figure 2 and Supplementary Figure 1) demonstrated (a) that haplotypes controlling CL extended across the remaining tag-SNPs, strongest over the region containing the enhancer element, and (b) that ML was associated with the inverse 2.1.2 (= A.A.T) rs793515\_rs6199521\_rs590520 haplotype compared with CL (1.2.1 = C.G.C; Figure 2). Data for one degree of freedom tests for specific haplotype associations presented in Figure 2 are supported by global test statistics (Supplementary Figure 1) in which the total number of haplotypes is taken into account as indicated by the degrees of freedom. Diminishing strength of the CL haplotype associations (Figure 2; Supplementary Figure 1) moving 3' across the four SNPs concurs with the observation in this Brazilian population that, although  $D'$  between rs7930515 and rs619521 ( $D' = 0.62$ ) and between rs590520 and rs531894 ( $D' = 0.86$ ) are relatively high,  $r^2$  values that take allele frequencies into account are low (0.11 and 0.29, respectively) and below the stringent cutoff ( $r^2 = 0.8$ ) we set in choosing tag SNPs. In summary, the association between *FLI1* and CL observed in primary and replication samples appears to map within linkage disequilibrium block 1 (Figure 1b) to the region that is most strongly tagged by SNP rs7930515 and closest to the proximal promoter containing the functional GAn microsatellite repeat, with haplotype associations extending across the region of intron 1 containing the functional ETS/ETS/GATA enhancer element proximal of SNP rs619521. Interestingly, no SNPs are observed in public domain databases within the region of the ETS/ETS/GATA enhancer element (Supplementary Figure 2), attesting to its importance as a highly conserved regulatory element.<sup>22</sup> The *FLI1* promoter is itself upregulated by ETS factors ETS1, ETS2, FLI1 and ELF1, in combination with GATA factors.<sup>25</sup> Recent improved motif identification and analysis of ChIP-Seq data demonstrated that FLI1 activates gene transcription when its binding site is located in close proximity to the gene transcription start site (up to ~150 kb), especially when it contains a microsatellite sequence.<sup>26</sup> Hence, there may be strong functional significance to the maintenance of linkage disequilibrium across the proximal promoter and intron 1 of *FLI1* containing the GAn microsatellite and the ETS/ETS/GATA enhancer.

Here we have demonstrated association (combined OR 1.62; 95% confidence interval 1.26–2.09;  $P = 1.8 \times 10^{-4}$ ) between *FLI1* and susceptibility to CL caused by *L. braziliensis*. This follows on from genetic and functional mapping of the *lmr2* gene controlling cutaneous lesions caused by *L. major* on murine chromosome 9 to the *Flil* gene.<sup>20</sup> Resistance to *L. major* correlated with a wound-healing response that presented in congenic resistant mice as a large population of fibroblasts and an organized and abundant deposition of collagen bundles in the absence of inflammatory cells. Recent studies have shown an association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the *FLI1* gene.<sup>27</sup> In congenic susceptible mice, response to wounding was associated with a larger population of acute inflammatory cells with sparse and disorganized collagen bundles. In a previous

study<sup>9</sup> we found an association between CL caused by *L. braziliensis* and a regulatory polymorphism in the promoter of the gene *IL6* encoding interleukin 6. Homocysteine-dependent stimulation of interleukin 6 has recently been reported<sup>28</sup> to upregulate genes essential for epigenetic DNA methylation (DNA (cytosine-5-)-methyl-transferases (Dnmts) via expression of FLII. Homocysteine increases the CpG methylation status (and hence represses gene expression) of the CpG-rich proximal promoter of the lysyl oxidase (*LOX*) gene,<sup>28</sup> an extra-cellular copper enzyme that initiates the cross-linking of collagens and elastins. Inhibition of interleukin 6 reverses this repression. Regulation of collagen expression and organization may thus involve epigenetic regulation at both *FLII* and *LOX* genes, consistent with the presence of the CpG motif across the region of the functional *FLII* promoter elements. This suggests that, although there are many immune-related functions for both interleukin 6 and FLII that could account for association with CL caused by *L. braziliensis*, there may be a direct functional link between these two genes that mediates resistance or susceptibility to infection through the wound-healing response. This, in turn, might provide a novel therapeutic opportunity. For example, the use of imatinib mesylate has been proposed for treatment of systemic sclerosis,<sup>29,30</sup> an autoimmune disorder similarly resulting from immune activation, fibrosis development and damage of small blood vessels, in which FLII is downregulated through an epigenetic mechanism.<sup>30</sup> Imatinib mesylate reverses the expression levels of FLII. Further work will be required to analyse expression levels of FLII in tissue biopsies from *L. braziliensis* patients to determine its potential as a therapeutic target. Overall our results strengthen the potential role of genes/mechanisms associated with wound healing in CL, and suggest that a broader analysis of pathways involved in wound-healing responses may contribute to a better understanding of the pathogenesis of disease.

### Acknowledgments

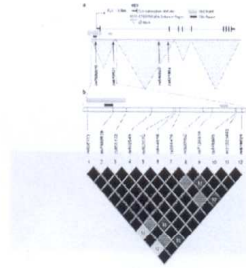
We acknowledge the support of NIH Grant AI 30639 for the field work in Brazil, and The Wellcome Trust for supporting the laboratory work and statistical analyses carried out in the UK. LC was supported by NIH/FIC 1 D43 TW007127-01 for her period of stay in UK. JO and AM were also supported by NIH/FIC 1 D43 TW007127-01 in Brazil.

### References

1. Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol.* 2009; 31:254–266. [PubMed: 19388946]
2. El-Safi S, Kheir MM, Bucheton B, Argiro L, Abel L, Dereure J, et al. Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. *C R Biol.* 2006; 329:863–870. [PubMed: 17067929]
3. Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2009; 25:383–391. [PubMed: 19617002]
4. Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:294–305. [PubMed: 16543933]
5. Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res.* 1993; 26:233–238. [PubMed: 7670536]
6. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70:6734–6740. [PubMed: 12438348]
7. Cabrera M, Shaw M-A, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in TNF genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1995; 182:1259–1264. [PubMed: 7595196]

8. Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. *BMC Med Genet.* 2010; 11:10. [PubMed: 20089160]
9. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis.* 2006; 194:519–527. [PubMed: 16845637]
10. Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008; 180:6139–6148. [PubMed: 18424735]
11. Ramasawmy R, Menezes E, Magalhaes A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, et al. The-2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010; 10:607–613. [PubMed: 20430117]
12. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65:87–89. [PubMed: 11508396]
13. D'Oliveira A Jr, Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35:7–10. [PubMed: 11873254]
14. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa JJ, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005; 73:7853–7859. [PubMed: 16299275]
15. Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, Coffman RL. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity.* 1997; 6:551–557. [PubMed: 9175833]
16. Mock B, Blackwell J, Hilgers J, Potter M, Nacy C. Genetic control of *Leishmania major* infection in congenic, recombinant inbred and F2 populations of mice. *Eur J Immunogenet.* 1993; 20:335–348. [PubMed: 9098402]
17. Roberts M, Mock BA, Blackwell JM. Mapping of genes controlling *Leishmania major* infection in CXS recombinant inbred mice. *Eur J Immunogenet.* 1993; 20:349–362. [PubMed: 9098403]
18. Havelkova H, Badalova J, Svobodova M, Vojtikova J, Kurey I, Vladimirov V, et al. Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects. *Genes Immun.* 2006; 7:220–233. [PubMed: 16511555]
19. Sakhianandeswaren A, Elso CM, Simpson K, Curtis JM, Kumar B, Speed TP, et al. The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:15551–15556. [PubMed: 16223880]
20. Sakhianandeswaren A, Curtis JM, Elso C, Kumar B, Baldwin TM, Lopaticki S, et al. Fine mapping of *Leishmania major* susceptibility Locus *Imr2* and evidence of a role for *Fli1* in disease and wound healing. *Infect Immun.* 2010; 78:2734–2744. [PubMed: 20368343]
21. Morris EE, Amria MY, Kistner-Griffin E, Svenson JL, Kamen DL, Gilkeson GS, et al. A GA microsatellite in the *Fli1* promoter modulates gene expression and is associated with systemic lupus erythematosus patients without nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R212. [PubMed: 21087477]
22. Donaldson IJ, Chapman M, Kinston S, Landry JR, Knezevic K, Piltz S, et al. Genome-wide identification of cis-regulatory sequences controlling blood and endothelial development. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:595–601. [PubMed: 15649946]
23. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:827–837. [PubMed: 11715049]
24. Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol.* 1993; 13:4011–4022. [PubMed: 8321208]
25. Svenson JL, Chike-Harris K, Amria MY, Nowling TK. The mouse and human *Fli1* genes are similarly regulated by Ets factors in T cells. *Genes Immun.* 2010; 11:161–172. [PubMed: 19829305]

26. Boeva V, Surdez D, Guillon N, Tirode F, Fejes AP, Delattre O, et al. *De novo* motif identification improves the accuracy of predicting transcription factor binding sites in ChIP-Seq data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:e126. [PubMed: 20375099]
27. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2271–2279. [PubMed: 16802366]
28. Thaler R, Agsten M, Spitzer S, Paschalis EP, Karlic H, Klaushofer K, et al. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1 and epigenetic DNA-methylation. *J Biol Chem.* 2010; 286:5578–5588. [PubMed: 21148317]
29. Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2010; 37:54–70. [PubMed: 20175840]
30. Asano Y, Bujor AM, Trojanowska M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2010; 59:153–162. [PubMed: 20663647]
31. Clayton D. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *Am J Hum Genet.* 1999; 65:1170–1177. [PubMed: 10486336]
32. NCBI. Entrez SNP. 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
33. Knapp M. A note on power approximations for the transmission disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:1177–1185. [PubMed: 10090903]
34. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ('espundia' Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80:859–876. [PubMed: 3037735]
35. O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1998; 63:259–266. [PubMed: 9634505]
36. Cordell HJ, Barratt BJ, Clayton DG. Case/pseudocontrol analysis in genetic association studies: A unified framework for detection of genotype and haplotype associations, gene-gene and gene-environment interactions, and parent-of-origin effects. *Genet Epidemiol.* 2004; 26:167–185. [PubMed: 15022205]



**Figure 1.**

Gene structure of *FLII* showing position of SNPs used in this study in relation to linkage disequilibrium (LD) blocks and functional regulatory elements. (a) A diagrammatic representation of gene structure, the location of the GAn repeat and the ETS/ETS/GATA enhancer, the positions of SNPs, and the four large LD blocks (as determined for the CEU HapMap sample) that cover the gene. (b) Provides more detail of the first LD block in intron 1 that contains the associated SNP rs7930515 relative to the functional regulatory elements.  $D'$  values and confidence levels (LOD) are represented as black for  $D' = 1$ ,  $LOD > 2$ ; shades of grey for high  $D' < 1$ ,  $LOD > 2$ ; white (none present) for  $D' < 1$ ,  $LOD < 2$ . The numbers within the squares represent the  $D'$  scores for pairwise LD. Where no numbers occur that  $D'$  value is 1 (that is, 100%).



Haplotype	CL		ML	
	Frequency	P-value	Frequency	P-value
1.1	0.12	0.0001	0.10	0.0001
1.2	0.10	0.0001	0.08	0.0001
1.3	0.08	0.0001	0.06	0.0001
1.4	0.06	0.0001	0.04	0.0001
1.5	0.04	0.0001	0.02	0.0001
1.6	0.02	0.0001	0.01	0.0001
1.7	0.01	0.0001	0.00	0.0001
1.8	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.9	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.10	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.11	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.12	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.13	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.14	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.15	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.16	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.17	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.18	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.19	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.20	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.21	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.22	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.23	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.24	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.25	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.26	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.27	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.28	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.29	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.30	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.31	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.32	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.33	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.34	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.35	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.36	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.37	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.38	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.39	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.40	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.41	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.42	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.43	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.44	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.45	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.46	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.47	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.48	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.49	0.00	0.0001	0.00	0.0001
1.50	0.00	0.0001	0.00	0.0001

**Figure 2.**

Results of the single point (global  $P$ -value) and haplotype (1 degree of freedom tests for individual haplotypes) analyses performed in TRANSMIT for combined families from primary and replication samples. TRANSMIT analyses, which use the EM algorithm to take account of missing parental data, were performed using the robust-ro flag to take account of family clustering.<sup>31</sup> Results are shown for over and undertransmitted haplotypes with estimated frequencies  $>0.1$  for (a) CL and (b) ML. The single point analysis concurs with the CPC analysis presented in the main text ( $P$ -values differ because TRANSMIT infers data for missing parents), with only SNP rs7930515 showing significant single point association with CL. Only haplotype associations with nominal  $P \leq 0.05$  are shown. The overtransmitted haplotypes (1.1 and 1.2) across the two 5' SNPs rs793515 and rs619521 show that the association maps to rs793515 for CL, but there is evidence of haplotype associations that extend across the region from the GAn repeat to the enhancer element (see Figure 1).

Table 1

Details of the *FLI1* intron 1-genotyped SNPs including allele frequencies for Caucasian (CEPH), Asian (HCB) and sub-Saharan (YRI) populations as recorded in Build 37.1 of the NCBI Entrez SNP database<sup>32</sup>

Gene/SNP	Physical position (bp)	Alleles <sup>a</sup>	MAF Brazil	Caucasian	Asian <sup>b</sup>	African <sup>b</sup>
FLI1_rs7930515	128564794	C>A	0.291	0.259	0.411	0.254
FLI1_rs619521	128578157	A>G	0.422	0.483	0.178	0.342
FLI1_rs590520	128620132	C>T	0.362	0.289	0.344	0.395
FLI1_rs531894	128628756	A>G	0.418	0.375	0.602	0.425

Abbreviations: MAF, minor allele frequency; SNP, single nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup> Major-minor alleles for this Brazilian population, which matches major-minor for the Hapmap CEU population.

<sup>b</sup> Frequency for the allele that is a minor allele in Hapmap CEU population.

Table 2

Characteristics of the primary and replication samples

	Primary sample			Replication sample		
	CL	ML	Leishmaniasis per se	CL	ML	Leishmaniasis per se
No cases	250	87	337	402	39	441
Males	128	60	188	219	24	243
Females	122	27	149	183	15	198
Age at disease						
Mean	19.1	30.3	22.4	21.5	26.6	21.9
95% CI	17.1–21.2	25.8–34.7	20.3–24.4	20.1–22.9	20.7–32.4	20.6–23.3
No nuclear families	168	—	168	157	—	157
Total N in families/trios	767	—	767	764	—	764

Abbreviations: CI, confidence interval; CL, cutaneous leishmaniasis; ML, mucosal leishmaniasis.

The study was conducted in the area of Corte de Pedra, Bahia, Brazil, where *L. braziliensis* is endemic. Corte de Pedra is in a region of rural rain forest, where agriculture underpins the local economy. Around 3300 subjects were interviewed during 4 years to select the study population. The primary sample was collected during the period 2000–2004; the replication sample during 2008–2010. For the primary sample, index cases of ML were ascertained from medical records of the Corte de Pedra Public Health Post, families visited and blood samples for DNA collected from all ML and CL cases, as well as available unaffected family members. For the replication sample, case samples and attending parents were sampled at the health post, and additional family members collected in follow-up visits to the household. The case definition of ML is a characteristic mucosal lesion with either parasitological confirmation or two of the three following criteria: positive delayed-type hypersensitivity test, positive leishmania serology and a histopathology suggestive of leishmaniasis. All cases in the current study also responded to antileishmanial therapy. CL is defined as the presence of a single chronic ulcerative lesion at a skin site without evidence of mucosal involvement and without evidence of dissemination to 10 or more sites (disseminated leishmaniasis), also confirmed by detection of parasites or two of the three criteria listed above. Past cases that have been treated in the health post of Corte de Pedra have their diagnoses confirmed by medical records using the same criteria defined above and all cases were examined for detection of a characteristic well-delimited scar. Informed consent was obtained from all the participants and the research was approved by the ethical committee of the Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Brazil. Transmission disequilibrium test (TDT) power approximations<sup>33</sup> show that 250 primary, 402 replication and 652 combined CL trios had  $\geq 53\%$ ,  $\geq 76\%$ , and  $\geq 94\%$  power, respectively, to detect an odds ratio  $\geq 1.5$  at  $P = 0.01$  for markers with minor allele frequency  $\geq 0.2$ . For leishmaniasis per se, 337 primary, 441 replication, and 778 combined CL trios had  $\geq 81\%$ ,  $\geq 81\%$  and  $\geq 97\%$  power, respectively, to detect an odds ratio  $\geq 1.5$  at  $P = 0.01$  for markers with minor allele frequency  $\geq 0.2$ . In contrast, primary, replication and combined ML trios all had  $\geq 20\%$  power for the same parameters. As markers used for association analysis were not known to be causal variants, or to be in complete LD with a functional variant, robust association tests were performed to take account of multiple trios within a pedigree. It is possible that some CL cases in our study could progress to ML disease at a later date. Epidemiological studies show that this will affect  $< 4\%$  of CL patients,<sup>34</sup> thus representing a small reduction in the power of our study to detect CL-specific genetic effects. Demographical, epidemiological and phenotype characteristics of these subjects were previously described in full.<sup>9</sup>

Table 3

Results of robust CPC analysis for *FLI1* tag SNP rs7930515 (see Table 1 and Figure 1) for transmission of alleles CPC analysis for transmission of alleles from heterozygous parents to CL, ML and *L. braziliensis* *per se* (CL and ML) individuals in families

Gene/marker	Sample set	Phenotype	Allele	# case/pseudo-control sets	OR	95% CI	P-value
FLI1_rs7930515	Primary	CL	C	78	1.65	1.18–2.29	<b>0.003</b>
	Replication	CL	C	131	1.60	1.10–2.33	<b>0.014</b>
	All	CL	C	209	1.62	1.26–2.09	<b>1.8 × 10<sup>-4</sup></b>
	Primary	ML	C	23	1.25	0.64–2.42	0.44
	Replication	ML	C	16	0.44	0.16–1.24	0.12
	All	ML	C	39	0.90	0.52–1.58	0.73
	Primary	CL+ML	C	101	1.54	1.09–2.18	<b>0.014</b>
	Replication	CL+ML	C	146	1.36	0.96–1.94	0.083
	All	CL+ML	C	247	1.45	1.13–1.85	<b>0.003</b>

Abbreviations: # case/pseudo-control sets, number of informative transmissions; CI, confidence interval; CL, cutaneous leishmaniasis; CPC, case/pseudo-control; ML, mucosal leishmaniasis; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism.

SNPs rs619521, rs590520 and rs531894 (see Table 1 and Figure 1) did not show significant single point associations, as demonstrated in Figure 2 for the combined analysis of families in TRANSMIT. Genotyping was performed in Cambridge using Taqman technology (Applied Biosystems, CA, USA) for SNPs presented in Table 1. All SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium in genetically unrelated founders of the families (data not shown). PEDCHECK35 was used to determine Mendelian inconsistencies within families. Missingness (that is failure to score on Taqman assays) ranged from 4.6% (43/935 individuals genotyped) to 10.3% (97/935) across the four SNPs. Association analyses were performed under an additive model using family-based CPC analysis,<sup>36</sup> where each affected offspring is matched to one to three pseudo-controls that derive from the remaining possible genotypes of the parental mating. OR, 95% CI and P-values are calculated using robust conditional logistic regression (CLOGIT) models employing a robust sandwich estimator of variance and a Wald  $\chi^2$  statistic to control for clustering of trios within pedigrees. CPC was implemented in STATA v8.0 (<http://www.stata.com/>).

Bold entries indicate P-values significant at  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS GERAIS

### VII. 1. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GÊNICAS NA POPULAÇÃO ESTUDADA

Como primeiros passos na análise dos genes avaliados, foram feitos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e cálculos de frequência alélica para os marcadores testados neste estudo. Um total de 20 marcadores (SNPs) em seis genes foi avaliado. De acordo com o teste de EHW realizado pelo método de regressão logística condicional, todos os SNPs se mantiveram dentro do equilíbrio na população ( $p > 0,05$ ), o que nos possibilitou seguir analisando todos os marcadores na amostragem. Desvios do EHW indicam problemas técnicos na genotipagem sugerindo eliminação de marcadores que recaiam sobre essa condição (Pacheco & Moraes, 2009). Em relação às frequências alélicas, para melhor visualização, apresentaremos os dados em forma de tabelas. Todos os SNPs testados na população de Corte de Pedra apresentaram frequência alélica mínima maior do que 15% na população (Tabelas 4 a 9).

Tabela 4: frequências alélicas dos marcadores do gene *TGFB1* na população de Corte de Pedra, Bahia.

TGFB1		
	rs2241715 C/A	rs1800469 G/A
Alelo 1	0,650	0,672
Alelo 2	0,350	0,328

rs2241715: alelo 1 = C, alelo 2 = A; rs1800469: alelo 1 = G, alelo 2 = A.

Tabela 5: freqüências alélicas dos marcadores do gene *TGFBR1* na população de Corte de Pedra, Bahia.

<b>TGFBR1</b>			
	<b>rs10760673 G/A</b>	<b>rs2026811 C/A</b>	<b>rs334358 T/G</b>
<b>Alelo 1</b>	0,732	0,711	0,199
<b>Alelo 2</b>	0,268	0,289	0,801

rs10760673: alelo 1 = G, alelo 2 = A; rs2026811: alelo 1 = C, alelo 2 = A;  
rs334358: alelo 1 = T, alelo 2 = G.

Tabela 6: freqüências alélicas dos marcadores do gene *TGFBR2* na população de Corte de Pedra, Bahia.

<b>TGFBR2</b>						
	<b>rs6550005 G/A</b>	<b>rs4955212 G/A</b>	<b>rs13081020 T/C</b>	<b>rs1962859 C/T</b>	<b>rs934328 G/A</b>	<b>rs2116142 G/A</b>
<b>Alelo 1</b>	0,648	0,740	0,632	0,194	0,361	0,317
<b>Alelo 2</b>	0,352	0,260	0,368	0,806	0,639	0,683

rs6550005: alelo 1 = G, alelo 2 = A; rs4955212: alelo 1 = G, alelo 2 = A;  
rs13081020: alelo 1 = T, alelo 2 = C; rs1962859: alelo 1 = C, alelo 2 = T;  
rs934328: alelo 1 = G, alelo 2 = A; rs2116142: alelo 1 = G, alelo 2 = A.

Tabela 7: freqüências alélicas dos marcadores do gene *CTGF* na população de Corte de Pedra, Bahia.

<b>CTGF</b>			
	<b>rs6918698 G/C</b>	<b>rs9493150 G/C</b>	<b>rs2151532 G/A</b>
<b>Alelo 1</b>	0,460	0,636	0,160
<b>Alelo 2</b>	0,540	0,364	0,840

Rs6918698: alelo 1 = G, alelo 2 = C; rs9493150: alelo 1 = G, alelo 2 = C;  
rs2151532: alelo 1 = G, alelo 2 = A.

Tabela 8: frequências alélicas dos marcadores do gene *SMAD2* na população de Corte de Pedra, Bahia.

<b>SMAD2</b>		
	<b>rs1792658 C/A</b>	<b>rs1631576 T/C</b>
<b>Alelo 1</b>	0,290	0,428
<b>Alelo 2</b>	0,710	0,572

rs1792658: alelo 1 = C, alelo 2 = A; rs1631576: alelo 1 = T, alelo 2 = C.

Tabela 9: frequências alélicas dos marcadores do gene *FLII* na população de Corte de Pedra, Bahia.

<b>FLI1</b>				
	<b>rs7930515 C/A</b>	<b>rs619521 T/C</b>	<b>rs590520 T/C</b>	<b>rs531894 T/C</b>
<b>Alelo 1</b>	0,683	0,588	0,377	0,573
<b>Alelo 2</b>	0,317	0,412	0,623	0,427

rs7930515: alelo 1 = C, alelo 2 = A; rs619521: alelo 1 = T, alelo 2 = C; rs590520: alelo 1 = T, alelo 2 = C; rs531894: alelo 1 = T, alelo 2 = C.

## VII. 2. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES AVALIADOS E O FENÓTIPO LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC)

Devido a resultados obtidos por cálculo de poder amostral, descreveremos os dados, à exceção do gene *FLII*, considerando o somatório total de famílias. Ou seja, contabilizando em um só grupo as famílias do grupo primário e do grupo de replicação (total de 225 famílias). Descreveremos os resultados obtidos levando em consideração os três fenótipos de doença analisados (LC, LM e leishmaniose *per se*). Neste sub-tópico, serão descritos os resultados obtidos para LC.

Para o gene *TGFBI*, não observamos associação entre os marcadores testados (rs1800469 e rs2241715) e essa forma da doença ( $p > 0,05$ ). Em relação aos genes dos receptores de TGF- $\beta$ , *TGFBR1* e *TGFBR2*, o alelo C do SNP rs1962859 C/T do gene *TGFBR2* mostrou associação com LC no teste de desequilíbrio de ligação (TDT) ( $X^2 = 6,4$  e  $p = 0,011$ ), a qual foi confirmada no modelo de regressão logística condicional (RLC) (OR = 0,66; IC 95% = 0,50-0,88;  $p = 0,005$ ). O gene de *SMAD2* teve o alelo C do marcador rs1792658 C/A também significativamente associado à LC na população, tanto no teste do TDT ( $X^2 = 9,1$  e  $p = 0,002$ ) como no teste de RLC (OR = 0,63; IC 95% = 0,42-0,95;  $p = 0,029$ ). Em relação ao gene *CTGF*, os três marcadores foram associados com o fenótipo LC. O alelo G do SNP rs6918698 G/C (TDT:  $X^2 = 6,4$  e  $p = 0,011$ ; RLC: OR = 1,26; IC 95% = 1,01-1,57;  $p = 0,036$ ), o alelo G do SNP rs9493150 G/C (TDT:  $X^2 = 4,4$  e  $p = 0,034$ ; RLC: OR = 1,31; IC 95% = 1,01-1,70;  $p = 0,039$ ) e, finalmente, o genótipo GG do SNP rs2151532 (RLC: OR = 3,17; IC 95% = 1,26-7,96;  $p = 0,014$ ).



Em relação ao gene de *FLII*, de acordo com o artigo em anexo a esta dissertação (Castellucci *et al.*, 2011), as famílias que constam no banco de DNA do laboratório, as quais foram coletadas em dois períodos diferentes, foram divididas em amostragem primária, coletada entre 2000 e 2004, e amostragem de replicação, coletada entre 2008 e 2010. SNPs do íntron 1 ligados ao promotor e elementos regulatórios (“*haplo-tagging SNPs*”) foram analisados em 68 famílias de múltiplos casos (250 casos de LC e 87 casos de LM) e replicados em 157 famílias (402 casos de LC e 39 casos de LM), todas provenientes da área endêmica de Corte de Pedra, Bahia. Análise de regressão logística robusta mostrou associação entre o alelo C do marcador rs7930515 e LC (OR = 1,65; IC 95% = 1,80-2,29;  $p = 0,003$ ), que foi confirmada (OR = 1,60; IC 95% = 1,10-2,33;  $p = 0,014$ ) no grupo de replicação (análise combinada:  $p = 1,8 \times 10^{-4}$ ). *FLII*\_rs7930515 está em desequilíbrio de ligação com elementos funcionais do promotor. As tabelas 10 e 11 mostram o resumo dos dados descritos acima.

Tabela 10: Resultados da análise de associação entre os genes *TGFBR2*, *SMAD2* e *CTGF* e o fenótipo LC.

Gene/Marcador	Alelo	TDT		Regressão Logística Condicional		
		$\chi^2$	$p$	OR	IC 95%	$p$
<b>TGFBR2_1962859</b>	C	6,4	0,011	0,66	0,50-0,88	0,005
<b>SMAD2_rs1792658</b>	C	9,18	0,002	0,63	0,42-0,95	0,030
<b>CTGF_rs6918698</b>	G	3,87	0,048	1,26	1,01-1,57	0,036
<b>CTGF_rs9493150</b>	G	4,48	0,034	1,31	1,01-1,70	0,039
<b>CTGF_rs2151532</b>	GG	-	-	3,17	1,26-7,96	0,014

Abreviações: TDT: teste de desequilíbrio de ligação;  $\chi^2$ : qui-quadrado; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. A tabela resume os dados apenas dos marcadores que mostraram significância estatística.

Tabela 11: Resultados da análise de regressão logística condicional robusta entre o gene *FLII* e o fenótipo LC.

Gene/Marcador	Amostra	Fenótipo	Alelo	OR	IC 95%	P
<b>FLI1_rs7930515</b>	Primária	LC	C	1,65	1,18-2,29	0,003
	Replicação	LC	C	1,60	1,10-2,33	0,014
	Combinada	LC	C	1,62	1,26-2,09	1,8 x 10 <sup>-4</sup>

Abreviações: LC: leishmaniose cutânea; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

### VII. 3. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES AVALIADOS E O FENÓTIPO LEISHMANIOSE MUCOSA (LM)

Nesta análise, não observamos nenhuma associação estatisticamente significativa entre os marcadores dos genes *TGFB1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *CTGF*, *SMAD2* e *FLII* testados e o desenvolvimento da LM na população da área endêmica de Corte de Pedra. Assim, nossos resultados indicam que os genes avaliados estão em associação com o desenvolvimento apenas do fenótipo de doença LC, mas não LM.

## VII. 4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES AVALIADOS E O FENÓTIPO LEISHMANIOSE *PER SE*

O grupo leishmaniose *per se* é composto pelos indivíduos que tiveram uma ou ambas as formas de doença, LC e LM. Como ocorre na grande maioria dos casos, indivíduos que têm LM desenvolveram antes ou concomitantemente LC. Assim, este grupo se comportou de forma essencialmente parecida com o grupo de leishmaniose cutânea, com a diferença de que os indivíduos com LM modificaram levemente o efeito observado por estes genes. Assim, não foi observada associação entre os marcadores do gene *TGFBI* e o fenótipo leishmaniose *per se*. Do mesmo modo, em relação aos genes de seus receptores, *TGFBR1* e *TGFBR2*, o alelo C do SNP rs1962859 C/T do gene *TGFBR2* mostrou associação com leishmaniose *per se* no TDT ( $X^2 = 4,26$  e  $p = 0,039$ ), a qual foi confirmada no modelo de regressão logística condicional (OR = 0,74; IC 95% = 0,56-0,95;  $p = 0,019$ ). Em relação ao gene *SMAD2*, o alelo C do SNP rs1792658 C/A também foi associado com o fenótipo leishmaniose *per se* (TDT:  $X^2 = 11,79$  e  $p = 0,0005$ ; RLC: OR = 0,61; IC 95% = 0,42-0,90;  $p = 0,012$ ). No caso do gene *CTGF*, o genótipo GG do marcador rs2151532 (OR = 2,94; IC 95% = 1,24-6,96;  $p = 0,014$ ) e o genótipo CC do marcador rs6918698 foram associados a este fenótipo (OR = 1,5; IC 95% = 1,00-2,25;  $p = 0,049$ ), assim como o alelo G do SNP rs9493150 G/C, tanto no teste do TDT ( $X^2 = 4,80$  e  $p = 0,028$ ) como no teste de RLC (OR = 1,29; IC 95% = 1,03-1,63;  $p = 0,026$ ).

Para análise de associação entre marcadores do gene de *FLII* e o fenótipo leishmaniose *per se*, análise de regressão logística robusta mostrou associação entre o alelo C do marcador rs7930515 e leishmaniose *per se* na amostragem primária (OR = 1,54; IC 95% = 1,09-2,18;  $p = 0,014$ ) e na análise combinada (OR = 1,45; IC 95% =

1,13-1,85;  $p = 0,003$ ). As tabelas 12 e 13 mostram o resumo dos resultados descritos acima.

Tabela 12: Resultados da análise de associação entre os genes *TGFBR2*, *SMAD2* e *CTGF* e o fenótipo leishmaniose *per se*.

Gene/Marcador	Alelo	TDT		Regressão Logística Condicional		
		$\chi^2$	$p$	OR	IC 95%	$p$
TGFBR2_1962859	C	4,26	0,039	0,73	0,56-0,95	0,019
SMAD2_rs1792658	C	11,79	0,0005	0,61	0,42-0,90	0,012
CTGF_rs2151532	GG	-	-	2,94	1,24-6,96	0,014
CTGF_rs6918698	CC	-	-	1,5	1,00-2,25	0,049
CTGF_rs9493150	G	4,80	0,028	1,29	1,03-1,63	0,026

Abreviações: TDT: teste de desequilíbrio de ligação;  $\chi^2$ : qui-quadrado; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. A tabela resume os dados apenas para marcadores que mostraram significância estatística.

Tabela 13: Resultados da análise de regressão logística condicional robusta entre o gene *FLI1* e o fenótipo leishmaniose *per se*.

Gene/Marcador	Amostra	Fenótipo	Alelo	OR	IC 95%	P
FLI1_rs7930515	Primária	LC+LM	C	1,54	1,09-2,18	0,014
	Replicação	LC+LM	C	1,36	0,96-1,94	0,083
	Combinada	LC+LM	C	1,45	1,13-1,85	0,003

Abreviações: LC+LM: leishmaniose *per se*; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

## VII. 5. AVALIAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DOS GENES ESTUDADOS NA POPULAÇÃO DE CORTE DE PEDRA

Análise do desequilíbrio de ligação (DL) foi realizada por meio do programa Haploview v. 4.2 com “cut-off” de  $r^2 > 0,8$  usado para selecionar “tag-SNPs” baseados na frequência alélica da população caucasóide (CEU) do projeto HapMap. Com isso, buscamos selecionar SNPs mais informativos ao longo do gene, antes de comprar os ensaios de genotipagem. Um dos objetivos desta dissertação foi avaliar se ocorria a formação de haplótipos devido ao desequilíbrio de ligação entre os marcadores na população de Corte de Pedra. A medida de desequilíbrio de ligação pode ser dada em valores de  $D'$  e  $r^2$ . Quanto mais aproximado de 1,0, mais forte é a ligação entre os marcadores. Valores de  $D'$  e  $r^2$  baixos indicam recombinação entre marcadores. Os valores de  $r^2$  são dependentes da frequência alélica. As figuras 3 a 6 mostram os mapas dos padrões de desequilíbrio de ligação entre os SNPs dos genes, já separados nas famílias primárias e de replicação.

A análise dos SNPs feita par a par mostra que os 20 marcadores genotipados estão em DL ( $r^2 > 0,8$ ), ou seja, formam haplótipos na população de Corte de Pedra. Assim, o valor de  $p$  necessário para alcançar significância estatística levando múltiplos testes em consideração é  $p = 0,002$  ( $= 0,05/20$ ). Cálculos de poder mostram que o grupo de famílias primário (250 casos de LC) tem 53% de poder e o grupo de família de replicação (402 casos de LC) 76% de poder para detectar efeitos genéticos com uma *odds ratio* (OR)  $> 1,5$  e MFA  $\geq 0,15$ . Por outro lado, a combinação dos dois grupos familiares (652 casos de LC) teve 94% de poder de detectar associação para um efeito da mesma magnitude, valor de  $p$  e MFA. Similarmente, em relação ao grupo leishmaniose *per se* (i.e. LC+LM) os cálculos de poder mostraram

para as famílias primárias, de replicação e combinadas, 81%, 81% e 97% de poder, respectivamente. Como os dois grupos de famílias foram bem pareados geograficamente e demograficamente (Tabela 2), o poder estatístico para detectar associações genéticas com este grupo de genes ficou maximizado utilizando a combinação (somatório) das famílias.

Figura 4: Mapas dos padrões de desequilíbrio de ligação entre os SNPs dos genes *TGFB1* e *TGFBR1*.

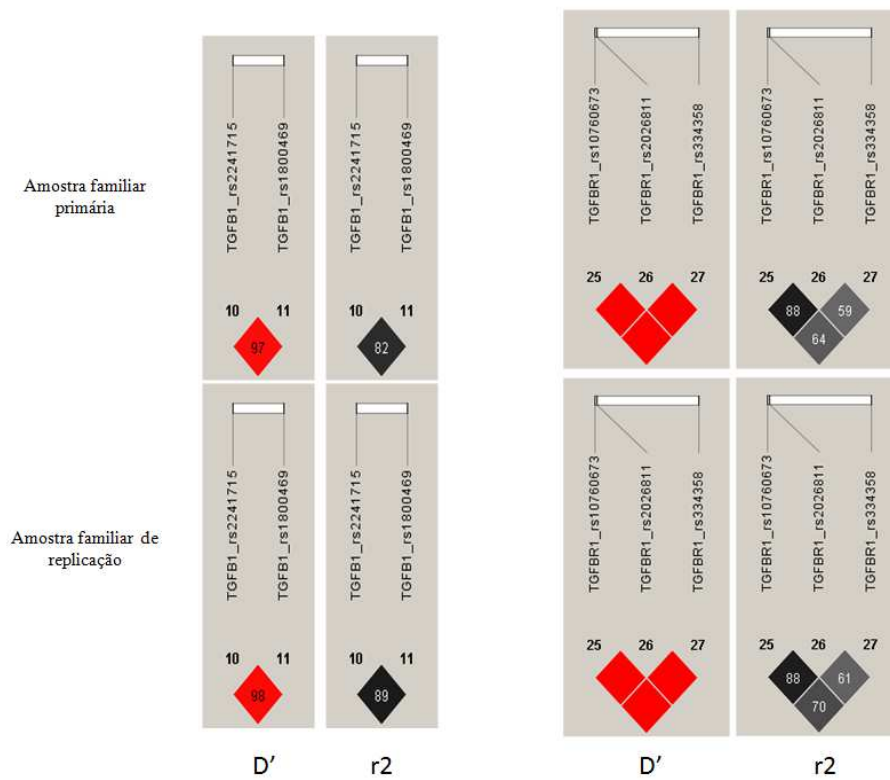


Figura 5: Mapa do padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *TGFBR2*.

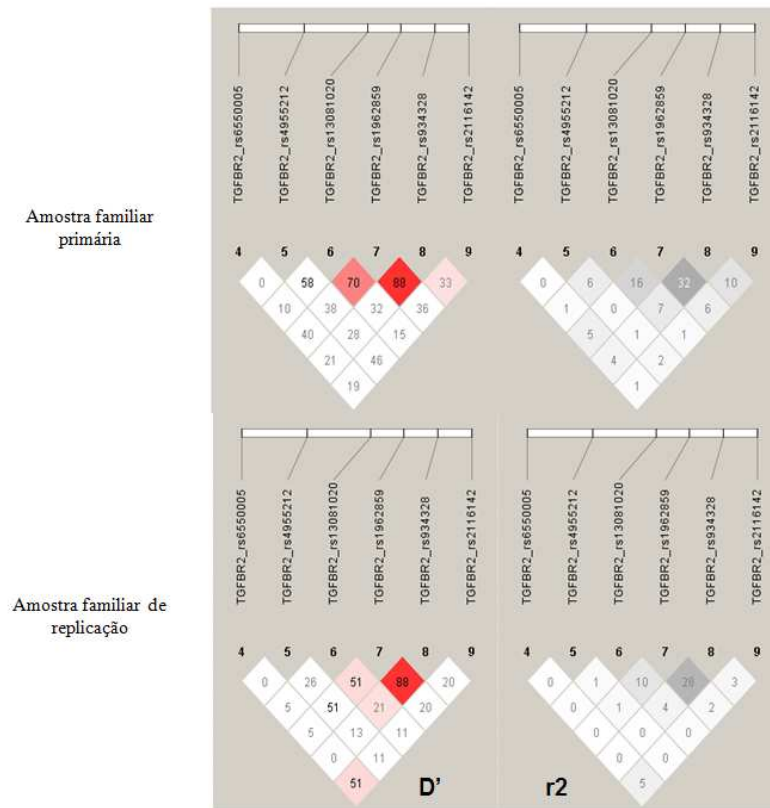


Figura 6: mapas dos padrões de desequilíbrio de ligação entre os SNPs dos genes *CTGF* e *FLII*.

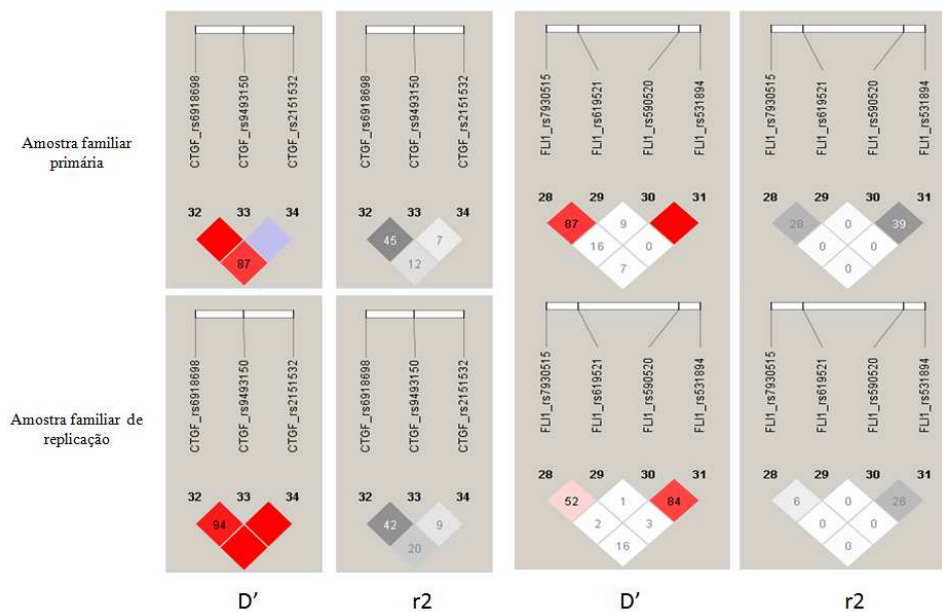
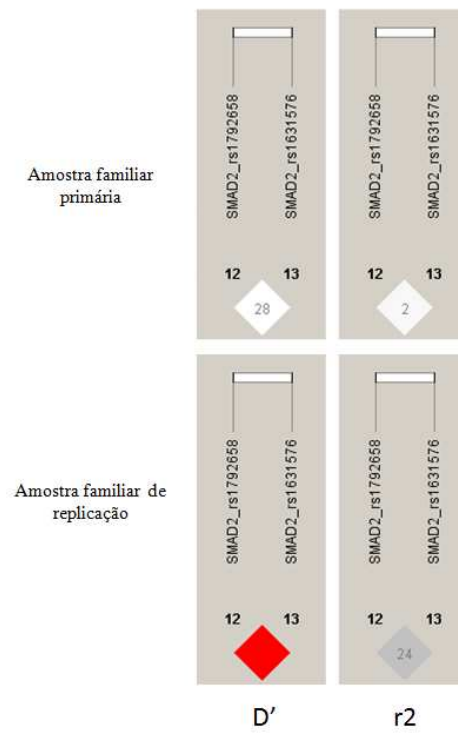


Figura 7: Mapa do padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *SMAD2*.





## VII. 6. AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL INTERATIVIDADE ENTRE OS GENES ESTUDADOS

Avaliamos se os genes testados interagiriam um com o outro de alguma forma. Em outras palavras, utilizamos ferramentas estatísticas para saber se estes genes adicionam efeitos independentes à leishmaniose (se alvejam variáveis/vias distintas) ou se, ao contrário, estão fazendo parte de um mesmo haplótipo ou ligados à mesma variável. Por meio de testes de análise de regressão logística condicional robusta do tipo intra-locus, detectamos que alguns marcadores testados não agem de maneira independente na via de ativação de *TGFBI*, ou seja, estes genes interagem juntos na leishmaniose tegumentar americana como descrito a seguir: embora os três SNPs do gene *CTGF* tenham mostrado associação com LC e leishmaniose *per se*, análises intra-locus (dados não mostrados neste trabalho) sugerem que estes SNPs estão ligados, provavelmente atuando sobre a mesma variante causal e que o efeito observado se deve ao papel funcional do marcador rs6918698, sendo este o SNP de escolha utilizado nestas análises. Assim, testes inter-locus mostraram que o SNP rs6918698 adiciona efeitos independentes quando comparado ao SNP de *FLII* rs7930515, previamente associado com LC na mesma população (Castellucci *et al.*, 2011). Adicionalmente, o SNP rs1962859 do gene *TGFBR2*, também adiciona efeitos independentes a marcadores de *FLII* e *CTGF* e vice-versa. Por outro lado, o SNP rs1792658 do gene *SMAD2*, também associado com a doença nas famílias de Corte de Pedra, adiciona efeitos independentes sobre *FLII*, *CTGF* e *TGFBR2*. Porém, o inverso não se observa em relação à *CTGF*, ou seja, isso indica que o efeito exercido por *CTGF* está condicionado à herança de determinados alelos de *SMAD2* (Tabela 14). Os genes de *TGFBI* e *TGFBR1* não apresentaram associação com nenhum fenótipo de doença analisado (LC, LM e leishmaniose *per se*) e por isso foram excluídos desta modalidade de análise.

Tabela 14: Resultados da análise de regressão logística incondicional inter-locus.

MODELO NULO	MODELO ALTERNATIVO	TESTE ROBUSTO		
		$\chi^2$	GL	P
FLI1_rs7930515	CTGF_rs6918698 + FLI1_rs7930515	13,07	1	0,0003
SMAD2_rs1792658	CTGF_rs6918698 + SMAD2_rs1792658	4,08	1	0,043
TGFBR2_rs1962859	CTGF_rs6918698 + TGFBR2_rs1962859	13,54	1	0,0002
CTGF_rs6918698	FLI1_rs7930515 + CTGF_rs6918698	7,14	2	0,028
SMAD2_rs1792658	FLI1_rs7930515 + SMAD2_rs1792658	10,43	1	0,0012
TGFBR2_rs1962859	FLI1_rs7930515 + TGFBR2_rs1962859	6,07	1	0,014
<b>CTGF_rs6918698</b>	<b>SMAD2_rs1792658 + CTGF_rs6918698</b>	<b>4,49</b>	<b>2</b>	<b>0,1061</b>
FLI1_rs7930515	SMAD2_rs1792658 + FLI1_rs7930515	18,09	1	0,00002
TGFBR2_rs1962859	SMAD2_rs1792658 + TGFBR2_rs1962859	7,04	1	0,008
CTGF_rs6918698	TGFBR2_rs1962859 + CTGF_rs6918698	9,58	2	0,008
FLI1_rs7930515	TGFBR2_rs1962859 + FLI1_rs7930515	12,36	1	0,0004
SMAD2_rs1792658	TGFBR2_rs1962859 + SMAD2_rs1792658	5,42	1	0,019

Análise de SNPs de *CTGF*, *FLI1*, *SMAD2* e *TGFBR2* para determinar efeitos de interatividade para o fenótipo leishmaniose cutânea na população de Corte de Pedra, Bahia. Resultados similares foram observados para leishmaniose per se (LC e LM), dados não mostrados. Em negrito, dado mostrando que CTGF\_rs6918698 não é independente de SMAD2\_rs1792658.

## VIII. DISCUSSÃO

Em muitos países, doenças infecciosas como a tuberculose, malária e leishmaniose são um problema de saúde pública relevante devido às taxas elevadas de infecção, morbidade e mortalidade registradas. A leishmaniose tem grande importância epidemiológica, no entanto, embora muitos avanços importantes no entendimento da sua patogênese e resposta imune tenham ocorrido nas últimas décadas, os conhecimentos gerados ainda não se traduziram em benefícios diretos para o paciente e o controle da doença. Particularmente na leishmaniose tegumentar, a dificuldade de controle epidemiológico advém da impossibilidade de eliminação do vetor e identificação de hospedeiros intermediários pela sua transmissão em regiões de mata. A implantação de medidas profiláticas, a exemplo de vacinas, passa por um melhor entendimento da resposta imune ao parasito e imunopatogênese da doença. Como a resposta do hospedeiro depende, em parte, de fatores genéticos e uma maior frequência de casos de leishmaniose tem sido observada em uma mesma família, a identificação de fatores hereditários que predisõem ao desenvolvimento de determinadas formas clínicas da doença poderia auxiliar a definição de novas estratégias terapêuticas e profilaxias para os indivíduos susceptíveis.

As doenças infecciosas são multifatoriais, sofrendo a influência de um grande número de variáveis que determinam o fenótipo clínico observado. Entre estas, podemos destacar fatores de exposição ambiental ligados a hábitos sócio-culturais, ocupacionais e de moradia das populações, fatores nutricionais, interações com outras doenças regionais e fatores genéticos que podem contribuir para o aumento da susceptibilidade ou resistência do indivíduo, bem como determinar a forma clínica da doença. No caso das doenças infecciosas, tais fatores de exposição ganham uma relevância ainda maior, haja vista que o risco

de concordância entre irmãos é menor, há dependência de um agente infeccioso essencial (Siddiqui *et al.*, 2001) e, para muitas, também a presença de um vetor de transmissão.

O presente estudo demonstrou uma associação entre *FLII* e susceptibilidade à LC causada por *L. braziliensis*. Este resultado segue o mapeamento genético e funcional de genes do locus *lmr2* murino, que identificou o gene de *FliI* como novo candidato influenciando resistência a *L. major*, correlacionada com uma resposta de cura de lesão apresentada em camundongos congênitos resistentes como uma grande população de fibroblastos, uma abundante e organizada deposição de feixes de colágeno e ausência de células inflamatórias (Sakthianandeswaren *et al.*, 2010). Estudos recentes têm mostrado uma associação entre um aumento na expressão de colágeno do tipo I e repressão epigenética do gene *FLII* (Wang *et al.*, 2006).

Análise haplotípica mostrou que a forma mucosa da doença está associada com o haplótipo inverso 2.1.2 (= A.A.T) rs7930515\_rs619521\_rs590520 comparado com LC (1.2.1 = C.G.C) (Figura 2 do artigo). A associação entre *FLII* e LC observada nas amostragens primária e de replicação parece se encontrar dentro do bloco 1 de desequilíbrio de ligação (Figura 1b do artigo), na região que é mais fortemente coberta pelo SNP rs7930515 e mais próxima do promotor que contém o microssatélite de repetição GAn funcional, com associações haplotípicas se estendendo através da região do íntron 1 que contém o elemento funcional *enhancer* ETS/ETS/GATA proximal do SNP rs619521. De maneira interessante, nenhum SNP é encontrado em bancos de dados de domínio público dentro da região do elemento *enhancer* ETS/ETS/GATA, atestando sua importância como um elemento regulatório altamente conservado (Donaldson *et al.*, 2005). O promotor do gene *FLII* é regulado positivamente por fatores ETS, ETS1, ETS2,

FLI1 e ELF1, em combinação com fatores GATA (Svenson *et al.*, 2010). Assim, pode haver um significado funcional forte para a manutenção do desequilíbrio de ligação entre o promotor e o íntron 1 de FLI1 que contém o microssatélite GAn e o *enhancer* ETS/ETS/GATA.

Em um estudo prévio, nosso grupo identificou uma associação entre LC causada por *L. braziliensis* e um polimorfismo regulatório na região promotora do gene que codifica a interleucina 6 (IL-6) (Castellucci *et al.*, 2006). Estimulação de IL-6 dependente de homocisteína foi recentemente descrita regulando positivamente genes essenciais para metilação epigenética do DNA via expressão de *FLII* (Thaler *et al.*, 2011). A homocisteína aumenta o estado de metilação das ilhas CpG (e, conseqüentemente, reprime a expressão do gene) do promotor do gene da lisil oxidase (*LOX*) (Thaler *et al.*, 2011), uma enzima extracelular que inicia o *cross-linking* de colágeno e elastina. A inibição da IL-6 inverte essa repressão. A regulação da organização e expressão de colágeno pode, assim, envolver a regulação epigenética em ambos, *FLII* e *LOX*, consistente com a presença de ilhas CpG na região de elementos funcionais do promotor de *FLII*. Isto sugere que, embora haja muitas funções imunológicas para *IL-6* e *FLII* que poderiam explicar a associação com LC causada por *L. braziliensis*, pode haver uma ligação direta funcional entre estes dois genes que medeia a resistência ou susceptibilidade à infecção através da resposta de cura de lesão. Isto, por sua vez, pode fornecer uma nova oportunidade terapêutica. Por exemplo, o uso de mesilato de imatinibe tem sido proposto para o tratamento da esclerose sistêmica (Asano, 2010; Asano *et al.*, 2010), uma desordem auto-imune semelhante, resultante de ativação imune, desenvolvimento de fibrose e danos de pequenos vasos sanguíneos, em que *FLII* é negativamente regulado através de um mecanismo epigenético (Asano *et al.*, 2010). O mesilato de imatinibe reverte os níveis de expressão de *FLII*. Assim, estudos adicionais serão necessários para analisar os níveis de expressão de

*FLII* em biópsias de tecidos de pacientes infectados por *L. braziliensis* para determinar seu potencial como alvo terapêutico.

No camundongo, *Fli1* age como um repressor de *CTGF*, competindo com fatores de transcrição Ets-1 em um equilíbrio dependente de Sp-1, tanto estimulando como reprimindo a expressão gênica (Nakerakanti *et al.*, 2006). Neste estudo, todos os três tag-SNPs de *CTGF* avaliados mostraram associações com LC e leishmaniose *per se*. Destes marcadores, o marcador rs6918698, situado a -945 pares de base “upstream” no gene *CTGF*, é conhecido como uma variante funcional (Fonseca *et al.*, 2007) cuja substituição de uma citosina (alelo C) por uma guanina (alelo G) cria um sítio para reguladores transcricionais Sp-1 e Sp-3. Em nosso estudo, o alelo G mostrou-se um fator de risco para LC e leishmaniose *per se*. O alelo G liga Sp-3 com alta afinidade para reprimir a expressão de *CTGF* (Fonseca *et al.*, 2007). Devido ao fato de as análises mostrarem que os marcadores de *CTGF* rs6918698, rs9493150 e rs2151532 não exercem efeitos independentes um sobre o outro, é provável que os três estejam causando o mesmo efeito genético que, nesse caso, provavelmente se deve ao papel funcional do marcador rs6918698. Nós concluímos que essa repressão de *CTGF* é um fator de risco para a doença e que este gene é necessário nos processos cicatriciais na leishmaniose. Interessantemente, nossas análises mostraram que o mesmo SNP de *CTGF* rs6918698 adiciona efeitos independentes e vice-versa ao SNP rs7930515 do gene *FLII*, o qual publicamos previamente estar associado com LC em Corte de Pedra (Castellucci *et al.*, 2011). Isso indica que polimorfismos de *CTGF* e *FLII* estão contribuindo cada qual com um efeito (talvez atuando em uma via diferente) na susceptibilidade a LC e, em menor proporção, no fenótipo leishmaniose *per se*.

Estudos prévios (Klass *et al.*, 2009) mostram que a molécula de TGF- $\beta$  regula positivamente a síntese de mRNA para CTGF. Dessa forma, expandimos nossos estudos de associação para outros genes da via de ativação do gene de TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$  liga dois receptores treonina kinase, TGFBR1 e TGFBR2, estabilizando a sua sinalização por vias dependentes de SMAD2/4 – e SMAD3. Em nosso estudo, não observamos associações entre a leishmaniose e os genes *TGFB1* e *TGFBR1*. Porém, um marcador do gene *TGFBR2*, rs1962859, foi associado com LC e leishmaniose *per se*. Dados mostram que *FLII* também age como um repressor de *TGFBR2* (Hahm *et al.*, 1999). Finalmente, o marcador de *SMAD2* rs1792658 foi também associado com LC e, embora seus efeitos sejam exercidos de forma independentes para *FLII*, *CTGF* e *TGFBR2*, o reverso não se confirma em relação à *CTGF*. Em outras palavras, os efeitos do gene *CTGF* são observados apenas sob influência de polimorfismos específicos de *SMAD2*, indicando a importância potencial da sinalização de TGF- $\beta$  via SMAD2 para indução de CTGF na LC.

As interações entre *FLII* e genes da via de sinalização de TGF- $\beta$  regula a deposição de colágeno e o processo de fibrose durante o processo de cura das lesões. Na pesquisa por associações genéticas que pudessem evidenciar processos de reparo tecidual importantes na leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis* em Corte de Pedra, Bahia, identificamos o gene *FLII* como importante biomarcador de doença, corroborando o papel observado previamente para este gene em modelo murino, e indicamos um papel para o gene *CTGF*, que, regulado pela sinalização da via SMAD2 na ativação de TGF- $\beta$ , é requerido como elemento de cicatrização na LC.

A regulação anormal de TGF- $\beta$  está implicada em um largo número de patologias fibróticas e inflamatórias, incluindo esclerose

múltipla e cirrose hepática. Assim, essa citocina é um importante regulador de ambos, fibrinogênese fisiológica e fibrose patológica, promovendo ativação de fibroblastos e diferenciação de miofibroblastos (Pohlers *et al.*, 2009). Em contraste, a forte resposta pró-inflamatória demonstrada por estudos imunológicos (Castes *et al.*, 1993; Bacellar *et al.*, 2002) e associações genéticas (Cabrera *et al.*, 1995; Castellucci *et al.*, 2006; Ramasawmy *et al.*, 2010) parecem acompanhar o fenótipo leishmaniose mucosa. Vale destacar que a importância de *FLII* e *CTGF/SMAD2* na via de ativação de TGF- $\beta$  no processo de cura de lesões tem feito destas moléculas alvos atrativos para intervenções terapêuticas (Asano, 2010).

Os resultados deste estudo reforçam o potencial papel de genes/mecanismos associados com a cicatrização das lesões na LC, e sugerem que uma análise mais ampla das vias envolvidas na resposta de cura das lesões pode contribuir para um melhor entendimento da patogênese da doença. Polimorfismos nos genes *FLII*, *CTGF* e *SMAD2* são fatores de risco para LC e, confirmando estudos prévios, a regulação fisiológica normal nos processos de cicatrização é importante para a cura mais rápida das lesões.



## IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

A cura da lesão de leishmaniose resulta do efeito de uma resposta imune equilibrada, assim como da cooperação de elementos da matriz e colágenos. Dados da literatura mostram que o processo de cicatrização é crítico para uma rápida cura na leishmaniose murina causada por *L. major*. Nós temos feito o “*screening*” de genes da via de ativação de TGF- $\beta$ , trabalhando com a hipótese de que genes associados com cura de lesão, mapeados em camundongo, poderiam também ser importantes biomarcadores de doença humana causada por *L. braziliensis*. Consistente com isso, o presente estudo identificou um polimorfismo no gene de *FLII* como fator de risco para leishmaniose cutânea na Bahia, em seguimento aos estudos de mapeamento dos genes controlando a LC murina causada por *L. major*. Em humanos, a regulação negativa da expressão de *FLII* resulta no aumento da expressão dos genes de colágeno do tipo I *COL1A1* e *COL1A2* e redução da expressão do gene da metaloproteinase de matriz (*MMP1*) em fibroblastos *in vitro*, sugerindo que a supressão de *FLII* está envolvida na ativação da resposta profibrótica (Nakerakanti *et al.*, 2006). Nesse sentido, é proposta de estudo posterior avaliar o polimorfismo dos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *MMP1* na população de Corte de Pedra e determinar se, e de que maneira, a expressão de *FLII* e genes na sua via de ativação (*COL1A1*, *COL1A2* e *MMP1*) se alteram como resultado da infecção por *L. braziliensis*.

Crescente evidência aponta para o papel da regulação epigenética de *FLII*. Por exemplo, a ilha CpG no promotor de *FLII* permanece não metilada em fibroblastos normais, resultando em um gene transcricionalmente ativo, mas em fibroblastos de pacientes com escleroderma, a metilação das mesmas ilhas CpG está significativamente aumentada, conduzindo à repressão da transcrição de

*FLII* e elevada transcrição de colágeno tipo I (Wang *et al.*, 2006). Como parte de nossos estudos preliminares, macrófagos humanos da linhagem THP-1 foram cultivados em 0, 3, 24, 48 e 72 horas para metilação e análise de expressão gênica respectivamente. Em resumo, macrófagos foram plaqueados a  $2 \times 10^6$  células por poço, estimulados com fitohemaglutinina em 10 ng/mL por 24 horas e infectados com antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL) em uma taxa 1:5 célula:parasitas. Confirmação e quantificação da infecção foram feitas em todos os tempos e mostrou que o percentual de infecção aumentou de 20% em 3 horas para 75% em 72 horas. Enquanto os níveis de expressão de *FLII* não se alteram de forma significativa em macrófagos não infectados, houve um decréscimo importante da expressão do gene nos macrófagos infectados, de forma que entre 24 e 72 horas a redução foi de mais de 15 vezes. Em relação à metilação do DNA, sob condições de não infecção, o DNA permanece totalmente não metilado, sendo que após a infecção com ASL um aumento da metilação parcial do DNA é observado entre 48 e 72 horas, consistente com o que foi observado em relação ao dado de expressão gênica. Esse dado preliminar indica que a infecção por *Leishmania* reprime a expressão de *FLII* em macrófagos. O concomitante aumento da metilação nas ilhas CpG de *FLII* indica que esta redução dos níveis de expressão tem origem epigenética. Adicionalmente, em um estudo prévio nós observamos associação entre leishmaniose causada por *L. braziliensis* e um polimorfismo regulatório no promotor do gene de *IL-6*. Dados têm mostrado que esta citocina pode regular positivamente genes essenciais para a metilação epigenética do DNA, através da expressão de *FLII*, o que sugere uma interação funcional entre os dois genes (Thaler *et al.*, 2011). Desse modo, iremos dar continuidade ao presente estudo também avaliando a expressão gênica de *FLII* e genes sob sua regulação (*COL1A1*, *COL1A2* e *MMP1*) em biópsias de pele normal e de lesões de LC estratificadas por genótipo de *FLII* rs7930515, além de avaliar a correlação funcional e a regulação epigenética entre os genes *IL6* e *FLII* em macrófagos cultivados de pacientes com leishmaniose tegumentar.

## X. CONCLUSÕES

1. Foi observada associação entre a LC e o fenótipo leishmaniose *per se* (LC e LM) e os genes *FLI1*, *CTGF* e *SMAD2*.
2. A importância de *FLI1* como biomarcador de doença humana causada por *L. braziliensis* corrobora estudos anteriores que identificaram a associação entre este gene e doença cutânea causada por *L. major* em camundongos.
3. Embora a maioria dos genes adicione efeitos de forma independente, foi demonstrado que o efeito exercido por *CTGF* está condicionado à herança de alelos *SMAD2*.
4. Esses dados sugerem que polimorfismos nos genes *CTGF* e *SMAD2* são fatores de risco para a LC e, portanto, a regulação fisiológica dos processos de cicatrização é importante na cura de lesões de leishmaniose.
5. A avaliação do desequilíbrio de ligação mostrou que os 20 marcadores genotipados formam haplótipos na população de Corte de Pedra.
6. Os resultados deste estudo reforçam o papel de genes associados com a cicatrização das lesões na resistência a LC.

## XI. SUMMARY

After infection with *Leishmania braziliensis*, most patients develop cutaneous leishmaniasis (CL) and a small percentage, around 3%, mucosal (ML) and disseminated (LD) forms of the disease. In mice, mapping of genetic regions linked to the control of the CL caused by *Leishmania major* has showed that genes involved in tissue repair are associated with faster healing of lesions in resistant animals. This study aims to evaluate the role of polymorphisms at genes of TGF- $\beta$  pathway signaling, working with the hypothesis that genes associated with wound healing, mapped in mice, could be also important biomarkers of human disease caused by *L. braziliensis*. This was an association study based in families. We genotyped samples from 225 families selected from medical records from the Health Post of Corte de Pedra, Bahia, an endemic area of *L. braziliensis*. Twenty markers of six genes, *TGFB1*, *TGFBRI*, *TGFBR2*, *CTGF*, *SMAD2* and *FLII*, were chosen. Using conditional logistic regression analysis, this study demonstrated an association between the CL and leishmaniasis *per se* (CL and ML) phenotypes and *FLII*, *CTGF* and *SMAD2* genes. The association observed for the *FLII* gene follows the genetic and functional mapping of genes on murine chromosome 9, which identified *Fli1* as a new candidate influencing resistance to *L. major*. Additionally, our data suggested that polymorphisms in *CTGF* and *SMAD2* are risk factors for CL and therefore the physiological regulation of tissue scarring is an important mechanism in the healing of cutaneous leishmaniasis. Further work will be required to determine the actual role of these genes, including the regulation of *FLII* and *CTGF* during the natural course of disease. This would include analysis of these gene expression levels in tissue biopsies from individuals infected with *L. braziliensis* to evaluate their potential as a therapeutic target. The results of this study strengthen the potential role of genes associated with lesion healing and CL and suggest that a broader analysis of the pathways involved in wound healing response may contribute to a better understanding of disease pathogenesis.

**Keywords:** leishmaniasis, genetic polymorphism, TGF- $\beta$ , wound healing

## XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahuja SS, Reddick RL, Sato N, Montalbo E, KostECKI V, Zhao W, Dolan MJ, Melby PC, Ahuja SK. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *Journal of Immunology* 163: 3890-7, 1999.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 334-59, 2008.

Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta Tropica* 105: 1-9, 2008.

Andrade ZA. Extracellular matrix and schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 61-73, 1991.

Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Molecular and Cellular Biology* 29: 425-34, 2009.

\_\_\_\_\_. Future treatments in systemic sclerosis. *The Journal of dermatology* 37: 54-70, 2010.

\_\_\_\_\_, Bujor AM, Trojanowska M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *Journal of dermatological science* 59: 153-62, 2010.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-40, 2002.

\_\_\_\_\_, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 200: 75-8, 2009.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* 64: 1-109, 2007.

Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International journal of dermatology* 34: 474-9, 1995.

Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *The Journal of Clinical Investigation* 92: 2841-9, 1993.

Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, Coffman RL. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity* 6: 551-7, 1997.

Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European Journal of Immunology* 28: 1389-400, 1998.

\_\_\_\_\_, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology* 165: 969-77, 2000.

\_\_\_\_\_, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 168: 3992-4000, 2002.

Bertholet S, Debrabant A, Afrin F, Caler E, Mendez S, Tabbara KS, Belkaid Y, Sacks DL. Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells. *Infection and Immunity* 73: 6620-8, 2005.

\_\_\_\_\_, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, Houde M, Desjardins M, Sher A, Sacks D. *Leishmania* antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 177: 3525-33, 2006.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-8, 2006.

Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, Sakrauski AK, Seegmüller I, Voigt H, Launois P, Levine AD, Wagner H, Heeg K, Louis JA, Röcken M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nature Immunology* 2: 1054-60, 2001.

Blackwell, JM. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Molecular Medicine Today* 2: 205-11, 1996.

\_\_\_\_\_, Searle S, Mohamed H, White JK. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease:

continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Immunology Letters* 85: 197-203, 2003.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine* 342: 1350-8, 2000.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews* 173: 17-26, 2000.

Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 2552-61, 1997.

Bradley DJ. Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature* 250: 353-4, 1974.

Cabello PH, Lima AM, Azevedo ES, Krieger H. Familial aggregation of *Leishmania chagasi* infection in northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52: 364-5, 1995.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine* 182: 1259-64, 1995.

Carrión J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, Abanades DR, Requena JM, Alonso C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunology* 28: 173-83, 2006.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-25, 1994.



Castellucci L, Cheng LH, Araújo C, Guimarães LH, Lessa H, Machado P, Almeida MF, Oliveira A, Ko A, Johnson WD, Wilson ME, Carvalho EM, DE Jesus AR. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 69-73, 2005.

\_\_\_\_\_, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, Ribeiro S, Reale J, Noronha EF, Wilson ME, Duggal P, Beaty TH, Jeronimo S, Jamieson SE, Bales A, Blackwell JM, de Jesus AR, Carvalho EM. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 194: 519-27, 2006.

\_\_\_\_\_, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhães A, Guimarães LH, Lessa M, de Jesus AR, Carvalho EM, Blackwell JM. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. *BMC Medical Genetics* 11: 10, 2010.

\_\_\_\_\_, Jamieson SE, Miller EN, de Almeida LF, Oliveira J, Magalhães A, Guimarães LH, Lessa M, Lago E, de Jesus AR, Carvalho EM, Blackwell JM. FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Genes and immunity* 12: 589-94, 2011.

Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biological Research* 26: 233-8, 1993.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews. Microbiology* 5: 873-82, 2007.

Clark RAF. Wound repair-overview and general considerations. In Clark RAF, Henson PM (ed.), *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 1. ed., Plenum Press: Nova Iorque, 3-50p., 1996.

Convit J, Lapenta P. Sobre un caso de leishmaniose tegumentaria de forma disseminada. *Revista de la Policlínica (Caracas)* 18: 153-8, 1946.

\_\_\_\_\_, Pinardi ME, Rondón AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 603-10, 1972.

\_\_\_\_\_, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 444-8, 1993.

Cordell HJ, Barratt BJ, Clayton DG. Case/pseudocontrol analysis in genetic association studies: A unified framework for detection of genotype and haplotype associations, gene-gene and gene-environment interactions, and parent-of-origin effects. *Genetic epidemiology* 26: 167-85, 2004.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 319-23, 1986.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology* 180: 5771-7, 2008.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than

interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744-8, 2003.

Cuba Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, McMahon Pratt D, Butcher J, Barreto AC, Marsden PD. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 500-7, 1985.

Döffinger R, Dupuis S, Picard C, Fieschi C, Feinberg J, Barcenas-Morales G, Casanova JL. Inherited disorders of IL-12- and IFN $\gamma$ -mediated immunity: a molecular genetics update. *Molecular Immunology* 38: 903-9, 2002.

Donaldson IJ, Chapman M, Kinston S, Landry JR, Knezevic K, Piltz S, Buckley N, Green AR, Göttgens B. Genome-wide identification of cis-regulatory sequences controlling blood and endothelial development. *Human Molecular Genetics* 14: 595-601, 2005.

Elso C, Kumar B, Smyth G, Foote S, Handman E. Dissociation of disease susceptibility, inflammation and cytokine profile in *lmr1/2* congenic mice infected with *Leishmania major*. *Genes and Immunity* 5: 188-96, 2004a.

\_\_\_\_\_, Roberts LJ, Smyth GK, Thomson RJ, Baldwin TM, Foote SJ, Handman E. Leishmaniasis host response loci (*lmr1-3*) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes and Immunity* 5: 93-100, 2004b.

Esterre P, Dedet JP, Guerret S, Chevallier M, Frenay C, Grimaud JA. Matrix remodelling and fibroblast phenotype in early lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Pathology, Research and Practice* 187: 924-30, 1991.

Follador I, Araujo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Miranda JC, Bittencourt A, Carvalho EM. Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 497-503, 1999.

Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, Spagnolo P, Pantelidis P, Leoni P, McHugh N, Stock CJ, Shi-Wen X, Denton CP, Black CM, Welsh KI, du Bois RM, Abraham DJ. A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *The New England journal of medicine* 357: 1210-20, 2007.

Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology* 28: 687-95, 1998.

Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P, Searle S, Moore E, Li M, Blackwell JM. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *The Biochemical Journal* 354: 511-9, 2001.

Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *International Journal for Parasitology* 34: 433-44, 2004.

Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PH, Thiele CJ, Kim SJ. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nature genetics* 23: 222-7, 1999.

Handman E, Elso C, Foote S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 59: 1-75, 2005.

Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R, Bernstein A. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* 13: 167-77, 2000.

Havelková H, Badalová J, Svobodová M, Vojtíková J, Kurey I, Vladimirov V, Demant P, Lipoldová M. Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects. *Genes and Immunity* 7: 220-33, 2006.

Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425: 402-6, 2003.

Huber M, Timms E, Mak TW, Röllinghoff M, Lohoff M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infection and Immunity* 66: 3968-70, 1998.

Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Current Opinion in Rheumatology* 14: 681-5, 2002.

Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *Journal of Immunology* 172: 1848-55, 2004.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121-33, 2006.

Izzo AA, Izzo LS, Kasimos J, Majka S. A matrix metalloproteinase inhibitor promotes granuloma formation during the early phase of *Mycobacterium tuberculosis* pulmonary infection. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 84: 387-96, 2004.

Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharesi-Fard B. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine* 35: 159-65, 2006.

Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Current Medicinal Chemistry* 16: 599-614, 2009.

Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. Transforming growth factor beta1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate medical journal* 85: 9-14, 2009.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448: 484-7, 2007.

Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *The American Journal of Pathology* 163: 571-81, 2003.

Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 186: 1757-62, 1997.

Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 569-96, 1983.

\_\_\_\_\_, Shaw J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D (ed.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9. ed., Arnold: Londres, 242-66p., 1998.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 233-40, 2005.

Lipoldová M, Svobodová M, Krulová M, Havelková H, Badalová J, Nohýnková E, Holán V, Hart AA, Volf P, Demant P. Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. *Genes and Immunity* 1: 200-6, 2000.

\_\_\_\_\_, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews. Genetics*. 7: 294-305, 2006.

Lira R, Rosales-Encina JL, Argüello C. *Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen. *Experimental Parasitology* 85: 149-57, 1997.

Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Annales de L'Institut Pasteur. Immunology*. 138: 744-9, 1987.

Majka SM, Kasimos J, Izzo L, Izzo AA. *Cryptococcus neoformans* pulmonary granuloma formation is associated with matrix metalloproteinase-2 expression. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 40: 323-8, 2002.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231-4, 2006.

Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 20: 435-45, 2007.

Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JML, Jones TC. Human Mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III. Mucosal disease presentation and initial evolution. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 17: 179-86, 1984.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 67: 753-91, 1998.

Mock B, Blackwell J, Hilgers J, Potter M, Nacy C. Genetic control of *Leishmania major* infection in congenic, recombinant inbred and F2 populations of mice. *European Journal of Immunogenetics: Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* 20: 335-48, 1993.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145-73, 1989.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 366: 1561-77, 2005.

Nakerakanti SS, Kapanadze B, Yamasaki M, Markiewicz M, Trojanowska M. Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 25259-69, 2006.

Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential



autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448: 480-3, 2007.

Olds GR, Griffin A, Kresina TF. Dynamics of collagen accumulation and polymorphism in murine *Schistosoma japonicum*. *Gastroenterology* 89: 617-24, 1985.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2011.

Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease markers* 27: 173-86, 2009.

Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 16: 92-101, 2010.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (New York, N.Y.)* 321: 970-4, 2008.

\_\_\_\_\_, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology* 11: 1290-6, 2009.

Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et biophysica acta* 1792: 746-56, 2009.

Price NM, Gilman RH, Uddin J, Recavarren S, Friedland JS. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma

and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *Journal of Immunology* 171: 5579-86, 2003.

Ramasawmy R, Menezes E, Magalhães A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, Rosa ME, Guimarães LH, Lessa M, Noronha E, Wilson ME, Jamieson SE, Kalil J, Blackwell JM, Carvalho EM, de Jesus AR. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 10: 607-13, 2010.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology* 13: 151-77, 1995.

Roberts LJ, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E, Foote SJ. Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. *The Journal of Experimental Medicine* 185: 1705-10, 1997.

\_\_\_\_\_, Baldwin TM, Speed TP, Handman E, Foote SJ. Chromosomes X, 9, and the H2 locus interact epistatically to control *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology* 29: 3047-50, 1999.

Roberts M, Mock BA, Blackwell JM. Mapping of genes controlling *Leishmania major* infection in CXS recombinant inbred mice. *European Journal of Immunogenetics: Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* 20: 349-62, 1993.

Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biology* 1: 362-8, 1999.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463-7, 2004.

Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 29: 671-8, 2007.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews. Immunology*. 2: 845-58, 2002.

Sakthianandeswaren A, Elso CM, Simpson K, Curtis JM, Kumar B, Speed TP, Handman E, Foote SJ. The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 15551-6, 2005.

\_\_\_\_\_, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 25: 383-91, 2009.

\_\_\_\_\_, Curtis JM, Elso C, Kumar B, Baldwin TM, Lopaticki S, Kedzierski L, Smyth GK, Foote SJ, Handman E. Fine mapping of *Leishmania major* susceptibility Locus *Imr2* and evidence of a role for *Fli1* in disease and wound healing. *Infection and Immunity* 78: 2734-44, 2010.

Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *Journal of Immunology* 180: 6139-48, 2008.

Salomon GD, Kasid A, Bernstein E, Buresh C, Director E, Norton JA. Gene expression in normal and doxorubicin-impaired wounds:

importance of transforming growth factor-beta. *Surgery* 108: 318-22; discussion 322-3, 1990.

Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 68: 369-72, 1989.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science* 108: 985-1002, 1995.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700, 2003.

Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, Golding M, Shanker Narayan NP, Sitaraman T, Sengupta U, Pitchappan R, Hill AV. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nature genetics* 27: 439-41, 2001.

Silveira FT, Lainson R, De Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, De Souza AAA, Da Silva BM. Leishmaniose tegumentar americana. In Leão RNG (ed.), *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico*. 1. ed., CEJUP: Belém, 619-30p., 1997.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 341: 738-46, 1999.

Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL. Dynamics of collagen, MMP and TIMP gene expression during the granulomatous, fibrotic process induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98: 581-93, 2004.

Smith CA, Stauber F, Waters C, Alway SE, Stauber WT. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats. *Journal of Applied Physiology* 102: 755-61, 2007.

Solbach W, Laskay T. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology* 74: 275-317, 2000.

Svenson JL, Chike-Harris K, Amria MY, Nowling TK. The mouse and human *Fli1* genes are similarly regulated by Ets factors in T cells. *Genes and Immunity* 11: 161-72, 2010.

Thaler R, Agsten M, Spitzer S, Paschalis EP, Karlic H, Klaushofer K, Varga F. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, *Fli1*, and epigenetic DNA methylation. *The journal of biological chemistry* 286: 5578-88, 2011.

Truong AH, Ben-David Y. The role of *Fli-1* in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 19: 6482-9, 2000.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1829-34, 2002.

Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 199: 1559-66, 2004.

Vaalamo M, Kariniemi AL, Shapiro SD, Saarialho-Kere U. Enhanced expression of human metalloelastase (MMP-12) in cutaneous granulomas and macrophage migration. *The Journal of Investigative Dermatology* 112: 499-505, 1999.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-89, 2006.

Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469-85, 1993.

Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLII gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism* 54: 2271-9, 2006.

Wrana JL, Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11: 5-13, 2000.

Wu L, Siddiqui A, Morris DE, Cox DA, Roth SI, Mustoe TA. Transforming growth factor beta 3 (TGF beta 3) accelerates wound healing without alteration of scar prominence. Histologic and competitive reverse-transcription-polymerase chain reaction studies. *Archives of Surgery* 132: 753-60, 1997.

Xiao R, Liu FY, Luo JY, Yang XJ, Wen HQ, Su YW, Yan KL, Li YP, Liang YS. Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *The British Journal of Dermatology* 155: 1145-53, 2006.

Yagi K, Goto D, Hamamoto T, Takenoshita S, Kato M, Miyazono K. Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 703-9, 1999.

Yang L, Chan T, Demare J, Iwashina T, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *The American Journal of Pathology* 159: 2147-57, 2001.

Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of

inflammatory helper T cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 9358-63, 2007.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 8: 967-74, 2007.

## ANEXO I

### FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18), PARA O ESTUDO DE DETERMINANTES GENÉTICOS NAS LEISHMANIOSES NO BRASIL

**Projeto:** Determinantes genéticos nas leishmanioses no Brasil

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Número de identificação no Projeto:**

**Principal Investigador:** Edgar M.Carvalho, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

**Comitê de Ética:** Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 – Nazaré Cep: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, [cepmco@ufba.br](mailto:cepmco@ufba.br)/[cepmco@gmail.com](mailto:cepmco@gmail.com)

**Convite e objetivo:** Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste estudo é determinar se você ou as pessoas que vivem na sua vizinhança tem maior propensão para ter doenças infecciosas. A principal doença que nós estudaremos é chamada leishmaniose, que é a doença que provoca uma ferida na pele ou no nariz mas nós também daremos atenção a outras infecções. Nós queremos entender se alguns dos seus genes (que são características que seus pais passam para você e seus familiares) fazem você mais propenso a ter infecções. Nós também queremos saber se coisas do seu dia a dia fazem de você mais propenso às infecções.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de uma colher de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulha. Algumas vezes nós faremos um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Nós esperamos que este estudo nos esclareça porque você e sua família têm infecções, então poderemos prevenir isto no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.



\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão do paciente

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão do responsável

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Testemunha

#### COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou seu representante legal. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Investigador

## ANEXO II

### CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO DE DETERMINANTES GENÉTICOS NAS LEISHMANIOSES NO BRASIL

**Nome do Projeto:** Determinantes genéticos nas leishmanioses no Brasil

1. NOME DO  
PACIENTE: \_\_\_\_\_

**Nº do Projeto:** \_\_\_\_\_

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

**Comitê de Ética:** Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 - Nazaré

Cep: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, [cepmco@ufba.br](mailto:cepmco@ufba.br)/[cepmco@gmail.com](mailto:cepmco@gmail.com)

#### **Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo identificar pessoas que tem ou que tiveram leishmaniose cutânea e ou leishmaniose mucosa. Além disso, estudaremos todos os membros de sua família para verificar se existe alguma predisposição genética para o desenvolvimento de doenças infecciosas. Após lhe ser explicado o que contém neste questionário você pode perguntar tudo sobre o estudo a seu médico. Famílias dos pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa diagnosticados no posto de saúde de Corte de Pedra serão convidadas a participar do estudo. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este formulário de consentimento. Aproximadamente 2000 pessoas participarão deste estudo.

#### **Participação voluntária:**

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você pode estar recebendo no posto de saúde de Corte de Pedra.

**Finalidade do estudo:** Este estudo visa determinar se familiares de pacientes com leishmaniose cutânea e ou mucosa têm maior tendência a desenvolver a leishmaniose, que vizinhos que não tem este tipo de doença. Adicionalmente, nós tentaremos demonstrar através de estudo genético se existe uma associação entre alguns genes que são transmitidos aos seus filhos que influenciam no desenvolvimento desta doença ou de outras doenças infecciosas.

**Procedimentos:** Caso você aceite participar do estudo um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos e se você já teve leishmaniose. Um médico examinará você para ver se existe qualquer lesão que indique se você tem ou já teve leishmaniose. Também com o auxílio de uma lanterna e de um espécuro nós examinaremos você para ver se tem evidência de leishmaniose no nariz ou na boca. Caso seja detectada lesão ativa na pele ou na mucosa, você será convidado a comparecer no posto de saúde de Corte de Pedra para realizar exames de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (sorológico), teste cutâneo e biópsia / aspiração da lesão para isolamento do parasito que causa a doença e exame histopatológico da lesão. Se você concordar em retirar sangue para realização dos estudos de pesquisa genética para avaliar a susceptibilidade a doenças infecciosas, 10 ml de sangue serão colhidos (equivalente a 1 colher de sopa).

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada, com outros membros da equipe médica. Do Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira, o Órgão de Proteção dos Direitos Humanos e o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Institutional Review Board e o Office for Human Research Protection and the National Institute of Health of the United States of America.

**Análise de riscos e benefícios:** A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da sua pele, do seu nariz e da sua boca poderá documentar que você tenha leishmaniose cutânea ou leishmaniose mucosa. Neste caso você será tratado com antimônio (glucantime) o que trará vantagem para você desde que a doença foi documentada na sua fase ainda inicial. Este tratamento será acompanhado no Posto de Saúde de Corte de Pedra e caso haja necessidade, ou pela realização de exames, ou complicações do tratamento, você será internado no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos em Salvador. A passagem para Salvador será custeada pela pesquisa, contudo a vaga para internamento será de acordo com as normas do Hospital, sendo às vezes necessário esperar alguns dias para consegui-la.

**Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade:** O diagnóstico precoce da leishmaniose poderá ser feito através do exame. Desde quando toda a família vai ser examinada, se houver algum caso de outra doença na família, uma orientação ou tratamento adequado vai ser oferecido. O melhor conhecimento sobre a leishmaniose poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

**Custos:** Você não terá custos com a participação no estudo e caso necessite de tratamento para leishmaniose a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

**Esclarecimentos:** Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Edgar M. Carvalho, Dra. Lea

Castellucci e Dr. Luiz Henrique Guimarães, responsáveis por este estudo (Tel.: 71-3237-7353 ou 71-3283-8113). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento.

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

**ACEITO** que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Não **ACEITO** que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora

_____	_____	_____
Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora

_____	_____	_____
Nome/Assinatura da testemunha		



**4. Número do LTCP** |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

(\*) Campos obrigatórios

(Originado para todos os indivíduos participantes do TMRC  
com leishmaniose)

**SIM – Serviço de Imunologia**

**Hospital Universitário Professor Edgard Santos - UFBA**

**Data da visita\* (dd/mm/aaaa):** |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

4. N° do LTCP [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ] 3. N° do TMRC [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]\* 5. N° da Família [ ][ ][ ][ ][ ]

6. N° do indivíduo na Família [ ][ ][ ][ ]

167. Data da assinatura do TCLE para Estudo de Genética:.....[ ][ ][ ]/[ ][ ][ ]/[ ][ ][ ][ ][ ][ ]

GPS da casa: 168. Latitude [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ] 169. Longitude [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ] 170. Altitude [ ][ ][ ][ ]

### **Exposição Ambiental**

171. Você já trabalhou ou morou (pelo menos um mês) em fazenda?.....  não  sim

172. Possui animais em casa?.....  não  sim

Se “sim”, especifique:

173. Cachorros.....  não  sim

174. Cavalos.....  não  sim

175. Galinhas.....  não  sim

176. Porcos.....  não  sim

177. Outros.....  não  sim

178. Se “outros”, especifique: \_\_\_\_\_

179. Há eletricidade em casa? .....  não  sim

180. Há sanitário em casa?.....  não  sim

181. Usa mosquiteiro para dormir?.....  não  sim

182. Há resto de mata próximo a casa (raio de 100 m).....  não  sim

183. Há roça próxima a casa (raio de 50 metros)?.....  não  sim

184. Há galinheiro próximo a casa (raio de 50 metros)?.....  não  sim

185. Há pocilga próxima a casa (raio de 50 metros)? .....  não  sim

186. Há curral próximo a casa (raio de 50 metros)? .....  não  sim

187. Ocupação entre 16:00 e 24:00 hs:.....  Permanece em casa  Sai de casa

188. Se "Sai de casa", sai para:

Caçar/pescar.....  Estudo/trabalho.....  Outro

189. Se "Sai de casa para outro", especifique: \_\_\_\_\_

### Coleta de Exames

\_\_\_\_\_

190. Colhido sangue para genética:.....  não  sim

Iniciais do investigador \_\_\_\_\_





**4. Número do LTCP**

(\*) Campos obrigatórios

(Originado para todos os indivíduos participantes do TMRC  
com leishmaniose)

SIM – Serviço de Imunologia

Hospital Universitário Professor Edgard Santos - UFBA

Data da visita\* (dd/mm/aaaa):

4. N° do LTCP  3. N° do TMRC \* 5. N° da Família

6. N° do indivíduo na Família \*

Data da assinatura do TCLE para Estudo de Genética:.....

**Dados Demográficos**

14. Sexo:..... masculino  feminino

15. Data de nascimento\* (dd/mm/aaaa):.....

16. Naturalidade: \_\_\_\_\_

17. Ocupação:

Trabalhador rural Dona de casa Estudante Comerciante Motorista Outra

18. Cidade/Vilarejo\* \_\_\_\_\_ 19.

Tempo em endereço atual (anos):.....|\_|\_|,|\_|

20. N° de moradores no domicílio (exceto paciente):.....|\_|\_|

21. N° de moradores no domicílio com leishmaniose passada ou ativa:.....|\_|\_|

191. Grau de parentesco com o caso índice:..... Pai/mãe  Irmão  Filho  Outro

### **História Médica Progressa**

192. Leishmaniose cutânea ativa:..... não  sim

Se “não” ir para item 200. Se “sim” preencher também itens 193 a 199 e 52 a 71.

193. Já esteve no PSCP?..... não  sim

194. Local da lesão:  Segmento cefálico  Tronco  MMSS  MMII  Genitália/glúteo

195. N° de cicatrizes sugestivas de leishmaniose:.....|\_|\_|

196. Lesões acima da cintura:..... não  sim

197. Ano de início da lesão cutânea: \_\_\_\_\_

198. Tratado (antimonial) lesão cutânea:..... não  sim

199. Completou o tratamento:..... não  sim

200. Leishmaniose mucosa:..... não  sim

Se “não” ir para item 171. Se “sim” preencher também itens 201 a 203.

201. Ano de diagnóstico da lesão mucosa: \_\_\_\_\_

202. Tratada (antimonial) lesão mucosa:..... não  sim

203. Completou o tratamento da lesão mucosa:.....  não  sim

### **Exposição Ambiental**

171. Voce já trabalhou ou morou (pelo menos um mês) em fazenda?.....  não  sim

172. Possui animais em casa?.....  não  sim

4. N° do LTCP [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]      3. N° do TMRC [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]\*      5. N° da Família [ ] [ ] [ ] [ ]

### **Exposição Ambiental (Continuação)**

Se “não” possui animais em casa, ir para item 179. Se “sim”, especifique:

173. Cachorros.....  não  sim

174. Cavalos.....  não  sim

175. Galinhas.....  não  sim

176. Porcos.....  não  sim

177. Outros.....  não  sim

178. Se “outros”, especifique: \_\_\_\_\_

179. Há eletricidade em casa? .....  não  sim

180. Há sanitário em casa?.....  não  sim

181. Usa mosquiteiro para dormir?.....  não  sim

182. Há resto de mata próximo a casa (raio de 100 m).....  não  sim

183. Há roça próxima a casa (raio de 50 metros)?.....  não  sim

184. Há galinheiro próximo a casa (raio de 50 metros)?.....  não  sim

185. Há pocilga próxima a casa (raio de 50 metros)? .....  não  sim

186. Há curral próximo a casa (raio de 50 metros)? .....  não  sim

187. Ocupação entre 16:00 e 24:00 hs:.....  Permanece em casa  Sai de casa

188. Se "Sai de casa", sai para:

Caçar/pescar.....  Estudo/trabalho.....  Outro

189. Se "Sai de casa para outro", especifique: \_\_\_\_\_

**Exame Físico Médico** (preencher itens 52 a 71, se respondeu "sim" no item 192)

52. N° total de lesões de pele:..... [ ][ ][ ][ ]

53. Tempo de duração da lesão ativa (semanas):..... [ ][ ][ ][ ]

**Número e tipos de lesões:**

54. Ulceradas..... [ ][ ][ ][ ]

55. Pápulas ..... [ ][ ][ ][ ]

56. Nódulos ..... [ ][ ][ ][ ]

57. Vegetações ..... [ ][ ][ ][ ]

58. Verucosas..... [ ][ ][ ][ ]

**Lesão principal:**

59. Local maior lesão (marque apenas UM):

Cabeça  Face  Pescoço  Tronco  Braço D  Braço E

Antebraço D  Antebraço E  Coxa D  Coxa E  Perna D  Perna E  Outro

60. Se "Outro", especificar: \_\_\_\_\_

4. N° do LTCP [ ][ ][ ][ ][ ]      3. N° do TMRC [ ][ ][ ][ ][ ]\*      5. N° da Família [ ][ ][ ]

**Exame Físico Médico (Continuação)**

Tamanho da maior lesão (mm):.....61a. [ ][ ][ ] x 61b. [ ][ ][ ]

62. Tipo da lesão:  ulcerada  pápula  nódulo  vegetação  verrucosa  NE

63. Infecção secundária:..... não  sim  NE

64. Cicatriz sugestiva de Leishmaniose cutânea:..... não  sim  NE

65. N° de cicatrizes:.....[ ][ ]

66. Tempo de duração das cicatrizes (anos):.....[ ][ ], [ ]

**Linfadenopatia:**

67. Linfadenopatia presente:..... não  sim  NE

68. Mais de 1 cadeia envolvida:..... não  sim

69. Local:  Cervical  Ocipital  Axilar  Inguinal  Crural  Outra

Tamanho do maior linfonodo (mm):.....70a: [ ][ ][ ] x 70b [ ][ ][ ]

71. Foto das lesões realizada:..... não  sim

**Triagem Otorrinolaringológica**

204. Lesões mucosas ativas:..... não  sim  NE

205. Cicatriz característica de lesão mucosa:..... não  sim  NE

206. Referido ao PSCP para exame ORL:..... não  sim

**Coleta e Exames Realizados**

190. Colhido sangue para genética:..... não  sim

46. Realizada IDRM prévia\*:..... não  sim  NA

47. Se "sim":..... POS  NEG  Duvidoso

48. Se "não", realizado agora\*:..... não  sim

.....Iniciais do entrevistador \_\_\_\_\_

**Leitura da IDRМ:**

IDRM:.....49a. |\_|\_| x 49b. |\_|\_| mm

50. IDRМ:.....  POS  NEG  Duvidoso

**Diagnóstico da Forma Clínica de Leishmaniose - Fenótipo**

**207. Fenótipo da Forma Clínica:**

Cutânea (CL=0).....  Mucosa (ML=1).....  Disseminada (DL=2)

Cutâneo mucosa (CML=3).....  Pré-ulcerativa (4).....  Sub-clínica (5)

Sem evidência de LT

**Iniciais do investigador\_\_\_\_\_**