



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



ANADILTON SANTOS DA HORA

**AVALIAÇÃO DE GENES DE CURA DE LESÃO COMO
BIOMARCADORES DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
ANTIMONIAL PENTAVELENTE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



ANADILTON SANTOS DA HORA

**AVALIAÇÃO DE GENES DE CURA DE LESÃO COMO
BIOMARCADORES DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
ANTIMONIAL PENTAVELENTE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Professora Orientadora: Léa Cristina Castellucci

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

Salvador (Bahia), 2018

I. RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e está entre as endemias com maior impacto em saúde pública, devido à sua distribuição globalizada e limitações referentes ao diagnóstico, tratamento e controle em áreas endêmicas. O antimonial pentavalente (Sb^V) administrado por via intravenosa ou intramuscular tem sido a droga de primeira escolha para o tratamento da doença, com relatos crescentes do aumento na resistência a esse fármaco em diferentes sítios endêmicos. Nos últimos anos, tem sido mostrado que polimorfismos em genes associados com cura de lesão e reparo tecidual são fatores de risco para a LC causada por *Leishmania braziliensis*. **Objetivo:** Avaliar se polimorfismos em genes relacionados à cura de lesão e reparo tecidual, previamente associados ao desenvolvimento da LC, seriam também biomarcadores da resposta ao tratamento da doença. **Métodos:** Foi realizado um estudo caso controle para testar a associação de marcadores do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) nos genes *FLII*, *COL1A1*, *CTGF*, *IL-22* e *SMAD2* e cura ou falha terapêutica em pacientes provenientes da área endêmica de Corte de Pedra-BA. Os pacientes participantes foram alocados como *refratários* ao Sb^V (casos) ou *respondedores* ao Sb^V (controles). Após extração do DNA com proteinase K pelo método de salting-out, os SNPs foram genotipados pela técnica de qPCR em tempo real utilizando ensaios TaqMan (ThermoFisher®) e analisados por regressão logística por meio do programa STATA™. Em adição, análises complementares entre os SNPs testados e parâmetros das fichas médicas como tratamento, área de enduração do teste Montenegro, tamanho e número das lesões foi realizado pelo programa GraphPad Prism5. Foram realizadas associações entre os parâmetros e a resposta ao tratamento na coorte. **Resultados:** Não observamos associações entre os marcadores testados e cura ou falha terapêutica na LC no estudo genético de base populacional ($p > 0,05$). Entretanto, observamos uma forte associação entre o gene *COL1A1* ($p = 0,0009$) e o parâmetro tratamento, com uma maioria de pacientes respondedores carregando genótipos contendo o alelo A (AA e AG), além de uma associação ($p = 0,0170$) entre o genótipo CC do gene de *FLII* e o tamanho das lesões dos pacientes. Em adição, na comparação entre pacientes respondedores e refratários ao Sb^V com diferentes parâmetros clínicos, observamos uma forte associação entre a área de enduração do teste cutâneo (IDRM) e o tratamento, sendo a área do teste significativamente maior nos pacientes respondedores ao antimonial pentavalente ($p = 0,0003$). **Conclusões:** O gene de *COL1A1* está ligado à resposta ao tratamento na LC por mecanismos que hipoteticamente envolvem a deposição de colágeno no local da lesão e que poderiam ajudar a conter os parasitas e/ou otimizar o processo cicatricial nos pacientes respondedores ao tratamento com Sb^V ; o polimorfismo do gene *FLII*, previamente associado com LC mostrou ser um marcador de lesão aumentada nos portadores do alelo C; Pacientes com maior área de enduração do Teste de Montenegro desenvolvem uma melhor resposta celular no início da doença, o que controla melhor o processo infeccioso e se reflete em uma melhor resposta terapêutica.

Palavras-chave: 1. Polimorfismo genético; 2. Leishmaniose Tegumentar Americana; 3. Genotipagem de SNPs; 4. Resposta terapêutica

IX. SUMMARY

Introduction: American Cutaneous *Leishmania* sis (LTA) is a parasitic infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is among the endemic diseases with the greatest impact on public health due to its globalized distribution and limitations in diagnosis, treatment and control in endemic areas. Pentavalent antimonial (Sbv) administered intravenously or intramuscularly has been the drug of first choice for the treatment of the disease, with increasing reports of increased resistance to this drug at different endemic sites. In recent years, polymorphisms in genes associated with wound healing and tissue repair have been shown to be risk factors for LC caused by *Leishmania braziliensis*. **Objective:** To evaluate whether polymorphisms in genes related to lesion healing and tissue repair, previously associated with the development of LC, would also be biomarkers of the response to treatment of the disease. **Methods:** A case-control study was performed to test the association of single nucleotide polymorphism (SNP) markers in the *FLII*, *COL1A1*, *CTGF*, *IL-22* and *SMAD2* genes and cure or therapeutic failure in patients from the endemic area of Corte de Pedra -BA. Participating patients were allocated as refractory to Sbv (cases) or responders to Sbv (controls). After extracting the DNA with proteinase K by the salting-out method, the SNPs were genotyped by the real time qPCR technique using TaqMan assays (ThermoFisher®) and analyzed by logistic regression using the STATA™ program. In addition, complementary analysis between the SNPs and parameters of medical records such as treatment, area of the Montenegro test, size and number of lesions were performed by the program GraphPad Prism5. We also tested associations between these same parameters and response to treatment in the cohort. **Results:** We did not observe associations between the markers tested and cure or therapeutic failure in CL in the population-based genetic study ($p > 0.05$). However, we observed a strong association between the *COL1A1* gene ($p = 0.0009$) and the treatment parameter, with a majority of responders carrying genotypes containing the A allele (AA and AG), as well as an association ($p = 0.0170$) between the *FLII* CC genotype and the size of the lesions of the patients. In addition, in the comparison between responders and refractory patients with Sbv with different clinical parameters, we observed a strong association between the area of skin test induration (IDRM) and treatment, with the test area significantly higher in patients responding to pentavalent antimonial ($p = 0.0003$). **Conclusions:** The *COL1A1* gene is linked to the treatment response in CL by mechanisms that hypothetically involve collagen deposition at the lesion site and could help to contain the parasites and / or optimize the cicatricial process in patients responding to Sbv treatment; the *FLII* gene polymorphism, previously associated with LC, was shown to be marker of increased lesion for C allele carriers; Patients with greater area of the Montenegro Test develop a better cellular response at the onset of the disease, which controls better the infectious process and is reflected in a better therapeutic response.

Keywords: Genetic polymorphism; 2. American Cutaneous *Leishmania* sis; 3. Genotyping of SNPs; 4. Therapeutic response

Tabela 2. Pannel de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) genotipados neste estudo.

Gene_SNV	Localização	Cromossomo	Alelos	(BA)	(CEU)	(YRI)
CTGF_rs6918698	Promotor	6	C<G	0,48	0,412	0,483
FLI1_rs7930515	Íntron	11	A>C	0,28	0,296	0,238
IL22_rs2227485	Íntron	12	A>G	0,47	0,45	0,446
COL1A1_rs2586488	Íntron	17	A>G	0,34	0,371	0,420
SMAD2_rs1792658	Íntron	18	A>C	0,23	0,185	0,247

Tabela 2: Polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) selecionados para a genotipagem da amostra de estudo. A tabela 2 mostra o pannel de marcadores avaliados. Observa-se que são mostradas as frequências alélicas para a população estudada (BA) em comparação com duas populações do HapMap: CEU (caucasóide) e YRI (Yorubá africana).

Tabela 8. Análises de associação por regressão logística entre os SNPs nos genes avaliados e a resposta ao antimonial pentavalente.

FLI1_rs7930515	Odds ratio	IC	P
Global 2df			0.264
1/2 X 2/2	0.748	0.383-1.461	0.397
1/1 X 2/2	2.105	0.551-8.041	0.276
Global 1df			0.754
Alelo 1	1.080	0.662-1.763	0.755
Alelo 2	0.925	0.566-1.509	0.755
likelihood-ratio test			0.109
COL1A1_rs2586488	Odds	IC	P
Global 2df			0.946
1/2 X 2/2	1.079	0.565-2.058	0.817
1/1 X 2/2	0.922	0.319-2.662	0.881
Global 1df			0.994
Alelo 1	1.001	0.623-1.608	0.995
Alelo 2	0.998	0.621-1.602	0.995
likelihood-ratio test			0.739
CTGF_rs6918698	Odds	IC	P
Global 2df			0.858
1/2 X 2/2	0.825	0.377-1.804	0.631
1/1 X 2/2	0.793	0.324-1.940	0.612
Global 1df			0.619
Alelo 1	0.893	0.573-1.393	0.620
Alelo 2	1.118	0.717-1.743	0.620
likelihood-ratio test			0.807
IL-22_rs2227485	Odds	IC	P
Global 2df			0.282
1/2 X 2/2	1.756	0.833-3.702	0.139
1/1 X 2/2	1.9	0.716-5.041	0.197
Global 1df			0.159
Alelo 1	1.419	0.868-2.320	0.163
Alelo 2	0.704	0.430-1.151	0.163
likelihood-ratio test			0.458
SMAD2_rs1792658	Odds	IC	P
Global 2df			0.554
1/2 X 2/2	0.553	0.156-1.961	0.360
1/1 X 2/2	0.729	0.212-2.502	0.616
Global 1df			0.900
Alelo 1	1.031	0.637-1.667	0.900
Alelo 2	0.969	0.599-1.567	0.900
likelihood-ratio test			0.280

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); IC = 95% de intervalo de confiança.

Tabela 09. Resultados dos testes de associação entre os de SNPs genotipados com os parâmetros clínicos de pacientes com LC (n= 159).

Gene / SNP	Características clínicas	*(P < 0.05)
COL1A1 rs2586488	Tam Lesão mm	0,6093
	IDRM mm	0,5318
	N de lesões ulceradas	0,3180
	Genótipo x Tratamento	*0,0009
	Alelo x Tratamento	*0,0015
CTGF rs6918698	Tam Lesão mm	0,2922
	IDRM mm	0,6302
	N de lesões ulceradas	0,9702
	Genótipo x Tratamento	0,6484
	Alelo x Tratamento	0,7226
FLI1 rs7930515	Tam Lesão mm	0,0170
	IDRM mm	0,7948
	N de lesões ulceradas	0,6282
	Genótipo x Tratamento	0,1232
	Alelo x Tratamento	0,8905
IL-22 rs2227485	Tam Lesão mm	0,4599
	IDRM mm	0,9582
	N de lesões ulceradas	0,9084
	Genótipo x Tratamento	0,3100
	Alelo x Tratamento	0,1823
SMAD2 rs1792658	Tam Lesão mm	0,3512
	IDRM mm	0,1411
	N de lesões ulceradas	0,0616
	Genótipo x Tratamento	0,2369
	Alelo x Tratamento	0,7858

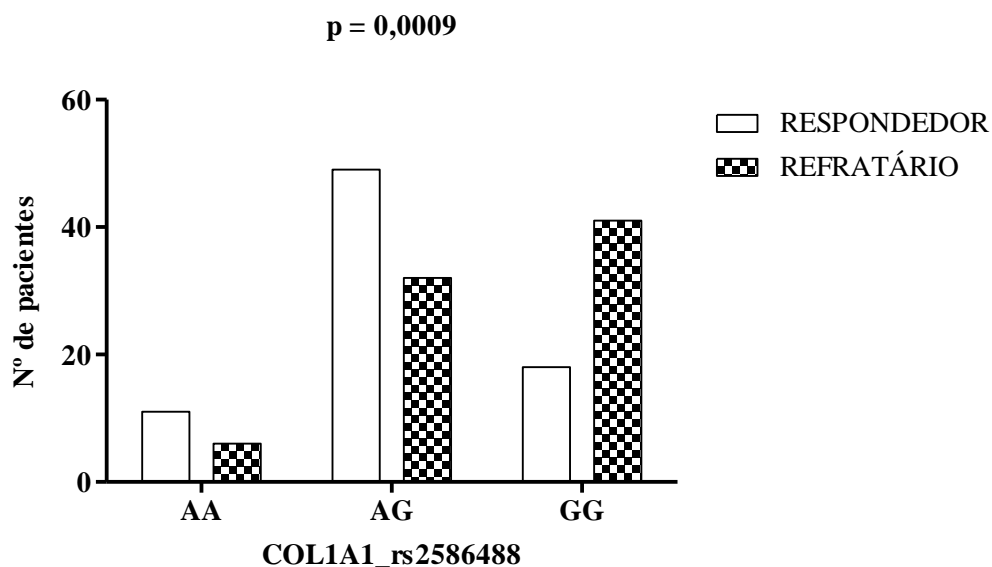


Figura 8. Associação entre genótipos do polimorfismo rs2586488 no gene de *COL1A1* e resposta ao tratamento de pacientes com LC. PCR em tempo real realizado com cDNA extraído de sangue total de pacientes (Respondedor vs Refratário) com LC (N=159). Cada coluna representa os genótipos no gene de *COL1A1*. Os dados foram analisados utilizando os testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Mann Whitney ($p=0,0009$). O valor de P mostra que houve associações significativas com os pacientes respondedores ao tratamento no grupo de carreadores de genótipos contendo o alelo A (AA e AG) quando comparados com aqueles com o genótipo GG.

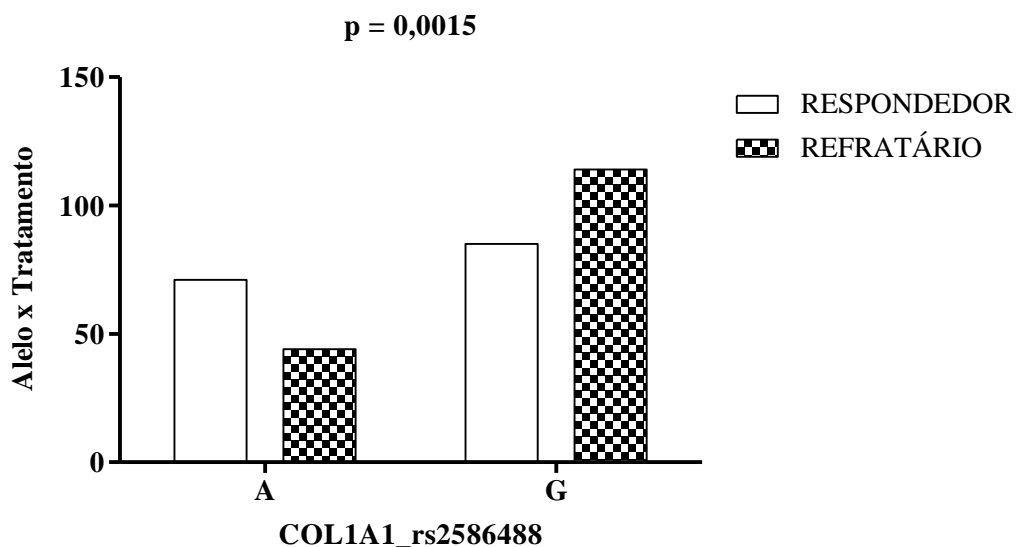


Figura 9. Associação alélica do polimorfismo rs2586488 no gene de *COL1A1* e resposta ao tratamento de pacientes com LC. PCR em tempo real realizado com cDNA extraído de sangue total de pacientes (Respondedor vs Refratário) com LC (N=159). Cada coluna representa os alelos separadamente (alelos A e G). Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney ($p=0,0015$). O valor de P mostra que houve associações significativas com os pacientes respondedores ao tratamento, carregando o alelo A em maior frequência, quando comparado com o alelo G.

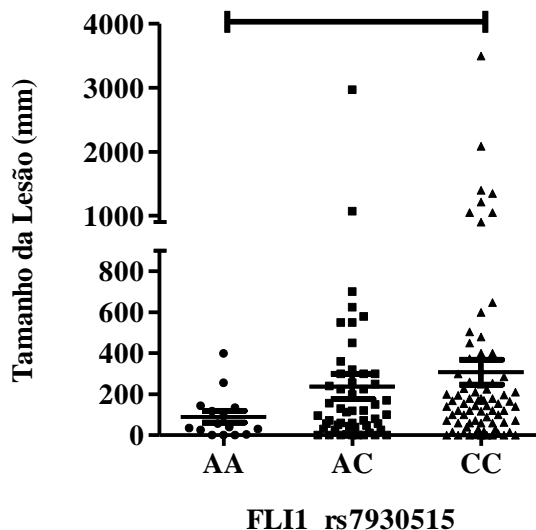


Figura 10. Associação entre genótipos do polimorfismo rs7930515 no gene de *FLII* e o tamanho das lesões dos pacientes com LC. PCR em tempo real realizado com cDNA extraído de sangue total de pacientes (Respondedor vs Refratário) com LC (N=159). Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. Os dados foram analisados utilizando os testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Mann Whitney ($p = 0,0170$). O valor de P mostra uma diferença significativa entre os genótipos CC vs AA no gene *FLII* e o tamanho das lesões dos pacientes com LC.

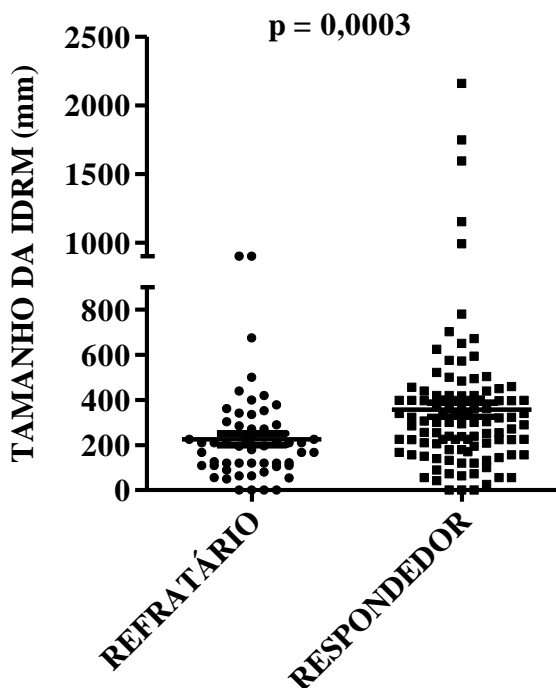


Figura 11. Associação entre o tamanho da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e a resposta ao tratamento de pacientes com LC. PCR em tempo real realizado com cDNA extraído de sangue total de pacientes (Respondedor vs Refratário) com LC (N=159). Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. Os dados foram analisados os testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Mann Whitney. O valor de P mostra que houve uma associação entre a área de endureção do teste cutâneo (IDRM) e o tratamento, sendo a área do teste significativamente maior nos pacientes respondedores ao antimônio pentavalente ($p=0,0003$).

Tabela 10. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com leishmaniose cutânea em resposta ao tratamento com antimonial pentavalente.

ASPECTOS CLÍNICOS DEMOGRÁFICOS	RESULTADO DO TRATAMENTO		
	Respondedor n = 105	Refratário n = 54	Valor de p
Idade, média, (DP)	27.50 ±15.65	27,29 ±17.18	0,7920
Gênero, %			
Masculino	67/ 105(63.80%)	32/54(59.25%)	0,6070
Número de lesões, mediana, (IQ)	1 (1-2)	1 (1-2)	0,4659
Área da maior lesão, mediana, mm ² (IQ)	120,0 (32,5 - 217,0)	132,5 (30-412,5)	0,2142
Área da IDR _M , mediana, mm ² (IQ)	300 (180 - 419)	195,5 (110 – 292,8)	*0,0003
Lesões nos membros inferiores, %	72 (66.74)	32 (13.76)	

DP= Desvio padrão; IQ = Intervalo interquartil; IDR_M= Intradermorreação de Montenegro. (N= 159)