



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



VARIANTE DO GENE *TREM1* EM INDIVÍDUOS COM  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL: UM  
ESTUDO CASO-CONTROLE

JOSÉ DO ESPÍRITO SANTO JÚNIOR

Manaus-AM

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



DISSERTAÇÃO

VARIANTE DO GENE *TREMI* EM INDIVÍDUOS COM  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL: UM  
ESTUDO CASO-CONTROLE

Mestrando: José do Espírito Santo Júnior

Orientador: Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

Manaus-AM

2018

## Ficha Catalográfica

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

Espírito Santo Júnior, José do

E77v Variante do gene TREM1 em indivíduos com Leishmaniose Cutânea no estado do Amazonas, Brasil : Um estudo caso-controle

/ José do Espírito Santo Júnior. 2018  
61 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rajendranath Ramasawmy

Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmania. 2. trem-1. 3. rfp. 4. marcador genético. I.  
Ramasawmy, Rajendranath II. Universidade Federal do Amazonas

III. Título

“A menos que modifiquemos à  
nossa maneira de pensar, não seremos  
capazes de resolver os problemas  
causados pela forma como nos  
acostumamos a ver o mundo. ”

Albert Einstein

## RESUMO

A leishmaniose é um grupo de doenças infecciosas crônicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos por flebotomíneos. O amplo espectro de manifestações clínicas varia de lesões cutâneas leves que podem ser auto curáveis até formas severas mucosas e viscerais. A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais comum e afeta milhões de pessoas no mundo. O desfecho clínico de LC é influenciado por respostas específicas de células T do hospedeiro. O receptor TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1) é um potente amplificador de sinais inflamatórios pertencente à superfamília das imunoglobulinas altamente expresso superfície de neutrófilos e monócitos no local de infecção. A via de sinalização induzida pela ativação de TREM-1 resulta na degranulação de neutrófilos, influxo de cálcio, sobrevivência celular e potente produção de citocinas inflamatórias. O gene *TREM1* está localizado no cromossomo 6. Neste estudo, nós investigamos se o polimorfismo rs22344237 presente no gene *TREM1* está associado com LC causada por *Leishmania guyanensis* no estado do Amazonas. Além disso, também verificamos se o polimorfismo estudado tem influência sob a expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$ . Neste estudo caso-controle, utilizamos o método (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) PCR-RFLP para a genotipagem. No total, 778 pacientes com LC e 766 pacientes controles recrutados foram genotipados. As concentrações das citocinas do plasma IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  foram mensuradas em 374 controles saudáveis através do equipamento Luminex. Nenhum grupo apresentou desvio para o teste de Equilíbrio Hardy-Weinberg. Os grupos caso e controle foram comparados pelos testes  $\chi^2$  e Odds Ratio (OR) com Intervalo de Confiança (IC) 95%. O perfil de citocinas foram comparados aos genótipos pelo teste ANOVA não-paramétrico. Contudo, nossos resultados mostram que não há associação o polimorfismo e LC causada por *L. guyanensis*. Similarmente, os genótipos deste polimorfismo não mostraram efeito sob a concentração das citocinas. Todavia, a ausência de associação à LC causada por *L. guyanensis* não descarta o papel do receptor TREM-1 na resposta imune a doenças infecciosas. Outros polimorfismos neste gene devem ser estudados para que não se possa excluir outras associações.

Palavras-Chave: *Leishmania guyanensis*, TREM-1, RFLP, Marcador Genético

## Abstract

*Leishmaniasis is a group of chronic infectious diseases caused by protozoan of the genus Leishmania transmitted by phlebotomine bites. The broad spectrum of clinical manifestations ranges from mild cutaneous lesions that can self-healing lesions to severe mucosal or visceral lesions. Cutaneous Leishmaniasis (CL) is the most common form and affects millions of people worldwide. The clinical outcome of CL is influenced by host-specific T cell responses. The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM)-1 is a potent amplifier of inflammatory signals belongs to the superfamily of immunoglobulin highly expressed on the neutrophils and monocytes surface in site of infectious. The TREM-1 signaling pathway leads to neutrophil degranulation, calcium influx, cell survival and cytokine overwhelming. The TREM1 gene is localized in the chromosome 6. In this study we investigated whether the TREM1 polymorphism rs22344237 A/T (Ser25Thr) is factor of risk or protection to CL patients due Leishmania guyanensis infections in the Amazonas state. Furthermore, was verified whether this polymorphism has influence under concentration of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in plasma. In this case-control study, the variant was genotyped by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) in 778 CL patients and 766 healthy controls. Plasma cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  were measured in 374 healthy controls by Luminex. The groups of study not presented Hardy-Weinberg equilibrium deviation and the alleles and genotype frequencies comparisons between CL patients and controls was performed with  $\chi^2$  and odds ratio (OR) test with a 95% confidence interval (CI). For comparisons between genotypes and cytokines concentrations the ANOVA non-parametric test was used. The results showed that the polymorphism not is associated how a risk or protection marker to CL. Similarly, the genotypes not exhibited effects under cytokines levels. Altogether the lack of association to CL caused by L. guyanensis do not rule out the role played by TREM1 in the immune response to the disease. Other polymorphisms in this gene should be studied before ruling out the lack of association.*

*Key words: Leishmania; TREM1; RFLP; genetic marker*

## Abreviaturas e Siglas

AM – Amazonas

BALB/c – Bagg Albinos/c

Bcl-2 – Linfomas de células B 2

BR – Brasil

BSA – Soro de Albumina Bovino

C3b – Complemento 3b

C75BL/6 – C57 black/6

CA – Califórnia

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CCL – Quimiocina Ligante CC

CD – Grupo de Diferenciação

CDC – Centro de controle e prevenção de doenças

CEP – Comitê de Ética de Pesquisa

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CR3 – Receptor de Complemento 3

CXCL – Quimiocina Ligante CXC

DAP12 – Proteína Ativadora de DNAX

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – dinucleotídeo trifosfato

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Receptor de fator de crescimento epidérmico

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FGFR – Receptor de fator de crescimento de Fibroblasto

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

FoxP3 – caixa Forkhead P3

GM-CSF – Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos

gp120 – glicoproteína 120

HIV – Vírus da Imunodeficiência humana

HLA – Antígeno leucocitário humano

IC – Intervalo de confiança

iC3b – Complemento 3b inativado

IFN- $\gamma$  – Interferon-gama

IGF – Fator de crescimento tipo insulina

IL – Interleucina

IRAK – Quinase associada ao receptor de Interleucina-1

ITAM – Imuno receptor com motivo de ativação baseado em Tirosina

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LCMV – Vírus da coriomeningite linfocítica

LD – Leishmaniose Disseminada

LM – Leishmaniose Mucosa

LPDE – Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana



LTA – Linfotixina alfa

LV – Leishmaniose Visceral

MAC-1 – Antígeno de macrófago 1

MAPK – Proteína quinase ativada por mitogênio

MCP-1 – Proteína Quimioatratante de Monócitos -1

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MIP1 $\alpha$  – Proteína inflamatória de macrófagos -1 alfa

mM – milimolar

MseI – *Micrococcus* espécies I gene

NK – Assassinas Naturais

NLR – Receptores tipo NOD

NOD – Domínio de oligomerização de nucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Odds ratio

PBMC – Células mononuclear do sangue periférico

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PGLYRP – Proteína receptora de reconhecimento de peptídeoglicano

PGN – Peptideoglicano

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC $\theta$  – Proteína quinase C teta

pM – picomolar

PSG – Gel secretório de promastigota

RFLP – Polimorfismo por comprimento de fragmento de restrição

RPM – Rotações por minuto

Ser – Serina

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

sTREM-1 – TREM-1 solúvel

Taq – *Thermus aquaticus*

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF $\beta$  – Fator de transformação do crescimento beta

Th – T auxiliar

TLR – Receptores tipo Toll

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TOLLIP – Proteína de interagindo com Toll

Tre – Treonina

Treg – T reguladora

TREM-1 – Receptor Gatilho Expresso em células Mielóides -1

TX – Texas

USA – Estados Unidos da América

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da distribuição mundial de novos casos de LC em 2015

Figura 2 – Ciclo de vida da *Leishmania*.

Figura 3 – Ação de monócitos contra *Leishmania* e ativação de células T CD4 efectoras.

Figura 4 – Neutrófilos contra *Leishmania* através de NETS e cooperação entre macrófagos.

Figura 5 – Divisão de subconjuntos de células T efectoras Th1, Th2, Th17, Treg e citocinas modulatórias da resposta imune

Figura 6 – Estrutura do Complexo de Ativação TREM-1/DAP12

Figura 7 – Localização e estrutura do gene *TREM1*.

Figura 8 – Fluxograma de Atividades do Trabalho

Figura 9 – Concentrações de citocinas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  entre os três genótipos A/A, A/T e T/T de indivíduos saudáveis.

## LISTA DE TABLEAS

<b>Ordem</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Discriminação alélica para rs2234237 A/T	37
<b>2</b>	Frequências Alélicas e Genotípicas	41

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Epidemiologia.....	17
2.2 Ciclo Biológico/Agente Etiológico.....	19
2.3 Vetor .....	21
2.4 Manifestações Clínicas da LTA.....	21
2.5 Aspectos imunológicos .....	23
2.5.1 Imunidade Inata .....	23
2.5.2 Imunidade Adaptativa.....	27
2.6 Receptor TREM-1.....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	35
4.1 Tipo de estudo.....	35
4.2 Termos éticos .....	35
4.3 População amostral .....	36
4.4 Área de Estudo.....	36
4.7 Critérios de inclusão .....	36
4.8 Critérios de não inclusão.....	37
4.9 Material Biológico .....	37
4.10 Extração de DNA.....	37
4.11 Quantificação do DNA extraído .....	37
4.12 PCR para genotipagem.....	38
4.13 Digestão Enzimática .....	38
4.14 Dosagem de Citocinas.....	39

4.15 Análise Estatística.....	39
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 Característica da População Estudada.....	42
5.2 Frequência Alélica e Genotípica, EHW, OR para rs2234237.....	42
5.3 Dosagem de Citocinas.....	42
6. CONCLUSÃO.....	43
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>8. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>55</b>
<b>9. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>56</b>

## 1.INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma doença infecciosa crônica que afeta milhões de pessoas por ano no mundo, países pobres e subdesenvolvidos são os alvos principais. Causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida através de vetores flebotomíneos, a leishmaniose é a nona doença endêmica parasitária considerada como problema de saúde pública em diversos países (ALVAR et al., 2012; DESJEUX, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

As manifestações clínicas são diversificadas, na qual dividem-se em três principais formas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucosa (LM) e Leishmaniose Visceral (LV), que acometem a pele, a mucosa e as vísceras, respectivamente (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A LC é considerada a forma mais comum das leishmanioses. Cerca de 1.3 milhão de casos são registrados por ano com mais de 90% dos casos ocorrendo nas Américas, bacia do mediterrâneo, Oriente Médio e na Ásia Central (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). O Brasil possui grande magnitude com cerca de 20 mil casos de LC por ano. Na região norte, o estado do Amazonas é endêmico e 1.645 casos foram registrados em 2015, ficando somente atrás do estado do Pará (BRASIL, 2017).

A cidade de Manaus, capital do Amazonas, é endêmica para a espécie *L. guyanensis*, responsável por uma quantidade significativa de casos de LC (>94%) e apenas alguns poucos casos ocasionados por *L. braziliensis*. (BENÍCIO et al., 2015; BENICIO et al., 2011; DESJEUX, 2004)

A LC apresenta um desenvolvimento complexo que abrange aspectos socioeconômicos, ambientais, nutricionais, imunológicos e genéticos. O desfecho clínico está relacionado a diferentes espécies de *Leishmania*, reposta do estado imunológico e a influência do *background*

genético hospedeiro (DESJEUX, 2004). As células imunitárias T CD4<sup>+</sup> *helper* tipo 1 (Th1) são células efetoras produtoras de interferon (IFN)- $\gamma$ , que ativam mecanismos oxidativos de macrófagos necessários para destruir *Leishmania* e controlar a infecção. As células do tipo 2 ou Th2 secretam citocinas interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13 anti-inflamatórias, e são respostas associadas a suscetibilidade a infecção por *Leishmania* (ABBAS, ABUL ; LICHTMAN, 2012). O balanço entre as repostas Th1 e Th2 ditam o progresso ou a auto cura da infecção (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014)

Uma gama de receptores celulares coordena a ativação das respostas imunes contra *Leishmania*. TREM (*Tiggering Receptor Expressed on Myeloids Cells*)-1 é uma glicoproteína receptora pertencente à superfamília das imunoglobulinas, seletivamente expresso na superfície de monócitos/macrófagos e neutrófilos. A ativação de TREM-1 leva a três vias principais PI3k, MAPK e PKC $\theta$  que conduz à amplificação da resposta inflamatória através de uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12p40 e quimiocinas como MIP1 $\alpha$ , MCP1 e GM-CSF (ARTS et al., 2013; BOUCHON et al., 2001a; BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). O gene *TREMI* está localizado no cromossomo 6, além de outros genes de importância para respostas imunológicas.

Diversos estudos demonstraram que SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) presentes em vários genes humanos são marcadores associados ao risco ou proteção para leishmaniose (CABRERA et al., 1995; CASTELLUCCI et al., 2006; DE ARAUJO et al., 2015a, 2015b; SALHI et al., 2008). Alguns SNPs presentes no gene *TREMI* também foram associados a diversas doenças infecciosas como choque séptico, formas graves de malária, endocardite infecciosa e prognóstico de sepse (ADUKPO et al., 2016; DE ARAUJO et al., 2015b; GOLOVKIN et al., 2014, 2015; PENG et al., 2015; SU et al., 2012).



Porém nenhum estudo havia investigado SNPs presentes no gene *TREMI* em indivíduos com LC. Neste presente trabalho, nós investigamos a variante rs2234237A/T (Ser25Tre) presente no gene *TREMI* em pacientes com LC causada por *L. guyanensis* na cidade de Manaus e medimos as concentrações das citocinas IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL6, IL8 e IL10 presentes no plasma.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Epidemiologia.**

O quadro epidemiológico da leishmaniose é amplamente diverso. Sendo uma doença tropical negligenciada presente em 98 países, a leishmaniose é categorizada no 9º lugar das doenças infecciosas endêmicas e parasitárias (OMS, 2016a).

As condições ambientais, o clima, regiões geográficas e situações socioeconômicas estão relacionadas diretamente ao *status* de endemicidade da doença (DESJEUX, 2004). Condições ambientais naturais não são os únicos critérios para distribuição da doença. A ação do homem no meio ambiente também leva a mudanças na distribuição da doença através da circulação de humanos em áreas de risco, desflorestamento, urbanização, criação de novos assentamentos e pastos para atividades agrícolas facilitando a entrada de hospedeiros humanos no ciclo biológico da *Leishmania* levando ao aumento de casos da doença (GOTO; LINDOSO, 2010)

Atualmente mais de um bilhão pessoas vivem em área de risco para leishmaniose no mundo e cerca de 431 milhões somente para LC. Os países mais afetados são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Índia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria no qual representam 70% dos casos para LC (OMS, 2016b; (KARIMKHANI et al., 2016). A distribuição geográfica mundial para LC pode ser visualizada na Figura 1.

Um estudo epidemiológico realizado em 25 países mostrou que apenas o Brasil apresenta alta morbidade para LC e LV (OMS, 2016b). Os casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil são altos e permanecem desde 2012 até 2015 entre 20.000 e 25.000. As regiões sudeste, sul e centro-oeste apresentam notificações inferiores a 5.000 casos.

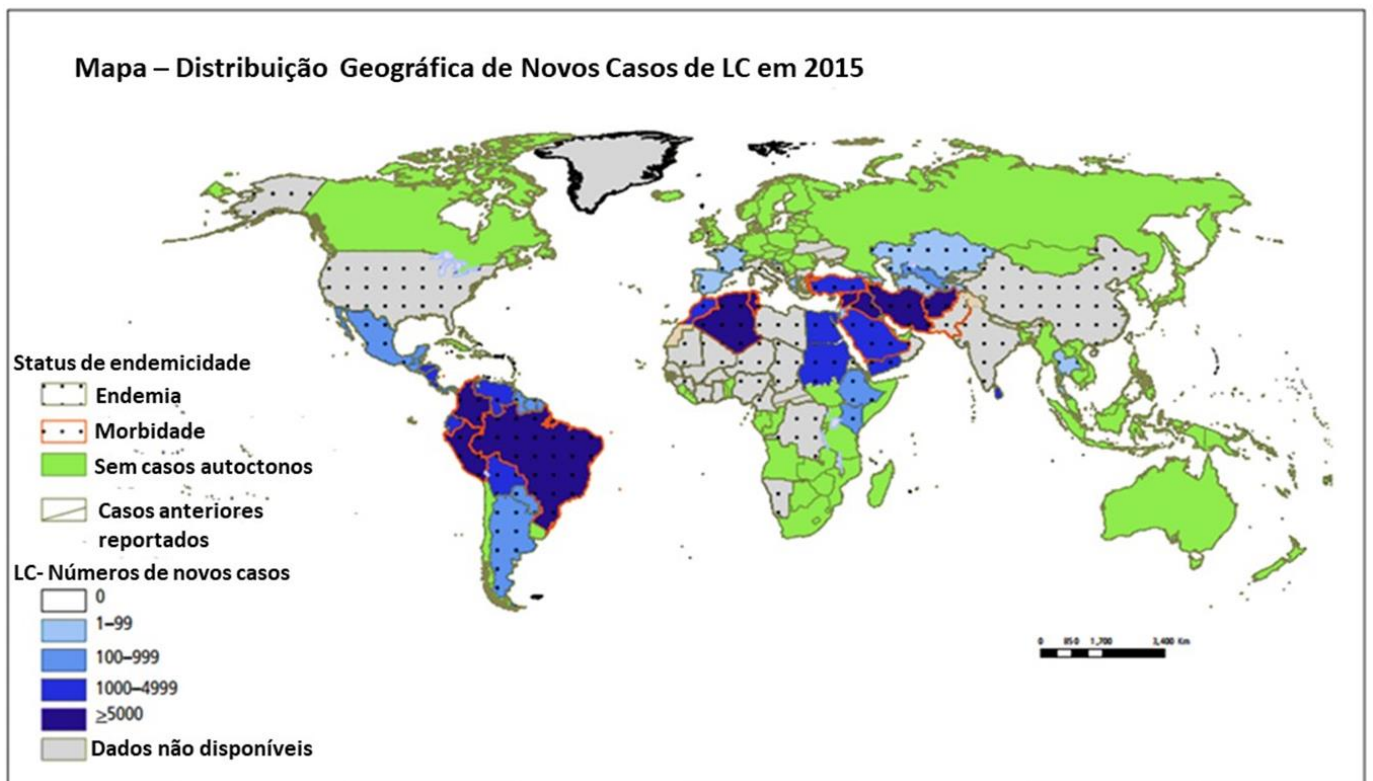


Figure 1 : Mapa da distribuição mundial de novos casos de LC em 2015: As diferentes cores no mapa representam características epidemiológicas descritas na legenda do mapa. (Adaptado)

Fonte: WHO, 2017

Em contrapartida, a região norte do país é que exibe um maior percentual de casos com cerca de 40% de registros, e aproximadamente 10.000 casos reportados no ano de 2015 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2015)

No estado do Amazonas e no estado do Pará foram notificados 1.645 e 3.610 novos casos no ano de 2015, respectivamente (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2015). A intensa modificação ambiental devido ao crescimento da cidade de Manaus, capital do Amazonas, levou ao aumento das atividades de desflorestamento e criação de novos assentamentos

tornando regiões peri-urbanas endêmicas para casos de LC causada predominantemente pela espécie *L. guyanensis* (BENÍCIO et al., 2015; BENICIO et al., 2011; GRIMALDI; TESH, 1993).

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) é o centro de referência para atendimento de casos de LTA no Amazonas, registrando de 700 a 800 casos anualmente, mais da metade dos casos em todo o estado (FMT-HVD, 2013).

## **2.2 Ciclo Biológico/Agente Etiológico**

O parasito *Leishmania* pertence à ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*. Os subgêneros de *Leishmania* são caracterizados por se desenvolver restritamente na parte anterior ao intestino e intestino médio e os do subgênero *Viannia* se desenvolvem obrigatoriamente na parte posterior do intestino e migram para parte anterior a boca (LAINSON, 2010).

O parasito é dimórfico, compreende as formas promastigotas e amastigotas. Promastigotas se desenvolvem no intestino do vetor, apresentam flagelos, são alongadas e possuem propriedades infectantes. As formas amastigotas, são ovaladas, se desenvolvem no interior dos fagolisossomos das células fagocíticas do hospedeiro, como macrófagos, neutrófilos e células dendrítica (NEVES et al., 2004; SCOTT; NOVAIS, 2016).

Os hospedeiros vertebrados são infectados no momento do repasto sanguíneo. O vetor flebotomíneo fêmea inocula as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva, que possui papel quimiotático, o qual atrai as células ao sítio de infecção (JACKSON et al., 1996; SVENSJÖ et al., 2012). Dentro dos fagócitos as formas infectantes tornam-se amastigotas após sobreviverem ao ambiente oxidativo dos fagossomos. Os amastigotas realizam a multiplicação por divisão binária e o aumento da carga parasitária. Os parasitos rompem a membrana celular

tornando os amastigotas acessíveis para infectar novas células ou sendo novamente transferidos através do repasto sanguíneo para novos vetores (CDC, 2016; NEVES et al., 2004)

O ciclo de vida no hospedeiro invertebrado é iniciado através do repasto sanguíneo onde as formas amastigotas são ingeridas e logo em seguida chegam ao intestino médio do vetor onde permanecem até se tornarem pequenos ovóides flagelados, e em alguns dias adquirem formas alongadas e flageladas, ao diferenciarem-se em formas infectantes, processo conhecido como metaciclogênese, migram para a proboscíde onde permanecem localmente na saliva até o momento do repasto sanguíneo subsequente (NEVES et al., 2004; SCHLEIN, 1993). (Figura 2)

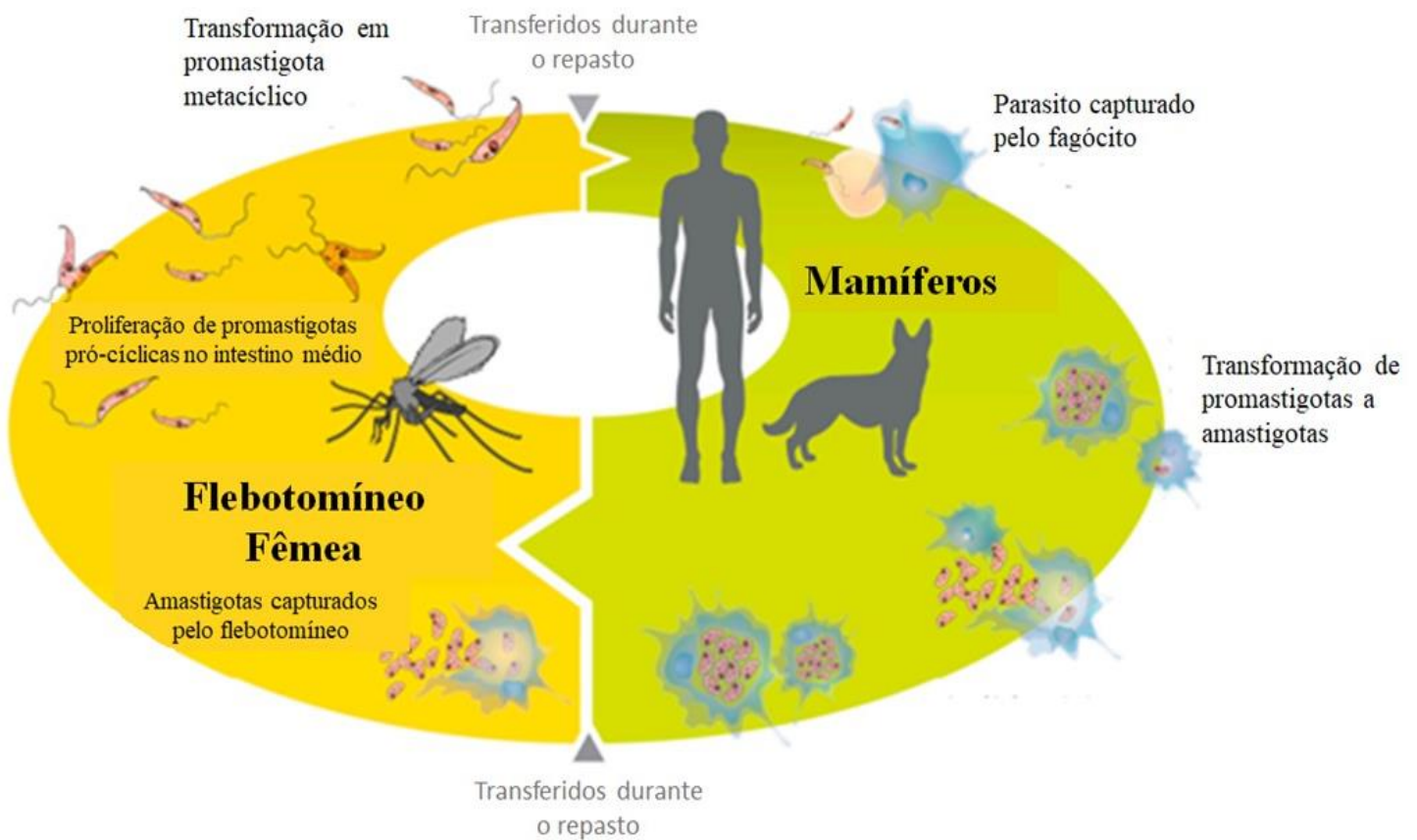


Figure 2: Ciclo de vida da *Leishmania*. (Adaptado) Fonte: VERAS et al., 2016.

## 2.3 Vetor

Os flebotomíneos são insetos de ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotminae*. Existe cerca de 800 espécies, mas apenas 98 espécies pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* podem ou suspeita-se ser vetores da leishmaniose humana (MAROLI et al., 2013).

No Velho Mundo, 42 espécies do gênero *Phlebotomus* são implicadas na transmissão de *Leishmania*. Alguns exemplos de espécies são *P. argentipes* transmite *L. donovani* causadora LV e dermatoses pós Kalazar; *P. ariasi* transmite *L. infantum* causadora de LV; *P. aculeatus* transmite *L. tropica* causadora de LCL; *P. duboscqi* transmite *L. major* causadora de LCL e *P. pedifer* transmitem *L. aethiopica* causadora de LCL. No Novo mundo, 56 espécies do gênero *Lutzomyia* são registradas as quais são responsáveis por transmitir 15 espécies de *Leishmania* (MAROLI et al., 2013).

Com extraordinário papel na distribuição epidemiológica e transmissão da doença, a contribuição do vetor também tem sido estudada a nível molecular. Diversos compostos salivares do vetor, como proteínas e nucleosídeos têm sido estudados e demonstram forte efeito no sucesso da infecção (CARREGARO et al., 2015).

## 2.4 Manifestações Clínicas da LTA

O espectro de manifestações clínicas da LTA vai de formas assintomáticas, cutâneas auto curáveis, e pode progredir a formas mucosas agressivas (AMEEN, 2010; SILVEIRA et al., 2008).

A LTA caracteriza-se por uma ou múltiplas lesões cutâneas que podem acometer a mucosa da faringe ou orofaringe (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). E divide-se em diferentes grupos de acordo com suas características:

Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) apresenta de uma a 6 lesões ulceradas de bordas elevadas e fundo granulomatoso e são causadas por todas as espécies dermatrópicas de *Leishmania*. A LCL exibe resposta imunológica predominante do tipo 1 ou mista, tipo 1 e tipo 2 (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A Leishmaniose Disseminada (LD) são múltiplas lesões nodulares e papulares acneiformes que acometem principalmente a região do tronco e da face, podendo ser causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A LD exibe uma resposta inflamatória mais acentuada quando comparada a LCL com altas produções de IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) se desenvolve de uma única lesão e se estende por grande parte da pele com criação de placas nas lesões e são causadas pela espécie *L. amazonensis* (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Diferentemente das demais formas, a resposta imunológica para LCD é marcada por uma baixa resposta de células Th1, exibindo alta carga parasitária (DÍAZ et al., 2006).

As lesões mucosas são mais agressivas e compreendem úlceras que acometem as mucosas da região faríngea e cavidade nasal, afetando grandemente o tecido e destruindo a cartilagem do nariz (CUENTAS et al., 1984). A LM exibe grande resposta inflamatória com alta produção de IL17, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , infiltrados neutrofílicos, baixa produção de IL-10 e outras citocinas anti-inflamatórias e carga parasitária extremamente menor (BOAVENTURA et al., 2010).

## 2.5 Aspectos imunológicos

### 2.5.1 Imunidade Inata

Um progresso produtivo ou possivelmente auto curável em infecções por *Leishmania* dependem intrinsecamente do microambiente da lesão, das proporções de células infectadas, do estado de ativação das células locais além da virulência do parasito no decorrer do momento inicial da infecção (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

Durante o repasto sanguíneo, o vetor inocula junto com o parasito proteínas presentes na saliva que possuem propriedades quimiotáticas, vasodilatadoras e imunomoduladoras contribuindo grandemente no estabelecimento durante a fase aguda. A regurgitação de gel secretório de promastigota (PSG) presente na saliva de *Lu. longipalpes* leva ao aumento da expressão de transcritos envolvidos na inflamação (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ ), no recrutamento celular (CCL2/MCP1, CCL3, CCL4, CXCL2) e, após 6 dias, a proliferação celular, fibrose e fibroplasia (FGFR2, EGF, EGFR, IGF1) tanto *in vitro* como *in vivo*. IGF1 mostrou papel fundamental na ativação de macrófagos M2 alternativos em infecções induzidas por *L. mexicana* (GIRAUD et al., 2018). Em compensação, camundongos imunizados com a saliva de *Lu. whitmani* contra *L. braziliensis* apresentaram repostas celulares e humorais robustas com a presença de infiltrado celular intenso, produções de IFN- $\gamma$  e IL-10, baixa carga parasitária e lesões menores, além disso indivíduos saudáveis residentes de áreas endêmicas apresentaram anticorpos responsivos para saliva de *Lu. whitmani* em comparação a baixa resposta de anticorpos dos pacientes com LC ativa (GOMES et al., 2016).

Após o parasito ser inoculado, proteínas do sistema complemento como iC3b se ligam ao parasito e logo se convertem em C3b, porém logo é inibido para formação do complexo MAC

C5b-9 favorecendo a fagocitose pelas células do hospedeiro que possuem receptores CR3/MAC-1 que se ligam a C3b (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

Os macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos possuem receptores para C3b e são os principais alvos do parasito (GURUNG; KANNEGANTI, 2015). As produções de quimiocinas locais aumentam e atraem células para o sítio de infecção (SCOTT; NOVAIS, 2016). A liberação de MCP-1 por células endoteliais induz o recrutamento de monócitos que exercem funções efetoras no momento inicial da infecção, como a produção de radicais de oxigênio no interior dos fagossomos para destruir a *Leishmania* independente da ativação por IFN- $\gamma$  (GONCALVES et al., 2011). (Fig. 3)

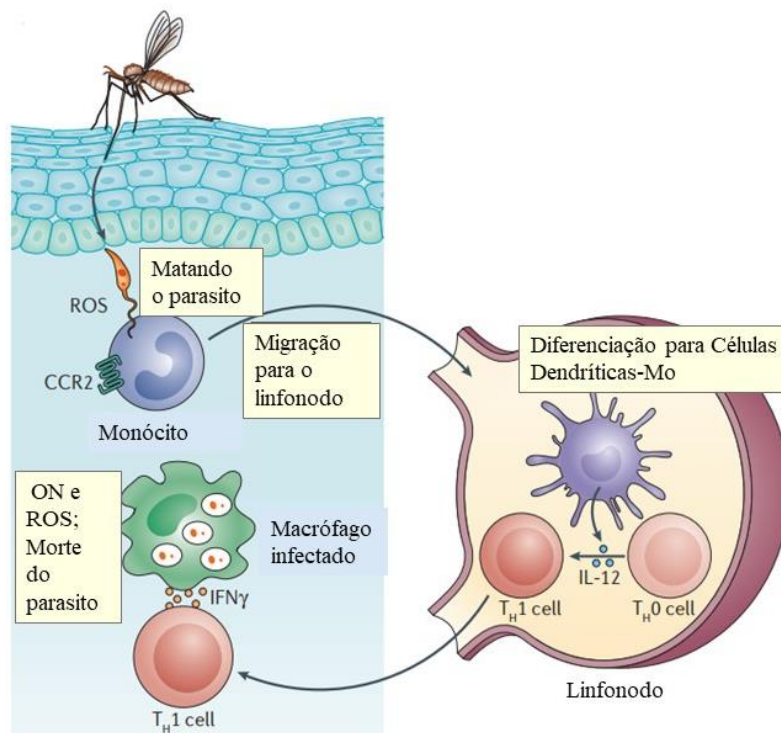


Figure 3: Ação de monócitos contra *Leishmania*, diferenciação de monócitos em células dendríticas e ativação de células T efetoras. (Adaptado) Fonte: SCOTT & NOVAIS, 2016



No tecido infectado, vários tipos de células produzem CXCL8 que atraem neutrófilos rapidamente para o local (DYER et al., 2014). Os neutrófilos atraídos formam armadilhas externas composta por uma malha densa de cromatina e proteínas chamada de *Neutrophils Extracellular Traps* (NETs), que capturam e matam parasitos a qual foi demonstrado com *L. amazonensis* (GUIMARAES-COSTA et al., 2009).

Cooperações entre neutrófilos e macrófagos infectados levam a eliminação do parasito. Os macrófagos do peritônio de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* co-culturados com neutrófilos inflamatórios destruíram eficientemente o parasito, porém a eliminação do parasito não depende do contato entre neutrófilos e macrófagos infectados, mas TNF- $\alpha$ , elastase de neutrófilos e fator ativador de plaquetas foram envolvidos aos efeitos leishmanicidas independente da geração de radicais de nitrogênio e oxigênio (DE SOUZA CARMO; KATZ; BARBIÉRI, 2010). Os neutrófilos e macrófagos estabelecem uma cooperação protetora contra *L. braziliensis*. O nível da carga parasitária foi significativamente reduzido em macrófagos de

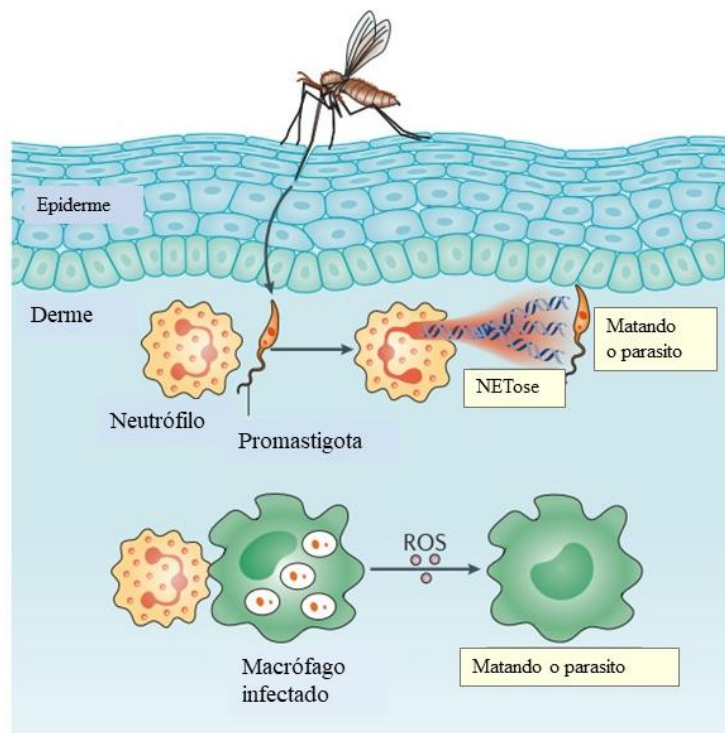


Figure 4: Neutrófilos contra *Leishmania* através de NETs e interação entre neutrófilos e macrófagos para destruir o parasito. (Adaptado) Fonte: SCOTT & NOVAIS, 2016

camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* na presença de neutrófilos, efeito similar também observado em células humanas (NOVAIS et al., 2009). (Fig.4)

Por outro lado, a proteção do hospedeiro por neutrófilos ainda permanece contraditória. O neutrófilo é utilizado como reservatório altamente carregado de parasitos chamado de “Cavalo de Tróia” e pode ser endocitado por macrófagos contribuindo com o aumento da carga parasitária, uma forma silenciosa para o aumento da infecção (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003)

A infiltração de neutrófilos são mecanismos altamente inflamatórios, e favorecem a progressão da infecção por *L. mexicana* levando a cronificação das lesões correlacionado à alta produção de IL-17 que por sua vez estimula a produção de CXCL8, a quimiocina responsável pelo recrutamento dos neutrófilos (PEDRAZA-ZAMORA et al., 2017). As células apresentadoras de antígenos profissionais estabelecem uma conexão entre o sistema imune inato e adaptativo através da apresentação de peptídeos às células T CD4<sup>+</sup>. A diferenciação dos linfócitos T estimulada por células dendríticas ocorre por meio de interações via receptores de superfície e citocinas na qual induzem respostas imunológicas específicas a *Leishmania* (GONZALEZ-LEAL et al., 2014). Alguns monócitos apresentam plasticidade e diferenciam-se em células dendríticas no início da infecção (MoDC- *Monocyte-derived Dendritic Cells*), em seguida capturam o parasito e migram para o linfonodo regional mais próximo onde induzem linfócitos T virgens a diferenciar-se em subconjuntos de células T efectoras CD4<sup>+</sup> *helper*. As células T ativadas são recrutadas através da liberação local de CXCL10 para o local infectado, onde subsequentemente medeiam respostas específicas contra *Leishmania* (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007). (Fig. 3)

## 2.5.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade celular é coordenada centralmente pelos linfócitos T, a qual é uma propriedade característica do sistema imune adaptativo e desempenha um papel fundamental na defesa contra *Leishmania*. Os tipos diferentes de manifestações clínicas estão relacionados à polarização de subconjuntos de linfócitos T (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017)

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em Th1 por estímulo de IL-12 produzida por células dendríticas concomitantemente a produção de IFN- $\gamma$  por células *Natural Killer* (NK) no linfonodo (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007). O papel do perfil Th1 é bem esclarecido em modelo animal. A produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  ativam mecanismos microbicidas nos lisossomos dos macrófagos como a produção de reativos de oxigênio para destruir patógenos intracelulares representando um mecanismo fundamental no controle de *Leishmania* (LIEW; LI; MILLOTT, 1990; WILHELM et al., 2001).

No ser humano, o perfil Th1 também exibe papel protetor. Co-culturas de linfócitos T CD4 com macrófagos infectados com *L. braziliensis* mostram uma forte habilidade para eliminação do parasito, o que é revertido quando anti-IFN- $\gamma$  é usado (SANTOS et al., 2013). Uma forte produção de IFN- $\gamma$  e uma baixa modulação de IL-4 e IL-10 detectado por imunoensaio em PBMC de pacientes curados, mostram que citocinas do tipo 1 estão associadas a cura clínica (CASTELLANO et al., 2009). As células T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e a alta produção de citocinas do tipo 1 sobre as citocinas do tipo 2, apesar de níveis basais, previnem a infecção e o desenvolvimento da lesão em indivíduos não infectados residentes de área endêmica (BARATTA-MASINI et al., 2007).

A IL-12 é a principal citocina que induz a diferenciação de células T para o fenótipo Th1. A capacidade de não reposta de células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados por *L. guyanensis* aos

estímulos de IL-12 está associada com a persistência da infecção em leishmaniose cutânea ativa (BOURREAU et al., 2001).

A diferenciação de células T para células Th2 não é totalmente compreendida, mas células B regulatórias e fatores transcricionais de células dendríticas do tecido podem estar envolvidos (CONNOR et al., 2017; RONET et al., 2010). A principal citocina indutora do perfil Th2 é a IL-4. As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 são secretadas por Th2 e desempenham funções anti-inflamatórias em LC. As citocinas Th2 ativam as células B, estimulam a troca de classe de anticorpos, recrutam eosinófilos e dirigem uma resposta humoral incapaz de destruir patógenos intracelulares como *Leishmania* (KOPF et al., 1996; REINHARDT; LIANG; LOCKSLEY, 2009).

Camundongos *knockout* para IL-4 infectados por *L. amazonensis* e *L. major* mostraram lesões menores quando comparados aos camundongos selvagens apesar de não eliminarem os parasitos (FELIZARDO et al., 2012; KOPF et al., 1996). A ação de IL-4 está relacionada à ativação da imunidade humoral, além de inibir a expressão do gene *IL12R* limitando as respostas Th1, contribuindo com uma resposta favorável para a replicação *Leishmania* (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SZABO et al., 1997). Respostas Th2 são predominantes na fase inicial da infecção por *L. guyanensis* e está correlacionada positivamente com a carga parasitária em biópsias de pacientes (BOURREAU et al., 2003).

Os Linfócitos T produtores de IL-17A/F ou Th17 são pró-inflamatórios, ativam a produção de citocinas e quimiocinas, como CXCL8 responsável pelo recrutamento de neutrófilos. Sua diferenciação é estimulada por IL-6, TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23 (MCGEACHY et al., 2007; MCGEACHY; CUA, 2008).

Em infecções por *Leishmania*, as células Th17 têm sido envolvidas na indução de fortes respostas neutrofílicas que levam ao progresso da infecção. Os camundongos BALB/c suscetíveis apresentaram aumento de células Th17 concomitante a neutrófilos exibindo níveis significantes quando comparados aos camundongos C57BL/6 após 90 dias de infecção por *L. mexicana* que permaneceu até a fase de cronificação da doença (PEDRAZA-ZAMORA et al., 2017).

De modo semelhante, biópsias de LM de pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentaram neutrófilos e células T produtoras IL-17 na lesão necrótica (BOAVENTURA et al., 2010). O *knockout* de IL-17 em camundongos suscetíveis diminuiu CXCL2 e neutrófilos que levou a redução significativa do tamanho da lesão quando comparado ao controle (KOSTKA et al., 2010).

Apesar do paradigma Th1/Th2 ser essencial no combate a *Leishmania*, células T regulatórias (Treg) produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$  desempenham funções de regulação de células efetoras. As células Treg naturais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>), um subconjunto de células T regulatórias, regulam a intensidade das respostas imunológicas ou atrasam respostas de células T efetoras, tais como Th1, Th2 e Th17 (JI et al., 2005).

Ao regular respostas Th1, células Treg mostram-se um mecanismo necessário para o controle de respostas inflamatórias exacerbadas. A ablação de células Treg em camundongos infectados por *L. (V.) panamensis* levou ao aumento das lesões, cargas parasitárias e expressões de IL-17 e IFN- $\gamma$ . Diferentemente, a imunoterapia através da transferência de células Treg saudáveis ou tratados com rIL-2/anti-IL-2 reduziu a concentração de citocinas inflamatórias, tamanho de lesões e cargas parasitárias em camundongos infectados (EHRlich et al., 2014).

As atividades de células Treg são controladas através das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . As Tregs inibiram a produção das citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$ , mas não houve mudanças em IL-13 e

IL-10 que contribuiu com a redução das lesões de LC observado em camundongos (EHRlich et al., 2014). O equilíbrio entre os diferentes tipos de respostas imunes é necessário para uma resposta eficaz e controlada para uma boa resolução da infecção (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

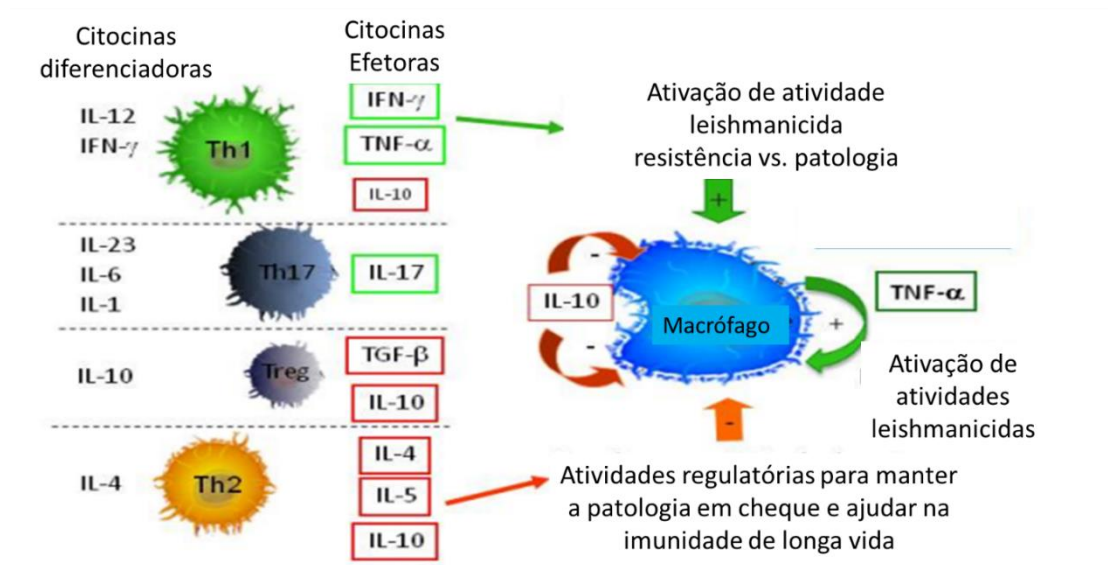


Figure 5 : Divisão de subconjuntos de células T efetoras Th1, Th2, Th17, Treg e citocinas modulatórias da resposta imune que ativam os macrófagos contra *Leishmania*. (Adaptado) Fonte: GOLLOB, 2016

## 2.6 Receptor TREM-1

Uma gama de receptores celulares desempenha importantes funções na modulação de respostas imunológicas, como reconhecimento, adesão e ativação celular. O receptor TREM-1 é uma proteína de 30kDa pertencente a superfamília das imunoglobulinas, expressa por monócitos/macrófagos e neutrófilos (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000).

A estrutura de TREM-1 possui um domínio extracelular tipo imunoglobulina do tipo V, um domínio intramembrana com aminoácidos de Lisina carregados positivamente, e um domínio intracelular com uma curta cauda ausente de domínio ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Por esse motivo TREM-1 necessita se ligar a uma proteína adaptadora DAP-12 (*DNAx-activating Protein*) para transdução de sinais. A proteína DAP12 possui um domínio transmembrana com aminoácidos de Aspartato carregados negativamente que interagem com o domínio intramembrana de TREM-1 e um domínio ITAM intracelular responsável por levar o sinal para o início da cascata de sinalização (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). (Fig. 6)

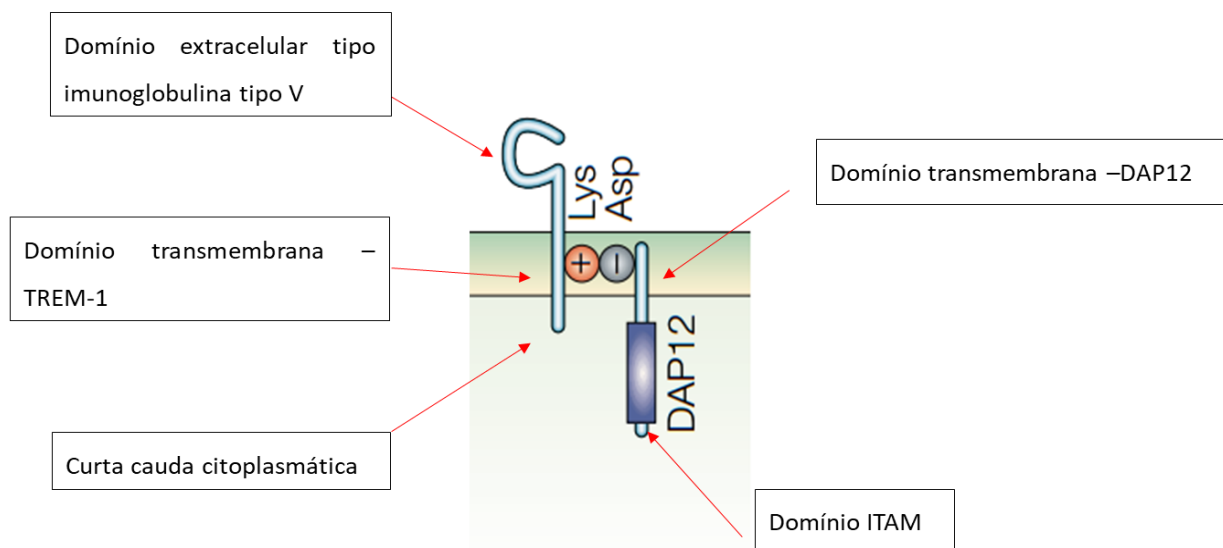


Figura 6: Estrutura do complexo TREM-1/DAP12 (Adaptado) Fonte: COLONNA, 2003

A ativação de TREM-1 leva ao aumento do fluxo de cálcio intracelular, secreção de várias citocinas pro-inflamatórias, sobrevivência celular via Bcl-2, degranulação em neutrófilos e amplia os sinais de TLRs e NLRs (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; PRÜFER et al., 2014; YUAN et al., 2017).

A ativação de TREM-1 conduz a proteção contra infecções bacterianas. Camundongos infectados por *Streptococcus pneumoniae* foram tratados com o TREM-1 agonista mAb e

resultou no aumento de resposta inflamatória que foi indiretamente relacionado a diminuição nos níveis de reguladores negativos de TLRs como TOLLIP e a ativação de TREM-1 por estímulo de *S. pneumoniae* diminuiu a atividade de IRAK-M durante as primeiras seis horas sem eliminação das bactérias. Depois de 48 horas ativação de TREM-1 levou a eliminação da infecção bacteriana (LAGLER et al., 2009).

O receptor TREM-1 de camundongos infectados por *Pseudomonas aeruginosa* foi bloqueado por mTREM-1/FC e resultou na diminuição de infiltrados neutrofílicos, citocinas pro-inflamatórias e ativação de TLRs (WU et al., 2011). Em compensação, o bloqueio de TREM-1 em camundongos com choque séptico induzido por LPS aumentou a sobrevivência em comparação aos camundongos tipo-selvagem (BOUCHON et al., 2001b; BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). Os camundongos *TREM1*<sup>-/-</sup> infectados por *Klebsiella (K.) pneumoniae* mostraram a resposta imune debilitada, crescimento e disseminação bacteriana e diminuição da sobrevivência (HOMMES et al., 2015).

O TREM-1 foi bloqueado em camundongos infectados pelo fungo *Aspergillus fumigatus* que resultou redução da inflamação, citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 características de respostas Th1, porém aumentou os níveis citocinas de respostas Th2 como IL4, IL5 e IL10, que atenuou a severidade da queratite fúngica (ZHONG et al., 2016).

Pacientes com hepatites C ou B apresentaram elevados níveis de TREM-1 solúvel (sTREM-1). Os camundongos *TREM1*<sup>-/-</sup> infectados por LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) apresentaram redução da inflamação, dano tecidual, número de neutrófilos no fígado. Os níveis de concentrações de CCL2 e TNF- $\alpha$  favoreceram a eliminação viral, diferentemente dos camundongos tipo-selvagem (KOZIK et al., 2016). A alta expressão de TREM-1 em células PBMC de pacientes em resposta a proteína viral gp120 do HIV-1



favoreceu as atividades anti-apoptóticas dos macrófagos através de Bcl-2 prolongando a sobrevivência das células na fase de latência do HIV-1 (YUAN et al., 2017).

Um estudo demonstrou que PGLYRP (*Peptidoglycan recognition protein*)-1, uma proteína presente no citosol de neutrófilos, foi liberada durante a ativação de neutrófilos e se ligou ao peptídeo glicano de bactérias presente no plasma e formou um complexo chamado de PGN-PGLYRP1 que se ligou ao TREM-1 e ativou as células mielóides, uma evidência nova de um ligante funcional para TREM-1 (READ et al., 2015)

Todavia, o papel imunológico de TREM-1 em LC ainda é pouco conhecido. Mas, camundongos *TREMI*<sup>-/-</sup> infectados por *L. major* apresentaram redução do número de neutrófilos infiltrados e do tamanho das lesões, contrariamente os camundongos tipo-selvagem apresentaram suscetibilidade às infecções por *L. major* (WEBER et al., 2014).

O gene *TREMI* humano está localizado no braço curto do cromossomo 6 na posição p.21.1. Outros genes que codificam moléculas de grande importância no sistema imune também se localizam no cromossomo 6, tais como *TNF*, *HLA-A*, *HLA-D*, *LTA*, *NOD2*, *IL17A* e *IL17F*.

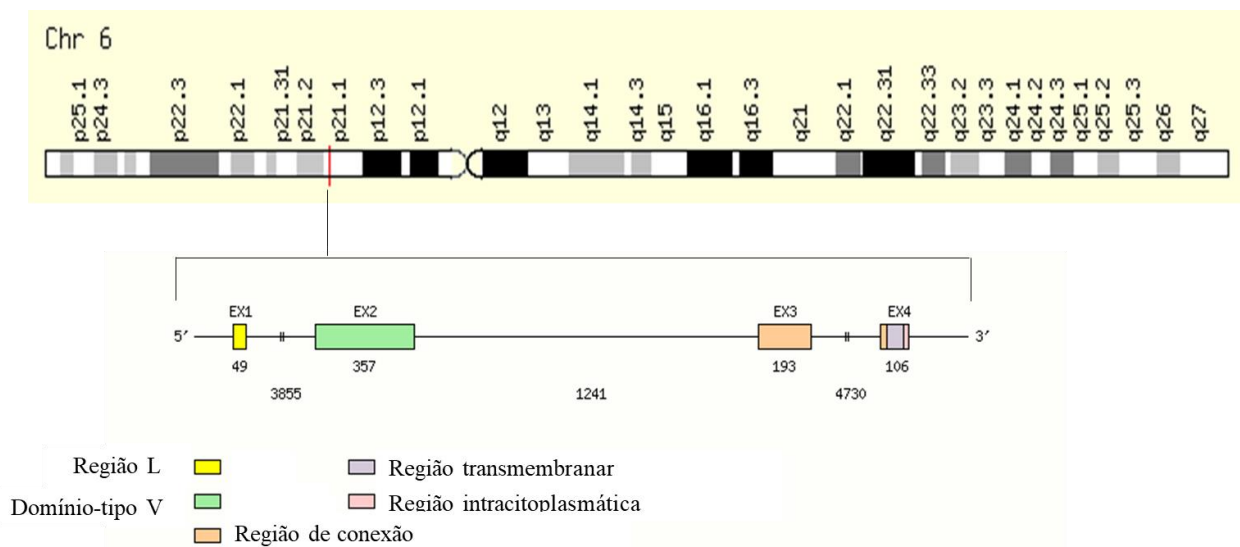


Figure 7: Localização do gene *TREMI* no cromossomo 6 e a estrutura do gene. A legenda em cores identifica as regiões codificantes dos domínios da proteína. (Adaptado) Fonte: genecard.com; igmt.org

Em relação à genética, SNPs do gene *TREMI* foram investigados em doenças infecciosas e inflamatórias, como malária na população de Gana na África, choque séptico na população chinesa, pneumonia causada por ventilação mecânica na população norte-americana, inflamação de artéria coronária e aterosclerose em russos e doenças inflamatórias intestinais em coreanos (ADUKPO et al., 2016; GOLOVKIN et al., 2014; JUNG et al., 2011; KUTIKHIN et al., 2016; PENG et al., 2015; RIVERA-CHÁVEZ et al., 2013). Há a necessidade de pesquisar e descobrir mais sobre o papel das variantes do gene *TREMI* frente a outras infecções, devido ao forte papel de TREM-1 na imunidade inflamatória contra diversos patógenos. O polimorfismo rs2234237 chama atenção por ser não sinônimo, responsável pela troca de Serina por Treonina na posição do códon 25 podendo implicar em uma possível alteração da função biológica do receptor e está localizado estrategicamente no éxon-2 responsável por codificar a região extracelular domínio tipo imunoglobulina tipo V local que interage com o ligante.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar uma possível associação da variante rs2234237 do gene *TREMI* a LC causada por *L. guyanensis* em pacientes e controles saudáveis e sua influência na imunidade do hospedeiro em uma população de área endêmica da cidade de Manaus, no Estado do Amazonas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs2234237 *TREMI* em pacientes e controles saudáveis.

- Comparar as frequências alélicas e genotípicas do SNP rs2234237 em ambos os grupos para teste de associação.

- Correlacionar um possível efeito do SNP rs2234237 sobre concentrações das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, e TNF- $\alpha$  presente no plasma de controles saudáveis.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo**

Este é um estudo caso-controle para análise de associação genética, e consiste na análise e comparação das frequências dos alelos polimórficos presentes na população (Caso e Controle) residente de área endêmica para a espécie *L. guyanensis* onde foi aplicado o teste de associação para investigar o papel da variante polimórfica na suscetibilidade ou proteção a LC.

### **4.2 Termos éticos**

Esta pesquisa seguiu as recomendações da Declaração de Helsinque, resoluções do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sobre pesquisa em seres humanos, com as resoluções 196/96 e 441/2011.

Os candidatos foram apresentados à opção de autorizar ou não o armazenamento de suas amostras biológicas para estudos futuros através do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e receberam assistência à saúde no ambulatório de dermatologia da FMT-HVD. Foram abordadas informações básicas sobre a natureza da pesquisa aos participantes do estudo. Este projeto esteve integrado a um projeto maior intitulado “Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose

cutânea”, com aprovação da CEP do FMT-HVD, sob o número do CAAE: 09995212.0.0000.0005.

### **4.3 População amostral**

A população estudada teve  $n$  amostral conveniente para estudos de associação genética (MARCHINI *et al.*, 2004). Foram 1.544 indivíduos, dentre os quais, 778 pacientes tinham LC e 766 indivíduos controles saudáveis eram residentes de áreas endêmicas e não tinham histórico de leishmaniose.

### **4.4 Área de Estudo**

O estudo foi realizado em indivíduos de regiões endêmicas para leishmaniose localizadas nas proximidades do município de Manaus. As regiões das rodovias AM-010 Manaus – Itacoatiara; e BR-174 Manaus – Boa Vista. Algumas das localidades utilizadas para o estudo no qual apresenta casos confirmados de leishmaniose são: BR-174 - Ramal do Pau-Rosa e Ramal da Cooperativa e suas vicinais (Km 21); AM-010 - Ramal Água Branca I (Km 32) e Ramal Água Branca II (Km 35), Ramal do Leão (Km 37).

### **4.7 Critérios de inclusão**

Pacientes de sexo masculino e feminino com idade mínima de 12 anos e máxima de 65 anos que tiveram diagnóstico positivo recente para leishmaniose, com no mínimo uma lesão ulcerada e no máximo seis, identificadas através de diagnóstico específico para leishmaniose cutânea (identificação de amastigotas de material biológico escarificado das bordas das lesões e corado com GIEMSA) e espécies identificadas através de sequenciamento específico feito a partir de DNA obtido de biópsias da lesão ou da cultura do parasito.

#### **4.8 Critérios de não inclusão**

Não foram incluídos indivíduos que apresentaram evidência de doença subjacente grave (cardíaca, renal, hepática, pulmonar e infecciosa) ou com imunodeficiência ou anticorpos positivos para HIV ou indivíduos que estavam em tratamento de imunossupressores e mulheres gestantes ou em fase de amamentação.

#### **4.9 Material Biológico**

Amostras de 5mL de sangue periférico foram coletadas em tubo contendo ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante para pacientes e controles. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas (LPDE) da FMT-HVD para separação do plasma e extração de DNA.

#### **4.10 Extração de DNA**

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (RPM) em centrífuga de bancada por 10 minutos, sendo coletados aproximadamente 120 a 200  $\mu$ L da camada de leucócitos (Buffy Coat). A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia de “*salting-out*” (Sambrook, 1986). As amostras de DNA purificadas foram ressuspensas em água livre de nucleases e armazenadas à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.11 Quantificação do DNA extraído**

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro de microvolume, em comprimentos de onda de 260nm e 280 nm pelo NanoDrop ND- 2000 (Thermo Scientific). Após a homogeneização da amostra foi utilizado 1  $\mu$ L para quantificação do DNA em ng/ $\mu$ L e determinação da pureza através da razão entre a absorbância 260/280nm.

## 4.12 PCR para genotipagem

A genotipagem foi feita pela técnica de PCR-RFLP. Os primers para o SNP rs2234237 do gene *TREMI* foram desenhados para cobrir a região genômica do SNP. Os seguintes primers senso e anti-senso Forward: 5' TCT TTC CCT GCT TAT AGA ACT CCG 3' e Reverse: 5' GGT CTT GGG CAT CTC TCC GTC CTT 3' foram usados para amplificar a região genômica do SNP gerando um fragmento de 166 pb.

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 50 ng de DNA genômico, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, os iniciadores senso e antisenso 0,10 pM cada, dNTP 40mM e 1U de *Taq* polimerase.

A PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler® EP gradient S (Eppendorf, Germany).

## 4.13 Digestão Enzimática

A digestão enzimática de cada amostra foi realizada através da enzima de restrição MseI que reconhece um padrão de sequência de 4 nucleotídeos 5'TTAA3'. A digestão enzimática foi realizada em um volume final de 25uL (10uL de produto de PCR + 15uL de mix para digestão enzimática). O mix final (PCR + Mix) foi conduzido para conter 2U de enzima MseI, tampão da reação a 1X de *Cutsmart* (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate e 100 µg/ml BSA). As amostras foram incubadas por no mínimo 2 horas a 37°C em banho Maria e em seguida foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio para a visualização dos fragmentos digeridos. A digestão enzimática gerou fragmentos de 166pb e 128pb mostrados na tabela 1.

#### Discriminação alélica para rs2234237

Genótipos	Tamanho de fragmentos
A/A	128pb
A/T	166pb +128pb
T/T	166pb

Tabela 1: Tamanhos de fragmentos gerados pela digestão enzimática.

#### 4.14 Dosagem de Citocinas

A dosagem de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-10 foi realizada em plasma de controles através do Kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Grp I Panel 27-plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações foram medidas através do método de imunensaio multiplex. Este método emprega a utilização de microesferas sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para distintas citocinas e utilização de anticorpos de detecção marcados com fluorescência e analisadas pelo Bioplex 200 Protein Array System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Os valores gerados após análises para cada citocina foram observados em picogramas por mililitro (pg/ml).

#### 4.15 Análise Estatística

A frequência alélica e genotípica foi determinada através de contagem direta. Para verificar se a distribuição genotípica estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências dos genótipos esperados foram calculadas usando a fórmula  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  onde “p” representa o alelo com maior frequência e “q” o de menor frequência. A comparação entre os genótipos observados e esperados foi feita pelo teste de chi-quadrado. O teste de chi-quadrado com o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC) foi utilizado para comparação

entre os grupos caso e controle. A influência dos genótipos sobre as concentrações de citocinas foi realizada através do Teste ANOVA não-paramétrico em indivíduos controles utilizando o software Graph Pad Prism 7.0. Os valores inferiores  $P < 0,05$  foram considerados significativos.



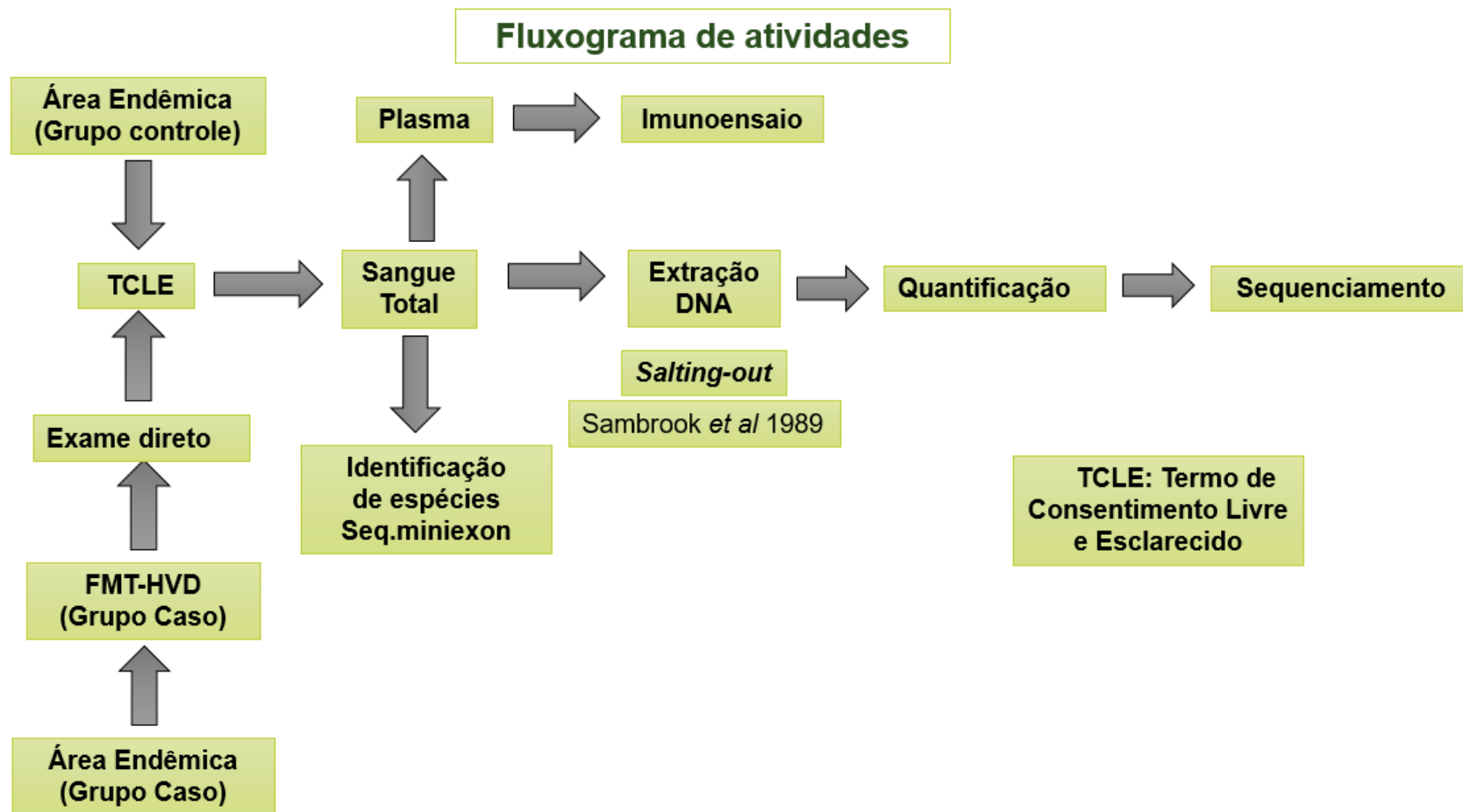


Figure 8: Fluxograma de atividades do trabalho, locais onde foram realizadas as atividades e métodos utilizados

## **5.RESULTADOS**

### **5.1 Característica da População Estudada**

Neste estudo foram recrutados 1.544 indivíduos, 778 pacientes confirmados por exame direto e 766 indivíduos controles sem sinal ou histórico de leishmaniose. Entre os 778 pacientes, 59,9% são do sexo masculino e 40,03% do sexo feminino. Dos 766 indivíduos grupo controle, 49,61% são do sexo masculino e 50,39% são de sexo feminino.

A população recrutada é proveniente da estrada AM-010 e seus ramais e BR-174 onde na região do Pau Rosa teve maior enfoque de casos.

### **5.2 Frequência Alélica e Genotípica, EHW, OR para rs2234237**

Para avaliar o SNP rs2234237 A/T (Ser25Tre), a frequência alélica e genotípica foi verificada por contagem direta. As frequências alélicas e genotípicas não apresentaram desvio para Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois grupos. Não houve diferença de frequência entre os grupos. As comparações feitas por Odds Ratio (OR) e sua significância estão apresentados na Tabela 2. Nossos resultados mostram que não houve associação entre os alelos do polimorfismo no gene *TREMI* à LC causada por *L. guyanensis*.

### **5.3 Dosagem de Citocinas**

As concentrações das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  do plasma mensuradas em 374 controles saudáveis foram comparadas aos genótipos dos indivíduos.

<b>Frequência dos Genótipos e Alelos</b>		
<b>Genótipos</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b><i>TREMI</i> A/T</b>	<i>n</i> =778	<i>n</i> =766
<b>AA</b>	569 (73%)	535 (70%)
<b>AT</b>	193 (25%)	215 (27%)
<b>TT</b>	16 (2%)	16 (3%)
<b>Alelos</b>		
<b>A</b>	666 (86%)	643 (84%)
<b>T</b>	113 (14%)	124 (16%)
<b>Comparação de Alelos e Genótipos</b>		
<b>Caso vs Controle</b>	<b>Valor <i>P</i></b>	<b>OR [95% IC]</b>
<b>AA vs TT</b>	0.86	0.9[0.4-1.8]
<b>AA vs AT+TT</b>	0.15	0.8[0.6-1.0]
<b>AA vs AT</b>	0.14	0.8[0.6-1.0]
<b>A vs T</b>	0.19	0.8[0.7-1.0]

Tabela 2: Frequência e comparações de alelos e genótipos dos grupos casos e controles. Foi utilizado o software GraphPad Prism v7.0. OR= odds ratio, IC=intervalo de confiança, *n* = número total de indivíduos analisados (*P* <0,05).

O SNP rs2234237 (A/T) não apresentou nenhum efeito nas concentrações citocinas dosadas. As relações entre genótipos e concentrações de citocinas são mostradas através dos gráficos na figura 9.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, nós investigamos o papel do polimorfismo rs2234237 (A/T) presente no gene *TREMI*. Este polimorfismo não-sinônimo (Ser25Tre) está localizado no éxon 2, região genômica que codifica o domínio de interação do receptor ao ligante implicando em uma possível alteração na sua função biológica.

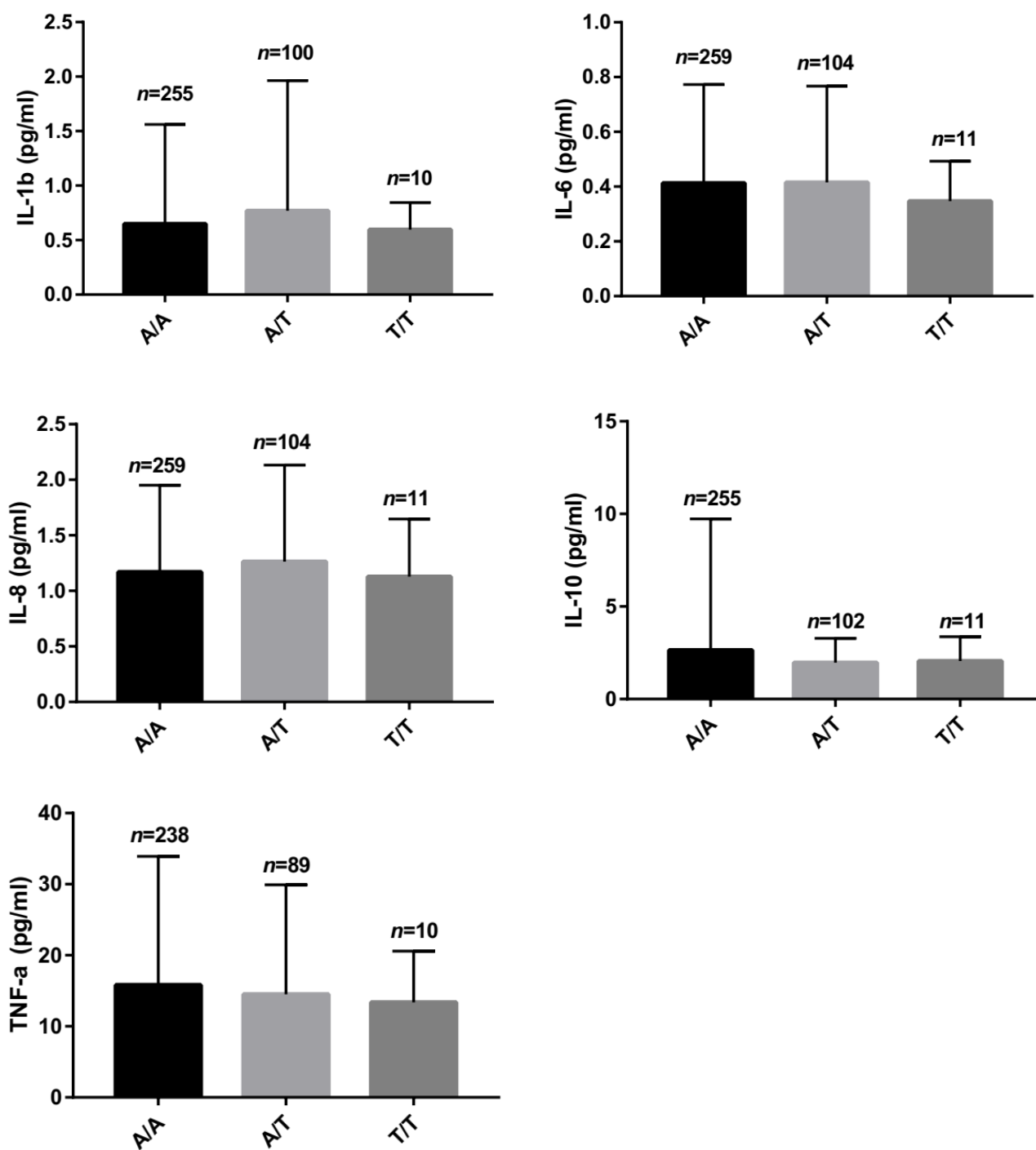


Figure 9: Concentrações de citocinas do plasma de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL10 e TNF- $\alpha$  entre os três genótipos (A/A, A/T e T/T) de indivíduos saudáveis. Foi utilizado o teste ANOVA-não paramétrico através do software GraphPad Prims v 7.0.

Muitos polimorfismos presentes no gene *TREMI* foram associados a diferentes tipos de doenças infecciosas e inflamatórias. Em doenças intestinais como a doença de Behcet, os polimorfismos rs9471535(C/T) e rs3789205 (C/T) além do rs2234237 (A/T) investigado neste estudo, foram associados com o aumento do risco do desenvolvimento da doença (JUNG et al., 2011).

O engajamento de TREM-1 é um potencial indutor inflamatório para sepse. Os alelos do rs2234237 (A/T) também foram associados ao prognóstico de sepse nos três modelos de herança, dominante, codominante e recessivo (SU et al., 2012). Em pacientes com ferimentos de queimadura ou de inalação, a variante rs2234237 (A/T) foi responsável por aumentar mais de três vezes o risco para pneumonia causada por ventilação mecânica (RIVERA-CHÁVEZ et al., 2013). Também com malária severa em crianças e relacionado a uma maior concentração de sTREM-1 no plasma o polimorfismo rs2234237 (A/T) foi associado, apesar deste estudo não apresentar tamanho amostral adequado para estudos genéticos (ADUKPO et al., 2016). O genótipo A/A foi associado com a elevação do risco a doença coronária em um estudo realizado na população russa (GOLOVKIN et al., 2014). Em contrapartida, não foi encontrada associação entre o polimorfismo rs2234237 A/T em sepse, choque séptico e endocardite infecciosa (CHEN et al., 2008; GOLOVKIN et al., 2015; PENG et al., 2015). Mas o genótipo AA do polimorfismo rs2234246 (A/G) mostrou ter efeito no aumento de IL-6 no plasma em pacientes. A concentração de IL-6 foi maior no grupo de não sobreviventes em choque séptico (PENG et al., 2015). O alelo T do polimorfismo rs2234246 de *TREMI* foi associado ao aumento de sTREM-1, L-selectina, expressão de mRNA, contribuindo com a hipótese de que TREM-1 leva ao extravasamento de monócitos e conseqüentemente ao aumento do progresso da aterosclerose (ALDASORO ARGUINANO et al., 2017).

A leishmaniose cutânea é uma doença tropical, infecciosa e crônica considerada um problema de saúde pública em várias partes do mundo. A LC é a forma mais comum das

leishmanioses e afeta vários estados do Brasil. Neste estudo, mostramos que polimorfismo rs2234237 (A/T) não está associado com a susceptibilidade ou proteção a LC causada por *L. guyanensis* e os genótipos não apresentaram efeitos sobre as concentrações das citocinas presente no plasma. Porém, são necessários mais estudos para identificar outros polimorfismos que possam estar envolvidos com proteção ou suscetibilidade à LC causada por *L. guyanensis* no gene *TREMI*, a fim de elucidar o papel de variantes genéticas frente a infecções por *L. guyanensis*.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL ; LICHTMAN, A. Cellular and Molecular Immunology. 2012.

ADUKPO, S. et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) and cytokine gene variants in complicated and uncomplicated malaria. **Tropical Medicine & International Health**, v. 21, n. 12, p. 1592–1601, 2016.

ALDASORO ARGUINANO, A. A. et al. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–16, 2017.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: Advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699–705, 2010.

ARTS, R. J. W. et al. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 209–215, 2013.

BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 839–849, 2007.

BENÍCIO, E. et al. Sustained presence of cutaneous leishmaniasis in urban Manaus, the largest human settlement in the Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1208–1213, 2015.

BENICIO, E. DE A. et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1141–1144, 2011.

BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, 2010.

BOUCHON, A. et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. **Nature**, n. March, p. 4–8, 2001a.

BOUCHON, A. et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic

shock. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1103–1107, 2001b.

BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 4991–4995, 2000.

BOURREAU, E. et al. Unresponsiveness of Specific T Cells to IL-12 is Associated with Active Cutaneous Leishmaniasis Owing to *Leishmania guyanensis*. **Scandinavian Journal of immunology**, v. 54, n. 3, p. 335–339, 2001.

BOURREAU, E. et al. Th2 Responses Predominate during the Early Phases of Infection in Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis and Precede the Development of Th1 Responses Th2 Responses Predominate during the Early Phases of Infection in Patients with Localized Cutane. v. 71, n. 4, p. 3–6, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos de leishmaniose tegumentar, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2015. p. 2015, 2015.

CABRERA, M. et al. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. November, 1995.

CARREGARO, V. et al. Nucleosides Present on Phlebotomine Saliva Induce Immunossuppression and Promote the Infection Establishment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–21, 2015.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.

CASTELLUCCI, L. et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **J Infect Dis**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 2006.

CHEN, Q. et al. Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. **Human Immunology**, v. 69, n. 3, p. 220–226, 2008.

CONNOR, L. M. et al. Th2 responses are primed by skin dendritic cells with distinct transcriptional profiles. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 1, p. 125–142, 2017.



CUENTAS, E. A. L. et al. POSSIBLE RISK FACTORS IN DEVELOPMENT OF MUCOSAL LESIONS IN LEISHMANIASIS. **The Lancet**, v. 324, n. 8397, p. 295, 4 ago. 1984.

DE ARAUJO, F. J. et al. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. **Genes and Immunity**, v. 16, n. 4, p. 284–288, 2015a.

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

DE SOUZA CARMO, É. V.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DÍAZ, N. L. et al. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 1, p. 114–117, 2006.

DYER, D. P. et al. TSG-6 Inhibits Neutrophil Migration via Direct Interaction with the Chemokine CXCL8. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 2177–2185, 2014.

EHRlich, A. et al. The Immunotherapeutic Role of Regulatory T Cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 2961–2970, 2014.

FELIZARDO, T. C. et al. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on Leishmania amazonensis dorsal skin - than on footpad-infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 48–57, 2012.

GIRAUD, E. et al. **Leishmania proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling.** [s.l: s.n.]. v. 14

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. **Immunoregulation in human American leishmaniasis: Balancing pathology and protection** **Parasite Immunology**, 2014.

GOLOVKIN, A. S. et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. **Gene**, v. 550, n. 1, p. 101–109, 2014.

GOLOVKIN, A. S. et al. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. **Cytokine**, v. 71, n. 1, p. 16–21, 2015.

GOMES, R. et al. Immunity to *Lutzomyia whitmani* Saliva Protects against Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 2016.

GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 2011.

GONZALEZ-LEAL, I. J. et al. Cathepsin B in Antigen-Presenting Cells Controls Mediators of the Th1 Immune Response during *Leishmania major* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.

HOMMES, T. J. et al. Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1/3 in klebsiella-derived pneumosepsis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 647–655, 2015.

JACKSON, T. S. et al. Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. H924-30, 1996.

JI, J. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during

Leishmania amazonensis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7147–7153, 2005.

JUNG, E. S. et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and inflammatory bowel diseases in the Korean population. **Life Sciences**, v. 89, n. 9–10, p. 289–294, 2011.

KARIMKHANI, C. et al. Global burden of cutaneous leishmaniasis: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 584–591, 2016.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KOPF, B. M. et al. IL-4-deficient Balb/c Mice Resist Infection with Leishmania major. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. September, 1996.

KOSTKA, S. L. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 2010.

KOZIK, J.-H. et al. Attenuated viral hepatitis in Trem1<sup>-/-</sup> mice is associated with reduced inflammatory activity of neutrophils. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28556, 2016.

KUTIKHIN, A. G. et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. **Meta Gene**, v. 9, p. 76–89, 2016.

LAGLER, H. et al. TREM-1 Activation Alters the Dynamics of Pulmonary IRAK-M Expression In Vivo and Improves Host Defense during Pneumococcal Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2027–2036, 2009.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519–531, 2007.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-

arginine. **Immunology**, v. 71, n. 4, p. 556–559, 1990.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, 2013.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 1994.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MCGEACHY, M. J. et al. TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 2007.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445–453, 2008.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11<sup>o</sup> ed. [s.l.: s.n.].

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 2009.

PEDRAZA-ZAMORA, C. P. et al. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. **Parasite Immunology**, 2017.

PENG, L. et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and septic shock in a Chinese Han population. **World Journal of Emergency Medicine**, v. 6, n. 1, p. 54–59, 2015.

PRÜFER, S. et al. Distinct signaling cascades of TREM-1, TLR and NLR in neutrophils and monocytic cells. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 3, p. 339–352, 2014.

READ, C. B. et al. Cutting Edge: Identification of Neutrophil PGLYRP1 as a Ligand for TREM-1. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 4, p. 1417–1421, 2015.

REINHARDT, R. L.; LIANG, H. E.; LOCKSLEY, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. **Nature Immunology**, v. 10, n. 4, p. 385–393, 2009.

RIVERA-CHÁVEZ, F. A. et al. A TREM-1 Polymorphism A/T within the Exon 2 Is Associated with Pneumonia in Burn-Injured Patients. **ISRN inflammation**, v. 2013, p. 431739, 2013.

RONET, C. et al. Regulatory B Cells Shape the Development of Th2 Immune Responses in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major* Through IL-10 Production. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 886–894, 2010.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SALHI, A. et al. Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6139–6148, 2008.

SANTOS, C. D. S. et al. CD8+granzyme B+-mediated tissue injury vs. CD4+IFN $\gamma$ + mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–1540, 2013.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255–258, 1993.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

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

SU, L. et al. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. **Inflammation**, v. 35, n. 6, p. 1833–1843, 2012.

SVENSJÖ, E. et al. Maxadilan, the *Lutzomyia longipalpis* vasodilator, drives plasma leakage via PAC1-CXCR1/2-pathway. **Microvascular Research**, v. 83, n. 2, p. 185–193, 2012.

SZABO, S. J. et al. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 5, p. 817–24, 1997.

WEBER, B. et al. TREM-1 Deficiency Can Attenuate Disease Severity without Affecting Pathogen Clearance. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, 2014.

WILHELM, P. et al. Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4012–4019, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly Epidemiological Record**, v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017.

WU, M. et al. TREM-1 amplifies corneal inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection by modulating toll-like receptor signaling and Th1/Th2-type immune responses. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2709–2716, 2011.

YUAN, Z. et al. HIV-related proteins prolong macrophage survival through induction of Triggering receptor expressed on myeloid cells-1. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–10, 2017.

ZHONG, J. et al. Inhibition of TREM-1 and dectin-1 alleviates the severity of fungal keratitis by modulating innate immune responses. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2016.

## **8. AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela força sem a qual não teria chegado até aqui e passados os momentos difíceis da vida.

Aos meus pais, Senhor José do Espírito Santo e Senhora Djanira Leal das Neves, por me darem seu incansável amor, atenção, carinho e o grande apoio nesta importante etapa.

Agradeço ao Professor e Doutor Rajendranath Ramasawmy, por confiar na minha capacidade e habilidade, e pela paciência, incentivo, suportes e ensino recebidos ao longo deste trabalho.

Aos caros colegas de trabalho do laboratório LPDE da Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Nayene Silveira, Rayane Belmiro, George Silva, Hector Graterol, Felipe Jules, Lener Santos, João Neto, Thaís Lacerda, Tirza Mesquita, Josué Lacerda.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Edson Brazão e Ana Paula de Araújo, por sempre estarem disponíveis para ajudar.

À Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), pelo suporte a pesquisa e o local para realização dos experimentos.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao PPGIBA e todo o seu corpo docente pelo conhecimento transmitido que levarei para toda vida.

À FAPEAM pelo financiamento e abolsa que possibilitou este projeto.

## 9. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E NA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES EM PCACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UMA POPULAÇÃO CASO-CONTROLE DE MANAUS, AMAZONAS

**Pesquisador:** RAJENDRANATH RAMASAWMY

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.  
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 09995212.0.0000.0005

**Instituição Proponente:** Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

**Patrocinador Principal:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 289.683

**Data da Relatoria:** 24/05/2013

#### Apresentação do Projeto:

Este é um estudo genético/epidemiológico quantitativo, transversal, de ciência básica, que utilizará ferramentas de análise genética para avançar na dissecação do componente genético de controle da susceptibilidade do hospedeiro à LTA causada pela espécie *Leishmania guyanensis*. Brevemente, análise de associação caso-controle será aplicada, a fim de se detectar distribuição distinta das frequências alélicas e genotípicas entre grupos de casos e controles não afetados pela doença, recrutados de forma prospectiva, o que indicaria envolvimento do gene investigado no controle da susceptibilidade à doença.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avançar no entendimento da complexa natureza do controle molecular da susceptibilidade e a cura da lesão do ser humano à LTA. Para isso, nós aplicaremos técnicas de análise genética de associação baseada em populações, na investigação de locus candidato ao controle da susceptibilidade à doença em uma população brasileira.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br



FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 280.683

**Objetivo Secundário:**

- Descrever, clinicamente e epidemiologicamente, uma amostra populacional de indivíduos afetados por LTA, recrutados na FMT-HVD, Manaus, adequada para estudos de análise genética da susceptibilidade do hospedeiro a fenótipos da leishmaniose;
- Descrever uma população sem sinal ou histórico de leishmaniose, recrutada na mesma região geográfica que o grupo de casos e pareada para idade, gênero e etnia, para compor o grupo controle;
- Genotipar marcadores dos genes citados acima nos indivíduos de ambos os grupos de casos e controles, a fim de se estabelecer as frequências alélicas e genotípicas em cada grupo;
- Dosar as citocinas em amostras de sangue dos pacientes com LC antes e após o tratamento com miltefosina;
- Aplicar análise de associação baseada em populações a fim de buscar evidências da participação de variantes dos genes envolvidos no controle da suscetibilidade do hospedeiro à doença;
- Comparar os genótipos dos genes estudados e a concentração das citocinas com o tempo de cura.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

- Os riscos de participação dos voluntários de pesquisa neste estudo são aceitáveis levando-se em consideração os eventos adversos (EAs) já descritos em inúmeros ensaios clínicos que utilizaram a Miltefosina no tratamento da Leishmaniose Visceral e da Leishmaniose Tegumentar. Os riscos físicos para a saúde de participação neste estudo são muito pequenos e limitados ao procedimento de biópsia e coleta de sangue, ambos de rotina nos laboratórios clínicos. Em ambos os casos, você poderá sentir um desconforto temporário devido a introdução da agulha. Tanto a biópsia quanto a coleta de sangue poderá resultar em uma pequena lesão que quase sempre cura-se sozinha. Em raros casos, pode ocorrer infecção localizada.

**Benefícios:**

- Possivelmente os resultados deste estudo, contribuirão para a incorporação da miltefosina como medicamento a ser recomendado pelo MS no tratamento da leishmaniose cutânea. A longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência à leishmaniose e seu tratamento, tomando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289,683

com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela leishmaniose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é de grande relevância pois pretende elucidar a susceptibilidade do ser humano a fenótipos da leishmaniose. Pretende verificar o papel de genes envolvidos no sistema imune e na cura de lesão sobre o controle da suscetibilidade do hospedeiro a doenças infecciosas causadas por diferentes parasitas intracelulares. O Pesquisador crê que variantes dos genes possam estar envolvidos no controle da suscetibilidade do ser humano e a cura da lesão a leishmaniose cutânea causada pela *L. guyanensis* em uma população recrutada no município de Manaus.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O protocolo contém os itens fundamentais para ser avaliado pelo CEP descritas na Resolução 196/96, item VI - Protocolo de Pesquisa.

**Recomendações:**

Adequar o projeto e TCLE conforme as pendências relatadas a seguir.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Folha de rosto:

1- Falta preenchimentos dos itens: 10 (Outro Telefone), 12 (cargo), 16 (telefone), 17 (outro telefone). Todos os itens da folha de rosto devem ser preenchidos, se houver dificuldade em preencher devido inconsistências do sistema, sugerimos imprimir, preencher a mão, escanear e posteriormente anexar à Plataforma Brasil para análise por este CEP.

Resposta do pesquisador: Os campos foram preenchidos e a nova Folha de Rosto foi anexada.

Conclusão do relator: Pendência atendida.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:**

Após análise do TCLE observa-se houve adequação de algumas pendências, porém outras ainda carecem de maior esclarecimento, segundo o relatado abaixo:

a) Observa-se discrepância nos métodos descritos no modelo de projeto da plataforma Brasil e o TCLE, pois no projeto esta descrito a retirada de 5 ml de sangue e no TCLE esse volume é de 10ml.

Resposta do pesquisador: Os itens foram corrigidos.

Parecer do relator: Identificado no TCLE a referencia de coleta de 5ml de sangue. Pendência atendida

b) Descrever o procedimento, riscos e desconfortos da biópsia de pele esclarecendo como será

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

feito o exame.

Resposta do pesquisador: Os itens foram corrigidos.

Parecer do relator: O TCLE informa o desconforto, sangramento e infecção, além de quebra da confidencialidade, informando como será realizado os exames, bem as medidas para minimizar os riscos.

Pendência atendida.

c) No tópico local do estudo, não está clara a procedência do grupo controle e o TCLE nem menciona o recrutamento do grupo controle.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido no TCLE - métodos.

Parecer do relator: Pendência atendida.

d) No tópico permissão para estocagem, adicionar após a palavra estocagem os termos guarda ou armazenamento, a fim de facilitar a compreensão do sujeito da pesquisa.

Resposta do pesquisador: Foi realizado a mudança conforme solicitado pelo relator. Anexado a permissão de estocagem.

Parecer do relator: Pendência atendida.

e) No tópico riscos para a saúde/desconforto esclarecer quais seriam os desconfortos que o paciente pode sentir (dor, sangramento, roxo, inchaço no local e até infecção no local). Relatando ainda que existe o risco de perda da confidencialidade e que mecanismos o projeto pretende adotar para minimiza-los. Este tópico foi abordado no item 10 confidencialidade dos dados, mas merece a menção pois essa perda de confidencialidade também representa risco ao indivíduo.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido no TCLE.

Parecer do relator: O TCLE informa o desconforto, sangramento e infecção, além de quebra da confidencialidade, informando como será realizado os exames, bem as medidas para minimizar os riscos.

Pendência atendida.

f) Dentro das atribuições previstas no item VIII.4.c.8 da resolução 196/96, cabe a CONEP, após aprovação do CEP institucional, apreciar as pesquisas enquadradas nessa área temática.

Resposta do pesquisador: De acordo com a revisão da Resolução 446/2011, este protocolo não se inclui mais em área temática especial e, portanto, não deve ser encaminhado a CONEP: Seção VII das competências da comissão - IV - Analisar e emitir parecer, no prazo de 60 dias, e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais em genética humana sempre que o

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

projeto envolver: 1) envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético; 2) armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais; 3) alterações da estrutura genética de células humanas para utilização in vivo; 4) pesquisas na área de genética da reprodução humana (reprogenética); 5) pesquisa em genética do comportamento e 6) pesquisas em que esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos sujeitos da pesquisa. Parecer do relator: A resolução citada trata da reestruturação da comissão da CONEP, contudo a descrição se refere a resolução 340/04. VI.3. O projeto não preenche nenhum desses critérios. Pendência atendida.

Detalhar na metodologia e no TCLE:

a) No tópico critério de inclusão, não há referência sobre o grupo controle.

Resposta do pesquisador: Foi detalhado tanto na metodologia (projeto de pesquisa quanto no TCLE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

b) No tópico critério de exclusão está mencionando "crianças que não conseguem ingerir as cápsulas". Isso deixa dúvidas com relação a faixa etária de 4 a 65 anos, pois crianças de 4 anos não ingerem capsulas. Sugiro rever a faixa etária com base nesse critério de exclusão.

Resposta do pesquisador: Como sugerido pelo relator, foi corrigido no projeto - critério de inclusão "10 a 65 anos".

Parecer do relator: Pendência atendida.

c) No tópico riscos, volto a reforçar a necessidade de descrever os riscos, que não podem ser considerados pequenos, pois além dos riscos resultantes dos procedimentos, há o risco de perda da confidencialidade.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido tanto no projeto como no TCLE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

d) Ajustar cronograma para início do projeto após aprovação em comitê de ética, pois segundo o cronograma existente o recrutamento de pacientes iniciou em 03/12/12.

Resposta do pesquisador: O cronograma foi corrigido tanto no projeto anexo pelo pesquisador

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 280.683

quanto na Plataforma Brasil.

Parecer do relator: Pendência atendida.

e) Solicitar a permissão para estocagem do material biológico: CNS Resolução 441/2011.

Resposta do pesquisador: Foi anexado ao protocolo o formulário padrão de armazenamento de material biológico, assinado pelo diretor da DEMPE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Considerando o feriado de 30/05/13 e o decreto de ponto facultativo em 31/05/13 que implicou em suspensão da reunião ordinária deste CEP, o coordenador-1 acata ad referendum o parecer da relatora, considerando que o interessado atendeu a todas as pendências apontadas.

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 196/96 de 10 de outubro de 1996, item IX.2, "c", utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 31 de Maio de 2013

Assinador por:

Maria Paula Gomes Mourão  
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br