



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DO POLIMORFISMO -670 E DA EXPRESSÃO DO GENE
FAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA: POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO
COM DADOS CLÍNICOS**

GILVANÉIA SILVA SANTOS

**Salvador - Bahia - Brasil
2004**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DO POLIMORFISMO -670 E DA EXPRESSÃO DO GENE
FAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA : POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO
COM DADOS CLÍNICOS**

GILVANÉIA SILVA SANTOS

Orientador: JOHAN VAN WEYENBERGH

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental

Salvador - Bahia – Brasil

2004



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Santos, Gilvaneia Silva
S237e Estudo do polimorfismo-670 e da expressão do gene Fas na Leishmaniose
cutânea: possível associação com dados clínicos. [manuscrito]. /
Gilvanéia Silva Santos. - 2004.
71 f. : il. ; 29 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de
Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

Orientador: Johan Van Weyenbergh.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Apoptose. 3. Polimorfismo. I. Título.

CDU 616.928.5:575

11.02.2005
S237e

14
ADW/1010
60/1000

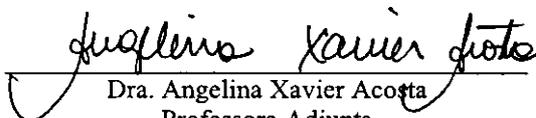
11.02.05

ESTUDO DO POLIMORFISMO -670 E DA EXPRESSÃO DO GENE FAS NA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA LOCALIZADA: POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS

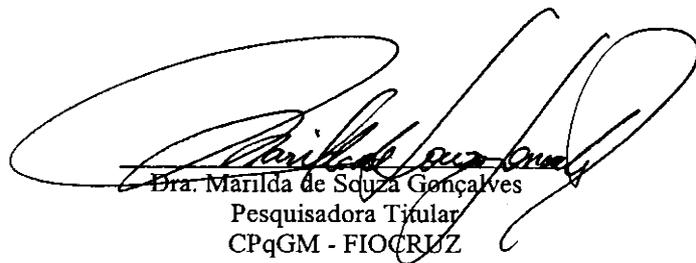
GILVANÉIA SILVA SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Angelina Xavier Acosta
Professora Adjunta
FAMED - UFBA



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Johan Van Weyenbergh
Pesquisador Associado
CPqGM - FIOCRUZ

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	16
1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	17
1.3.1 Leishmaniose Cutânea	18
1.3.2 Leishmaniose Cutâneo-mucosa	18
1.3.3 Leishmaniose Cutânea Disseminada	18
1.4 Imunologia da Leishmaniose	19
2 APOPTOSE	21
2.1 LEISHMANIOSE E APOPTOSE	23
2.2 POLIMORFISMO DO GENE FAS	24
2.3 POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE HUMANA	26
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS	30
5 CASUÍSTICA	31
6 MÉTODOS	
6.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	32

6.2	DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS.....	32
6.3	SEPARAÇÃO DE PBMC.....	33
6.4	EXTRAÇÃO DO DNA.....	34
6.5	GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO GENE FAS.....	34
6.6	ANÁLISE E DIGESTÃO DOS PRODUTOS DO PCR.....	35
6.7	PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	37
6.8	CITOMETRIA DE FLUXO.....	37
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	38
7	RESULTADOS.....	42
8	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS.....	53
9	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A Gel de poliacrilamida ilustrando o polimorfismo -670 da região promotora do gene Apo-1/Fas..... 36
- Figura 1B Representação esquemática do mapa de restrição do gene APO-1/Fas ilustrando os dois sitios para a enzima *Mva*I (-858 e -670) e os possíveis fragmentos gerados em função dos genótipos. 36
- Figura 2 Expressão de Fas (CD95) na superfície de linfócitos e monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea oriundos das áreas endêmicas de Jequiê-Jiquiriçá Bahia e controles normais. 51
- Figura 3 Correlação entre o tempo de doença e expressão de Fas (CD95) na superfície de monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea oriundos das áreas endêmicas de Jequiê-Jiquiriçá Bahia..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas e demográficas dos pacientes com leishmaniose cutânea oriundos das áreas endêmicas de Jequié- Jiquiriçá, Bahia.....	39
Tabela 2	Tabela de anticorpos utilizados para marcação de moléculas de superfície celular em PBMC de pacientes com LC e doadores normais.....	41
Tabela 3	Características clínicas e demográficas dos pacientes com LC oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia.....	43
Tabela 4	Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo -670 da região promotora do gene APO-1/Fas em pacientes com LC oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia e Doadores normais.....	45
Tabela 5	Correlação entre linfadenopatia e diferentes genótipos do polimorfismo - 670 do gene Fas em pacientes com leishmaniose cutânea oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia	46
Tabela 6	Associação entre os dados clínicos (Médias e desvios) e os diferentes genótipos do polimorfismo -670 do gene APO-1/Fas em pacientes com LC oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia.....	49

"Depois de muito meditar, cheguei a uma conclusão, de que um ser humano que estabeleceu um propósito deve cumpri-lo, e que nada pode resistir a um desejo, a uma vontade, mesmo quando para sua realização seja necessária uma existência inteira".

Benjamim Disraeli

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, que foram meu porto-seguro para onde eu guiava meu barco em meio à tempestade, encontrando neles apoio, incentivo, amor e paz.

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Johan Van Weyenberg, não apenas pela orientação, mas por seu exemplo de dedicação, doação, dignidade pessoal e, sobretudo, de amor pelo que faz.

A Dra. Lourdes Farré Vallvé, minha co-orientadora e amiga, por dedicar seu tempo e sua experiência para que minha formação fosse também um aprendizado de vida.

Aos chefes dos laboratórios LIM1 e LIP, Dr. Manoel Barrai e Dra. Aldina Barrai, por terem me concedido todas as condições necessárias para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Jackson Costa e equipe da área endêmica pela colaboração e fornecimento das amostras dos pacientes com leishmaniose.

À Dra. Marilda Gonçalves e José Pereira Neto, pelo apoio e colaboração no seqüenciamento das amostras.

A George Soares (Geo), sem o qual teria sido impossível realizar esse trabalho. Obrigada meu amigo pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos e pelo companheirismo!

À Gisélia Santana (Gigi), pela sinceridade de sua amizade desde que cheguei em Salvador.

À Aline Báfica, minha amiga e companheira em todos os momentos, desde experimentos na bancada até longas conversas durante as madrugadas.

À Adriana Almeida (Drica), pelo apoio e colaboração sempre no processamento das amostras.

À Cláudio Paulo, por sua disponibilidade sempre em ajudar, em toda e qualquer circunstância.

Aos colegas da pós-graduação, pelo convívio e amizade conquistados nesses anos.

Aos colegas dos laboratórios LIM1 e LIP, pelo convívio constante e companheirismo.

Aos amigos especiais, Ricardo Khouri, Daniele Decanine, Theolis Barbosa, Jânia Teixeira, Jorge Tolentino, Jorge Clarêncio, Clarissa Romero, Regis Gomes, Claire Silva, Raffaele Imbroinise e Vera Vinhas, por compartilharem momentos bons e difíceis durante a realização desse trabalho.

À Rosália Meire e Ilmara pela atenção e carinho incondicionais.

À Bibliotecária Ana Maria Fiscina, pelo apoio na aquisição dos artigos e pela ajuda na formatação da dissertação.

Ao curso de Pós-graduação e aos professores pela dedicação.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, que concedeu todo o suporte físico e pessoal necessário à elaboração desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Cluster of differentiation
DNA	Ácido desoxirribonucléico
IDRM	Teste de Intradermorreação de Montenegro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Mucocutânea
LD	Leishmaniose Difusa
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
MMII	Membros Inferiores
MMSS	Membros Superiores
NF-κB	Fator de Transcrição κ B
NO	Óxido Nítrico
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
SBV	Antimônio Pentavalente
STAT	Signal Transducer and Activation of Transcription
Th	Célula T auxiliar
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

ESTUDO DO POLIMORFISMO -670 E DA EXPRESSÃO DO GENE FAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA: POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS.
GILVANÉIA SILVA SANTOS. A expressão de Fas/FasL tem sido descrita como crucial para resistência à infecção por *Leishmania*, independente de uma resposta Th1, no modelo murino. Visto que esses dados na leishmaniose humana são ausentes, nós quantificamos a expressão de Fas (CD95) ex vivo em PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e investigamos o polimorfismo -670 da região promotora do gene Apo-1/Fas por PCR-RFLP. Foram realizadas marcações com anti-CD95 e marcadores de linhagens (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, 16b, CD56 e CD49d) em PBMC separados pelo gradiente de densidade e análise por citometria de fluxo. Quarenta pacientes com leishmaniose cutânea localizada (oriundos da área endêmica de Jequié e Jequiçá-Ba) foram incluídos após consentimento livre e esclarecido. Os resultados foram comparados com um grupo de 27 controles urbanos saudáveis e correlacionados com dados clínicos e demográficos (idade, IDRM, sorologia, tamanho de lesão, tempo da doença). As análises do polimorfismo na posição -670 do gene Fas demonstraram que o genótipo GG foi o mais freqüente entre os pacientes com LCL (45%), com 35% e 20% de GA e AA, respectivamente. Em controles normais, a freqüência dos genótipos GA, AA e GG foram 51,9%, 18,5% e 29,6%, respectivamente. A expressão de Fas em PBMC, dos pacientes comparados com os controles, foi aumentada em linfócitos e monócitos, mas um maior aumento foi observado em monócitos. A expressão de Fas em monócitos correlacionou negativamente ($p=0,03$, $r=-0,53$) com duração da doença. Nenhuma correlação foi observada entre a expressão de Fas e resposta imune humoral (IgG anti-*Leishmania*) ou celular (IDRM), sugerindo que a expressão de Fas e/ou apoptose poderia ser um terceiro parâmetro imune independente modificando a evolução da doença.

Palavras chave: Leishmaniose Cutânea, Apoptose, Polimorfismo.

ABSTRACT

EXPRESSION AND -670 POLYMORPHISM OF FAS GENE IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: POSSIBLE ASSOCIATION WITH CLINICAL DATA.

GILVANÉIA SILVA SANTOS. Fas/FasL expression has been shown to be crucial to resistance to *Leishmania* infection, independent of a Th1 immune response, in the murine model. Since data in human leishmaniasis are lacking, we quantified ex vivo Fas (CD95) expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with localized cutaneous leishmaniasis and we investigated the promoter -670 polymorphism in the Apo-1/Fas gene by PCR-RFLP. Staining with anti-CD95 and lineage markers (CD3, CD4, CD14, CD16, CD16b, CD19, CD56 and CD49d) was performed on density gradient-separated PBMC and analysis by flow cytometry. Forty patients with localized cutaneous leishmaniasis (from endemic area of Jequié and Jequiçá-BA) were included after informed consent was obtained. Results were compared to a group of 27 healthy urban controls and correlated to clinical and demographic data (age, DTH, serology, lesion size, disease duration). Analyses showed that the Fas-GG (-670 polymorphism) genotype was the most frequent in patients with CL (45%), whereas 35,0% and 20,0% displayed GA and AA genotypes, respectively. In normal controls, the GA, AA and GG frequencies were 51,9%, 18,5% and 29,6%, respectively. Fas expression in patients, compared to controls, was increased in lymphocytes and monocytes, but the strongest increase was observed in monocytes. Monocyte Fas expression was negatively correlated ($p=0.03$, $r=-0.53$) to disease duration. No correlation was observed, however, with cellular (DTH) or humoral (anti-*Leishmania* IgG) immune response, indicating that Fas expression, and possibly apoptosis, might be a third, independent, disease-modifying immune parameter.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, Apoptosis, Polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma zoonose predominante em países tropicais e subtropicais. A doença ameaça 350 milhões de indivíduos que vivem em áreas de risco em 88 países ao redor do mundo. A Organização Mundial de Saúde estima um total de 2 milhões de casos novos de leishmaniose a cada ano, dos quais, apenas 600 mil são oficialmente notificados (WHO, on line, 2002).

A leishmaniose é causada por protozoários unicelulares do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae* ordem Kinetoplastida. Estes apresentam duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no trato digestivo do inseto vetor, e outra amastigota, sem flagelo livre, parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (NEVES, 1997).

O modo de transmissão habitual da doença é através da picada de insetos que podem pertencer a diversas espécies de flebotomíneos, dos gêneros *Psychodopygus* ou *Lutzomya* (COSTA et al., 2000). Ao exercer o hematofagismo, a fêmea do flebotomíneo com suas mandíbulas lesa o tecido subcutâneo, logo abaixo da epiderme, formando um afluxo de sangue, onde são inoculadas as formas promastigotas metacíclicas (NEVES, 1997).

A variedade de respostas existente no curso da leishmaniose depende da espécie de *Leishmania* envolvida e de características genéticas e imunológicas do hospedeiro. Diferentes formas clínicas da doença têm sido descritas,

compreendendo dois grupos principais: Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar (LAISON et al., 1978, BARRAL et al., 1991).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)

A LV é considerada como uma doença esporádica, com exceção das epidemias que têm ocorrido na Índia e Leste da África (PERSON & SOUZA, 1990). A doença pode ser causada pelos parasitas *Leishmania chagasi*, *L. amazoensis*, *L. donovani* e *L. infantum*. Essa forma da leishmaniose é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda significativa de peso, hepatoesplenomegalia, disenteria e anemia.

A incidência anual da LV varia em diferentes regiões entre 1 a 10 casos por 1000 habitantes, com flutuações sazonais e anuais (BADARÓ et al., 1986). A transmissão da doença depende da presença de um reservatório adequado de infecção e da susceptibilidade da população. Os pacientes com LV apresentam uma marcante ativação policlonal de células B, com abundante produção de anticorpos, os quais parecem não participar da recuperação ou da resistência contra a leishmaniose. Durante a fase aguda da LV, os pacientes não exibem uma reação de IDRM positiva, e a conversão para uma resposta positiva é indicativo de sucesso terapêutico. Uma resposta IDRM positiva está diretamente correlacionada com resistência à futura doença (BARRAL-NETTO & BITTENCOURT 1995).

1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A LTA é considerada a sexta endemia mais importante do mundo (WHO, on line, 2003). No Brasil, esta zoonose encontra-se em franca expansão geográfica, sendo uma das infecções dermatológicas mais importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e seqüelas que pode acarretar. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país (CENEPI, 1999). A doença vem ocorrendo de forma endêmico-epidêmica apresentando diferentes padrões de transmissão, relacionados não somente à penetração do homem em focos silvestres, freqüentemente em áreas de expansão de fronteiras agrícolas. Tem-se evidenciado a ocorrência da doença em áreas de colonização antiga. Nestas, tem-se discutido a possível adaptação dos vetores e parasitas a ambientes modificados e reservatórios (FUNASA, on line, 2003).

No estado da Bahia existem registros de casos de LTA desde o início da colonização (COSTA, 1986). O Estado tem sido confirmado como um dos líderes no número de registros de casos juntamente com o Maranhão e Ceará na região Nordeste, mantendo-se com uma média de 3.000 casos anuais (BARRETO *et al.*, 1981; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

As três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LTA são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (CIMERMAN, 2001), sendo o complexo *L. braziliensis* responsável pela forma mais grave da LC (LM e LD).

A LTA inclui as seguintes sub-formas:

1.3.1. Leishmaniose Cutânea (LC)

O aspecto mais freqüentemente observado nos casos de LC são úlceras com bordas elevadas nas partes expostas do corpo como a face, braços e pernas (WHO, on line, 2002). Estas lesões se iniciam no local de entrada do parasita como pequenas pápulas, que se desenvolvem em nódulos que ulceram no centro (WALTON, 1987). Menos freqüentemente podem ser observadas lesões verrucosas e vegetantes. A cura espontânea da lesão é um achado freqüente em algumas áreas endêmicas (COSTA et al., 1987).

1.3.2. Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM)

A forma mucocutânea é na maioria das vezes secundária às lesões cutâneas, acometendo principalmente as cavidades nasais, podendo levar a destruição parcial ou total da mucosa do nariz, seguidas da faringe, laringe e cavidade oral, provavelmente, devido à distribuição hematogênica dos parasitas presentes na lesão primária. É vista mais freqüentemente em homens adultos, sendo incomum em crianças. De acordo com dados epidemiológicos, aproximadamente 3% dos pacientes com infecção por *L. braziliensis* evoluem para a forma cutâneo-mucosa (BARRAL et al, 1997).

1.3.3. Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD)

Em cerca de 1% dos casos de LC pode ser observado um padrão de lesão disseminada. Essa forma clínica da doença pode ser causada tanto pela espécie

L. brasiliensis como *L. amazonensis*, certamente devido à disseminação hematogênica do parasita. As lesões aparecem como elementos acneiformes, pápulas e pequenas úlceras disseminadas presentes na face, tórax e membros (COSTA et al., 1986 & CARVALHO et al., 1994).

A doença caracteriza-se por um pólo não responsivo ou anérgico aos antígenos de *Leishmania*. A resposta humoral é exacerbada na ausência de resposta imune mediada por células (CONVIT et al., 1972).

1.4 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE

O estabelecimento dos modelos experimentais murinos na leishmaniose têm sido de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos imunomodulatórios da doença. Os modelos de infecção em camundongos BALB/c e C3H/HeN definiram os dois padrões de resposta imune, nos quais subpopulações diferentes, Th1 e Th2, determinam a susceptibilidade ou resistência à doença. Nos camundongos BALB/c, observa-se um pólo de resposta com o controle da multiplicação do parasita e cura espontânea da doença, enquanto em camundongos C3H/HeN observa-se uma forma progressiva e severa da doença (HEINZEL et al., 1989).

Na leishmaniose humana a polarização Th1/Th2 observada no modelo murino não é regra (RIBEIRO DE JESUS et al, 1998). A resposta imune observada em humanos é muito complexa, podendo ocorrer perfis distintos de citocinas. Uma situação que exemplifica estas diferenças é o papel do TNF- α . Em modelos experimentais, o TNF- α parece exercer um importante papel na defesa

do hospedeiro (TITUS et al., 1989, LIEW et al., 1990), todavia em humanos, títulos elevados de TNF- α no soro parecem não estar associado com proteção imune contra infecção por *Leishmania* (PISA et al., 1990). Alguns trabalhos têm observado ainda, que o TNF- α tem sido implicado no agravamento de várias doenças infecciosas (GRAU et al., 1989, SARNO et al., 1991, BARNES et al., 1992, MCGUIRE et al., 1994). Estudos mostraram que inibindo a produção do TNF- α , pacientes com LCM apresentavam melhor resposta à terapêutica (LESSA et al., 2001). Em pacientes com LC a produção ótima de TNF- α em associação com outras citocinas pode induzir mecanismos envolvidos na resolução da lesão, ao passo que, uma liberação elevada de TNF- α solúvel pode ter um efeito deletério, levando ao agravamento da doença. BÁFICA et al., (2003) sugerem que na LCL a resposta imune é localizada no sítio da úlcera e que o TNF- α pode colaborar para uma pior evolução clínica da lesão, uma vez que no soro dos pacientes é observado níveis diminuídos de TNF- α , contrastando com a intensa expressão de TNF- α na lesão desses pacientes.

A resposta imune em pacientes com LC é caracterizada por uma forte resposta celular com evidências de uma reação de hipersensibilidade tardia em resposta aos antígenos de *Leishmania*, proliferação de linfócitos e produção elevada de IFN- γ (CASTES et al, 1983). IFN- γ é a principal citocina associada com a morte da *Leishmania*, atuando na ativação de macrófagos e potencializando sua atividade leishmanicida. Essa citocina também é produzida na infecção por *L. braziliensis*, mas a razão pela qual tais pacientes desenvolvem a doença permanece sem resposta. Estudos sugerem que o IFN- γ pode desempenhar um

duplo papel na LC, podendo estar associado com o controle da multiplicação do parasita e/ou estar envolvido na patogênese da doença. Uma vez que o IFN- γ regula positivamente a produção do TNF- α , talvez essa citocina pró-inflamatória participe da destruição tecidual observada na leishmaniose tegumentar (RIBEIRO DE JESUS et al, 1998).

Algumas diferenças também têm sido observadas no perfil de citocinas em pacientes com lesões de curta duração quando comparados com pacientes com lesões duradouras. Pacientes com lesão crônica apresentam uma forte expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α , IL-1, IL-10 e TGF- β , quando comparado com a expressão de citocinas nas lesões iniciais. Os resultados desse trabalho indicam que a expressão temporal e diferencial de citocinas, *in situ*, pode ter um papel na patogênese da leishmaniose e que os padrões de citocinas podem ser espécie-específico (MELBY et al, 1994).

2 APOPTOSE

A apoptose, ou morte celular programada, é um suicídio celular ativo, pois requer a síntese de uma série de proteínas que traduzem o sinal apoptótico para o interior da célula (HETTS, 1998). A apoptose é um processo fisiológico fundamental na regulação do sistema imune, crítico para a homeostase tecidual em organismos multicelulares, que tem sido implicado na patogênese de diversas doenças do sistema imune.

Estudos têm mostrado que a apoptose poderia ser um mecanismo usado na defesa do hospedeiro contra vírus e provavelmente outros agentes infecciosos

como bactérias e parasitas intracelulares (VAUX et al., 1994). A desregulação da apoptose tem sido relacionada com doenças neurodegenerativas, AIDS, etc., enquanto defeitos na apoptose estão relacionados com câncer, doenças auto-imunes e infecções virais (KATOCH et al., 2002).

Existem duas vias principais para a indução da apoptose: a via dos receptores de morte e a via regulada pela mitocôndria. Os receptores de morte identificados até o momento pertencem à superfamília do receptor para o fator de necrose tumoral (TNF) e são o FAS, TNFR e TrailR. Esses receptores ligam-se a ligantes específicos, incluindo Fas ligante (FasL), TNF, TRAIL e APO2L (ASHKENASI et al., 1998).

Dentre os receptores, APO-1/Fas é o receptor de morte melhor caracterizado. Este receptor é uma proteína transmembranar expressa na superfície de muitos tipos celulares, tais como linfócitos, epitélio, fibroblastos e algumas células endoteliais (LEITHAUSER et al., 1993). O gene que codifica para o receptor APO-1/ Fas (CD95) foi mapeado no cromossomo 10 em humanos na posição 10q23 / 10q24.1 (BEHRMANN et al., 1994; INAZAWA, et al., 1992) e consiste de 9 éxons e 8 íntrons com extensão de aproximadamente 26 kb (CHENG et al., 1995). O papel preciso de APO-1/Fas na regulação imune, ainda não está bem definido, mas estudos têm sugerido a participação de Fas na predisposição e evolução clínica de várias doenças (KRAMMER, 2000, BRUNNER, 1995). Expressão anormal do gene APO-1/Fas tem sido observada em diversas doenças imunes, tais como síndrome linfoproliferativa autoimune e lúpus eritematoso sistêmico (HUANG et al., 1997). A expressão do gene APO-1/Fas está aumentada nas células T de crianças infectadas por HIV (BAUMLER et

al., 1996), doença de Hodgkin (XERRI et al., 1995) e lúpus eritematoso sistêmico (MYSLER et al., 1994).

2.1 LEISHMANIOSE E APOPTOSE

Recentemente tem-se sugerido a possibilidade do envolvimento da apoptose na patogênese e desenvolvimento das formas clínicas da leishmaniose. Um estudo com LC mostrou que há um aumento de células TCD8+ apoptóticas quando comparado com células TCD4+ nas lesões dos pacientes com leishmaniose cutânea ativa (BERTHO et al., 2000). Em modelos de camundongos deficientes para Fas e FasL infectados com *L. major*, foi demonstrada a importância funcional do sistema Fas-FasL para eliminação do parasito e na resolução da lesão provocada por *L. major* (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1998). Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que a infecção *in vitro* de macrófagos murinos com *L. major*, aumentava a expressão de Fas na superfície dos macrófagos em resposta ao IFN- γ . Corroborando com esses resultados, HUANG et al., (1998) demonstraram que camundongos MRL/lpr (mutantes para Fas) não controlam o desenvolvimento da lesão, apesar de desenvolverem uma resposta Th1 com elevada produção de IL-12 e NO, ratificando a importância da expressão de Fas na resistência à infecção por *Leishmania*.

Na literatura existe apenas um trabalho avaliando o papel do sistema Fas-FasL na leishmaniose cutânea em humanos. Os resultados desse estudo mostraram que a via de citotoxicidade Fas-FasL é um potente indutor de apoptose, sendo necessário para resolução da lesão (EL-KOWRANY et al., 2001).

Na leishmaniose visceral, EIDSMO et al., (2002) demonstraram que os níveis de Fas e FasL solúvel no plasma de pacientes com LV se correlacionaram com as mudanças patológicas observadas durante a infecção. Os níveis médios de FasL solúvel no plasma de pacientes com LV ou LV-HIV foram 2.9 a 4.2 vezes mais elevados quando comparados com os níveis em doadores normais. Quando a doença e carga parasitária eram controladas, os níveis dos marcadores apoptóticos, Fas e FasL, retornavam aos valores normais.

2.2 POLIMORFISMOS DO GENE FAS

Recentemente foram identificados dois polimorfismos na região promotora do gene APO-1/Fas (HUANG et al., 1997). O primeiro polimorfismo é uma substituição de uma G por uma A no nucleotídeo de posição -1377 dentro da região silenciadora. Essa substituição não cria nem deleta sítio de restrição, mas ocorre na seqüência do sítio de ligação para o fator de transcrição SP-1. Esse polimorfismo é raro na população, sendo observado em apenas 20% dos indivíduos normais (HUANG et al., 1997). O segundo polimorfismo está localizado no nucleotídeo -670 dentro da região enhancer devido à substituição de uma A por G, que cria um sítio de restrição para a enzima *Mva*I, resultando em três diferentes genótipos GA, GG e AA (HUANG et al., 1997). O polimorfismo -670 ocorre na seqüência consenso do sítio de ligação do elemento de transcrição nuclear GAS (Gamma-activated sequence), podendo influenciar a expressão do gene APO-1/Fas, dependendo da forma alélica expressa. Gas é uma seqüência de 9 bases com resíduos TT e AA terminais, requerido para ativação gênica em

resposta ao IFN- γ (SHUAI, 1994). O gene APO-1/Fas apresenta dois sítios para a enzima *MvaI*, um deles localizado na posição -858 (sítio constante, não polimórfico) gerando um fragmento constante com 98 pb e outro localizado na posição -670 (sítio polimórfico) (HUANG et al., 1997).

Estas descobertas induziram todo um conjunto de estudos que investigaram a possibilidade desses polimorfismos serem marcadores genéticos de susceptibilidade e progressão de doenças, nas quais a apoptose é importante na patogênese. O polimorfismo do gene APO-1/Fas tem sido avaliado como possível marcador genético em diversas doenças tais como esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide. HUANG et al., (1999) em um estudo com duas coortes de pacientes com LES, demonstraram um aumento na frequência do genótipo GG em alguns pacientes (esses com úlcera oral, fotossensibilidade, artrite renal e neuropsicose) quando comparados com controles normais, sugerindo um possível papel do genótipo GG em conferir susceptibilidade à fotossensibilidade em pacientes com LES, por envolver a expressão do gene APO-1/Fas. VAN VEEN e colaboradores (2002), observaram que o polimorfismo -670 do gene Fas influencia na susceptibilidade à esclerose múltipla, visto que indivíduos com o genótipo GG têm risco diminuído para o desenvolvimento de esclerose múltipla. A associação com o polimorfismo -670 também têm sido observada na doença de Alzheimer's (FEUK et al., 2000) e em pacientes derrame cerebral coreanos, nos quais, o polimorfismo -670 parece não ser fator de risco para a doença (SEO, et al., 2002). Todos os trabalhos existentes até o presente avaliando o polimorfismo -670 do gene APO-1/Fas foram

realizados em doenças autoimunes e câncer (WANG, et al., 2003). Em doenças infecciosas, entretanto, não existem trabalhos que correlacione esse polimorfismo genético com dados clínicos da doença.

Diferenças raciais têm sido reportadas como um importante fator na infecção por *Leishmania*. Em populações co-existentes de índios ameríndios e negros que tiveram conservada a sua integridade genética, observaram-se diferenças na velocidade e evolução da lesão mucosa. Na população negra, as lesões mucocutâneas desenvolviam-se rapidamente, resultando em um dano facial grave e forte reação de hipersensibilidade tardia. Por outro lado, embora muitos casos de leishmaniose foram registrados na população indígena, as lesões apresentavam desenvolvimento lento, não destrutivo e resposta diminuída aos antígenos de *Leishmania*, sugerindo que as mutilações observadas nos negros, foram resultantes de uma exagerada resposta imune inflamatória (WALTON & VALVERDE, 1979).

2.3 POLIMORFISMOS DO TNF- α ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE HUMANA

Um estudo tipo caso-controle com 46 pacientes com LCM sugeriu uma associação entre susceptibilidade de desenvolver essa forma da doença com um polimorfismo genético no alelo TNF2 afetando a produção de TNF- α (CABRERA et al, 1995). KARPLUS et al., (2002) estudando indivíduos com infecção com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos, demonstraram que existe uma forte associação entre os indivíduos assintomáticos (IDRM+) e um polimorfismo na região promotora do TNF- α . Nesse mesmo estudo foi sugerido que alguns

genótipos do locus do TNF podem estar associados ao desenvolvimento de formas contrastantes da doença como visceral e mucocutânea. Também se observou que a produção de níveis elevados de TNF- α , geneticamente determinada, em resposta à infecção por *L. chagasi*, pode predispor indivíduos, pelo menos em parte, para o desenvolvimento da forma visceral grave da doença.

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, tem-se observado um elevado crescimento do número de casos de LTA, tanto em magnitude como em expansão geográfica, com surtos epidêmicos nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte (COSTA et al, 2000).

Na Bahia, mais precisamente na região cacaueira de Três Braços e Corte de Pedra, diversos estudos foram desenvolvidos entre as décadas de 70 e 80, os quais serviram de modelo para o entendimento de alguns aspectos relacionados à epidemiologia, clínica e terapêutica da doença. Uma das regiões endêmicas em destaque é a do sudoeste, que juntamente com a região sul, concentram o maior número de casos de LTA no Estado (COSTA, 1986).

Os avanços no âmbito científico, em particular nos estudos da imunologia, têm ampliado nosso entendimento da resposta imune do hospedeiro contra infecções por *Leishmania* e muitos outros patógenos. Diferenças na susceptibilidade à infecção primária e/ou na evolução da lesão cutânea tem sido propostas como alternativas para explicar os mecanismos envolvidos na rapidez e extensão das lesões em algumas populações.

Na leishmaniose experimental murina, a resposta imune do hospedeiro e a resistência adquirida tem mostrado importante papel em resposta à infecção. Na leishmaniose humana, estudos têm fornecido evidências para componentes genéticos do hospedeiro na susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, influenciando a severidade e resistência da doença (SHAW et al., 1995).

Um aumento significativo na expressão do CD95 tem sido observado em PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (SANTOS et al., 2003). Considerando a importância do processo apoptótico na patologia da leishmaniose, acreditamos que a investigação do polimorfismo do gene APO-1/Fas nos pacientes com LC poderá fornecer dados para melhor compreensão da patogênese da doença, uma vez que a literatura é muito escassa com relação a estudos que avaliem o processo apoptótico na leishmaniose humana.

Contrastando com os padrões de resposta imunes Th1/Th2 definidos até o momento, propõe-se que a apoptose mediada por Fas pode ser um terceiro parâmetro imune a ser abordado na leishmaniose humana. Portanto, sugerimos que a combinação de estudos genéticos e imunológicos pode responder várias questões à cerca da relação entre imunidade, resistência/susceptibilidade genética e evolução clínica da leishmaniose.

A utilização de marcadores imunogenéticos em associação com testes sorológicos, poderá apresentar-se como possíveis medidas profiláticas na identificação de pacientes com melhor ou pior prognóstico, possibilitando intervenções terapêuticas que acelerem o processo de resolução das lesões.

HIPÓTESE

O genótipo GG correspondente ao polimorfismo -670 do gene Fas influencia na resposta imune do hospedeiro e no quadro clínico da leishmaniose cutânea localizada.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

- Investigar o papel de Fas na leishmaniose cutânea localizada.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência dos diferentes genótipos correspondentes ao polimorfismo -670 do gene Fas em pacientes com LC comparando com controles sadios;
- Avaliar a expressão do receptor Fas (CD95) na superfície das células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com LC comparando com controles sadios;
- Correlacionar os genótipos do gene Fas com a expressão do receptor Fas (CD95) na superfície das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LC e controles sadios;
- Correlacionar os genótipos do gene Fas com dados clínicos e resposta imune "in vivo" (IDRM+, sorologia) na leishmaniose cutânea localizada.

5 CASUÍSTICA

5.1 PACIENTES ESTUDADOS

Este estudo contou com a participação de 40 pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea, provenientes das áreas endêmicas de Jequié e Jiquiriçá-BA, atendidos no Posto de Saúde local pela equipe de médicos e pesquisadores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, que visitam a área periodicamente.

Os critérios de inclusão adotados no estudo foram lesão compatível com diagnóstico de leishmaniose cutânea, intradermorreação de Montenegro positiva e visualização de formas amastigotas na análise histopatológica da lesão. O recrutamento dos pacientes foi aleatório, não houve restrição por idade, gênero ou etnicidade. O período da coleta das amostras foi de outubro de 2002 a dezembro de 2003.

O diagnóstico para leishmaniose foi realizado através do exame clínico e confirmado através da Reação Intradérmica de Montenegro, sorologia e biópsia da lesão. Os pacientes apresentavam ulcerações cutâneas únicas, na maioria dos casos, localizadas mais freqüentemente nos membros inferiores. A idade dos pacientes variou entre 3 e 86 anos, dos quais 18 eram do gênero feminino e 22 do gênero masculino. As características clínicas e demográficas dos pacientes estão sumarizados na Tabela 1.

5.2 CONTROLES

Voluntários dos laboratórios (LIMI e LIP) e doadores normais do HEMOBA – BA foram recrutados como grupo controle para o estudo. O estudo contou com um total de 27 doadores, com idade entre 20 e 50, sendo 17 do gênero feminino e 10 do gênero masculino.

5.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse trabalho foi submetido à avaliação pelo comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Termo de consentimento em anexo, Anexo 1).

6 MÉTODOS

6.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Cada paciente e controle sadio doaram 20 mL de sangue periférico para o estudo, coletados por punção venosa, através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer Franklin Lakes-NJ-EUA) em tubos heparinizados, após consentimento livre e esclarecido.

6.2 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS ADOTADOS

Linfadenopatia - Foi verificada questionando-se ao paciente a presença ou não de “íngua”. Em alguns casos foi possível detectar a presença de linfadenopatia através do exame físico nas regiões submandibular, axilar ou inguinal do paciente pela equipe.

Tamanho da lesão – O tamanho da lesão foi determinado com o auxílio de uma régua, mensurando-se o diâmetro da mesma. Nós calculamos a superfície da lesão ulcerada através da medida do diâmetro.

Tempo de doença – O tempo de doença foi definido segundo o tempo relatado pelo paciente do surgimento da lesão, até o diagnóstico realizado no posto de saúde.

IDRM – O teste de intradermoreação de Montenegro foi avaliado com base na área de endureção formada após a administração do antígeno de *Leishmania*. O IDRM foi mensurado de forma semiquantitativa (-, +, ++ e +++).

6.3 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas a partir do volume de 20 mL de sangue heparinizado (10UI/mL), diluído 1:1 com solução salina a 0,9%, adicionando-se em seguida o Ficoll-Hipaque na proporção de 2:1. Os tubos foram então centrifugados (400xg por 40 minutos) e o anel de células coletado. As células foram lavadas 2 vezes com solução salina a 0,9% a 1000 rpm por 10 minutos e contadas, na última lavagem, em câmara de Newbauer.

Após a contagem, a quantidade de células era dividida, parte para extração de DNA, RNA, proteínas e parte para citometria de fluxo.

6.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico das células mononucleares obtidas a partir do gradiente de FICOLL-Hypaque foi extraído usando protocolo de tratamento com proteinase K e extração com Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico.

O "pellet" de células foi ressuspenso em uma solução de Tris - EDTA - NaCl (10 mM- 10 mM- 0,15 mM), SDS 20% e proteinase K (10 mg /mL). Essa solução era incubada a 65°C por 2 horas. Em seguida adicionava-se uma outra solução de Tris - EDTA - NaCl (10 mM- 10 mM- 0,65 mM) e fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Agitava-se vigorosamente e centrifugava-se a 10000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, transferia-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionava-se Etanol Absoluto para precipitação do DNA. O tubo era então homogeneizado e centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos. O álcool era descartado e o "pellet" lavado com Etanol 75%, que após centrifugação era secado ao ar e ressuspenso em 75 µL de H₂O MiliQ autoclavada. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose e acondicionadas à -20°C para posterior utilização.

6.5 GENOTIPAGEM POR PCR DO GENE APO-1/FAS

Reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas para amplificação da região promotora do gene APO-1/Fas (CD95) como previamente descrito por HUANG et al., (1997). As seqüências dos primers utilizados foram 5'-CTACCTAAGAGCTATCTACCGTTC-3' (APO-1/Fas Forward) e 5'-GGCTGTCCATGTTGTGGCTGC-3' (APO-1/Fas Reverse), sintetizadas de acordo

com dados publicados por HUANG et al., (1997), gerando um fragmento com 331 pb.

Cada reação era composta de aproximadamente 60 ng de DNA, 0,5 U de Taq polimerase, 0,25 μ M de cada primer, 200 μ M de dNTPs, 1.0 mM de $MgCl_2$ em tampão Tris-HCl 10 mM / KCl_2 50 mM (pH 8.5) num volume final de 20 μ L. As reações foram amplificadas em termociclador Perkin Elmer com as seguintes condições de temperatura: 94°C por 5 minutos para desnaturação do DNA, 55°C por 1 minuto, para pareamento dos primers e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão do primer pela Taq DNA Polimerase por 35 ciclos.

6.6 ANÁLISE DA DIGESTÃO PARA O POLIMORFISMO -670 DO GENE

APO-1/FAS

Após a amplificação da região promotora do gene Fas, 10 μ L da reação foi digerido com a enzima de restrição *MvaI*. Ao produto do PCR adicionava-se uma mistura de 5 μ L contendo 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dTT e 1U de *MvaI*. As amostras eram incubadas 2 h a 37°C. Os produtos da digestão eram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) em tampão de TBE 1X. Os géis eram corados com Brometo de Etídio e fotografados em luz UV.

Após a digestão com a enzima *MvaI* o fragmento de 331 pb originou dois fragmentos, um de 233 e outro de 98 pb na presença da A na posição -670, correspondendo ao genótipo AA. Na presença da G nesta posição, o fragmento de

233 pb era clivado em um fragmento de 189 e outro de 44 pb, correspondendo ao genótipo GG (Figura 1A e 1B).



Figura 1A. Gel ilustrando o polimorfismo -670 da região promotora do gene Apo-1/Fas. O produto do PCR foi digerido com a enzima *MvaI* e separado por eletroforese em gel de poli-acrilamida 6% e corado com brometo de etídio. Linha M representa o marcador de pares de bases de 100-pb; Linha 1 produto do PCR sem digerir; Linha 2 genótipo heterozigoto GA; Linha 3 homozigoto AA; Linha 4 genótipo homozigoto GG.

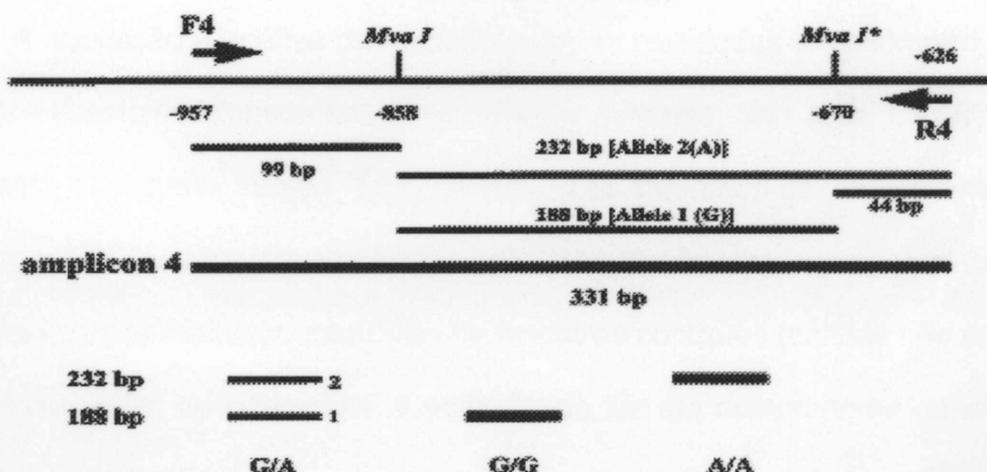


Figura 1B. Representação esquemática do mapa de restrição do gene APO-1/Fas ilustrando os dois sítios para a enzima *MvaI* (-858 e -670) e os possíveis fragmentos gerados em função dos genótipos.

6.7 PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) eram ressuspensas em um tampão de bloqueio contendo PBS 1% BSA 0,1 % azida sódica + soro humano na proporção de 4:1, com a finalidade de reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos. As amostras eram incubadas a 4°C por 15 minutos para ação do bloqueio. Em seguida adicionavam-se os anticorpos fluorescentes (Tabela 2) e mais uma vez as amostras eram incubadas por 30 minutos a 4°C protegidas da luz. Passados os 30 minutos as amostras eram lavadas com 150 µL por tubo de PBS + 1% BSA+ 0,1 % Azida sódica e centrifugadas a 1000 rpm a 4°C por 5 minutos. Após a lavagem, as células eram fixadas com formalina 1% (200 µL por tubo), vortexadas e acondicionadas a 4°C protegidas da luz para posterior aquisição.

6.8 CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACSort (Becton-Dickinson *Immunocytometry Systems*, San Jose, CA) através do programa CellQuest versão 3.1F. Inicialmente definiram-se os parâmetros de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) e seleção das populações celulares. Em seguida, era realizada aquisição de amostras controles (células não marcadas e isotipos), a fim de diferenciar a emissão de luz em comprimento de onda não definido, da emissão de luz pela presença da marcação.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos deste estudo foram realizadas utilizando o programa GraphPad-Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA).

As associações realizadas entre os diferentes genótipos do gene Fas e dados clínicos dos pacientes com LC foram analisadas através da análise de Pearson.

A análise estatística das associações do polimorfismo -670 do gene Fas, sorologia e linfadenopatia foram realizadas através do teste Exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 1: Características clínicas e demográficas de 40 pacientes com leishmaniose cutânea oriundos da área endêmica de Jequié-Jiquiriçá, Bahia.

Amostras	Idade	Gênero	Peso	Tamanho da Lesão	Tempo de Doença	Número de Lesões	Local da Lesão	Tratamento	Nº Ciclos	IDRM	Linfadenopatia
01	18	M	55	1,5	90d	1	MIE	SBV	2	+	Não
02	9	M	ND	1,5	30d	1	Antebraço	SBV	3	+	Não
03	34	H	58	1,0	30d	1	MIE	SBV	2	++	Sim
04	55	M	51	1,5	30d	1	Parietal D	SBV	1	ND	Sim
05	35	M	47	1,5	30d	3	MID	SBV	2	ND	Não
06	24	H	57	6,0	30d	1	MIE	SBV	3	ND	Sim
07	32	H	70	0,5	30d	1	Escápula	SBV	1	ND	Sim
08	30	M	65	1,0	15d	1	Antebraço	SBV	2	ND	Sim
09	04	M	16	1,0	15d	1	Antebraço	SBV	1	ND	Não
10	08	M	23	2,0	20d	1	MIE	SBV	2	ND	Sim
11	65	M	57	3,0	90d	13	MMII	SBV	2	ND	ND
12	13	M	48	1,5	30d	1	Parietal	SBV	2	++	Sim
13	22	H	68	1,0	60d	1	MIE	SBV	3	++	Sim
14	49	H	60	0,5	60d	2	MIE	SMT	ND	+	Não
15	25	M	59	0,5	60d	1	MID	SBV	2	+	Sim
16	ND	M	ND	ND	ND	ND	ND	SBV	ND	ND	ND
17	ND	M	ND	ND	ND	ND	ND	SBV	ND	ND	ND
18	ND	H	ND	ND	ND	ND	ND	SBV	ND	ND	ND
19	ND	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	9	M	ND	2,0	60d	ND	ND	SBV	ND	+	Sim
22	46	H	63	2,5	60d	1	MIE	SBV	2	+	Sim
23	60	H	64	1,5	25d	1	MID	SBV	1	+	Não

24	8	M	16	2,0	30d	3	MMII	SBV	ND	+	Sim
25	10	H	ND	2,0	45d	ND	ND	SBV	ND	ND	Sim
26	23	H	64	4,0	30d	5	MMII/SS	SBV	1	ND	Sim
27	19	H	66	1,5	50d	ND	Face	SBV	3	+	Sim
28	31	M	38	1,0	45d	1	Antebraço	SBV	1	++	Sim
29	41	H	60	2,0	20d	1	Face	SBV	2	ND	Sim
30	86	H	ND	5,0	100d	ND	Coxa	SBV	1	ND	Sim
31	24	M	55	2,0	15d	1	Antebraço	SBV	1	++	Sim
32	19	H	52	2,5	365d	1	MID	SBV	2	++	Sim
33	3	M	11	2,0	30d	1	Face	SBV	1	+	Sim
34	12	H	40	3,5	30d	1	MIE	SBV	2	ND	Sim
35	41	H	80	3,5	30d	1	Escápula	SBV	1	+	Sim
36	59	H	52	2,0	180d	44	MMII	SBV	2	+	Sim
37	57	H	62	1,5	90d	1	MSE	SBV	1	ND	Sim
38	28	H	52	1,5	60d	1	Face	SBV	3	+	Sim
39	17	M	45	2,0	180d	3	MID	SBV	1	+	Sim
40	16	H	56	1,0	15d	2	MID	SBV	1	+	Não

D = Dias

MID = Membros Inferiores Direito

MSE = Membros Superiores Esquerdo

MMII = Membros inferiores

MMII/SS = Membros Inferiores e Superiores

ND = Não disponível

SBV = Antimônio Pentavalente

Tabela 2: Anticorpos utilizados para marcação de moléculas de superfície celular em PBMC de pacientes com LC oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia e Doadores normais.

Anticorpo	Conjugado	Clone	Função	Expressão Celular
IgG1 ^P	FITC	A85-1		
IgG2a ^P	PE	G155-178		
α -CD3 ^P	FITC	UCHT-1	Transdução de sinal pelo TCR	Célula T e timócitos
α -CD4 ^P	FITC	RPA-T4	Co-receptor para MHC de classe II	Célula T helper, Mon, M ϕ
α -CD8 ^P	PE	HIT8a	Co-receptor para MHC de classe I	Cél T citotóxica, timócitos
α -CD14 ^P	PE	M5E2	Receptor para LPS e LBP	Mon
α -CD16 ^I	FITC	3G8	Receptor Fc γ RIII medeia fagocitose e ADCC	Neutrófilos, células NK e M ϕ
α -CD16b ^I	FITC	1D3	Receptor Fc γ RIIIb	Neutrófilos
α -CD49d ^P	PE	9F10	Integrina α 4	Cél B, timócitos, Mon, DC, eosinófilos
α -CD56 ^I	PE	N901	Molécula de Adesão	Células NK
α -CD95 ^P	PE	DX2	Regulação da apoptose e ativação	Variedade de linhagens celulares

^I = Immunotech; ^P = PharMingen

FITC = Isothiocinato de fluoresceína; PE = Ficoeritrina

ADCC = Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

DC = Célula Dendrítica; M ϕ = Macrófagos; Mon = Monócito

LBP = Proteína ligadora de lipopolissacarídeo; LPS = lipopolissacarídeo

TCR = Receptor de célula T

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA.

Esse estudo teve a participação de 40 pacientes com leishmaniose cutânea dos quais 56% eram do gênero masculino. A média de idade entre os pacientes foi de 27 anos. A presença de linfadenopatia foi um achado em cerca de 70% (N=28) dos pacientes, corroborando com os dados publicados em outras áreas endêmicas para leishmaniose. Vinte e três pacientes (77,4 %) apresentaram lesão única e 22,6% tinham entre 2 e 5 lesões, localizadas mais freqüentemente nos membros inferiores (57% dos casos). A média do tamanho das lesões foi de 10,4 cm \pm 8,5. O tempo médio da doença foi de 48,7 dias. Quarenta por cento dos pacientes foram tratados com apenas 1 ciclo de SB⁺⁵ e 18,75% dos pacientes necessitaram de 3 ciclos de SB⁺⁵.

Os dados acima estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Características clínicas e demográficas dos pacientes com LC oriundos da área endêmica de Jequié-Jiquiriçá, Bahia.

	Freqüência	Média	SD	Máximo	Mínimo
Gênero Masculino	56%				
Idade		29,4	19,4	86	3
Linfadenopatia	70%				
Lesão Única	77,4%				
2 ou + Lesões	22,6%				
Lesão MMII	57%				
Tamanho de Lesão (cm)		1,97		6,0	0,5
Tempo de Doença (Dias)		48,7	40,22	180	7
1 Ciclo de SB ⁺⁵	40,6%				
2 Ciclos de SB ⁺⁵	40,6%				
3 Ciclos de SB ⁺⁵	18,75%				

7.2 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO -670 DO GENE FAS EM PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA E DOADORES NORMAIS.

A genotipagem do polimorfismo -670 do gene Fas foi realizada em 40 amostras de pacientes com LC e em 27 amostras de doadores normais.

A distribuição genotípica do polimorfismo -670 da região promotora do gene Fas nas 40 amostras analisadas, demonstrou que 14 (35%) pacientes apresentaram o genótipo heterozigoto GA, enquanto o genótipo AA foi observado em oito (20%) amostras. O genótipo homozigoto GG foi o mais freqüente entre os pacientes com LC, tendo sido encontrado em 18 (45%) dos indivíduos.

Entre as amostras dos doadores normais observou-se que 14 indivíduos (51,8%) apresentaram o genótipo GA, enquanto que os genótipos AA e GG foram observados em cinco (18,5%) e oito (29,6%), indivíduos controles, respectivamente.

Apesar da aparente diferença na freqüência do genótipo GG entre as duas populações estudadas, não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos entre os pacientes com LC e doadores normais.

Os resultados observados na genotipagem demonstraram que o gene Apo-1/Fas está em equilíbrio na população normal segundo a Lei de Hardy-Weinberg.

A distribuição genotípica e freqüência alélica estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo -670 da região promotora do gene APO-1/Fas em pacientes com LC oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia e Doadores normais.

	Pacientes com LC N=40	Doadores Normais N=27
Frequência do Genótipo (%)		
A/A	8 (20%)	5 (18,5%)
G/A	14 (35%)	14 (51,9%)
G/G	18 (45%)	8 (29,6%)
Frequência do Alelo		
A	39	44,4
G	61	55,6

7.2.1 CORRELAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO -670 DO GENE FAS E LINFADENOPATIA EM PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JQUIRIÇÁ, BAHIA.

Avaliou-se o risco de desenvolver linfadenopatia em associação com os genótipos entre os pacientes com LC. Dentre os 40 pacientes estudados, 34 apresentaram registro de linfadenopatia nos prontuários. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de linfadenopatia e os diferentes genótipos GG, GA e AA. Entretanto, ao agrupar os genótipos GG + GA X AA, observou-se pelo teste de Fisher, que os genótipos agrupados tem 1,5 vezes mais risco para o desenvolvimento de linfadenopatia que os indivíduos com o genótipo AA ($p=0,012$, IC= 0,72-2,90).

Tabela 5: Correlação entre linfadenopatia e diferentes genótipos do polimorfismo -670 do gene Fas em pacientes com LC oriundos de Jequié-Jiquiriçá, Bahia.

Linfadenopatia		
Genótipos	Presença	Porcentagem %
A/A	4/7	57,1
G/A	11/12	80,0
G/G	12/15	91,7
Total	27/34	79,4

7.2.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -670 DO GENE FAS E IDRM EM PACIENTES COM LC ORIUNDOS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA.

Dos 40 pacientes analisados para o polimorfismo -670 do gene Fas, apenas 20 apresentaram registro de IDRM nos prontuários. Não foi observada diferença estatística entre os diferentes genótipos para o gene Fas e a intensidade do IDRM entre os pacientes com LC.

7.2.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -670 DO GENE FAS E TAMANHO DE LESÃO EM PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA.

Dos 40 pacientes estudados, 35 pacientes apresentaram registro do tamanho da lesão nos prontuários. Nenhuma associação foi observada entre o tamanho das lesões e os diferentes genótipos. A média do tamanho da lesão entre os pacientes com o genótipo GG foi de 1,8 cm ($\pm 0,3$) e entre os pacientes com os genótipos GA e AA as médias do tamanho da lesão foram 1,7 ($\pm 0,2$) e 1,9 cm ($\pm 0,4$), respectivamente.

7.2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -670 DO GENE FAS E TEMPO DE DOENÇA EM PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA.

Foi observada uma discreta variação no tempo de doença quando associado com a genotipagem do gene Fas em pacientes com LC. A média do tempo de doença entre os pacientes com os genótipos GG, GA e AA foram (dias \pm SE): 54 ± 10.4 , 41 ± 6.5 e 42 ± 10.1 , respectivamente. Apesar da aparente diferença no tempo de doença entre os pacientes com o genótipo GG (54 dias), em relação aos demais, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes.

Tabela 6: Associação entre os dados clínicos (Médias e desvios) e os diferentes genótipos do polimorfismo -670 do gene APO-1/Fas em pacientes com LC oriundos das áreas endêmicas de Jequié-Jiquiriçá, Bahia.

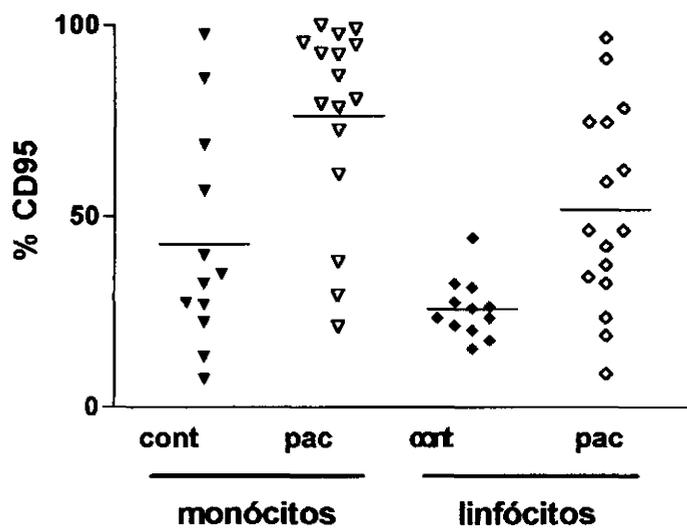
Dados Clínicos	Diferentes Genótipos		
	AA	GA	GG
Tempo de doença	41,7 ± 10,1 (n=6)	40,8 ± 6,5 (n=12)	54,4 ± 10,4 (n =16)
Tamanho de Lesão	1,9 ± 0,4 (n=7)	1,7 ± 0,2 (n=13)	1,8 ± 0,3 (n=15)
Ciclos de Sb⁺⁵	1,5 ± 0,3 (n=5)	1,8 ± 0,3 (n=11)	1,7 ± 0,2 (n=16)
IDRM+	1,4 ± 0,24 (n=7)	1,0 (n=10)	1,38 ± 0,18 (n=8)
IgG anti-<i>Leishmania</i>	0,300 ± 0,277 (n=5)	0,579 ± 0,166 (n=9)	0,465 ± 0,249 (n=13)

7.2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -670 DO GENE FAS E SOROLOGIA ANTI- *LEISHMANIA* EM PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA.

A quantificação de IgG anti-*Leishmania* foi realizada no plasma dos pacientes com LC e correlacionada com os diferentes genótipos do gene Fas. Foram realizados um teste χ^2 simples e um teste χ^2 para tendência entre a sorologia e os diferentes genótipos, mas as diferenças não foram estatisticamente significantes ($p=0,06$) e ($p= 0,13$), respectivamente. Entretanto, agrupando-se os genótipos GG + GA e associando-os com o genótipo AA, observou-se pelo teste de Fisher, que os genótipos GG e GA apresentaram um risco relativo de 1,59 vezes mais de ter sorologia positiva IgG anti-*Leishmania* que os indivíduos com o genótipo AA ($p= 0,079$, IC= 0,77-3,27).

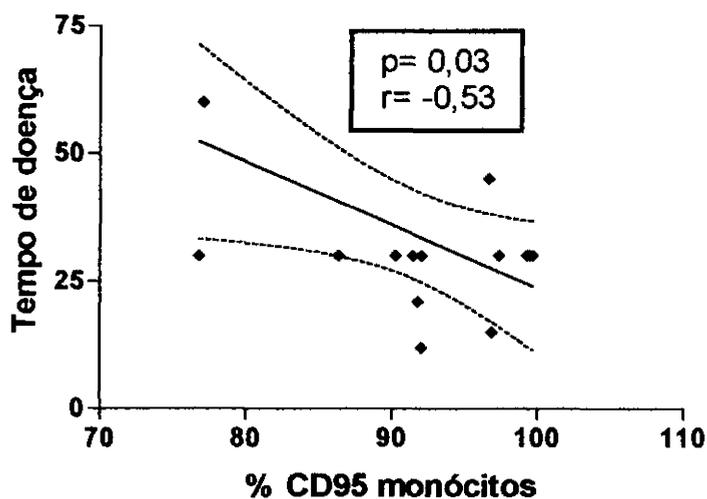
7.3 EXPRESSÃO DE FAS (CD95) NA SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS E MONÓCITOS DE PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JUIQUIRÁ, BAHIA E DOADORES NORMAIS.

A expressão, em porcentagem, de CD95 demonstrou que há um aumento na superfície de monócitos e linfócitos do sangue periférico dos pacientes com LC quando comparado com a expressão em monócitos e linfócitos de controles normais.



7.3.1 CORRELAÇÃO ENTRE TEMPO DE DOENÇA E EXPRESSÃO DE FAS (CD95) NA SUPERFÍCIE DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM LC ORIUNDOS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE JEQUIÉ-JIQUIRIÇÁ, BAHIA.

Foi observada uma correlação negativa entre o tempo de doença e a porcentagem da expressão de Fas (CD95) na superfície de monócitos de pacientes com LC ($p=0,02$, $r=-0,53$).



8 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Apoptose é um mecanismo de morte celular, geneticamente regulado. Esse fenômeno tem importante papel no desenvolvimento e organogênese tecidual, bem como na patogênese de várias doenças parasitárias (BARCINSKI et al., 1999).

Muitos trabalhos têm relatado a importância de fatores genéticos influenciando o curso de infecções causadas por patógenos intracelulares, tais como *Salmonella spp*, *Plasmodium falciparum* e *Mycobacterium spp* (ALTARE et al., 1998; BELLAMY, et al., 1999; MCGUIRE et al., 1994).

No presente estudo foi investigado se um polimorfismo geneticamente determinado no gene Fas estaria associado com o quadro clínico da leishmaniose cutânea. Dados preliminares do grupo já haviam demonstrado um aumento na expressão de Fas em PBMC de pacientes com LC quando comparados com controles normais (SANTOS et al., 2003). Polimorfismos do gene Fas têm sido associado com diversas doenças autoimunes e câncer. Vários estudos têm demonstrado a importância da apoptose na patogênese da leishmaniose, no entanto, nenhum estudo foi realizado, até o presente, avaliando o papel dos polimorfismos em qualquer molécula implicada na apoptose. Porém, têm-se demonstrado, aumento do risco relativo para LCM associado com o polimorfismo do TNF- α (CABRERA et al., 1995).

Esse é o primeiro trabalho analisando um polimorfismo em genes implicados na apoptose na leishmaniose cutânea humana. Embora o estudo tenha

contado com um número pequeno de amostras, os resultados servirão como base para estudos futuros.

Nesse estudo avaliou-se um marcador genético, o polimorfismo -670 da região promotora do gene Fas, em pacientes com LC. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica ou alélica entre os pacientes e controles. Porém, ao comparar os resultados com os dados da literatura (HUANG et al., 1997), observou-se um aumento da susceptibilidade à infecção por *Leishmania* entre os pacientes com o genótipo GG (RR= 1,7).

Um estudo de poder (Epi Info6) foi realizado para calcular o número de amostras necessário para um estudo de caso-controle, a fim de avaliar o risco relativo entre os indivíduos expostos e não expostos e a susceptibilidade à infecção. Os cálculos para o risco relativo foram realizados com base nas frequências observadas em nosso estudo e semelhantes às frequências dos genótipos observadas entre controles caucasianos (HUANG et al., 1997). Entre os indivíduos não expostos a frequência do genótipo GG foi de 29,6%, enquanto nos pacientes com LC a frequência foi de 45% (Tabela 3). Seria então necessário para um estudo do tipo caso-controle uma amostra com 166 pacientes com LC e 166 controles. Genotipando essas amostras será possível concluir ou não que os indivíduos com o genótipo GG são mais susceptíveis à infecção que os indivíduos com o genótipo AA (RR estimado = 1,52, OR estimado= 1,95). Porém, se o cálculo do número de amostras for realizado com base nas frequências dos genótipos em controles caucasianos, será necessário uma amostra com apenas 95 pacientes e 95 controles (RR estimado = 1,82 e OR estimado = 2,49).

Os pacientes com o genótipo GG tenderam a apresentar maior tempo de doença quando comparados com os pacientes com os genótipos GA e AA, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Também associou-se os diferentes genótipos com a presença de linfadenopatia entre os pacientes com LC e foi observado que os indivíduos com os genótipos GG + GA têm um risco aumentado de desenvolver linfadenopatia, quando comparados com os pacientes com a forma homozigota AA. A linfadenopatia é uma manifestação clínica inicial na LC, podendo ser o único sinal clínico da infecção (BARRAL et al., 1995). Estudos têm mostrado, que o linfonodo é um local de intensa resposta imune com produção de citocinas que podem influenciar no curso e predominância de uma resposta imune protetora ou deletéria (SCOTT, 1991). Sendo assim, sugerimos que os indivíduos com o genótipo AA, os quais tem o sítio de ligação do elemento GAS funcional, podem aumentar a transcrição do gene Fas resultando em maiores níveis de apoptose e menor acúmulo de células no linfonodo drenante.

Paralelamente, avaliou-se a expressão do CD95 (Apo1/Fas) em PBMC dos pacientes com LC e controles normais. Observou-se um aumento na expressão de CD95 nos monócitos dos pacientes quando comparados com a expressão em monócitos de doadores normais. Não foi observada correlação entre a % da expressão de Fas com resposta imune celular (IDRM) ou humoral (IgG anti-*Leishmania*). Devido ao pequeno número de amostras pareadas, não se observou correlação entre os genótipos do gene Fas e a expressão do receptor Fas na superfície de PBMC dos pacientes com LC e controles normais (Dados não mostrados). Todavia, detectou-se uma correlação negativa entre a expressão de Fas em monócitos e o tempo de doença em pacientes com LC. Os resultados

observados na expressão de Fas entre os pacientes com LC, indicam que expressão de Fas e/ou apoptose mediada por Fas pode ser um terceiro parâmetro imune, independente, modificando a evolução da leishmaniose.

O genótipo GG pode resultar em uma completa deleção da seqüência do elemento de transcrição GAS e significativa alteração da expressão do gene Fas (HUANG et al., 1997). O polimorfismo -670 do gene Fas resulta da substituição de um nucleotídeo na seqüência consenso do elemento de transcrição nuclear GAS, para a forma homodimérica do STAT1, identificado inicialmente em células reguladas por IFN- γ (IHLE, 1995). Existe a possibilidade do envolvimento de certas citocinas observadas na LC, principalmente IFN- γ , estarem regulando a expressão gênica de Fas, além de interferir com a expressão de outras moléculas pró- e anti-apoptóticas. Deste modo, pode-se especular que a tendência observada dos pacientes com o genótipo GG a apresentarem maior tempo de doença, assim como a correlação negativa entre a expressão de Fas (CD95) na superfície dos monócitos dos pacientes com o tempo de doença, deve-se à redução na "capacidade apoptótica" desses indivíduos no início da doença, resultando num retardo na ulceração da lesão e conseqüentemente no diagnóstico da doença.

A fase atual do estudo impediu que fosse realizada a associação dos genótipos com o tempo de cura, mas espera-se, baseados nos achados com camundongos deficientes em Fas/FasL, que os pacientes com o genótipo GG apresentem um aumento no tempo de cura quando comparados com os pacientes com os genótipos GA e AA.

Os resultados desse trabalho necessitam ser confirmado com um número maior de amostras de pacientes e controles. Pretende-se ainda, a obtenção de amostras controles da área endêmica, a fim de verificar como se comporta esse polimorfismo entre a população que é exposta, mas que não desenvolve doença. Contudo, apesar do pequeno número de pacientes estudados, esse estudo permitirá calcular o número de amostras necessário para um estudo imunogenético, capaz de determinar marcadores genéticos associados com fatores de risco na evolução clínica da leishmaniose cutânea, incluindo um grupo de pacientes com LCM. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento da doença mucosa incluem tamanho da lesão primária, múltiplas lesões e terapia inadequada no tratamento da lesão inicial (ALCAIS, et al., 1997). JONES e colaboradores (1987), estudando uma área endêmica para LC na Bahia, observaram que a doença mucosa foi mais comum no sexo masculino (2,3:1) e em pacientes que tiveram lesões múltiplas ou com elevado tamanho da lesão primária. Uma amostra maior de pacientes, também possibilitará a realização de análise multivariada, visto que certos fatores de risco, genéticos, clínicos e imunológicos, podem ou não ser interindependentes.

9 CONCLUSÃO

- Nesse estudo observou-se uma maior frequência do genótipo GG entre os pacientes com LC, quando comparados com controles sadios.
- Observou-se um aumento na expressão de CD95 em PBMC de pacientes com LC quando comparados com a expressão em controles normais.
- Verificou-se uma correlação negativa entre a expressão de Fas em monócitos dos pacientes com LC com o tempo de doença.
- Uma associação entre os genótipos GG e GA foi observada com a presença de linfadenopatia nos pacientes com LC.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALCAIS, A.; ABEL, L.; DAVID, C.; TORREZ, M.E.; FLANDRE, P.; DEDET, J.P.

Risk factors for onset of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia.

Am. J. Trop. Med. Hyg., **57**:79-84, 1997.

ALTARE, F.; JOUANGUY, E.; LAMHAMED, S.; DOFFINGER, R.; FISCHER, A.;

CASANOVA, J. L. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. **Curr.**

Opin. Immunol., **10**:413-417, 1998. Review.

ASHKENASI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**,

281: 1305-1308, 1998.

BADARO, R.; JONES, T.C.; LORENCO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.;

CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**,

154:639-649, 1986.

BAFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FREITAS, L. A.; NASCIMENTO, E. G.; BARRAL, A.

American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline.

Int. J. Dermatol., **42**:203-207, 2003.

BARCINSKI, M. A.; DOS REIS, G.A. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**:395-401, 1999.

BARNES, P.F.; CHATTERJEE, D.; BRENNAN, P. J.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infect. Immun.**, **60**:1441-1446, 1992.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JEUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**:536-546, 1991.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; CORREIA, G. B. D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy as the first signal of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:256-259, 1995.

BARRAL-NETTO, M.B.; BITTENCOURT, A. **Tropical Pathology**. 2nd ed. Springer, 1995. v. 8. Pag 597-651. Cap. 14.

BARRAL-NETTO, M.B.; MACHADO, P.; BITTENCOURT, A.; BARRAL, A. Recent in the pathophysiology and treatment of human cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opin. Dermatol.**, **4**:51-58, 1997.

- BARRETO, A. C.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D.; VEXENAT, J. A.; DE BELDER M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia, Brasil. Leishmaniose humana. **Boletín de la Oficina Panamericana de Salud** **90**:415-424, 1981.
- BAUMLER, C. B.; BOHLER, T.; HERR, I.; BENNER, A.; KRAMMER, P. H.; DEBATIN, K. M. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. **Blood**, **88**:1741-1746, 1996.
- BEHRMANN, I.; WALCZAK, H.; KRAMMER, P. H. Structure of the human APO-1 gene. **Eur. J. Immunol.**, **24**:3057-3062, 1994.
- BELLAMY, R. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. **Microbes Infect.**, **1**: 23-27, 1999.
- BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; DA-CRUZ, A. M.; COUTINHO, S. G. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**:317-325, 2000.
- BRUNNER, T., MOGIL, R. J., LAFACE, D., YOO, N. J., MAHBOUBI, A., ECHEVERRI, F., MARTIN, S. J., FORCE, W. R., LYNCH, D. H., WARE, C. F. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. **Nature**, **373**:441-444, 1995.

CABRERA, M.; SHAW, M.A.; SHARPLES, C.; WILLIAMS, H.; CASTES, M.; CONVIT, J.; BLACKWELL, J.M. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor genes associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **182**:1259-1264, 1995.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and Immunopathological Aspects of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Trop.**, **56**:315-325, 1994.

CASTES M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDON, A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **27**:176-186, 1983.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA / Ministério da Saúde – Notas de dados estatísticos, 1999.

CHENG, J.; LIU, C.; KOOPMAN, W. J.; MOUNTZ, J. D. Characterization of Human Fas Gene. Exon/intron Organization and Promoter Region. **J. Immunol.**, **154**: 1239-1245, 1995.

CIMERMAN, B. **Parasitologia Humana**. Atheneu Rio, 2001. São Paulo. Pag 36-58. Cap. 8.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J.
The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a
functional Fas (APO-1/CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, **28**:237-
245, 1998.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDON, A. J. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A
disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med.
Hyg.**, **66**: 603-610, 1972.

COSTA, J. M. L. **Estudo clínico epidemiológico de um surto epidêmico de
Leishmaniose Tegumentar Americana em Corte de Pedra- Ba. Brasília – DF,**
Tese de Mestrado - Universidade Nacional de Brasília, UNB, 1986.

COSTA, J. M. L.; NETTO, E. M.; VALE, K. C.; OSAKI, N. K.; TADA, M. S.;
MARDSSEN, P. D. Spontaneous healing of cutaneous *L. braziliensis braziliensis*
ulcers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **81**: 606, 1987.

COSTA, J. M. L. **Manual de controle da LTA. 5ª ed.** Brasília: Fundação Nacional
de Saúde, Ministério da Saúde, 2000. 62 p.

EIDSMO, L.; WOLDAY, D.; BERHE, N.; SABRI, F.; SATTI, I.; EL HASSAN, A. M.;
SUNDAR, S.; CHIODI, F.; AKUFFO, H. Alteration of Fas and Fas ligand
expression during human visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **130**: 307-
313, 2002.

EL-KOWRANY, S. I.; FERSAN, S. A.; NASSAR, S.O.; ISMAIL, H.I.H.; EISSA, M. M. The role of Fas system [Fas-FasL] as an inducer os apoptosis in cutaneous leishmaniasis: A combined human and experimental study. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, **31**:245-256, 2001.

FEUK, L.; PRINCE, J.A.; BREEN, G.; EMAHAZION, T.; CAROTHERS, A.; ST CLAIR, D.; BROOKES, A.J. Apolipoprotein-E dependent role for the FAS receptor in early onset Alzheimer's disease: finding of a positive association for a polymorphism in the TNFRSF6 gene. **Hum. Genet.**, **107**:391-396, 2000.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Disponível em: <<http://www.funasa.org.br>>
Acesso em: 13 mar. 2004.

GRAU, G. E.; TAYLOR, T. E.; MOLYNEUX, M. E.; WIRIMA, J. J.; VASSALLI, P.; HOMMEL, M.; LAMBERT, P. H. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. **N. Engl. J. Med.**, **320**:1586-1591, 1989.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, R. L.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of IFN- γ or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expression of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, **169**: 59-72, 1989.

HETTS, S. W. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. **JAMA**, **279**:300-307, 1998.

HUANG, F. P.; XU, D.; ESFANDIARI, E. O.; SANDS, W.; WEI, X. Q.; LIEW, F. Y. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced Nitric Oxide production. **Am. Assoc. Immunol.**, **160**:4143-4147, 1998.

HUANG, Q. R.; MORRIS, D.; MANOLIOS, N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/ Fas (CD95) gene. **Mol. Immunol.**, **34**:577-582, 1997.

HUANG, Q. R.; DANIS, V.; LASSERE, M.; EDMONDS, J.; MANOLIOS. Evaluation of new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, **38**: 645-651, 1999.

IHLE, J. N. Cytokine receptor signalling. **Nature**, **377**: 591-594, 1995.

INAZAWA, J.; ITOH, N.; ABE, T.; NAGATA, S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. **Genomics**, **14**:821-822, 1992.

JONES, T. C.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, A. C.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S. G.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANCA, F.; WIESE, K.; GOLIGHTLY, L.; FIKRIG, E.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infect. Dis.**, **156**:73-83, 1987.

KARPLUS, T. M.; SELMA, M. B. J.; CHANG, H.; HELMS, B. K.; BURNS, T. L.; MURRAY, J. C.; MITCHELL, A. A.; PUGH, E. W.; BRAZ, R. F. S.; BEZERRA, F. L.; WILSON, M. E. Association between the Tumor Necrosi Factor Locus and the Clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. **Infect. Immun.**, **70**: 6919-6925, 2002.

KATOCH, B.; SEBASTIAN, S.; SAHDEV, S.; PADH, H.; HASNAIN, S. E.; BEGUM, R. Programmed cell death and its clinical implications. **Indian J. Exp. Biol**, **40**:513-524, 2002.

KRAMMER PH. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, **407**:789-795, **2000**. Review

LAISON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. **Nature**, **273**: 595-600, 1978.

LEITHAUSER F.; DHEIN J.; MECHTERSHEIMER G.; KORETZ K.; BRUDERLEIN S.; HENNE C.; SCHMIDT A.; MOLLER P. Constitutive and induced expression of Apo-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. **Lab. Investig.**, **69**:415-429, 1993.

LESSA, H. A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A. A.; BARCELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E. M. Sucessul treatment of refractory Mucosal

Leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **65**: 87-89, 2001.

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVEM, A.; CARRIER, M. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. TNF- α mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, **69**: 570-573, 1990.

MASAAKI, N.; KIKUCHI, S.; FUKAZAWA, T.; MIYAGISHI, R.; YABE, I.; TASHIRO, K. An examination of the Apo-1/Fas promoter *MvaI* polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. **BMC Neurol.**, **2**:2-8, 2002.

MCGUIRE, W.; HILL, A. V.; ALLSOPP, C. E.; GREENWOOD, B. M.; KWIATKOWSKI, D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral Malaria. **Nature**, **371**: 508-510, 1994.

MELBY, P. C.; ANDRADE NARVAEZ, F. J.; DARNELL, B. J.; BALENCIA, G. P.; TRYON, W.; PALOMO-CETINA, A. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in chronic lesion of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **62**:837-842, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. DERMATOLOGIA SANITÁRIA. Guia de controle de leishmaniose tegumentar americana. M. S, Brasília, DF, 2000.

MYSLER, E.; BINI, P.; DRAPPA, J.; RAMOS, P.; FRIEDMAN, S.; KRAMMER, P.; ELKON, K. B. The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, **93**:1029-1034, 1994.

NEVES D. P. **Parasitologia Médica**. 9. ed. Atheneu Rio, São Paulo. 1997.

PERSON, R. D.; SOUSA, A. Q. **Leishmania species: visceral (Kala-zar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. Principles and practical of infections disease**. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. p 2066.

PISA, P.; GENNENE, M.; SODER, O.; OTTENHOFF, T.; HANSSON, M.; KIESSLING, R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **161**:988-991, 1990.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**:143-148, 1998.

SANTOS, G.S.; FARRE, L.; SOARES, G.; BARRA, A.; BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. Fas expression in PBMC of patients with localized cutaneous leishmaniasis- correlation with clinical data. XXVIII Meeting of the Brazilian Society of Immunology. October 05-08, 2003, Mangaratiba, Rio de Janeiro.

SARNO, E. N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, L. M.; NERY, J. A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.**, **84**:103-108, 1991.

SCOTT, P. Interferon- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**:3149-3155, 1991.

SEO, J. C.; HAN, S. W.; YIN, C. S.; KOH, H. K.; KIM, C. H.; KIM, E.; LEEM, K. H.; LEE, H. P.; KIM, S.; CHOE, B. K.; LEE, H. J.; YIM, S. V.; KIM, C. J.; CHUNG, J. H. Evaluation of a Apo-1/Fas promoter polymorphism in Korean stroke patients. **Exp. Mol. Med.**, **34**:294-298, 2002.

SHAW, M. A.; DAVIES, C. R.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; COLLINS, A. Human genetic susceptibility and infection with *Leishmania peruviana*. **Am. J. Human Genet.**, **57**: 1159-1168, 1995.

SHUAI, K. Interferon-activated signal transduction to the nucleus. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, **6**:253-259, 1994.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Méd.**, **170**: 2097-2104, 1989.

VAN VEEN, T.; KALKERS, N. F.; CRUSIUS, J. B. A.; WINSEN, L.; BARKHOF, F.; JONGEN, P. J. H.; PENA, A. S.; POLMAN, C. H.; UITDEHAAG, B. 670 polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, **128**: 95-100, 2002.

VAUX D. L.; HAECKER, G. Viral, worm and radical implications for apoptosis. **Trends Biochem. Sci.**, **19**:99-100, 1994.

WALTON, B. C. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Clinical aspects and control. (The leishmaniasis in biology and medicine vol 2), **Academic Press**, London, 1987. p 637

WALTON, B. C.; VALVERDE, L. Racial differences in espundia. **Ann. Trop. Méd. Parasitol.**, **73**:23-29, 1979.

WANG, L.; CHENG, L.; SPITZ, M. R.; WEI, Q. Fas A670G polymorphism, apoptotic capacity in lymphocyte cultures, and risk of lung cancer. **Lung Cancer**, **42**: 1-8, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infectious Disease Leishmaniasis.**

Disponível em: <<http://www.who.int/emc/disease/leish/leisdis1.html>> Acesso em: 10 out. 2003.

XERRI L.; CARBUCCIA N.; PARC P.; HASSOUN J.; BIRG F. Frequent expression of Fas/Apo-1 in Hodgkin disease and anaplastic large cell lymphomas. **Histopathology**, 27:235-241, 1995.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Solicitamos sua participação no estudo de pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ):

Primeiro você precisa saber que:

1. A sua participação no estudo é voluntária.
2. Você pode decidir não participar ou se retirar do estudo após o seu início. Se isto acontecer, você vai receber os mesmos cuidados médicos e não vai perder qualquer benefício a que tem direito.
3. Você poderá não ter qualquer benefício direito ou econômico se tomar parte no estudo. A pesquisa poderá dar-nos informação que ajude a outros pacientes no futuro.
4. Para menores de idade, a autorização deve ser dada pelo responsável.

Objetivo do estudo:

Estudo da imunopatologia na leishmaniose humana.

Sua participação:

Você vai participar no estudo doando antes do início do tratamento:

1. **Se você é um doador sadio**
20 ml de sangue
2. **Se você tem leishmaniose visceral:**
20 ml de sangue.
Uma biopsia da medula óssea, que se utilizará também para realizar o diagnóstico
3. **Se você tem leishmaniose cutânea:**
20 ml de sangue.
Um fragmento de 4 mm de uma das lesões. Nessa extração do fragmento você receberá anestesia local. Este fragmento se utilizará também para realizar o diagnóstico.

Teste para HIV:

Para participar neste estudo, é necessário testar o seu sangue para a presença de anticorpos anti-HIV (vírus da imunodeficiência adquirida humana), o vírus que causa a "Síndrome de Imunodeficiência Adquirida" (AIDS). O resultado deste teste será confidencial e lhe será comunicado pelos médicos responsáveis do estudo. Para fazer o teste será usada uma pequena amostra do sangue já doado.

Riscos:

Os possíveis riscos na retirada de sangue são dor local e, mais raramente, infecção. Este é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Resultados obtidos no estudo:

Os resultados obtidos no estudo lhe serão comunicados na consulta do médico. Também serão divulgados nos meios científicos e o seu nome não aparecerá nessa divulgação.

Eu, _____, li as explicações, ou ouvi a leitura, e recebi uma cópia deste documento de consentimento.

O Dr. _____ discutiu comigo esta informação e eu tive a possibilidade de fazer perguntas. Se eu tiver novas perguntas eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou contactar com o responsável pelo estudo Dr. _____, pelo telefone _____.

Eu _____, fui informado que para participar neste estudo o meu sangue tem que ser testado para a presença de anticorpos anti-HIV (vírus da imunodeficiência adquirida humana), e aceito de fazer o teste.

Eu consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que o procedimento descrito acima seja realizado em minha pessoa.

Assinatura	Número Registro Geral
Testemunha	Número Registro Geral
Médico Assistente	Data

Se o senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre sua participação neste estudo pode contactar Dra. Aldina Barral ou Dr. Jackson Costa pelo telefone: (071) 356-8782 r. 259.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Solicitamos sua participação no estudo de pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ):

Primeiro você precisa saber que:

1. A sua participação no estudo é voluntária.
2. Você pode decidir não participar o se retirar do estudo após o seu início. Se isto acontecer, você vai receber os mesmos cuidados médicos e não vai perder qualquer benefício a que tem direito.
3. Você poderá não ter qualquer benefício direito ou econômico se tomar parte no estudo. A pesquisa poderá darnos informação que ajude a outros pacientes no futuro.
4. Para menores de idade, a autorização deve ser dada pelo responsável.

Objetivo do estudo:

Estudo da imunopatologia na leishmaniose humana.

Sua participação:

Você vai participar no estudo doando antes do início do tratamento:

1. **Se você é um doador sadio**
20 ml de sangue
2. **Se você tem leishmaniose visceral:**
20 ml de sangue.
Uma biopsia da medula ossea, que se utilizará também para realizar o diagnóstico
3. **Se você tem leishmaniose cutânea:**
20 ml de sangue.
Um fragmento de 4 mm de uma das lesões. Nessa extração do fragmento você receberá anestesia local. Este fragmento se utilizará também para realizar o diagnóstico.

Teste para HIV:

Para participar neste estudo, é necessário testar o seu sangue para a presença de anticorpos anti-HIV (vírus da imunodeficiência adquirida humana), o vírus que causa a "Síndrome de Imunodeficiência Adquirida" (AIDS). O resultado deste teste será confidencial e lhe será comunicado pelos médicos responsáveis do estudo. Para fazer o teste será usada uma pequena amostra do sangue já doado.

Riscos:

Os possíveis riscos na retirada de sangue são dor local e, mais raramente, infecção. Este é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Resultados obtidos no estudo:

Os resultados obtidos no estudo lhe serão comunicados na consulta do médico. Também serão divulgados nos meios científicos e o seu nome não aparecerá nessa divulgação.

Eu, _____, li as explicações, ou ouvi a leitura, e recebi uma cópia deste documento de consentimento.

O Dr. _____ discutiui comigo esta informação e eu tive a possibilidade de fazer perguntas. Se eu tiver novas perguntas eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou contactar com o responsável pelo estudo Dr. _____, pelo telefone _____.

Eu _____, fui informado que para participar neste estudo o meu sangue tem que ser testado para a presença de anticorpos anti-HIV (vírus da imunodeficiência adquirida humana), e aceito de fazer o teste.

Eu consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que o procedimento descrito acima seja realizado em minha pessoa.

Assinatura	Número Registro Geral
------------	-----------------------

Testemunha	Número Registro Geral
------------	-----------------------

Médico Assistente	Data
-------------------	------

Se o senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre sua participação neste estudo pode contactar Dra. Aldina Barral ou Dr. Jackson Costa pelo telefone: (071) 356-8782 r. 259.