



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

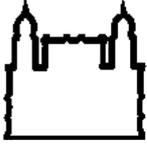
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DOS *LOCI* DO TNF  
ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM UMA  
COMUNIDADE RURAL DO SUDOESTE DA BAHIA, BRASIL**

**VANESSA BRANDÃO NARDY**

**Salvador - Bahia – Brasil - 2009**



**Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ**  
**Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM**  
**Laboratório de Imunoparasitologia – LIP**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**Epidemiologia e distribuição dos *loci* de TNFs associados à leishmaniose tegumentar  
em uma comunidade rural do Sudoeste da Bahia, Brasil**

**Vanessa Brandão Nardy**

Dissertação apresentada como parte do  
programa de mestrado *strictu sensu* do  
curso de pós-graduação em  
Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa do Centro de Pesquisa  
Gonçalo Moniz – CPqGM -  
FIOCRUZ/BA

**Área de Concentração: Epidemiologia  
Molecular e Medicina Investigativa.**

**Orientador: Jackson Maurício Lopes Costa**

**Coorientadora: Maria de Lourdes Vallve Farré**

**Salvador**  
**setembro/2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Nardy, Vanessa Brandão

N223e Epidemiologia e distribuição dos loci de TNFs associados à leishmaniose tegumentar em uma comunidade rural do Sudoeste da Bahia, Brasil. [manuscrito] / Vanessa Brandão Nardy. - 2010.  
102 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – . Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Maurício Lopes Costa, Laboratório de Imunoparasitologia.

1. Leishmaniose Tegumentar. 2. Epidemiologia. 3. Fator de Necrose Tumoral..  
I.Título.

CDU 616.993.161(813.8)

**VANESSA BRANDÃO NARDY**

**Epidemiologia e distribuição dos *loci* de TNFs associados à leishmaniose tegumentar em uma comunidade rural do Sudoeste da Bahia, Brasil**

**Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

---

**Profº Dr. Jackson Maurício Lopes Costa**

---

**Profª Drª Ana Angélica Leal Barbosa**

---

**Profº Dr. Edson Duarte Moreira Junior**

## **EPÍGRAFE**

**“Todos nós sabemos alguma coisa,  
todos nós ignoramos alguma coisa  
ninguém sabe tudo  
ninguém ignora tudo, estamos sempre  
aprendendo” (Paulo Freire)**

## **Agradecimentos**

À Deus e a minha família.

Talvez esta dissertação seja o resultado mais visível desse processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

...À Deus, por ter me dado a oportunidade da vida e por ter trilhado meus caminhos que agora toma uma nova direção.

...À meus pais Irani e Sebastião e minha irmã Elaine que com entusiasmo e fé me incentivaram a vencer meus objetivos, mesmo quando me pareciam distantes, pelo auxílio emocional e financeiro e especialmente, pelo orgulho que transparecem sentir em simplesmente, serem meus pais e irmã. **Amo vocês!!!!**

...À Dr. Jackson Costa, por ter me aceitado, sem hesitar, pela oportunidade, e principalmente pelos valiosos ensinamentos com paciência, lucidez e confiança.

...À Dr<sup>a</sup> Lourdes Farré pela competência com que co-orientou esta minha dissertação e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo as melhores e mais úteis informações, estou-lhe muito grata.

...À Dra Ana Angélica por sempre deixar claro que estava ao meu lado, pelo total apoio, por ter me apresentado a Dr. Jackson Costa, você Ana foi fundamental nesta dissertação. **MUITO OBRIGADA!**

...À Dra Sandra Mara pelas dicas, pelo projeto pelos ensinamentos, você foi uma peça muito valiosa para esta dissertação, saudades!

...À minha avó Teresinha Brandão pelas orações, pela fé, e pelas palavras, aos tios, tias, primos e primas pelo simples fato de me fazer acreditar que estariam presentes a qualquer momento que eu necessitasse.

...À meu noivo Juaci Carlos que sempre me incentivou, me apoiou, e o melhor de tudo sempre me cobrou que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas. Te amo.

...À meus amigos de disciplinas : Aline Cristina, Álvaro Muller, Ana Márcia, Cristina Aragão, Caroline Urpia, Eliomara Alves, Marcela Gómez, Teresa Brandão, Simone Oliveira e Wildo Navegantes; pela união e alegria.

...À Priscila que foi estímulo e companhia para que eu concluísse com êxito essa minha jornada , você é realmente uma pessoa maravilhosa.

...À Gigi, por todo apoio concedido neste trabalho e a amizade durante o realização do mestrado, você é muito especial para mim.

...À Raimundo Celestino e a Dalton pelo apoio nas análises, pelas orientações e pela ajuda com os programas.

...Aos amigos do LAPEX, Manuela, Yannick, Isabela, Juliana, Sr. Antônio, pelo carinho e descontração e principalmente meus sinceros agradecimentos a Everton e Marcelo por todo apoio, auxílio técnico, pela amizade e agradável convivência e como não poderia deixar de citar pela incrível paciência.

...À minha amiga Mara pelo carinho e companheirismo.

E a Fundação Oswaldo Cruz pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Enfim, está homenagem estende-se a todos que contribuíram com um sorriso amigo nas horas difíceis.

...À Eliane Gões pelo apoio concedido ao grupo ajudando no deslocamento ao campo, e por ter concedido o uso das instalações do Centro de Referencia em Doenças Endêmicas-PIEJ possibilitando desta forma a obtenção, preparo e armazenagem das amostras. A você Eliane nosso profundo agradecimento.

...Ào Centro de pesquisa Gonçalo Moniz pela concessão da bolsa, a qual foi muito importante para que eu pudesse me manter na cidade e concluísse meu mestrado.

## **Índice de figuras e gráficos**

Figura 1: Localização cromossômica do TNF.....	29
Figura 2: Figura mostrando um Polimorfismo de nucleotídeos únicos, uma substituição de base de Adenina (A) pra Guaina (G).....	31
Figura 3: : Localização geográfica do município de Jequié, local onde foi desenvolvido o estudo.....	38
Figura 4:Aspecto de uma moradia encravada em clareira aberta na mata, ao redor mostra relevo e vegetação encontrada na região de Florestal. ....	39
Figura 5: Aspecto do relevo e vegetação encontrada na região de Florestal (Distrito de Jequié) .....	40

## Índice de tabelas

Tabela 1: Características dos SNPs da região promotora do TNF nas posições -308 e -238..	45
Tabela 2: Sequências iniciadoras usadas para amplificar o segmento de DNA para cada “loci” .....	46
Tabela 3: Frequência das variáveis sociais dos chefes de família da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	53
Tabela 4: Frequência das variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias na comunidade rural Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	54
Tabela 5: Frequência das variáveis relacionadas ao hábito de moradia das famílias na comunidade rural Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	55
Tabela 6: Tabela 6: Frequência das variáveis relacionadas ao ambiente peri-domiciliar das famílias da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.....	56
Tabela 7: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias e a LT na comunidade de Florestal, Município de Jequié, Bahia.....	56
Tabela 8: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias e a LT em comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	57
Tabela 9: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao ambiente peri-domiciliar das famílias e a LT, em comunidades rurais do distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	58
Tabela 10: Indivíduos que relataram ter tido LT pregressa, e que realizaram o teste intradérmico de Montenegro (IDRM), na área rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	59
Tabela 11: Indivíduos que relataram ter tido LT pregressa, e que realizaram o teste ELISA, na área rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	59

Tabela 12: Frequência das variáveis sociais e laborais de cada indivíduo da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	60
Tabela 13: Associação entre sexo, idade, e atividades laborais com o teste intradérmico de Montenegro (IDRM) em comunidades rurais do Distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia.....	60
Tabela 14: Associação entre sexo, idade, e atividades laborais com ELISA em indivíduos estudados no distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia. ....	61
Tabela 15: Frequência relativa dos heterozigotos observados ( $H_o$ ) e esperados ( $H_e$ ) para os diferentes locos a fim de verificar se estão em equilíbrio de Hardy- Weinberg (HW) ....	62
Tabela 16: Distribuição genotípica dos SNPs nas posições -238 e -308 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ entre os três grupos. ....	62
Tabela 17: Distribuição genotípica dos SNPs na posição -308 da região promotora do gene do TNF- $\alpha$ entre os grupos de infectados e doentes para as diferentes relações de dominância. ....	63
Tabela 18: Distribuição alélica dos SNPs nas posições -238 e-308 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ entre os diferentes grupos. ....	64
Tabela 19: Distribuição alélica dos <i>SNPs</i> nas posições -238 entre os infectados e doentes ....	64
Tabela 20: Tabela de avaliação clínica e o genótipo do TNF-308 dos indivíduos infectados/doentes. ....	64

## Lista de abreviaturas

LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
Th	Células <i>helper</i>
TNF	Tumor Necrosis Factor
IFN- $\gamma$	Interferon-Gama
IL	Interleucina
MHC	Major Histocompatibility Complex
NO	Óxido Nítrico
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
<i>SNPs</i>	<i>Single Nucleotide Polimorphisms</i>
VNTRs	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i>
UTRs	<i>Untranslated region</i>
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbant-Assay
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CDC	Centers for Diseases Control
MCL	Leishmaniose Mucocutânea

## Sumário

1. RACIONAL E RELEVÂNCIA .....	19
1.1 Leishmaniose Tegumentar.....	19
1.1.1 Histórico .....	21
1.1.2 Dados epidemiológicos.....	22
1.1.3 Agentes etiológicos, vetores, e reservatórios. ....	23
1.2. Aspectos Imunológicos (Sistema Imune).....	24
1.3 Polimorfismos genéticos.....	27
2. JUSTIFICATIVA .....	32
3. HIPÓTESE .....	34
4. OBJETIVOS .....	35
4.1 Geral .....	35
4.2 Específicos.....	35
4.2.1 Primários.....	35
4.2.2 Secundários.....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 Tipo de Estudo.....	36
5.2 Desenho do Estudo .....	37
5.3 Área do Estudo .....	38
5.4 Sujeitos do Estudo .....	40
5.5 Critérios de inclusão .....	41

5.6 Critérios de exclusão .....	41
5.7 Coleta do Material Biológico .....	42
5.8 Avaliação para Exposição ao Parasito.....	42
5.9. Intradermoreação de Montenegro (IDRM) .....	42
5.10 Sorologia para Leishmania (Enzyme-Linked-Immunosorbant-Assay - ELISA ) .....	43
5.11. Marcadores e Indivíduos Seleccionados para Análise Genética.....	44
5.12 Extração de DNA.....	45
5.13 Amplificações dos segmentos de DNA .....	46
5.14 Programas Utilizados.....	47
5.15 Ensaio de PCR-RFLP .....	48
5.16 Separação Eletroforética.....	48
5.17 Visualização das Bandas .....	49
6.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
7.0 ASPECTOS ÉTICOS .....	52
8.0 RESULTADOS .....	53
9.0 DISCUSSÃO .....	66
9.1 Características socioeconômicas demográficas e ambientais.....	66
9.2 Estudo epidemiológico .....	69
9.3 Prevalência a infecção por Leishmania sp.....	73
9.4 Fatores genéticos .....	74
10.0 CONCLUSÃO.....	80

11.0 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	81
12.0 DIFICULDADE DO ESTUDO.....	82
13.0 PERSPECTIVA DO ESTUDO .....	83
14.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
15.0 ANEXOS.....	98

## Resumo

A leishmaniose tegumentar (LT) é um problema de saúde pública, não somente por sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também, pela possibilidade de produzir lesões destrutivas. São considerados grupos de alto risco para aquisição da doença: agricultores, obreiros de fazendas, madeireiro, caçadores, excursionistas e naturalistas. Para definir estratégias e ações de controle e prevenção para LT, devemos considerar tanto os aspectos epidemiológicos quanto aspectos genéticos. Desta forma este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil epidemiológico da área de estudo, correlacionando os fatores de risco já bem estabelecidos na literatura com os diferentes grupos de indivíduos infectados e não infectados a partir de inquérito epidemiológico na população e caracterizar marcadores moleculares (*SNP-Single Nucleotide Polymorphism*) da região promotora do TNF- $\alpha$ , que poderão estar envolvidos na susceptibilidade ou resistência da doença LT na comunidade de Florestal-BA. Das 129 famílias que participaram do inquérito, 80,6% dos chefes de famílias pertence ao sexo masculino e possui como atividade principal o trabalho no campo, 69,8% recebe menos que um salário mínimo por mês. A análise das variáveis que se refere às condições de moradia mostra que 66,7% das residências eram construídas de alvenaria, quase todas as casas eram cobertas por telhas, com piso de cimento ou cerâmica Pouco mais que a metade das moradias tinha como fonte de água a rede pública. A maioria das casas 81,4%, possuía energia elétrica, um alto percentual 36,4% lançam lixo no terreno próximo a sua casa. 70,5% das famílias, cria em sua residência algum tipo de animal doméstico, a maior parte dos indivíduos não usam proteção individual contra mosquitos, 70,5% dos domicílios se situavam próximo às matas, rios, e criação de galinha, 77,5% domicílios, havia descrição de diversos tipos de animais nos seus arredores. A prevalência na comunidade de Florestal foi dada com a utilização do teste de Montenegro (IDRM), e do exame sorológico ELISA, sendo que os valores dessa prevalência foram praticamente similares para ambos os testes. A IDRM acusou uma prevalência de 28,9%, enquanto que, o ELISA identificou uma prevalência de 27,4%. Apesar de alguns dados não terem sido estatisticamente significativo, alguns fatores de risco analisados demonstraram maiores prevalências a infecção (IDRM+), dentre eles estão: Indivíduos do sexo masculino, adultos, trabalhadores rurais, presença de mais que uma espécie de animal na residência ou próximo a ela, residência próxima a matas e rios, construções domiciliar mais aberta, lixo no terreno, ausência de água encanada. Assim os fatores responsáveis pelo aumento de casos da doença na área, foram falta de saneamento básico, situação econômica precária, construções inadequadas, convívio com animais

silvestres ou mesmo domesticados. Com relação ao estudo dos marcadores genéticos da região promotora do TNF, O loco TNF-308 mostrou estar em equilíbrio de Hardy- Weinberg, *p*-valor 0,464 ao contrário do loco TNF-238, que demonstrou uma deficiência na frequência de heterozigotos para esta região. Não foi encontrada associação dos polimorfismos da região promotora do TNF com a susceptibilidade ou resistência à infecção ou com o desenvolvimento da doença LT, vale ressaltar que o alelo\*A mesmo não mostrando resultado estatisticamente significativo mostrou ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença, OR= 8,77 e 1,14 para o TNF – 238 e -308 respectivamente, sugerindo a realização de novos estudos com amostragem ampliada para esclarecimento desta questão.

**Palavra chave:** Leishmaniose tegumentar, Epidemiologia, Fator de Necrose Tumoral

## Abstract

The cutaneous leishmaniasis (CL) is a public health problem, not only for its high incidence and wide distribution, but also by the possibility of producing destructive lesions. Groups are considered at high risk for acquiring the disease: farmers, farm workers, loggers, hunters, hikers and naturalists. To define strategies and actions to control and prevention for LT, we must consider both the epidemiological aspects regarding genetic aspects. Thus this study aimed to establish the epidemiological profile of the study area by correlating the risk factors already well established in the literature with different groups of infected and uninfected individuals from an epidemiological survey in the population and characterize molecular markers (SNP- Single Nucleotide Polymorphism) in the promoter region of *TNF- $\alpha$* , may be involved in susceptibility or resistance of disease in the community of Forest LT-BA. Das 129 families who participated in the survey, 80.6% of heads of households are male and has as main activity work in the field, 69.8% earn less than minimum wage per month. Analysis of variables with regard to housing conditions shows that 66.7% of the homes were built of masonry, almost all the houses were covered with tiles, with cement floors or ceramic. Slightly more than half of households had a source of water to the public. Most houses 81.4% owned electric power, a high percentage 36.4% throw trash on the ground near his home. 70.5% of families, establishing his residence in some kind of domestic animal, the largest share of respondents did not use personal protection against mosquitoes, 70.5% of households were located near the forests, rivers, and creation of chicken, 77, 5% of households, there were descriptions of various types of animals in their surroundings. The prevalence in the community of Forest was given using the Montenegro skin test (IDRM), and ELISA serology, and the values of prevalence were almost similar for both tests. The MST has accused a prevalence of 28.9%, whereas the ELISA identified a prevalence of 27.4%. Although some data were not statistically significant, some risk factors analyzed showed higher prevalence infection (IDRM+), among them are: Males, adults, rural workers, the presence of more than one species of animal in the residence or nearby to her residence near forests and rivers, home building more open, trash on the ground, no running water. Thus factors responsible for increasing cases of the disease in the area were poor sanitation, poor economic status, inadequate buildings, living with wild animals or domesticated. Regarding the study of genetic markers in the promoter region of *TNF*, the *TNF-308* locus was shown to be in Hardy-Weinberg p-value 0.464 in contrast to *TNF-238* locus, which showed a deficit in heterozygote frequency for this region . There was no association of polymorphisms in the

promoter region of TNF with the susceptibility or resistance to infection or disease development with LT, but it is noteworthy that the allele \*A The same is not showing a statistically significant result was found to be a risk factor for the development of disease, OR = 2.00 and 1.13 respectively, suggesting the new studies with larger samples to clarify this issue.

**Keyword:** Cutaneous leishmaniasis, Epidemiology, Tumor Necrosis Factor

## 1. RACIONAL E RELEVÂNCIA

### 1.1 Leishmaniose Tegumentar

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 1.5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (LT), e 500.000 casos de leishmaniose visceral (LV), ocorram a cada ano em todo mundo, com estimativa de 12 milhões de pessoas infectadas anualmente pelas leishmanias, e cerca de 350 milhões de indivíduos sob o risco de contrair a infecção no mundo, sendo a maior incidência em regiões tropicais e subtropicais, áreas favoráveis à proliferação de insetos vetores responsáveis pela transmissão das leishmanias ao homem (SOSA-ESTANI, 2001; COSTA, 2005; BRASIL, 2007; HSIA, 2008). A LT é um problema de saúde pública, não somente por sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também, pela possibilidade de produzir lesões destrutivas. É uma doença considerada negligenciada que apesar de afetar milhões de indivíduos, seu tratamento ainda é demorado e às vezes inadequado (ROMÃO *et al.*, 2007).

A LT já foi descrita em todos os continentes, exceto na Oceania. É considerada rara nos Estados Unidos, tendo sido descrita no sul do Texas em áreas próximas ao norte do México. Muitos dos casos relatados nos Estados Unidos foram relacionados a viagens para a América Latina. Recentemente, mais de 500 casos de LT diagnosticados em um período de 18 meses, foram de soldados que retornaram do Oriente Médio especialmente do Iraque (BASANO & CAMARGO, 2004; HSIA, 2008). No continente Americano, já foi registrada em quase todos os países com exceção do Canadá, Chile e Uruguai (ASHFORD, 1992; FOLLADOR *et al.* 1999; WHO, 2007). No Brasil ocorre em todos os Estados com números crescentes nos últimos 20 anos onde as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas, sendo mais freqüente em zonas úmidas e boscosas, ainda que possamos encontrar em ambientes secos e áridos (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), também conhecida como ferida brava ou úlcera de Bauru é uma doença primariamente zoonótica afetando outros animais que não o homem, o qual é envolvido secundariamente (FUNASA, 2000; BRASIL, 2007). É causada por protozoários intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), do gênero *Leishmania*, o qual está envolvido em um espectro crônico de doenças tegumentares e viscerais, podendo causar deformidades e até ser fatal (GONZÁLEZ, 2000; KARPLUS *et al.*, 2002). Este protozoário tem como vetor insetos flebotomíneos da família

*Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* (GRIMALDI Jr *et al.*, 1989) que durante seu repasto sanguíneo ingerem formas amastigotas de um animal infectado que se alojam no intestino do vetor transformando-se em promastigotas. Ao picar o hospedeiro mamífero estas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos transformando-se em formas amastigotas que se reproduzem por divisão binária, até romper as células onde serão liberadas e fagocitadas por outros macrófagos (TITUS *et al.*, 1994; MARZOCHI, 1997).

A LTA é endêmica e apresenta fortes indícios de que a infecção está acontecendo no ambiente extraflorestal, em nível domiciliar e peri-domiciliar (TEODORO *et al.*, 1993). Isto se deve ao desflorestamento que tem trazido para perto do homem, vetores e animais hospedeiros, onde animais domésticos têm servido como alternativas de reservas para o protozoário aumentando o número de casos em áreas urbanas (KROEGER *et al.*, 2002). As alterações ambientais implicam diretamente quanto ao risco do homem adquirir a infecção, pois classicamente, atribui-se às formas de ocupação dos ambientes florestais como fator determinante na aquisição da mesma.

Na atualidade, estas alterações ressurgiram com outra feição em áreas onde focos ativos da doença sobreviveram em pequenas matas residuais, havendo a urbanização da LT, com adaptação dos parasitos e vetores aos novos ambientes (FALQUETO *et al.*, 1986; FOLLADOR *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2004). Em relação aos vetores, pouco conhecimento há sobre seus criadouros, encontrando as formas imaturas em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes do solo, folhas mortas e úmidas e também nas forquilhas das árvores em tocas de animais, ou seja, em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (BASANO & CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

São considerados grupos de alto risco para aquisição da doença: agricultores, obreiros de fazendas, madeireiro, caçadores, excursionistas e naturalistas (GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da LT têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença. Podendo ser observado três perfis epidemiológicos: a) Puramente Silvestre - A transmissão está associada à derrubada de matas para construção de estradas, casas e outros a fins, além da exploração desordenada das florestas (extração de madeira, agricultura e mineração), neste caso a LTA é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres que pode atingir o homem quando entra em contato com estes; b) Silvestre Modificada - Ocorre à transmissão, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária. A infecção acontece na interface da área peri-domiciliar e das áreas de mata, onde o homem

costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura e ecoturismo; c) Rural ou Periurbana - Áreas de colonização onde existe a suspeita da participação de animais domésticos (cão doméstico e eqüinos) como reservatórios da infecção para o flebotomíneo vetor do parasita (SOSA-ESTANI *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2005).

Por ser uma doença de cadeia de transmissão complexa, a LT está sujeita a diversos determinantes, incluindo: desequilíbrio ecológico causado pela ação destrutiva do homem, as variações sazonais e a susceptibilidade da população (MARTINS *et al.*, 2004). No Brasil, os principais agentes etiológicos da LT são: *Leishmania Leishmania amazonensis*, *Leishmania Viannia guayanensis* e *Leishmania Viannia braziliensis*. Os reservatórios variam conforme a espécie de *Leishmania*, tendo os principais hospedeiros naturais à preguiça (*Choloepus didactylus*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais e roedores. É freqüente o encontro de várias espécies de animais domésticos como cão (*Canis familiares*), eqüinos (*Equus caballus*), mulas, roedores domésticos ou sinantrópicos albergando a *L. (V) braziliensis*. Os vetores da LT, que apresentam importância epidemiológica variável de acordo com sua localização geográfica, têm período de vida relativamente curto, de duas a quatro semanas. As espécies vetorais potenciais são: *Lutzomyia whitmani*, *L. flaviscutellata*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. Na Bahia as espécies de *Lutzomyia* de maior importância para a LT são: *Lutzomyia whitmani*, *L. intermedia*, *L. migonei* (GONTIJO & CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007)

### 1.1.1 Histórico

Existem relatos de comprometimento humano por *Leishmania* desde a antiguidade (LAINSON, 1997). Cunningham (1985), foi o primeiro pesquisador a descrever o parasito *Leishmania* causando a doença (leishmaniose) no homem na Índia, em casos de LV (BASANO & CAMARGO, 2004).

Em 1885 houve as primeiras suspeitas sobre a ocorrência da doença nas Américas, época em que já se registravam casos no Brasil. Lindenberg, (1909), confirmou a natureza das lesões cutâneas e nasofaríngeas quando encontrou leishmanias em úlceras cutâneas de pacientes no estado de São Paulo idênticas àquelas da *Leishmania tropica* observadas no Velho Mundo. Splendore, (1911), diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, chamou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “ferida brava” ou “nariz de tapir” (LINDEMBERG, 1909;

SPLENDORE, 1911; VIANNA, 1914). Aragão, (1922), demonstrou pela primeira vez o papel do flebotômico na transmissão da LT. Já Pessoa (1939/1940), descreveu a LT como doença profissional em regiões florestais. Forattini, (1958), demonstrou a importância de roedores silvestres parasitados em áreas florestais de São Paulo (PESSOA & BARRETO, 1948; FORATTINI & SANTOS, 1956; USSUI & NEVES, 2001).

Até a década de setenta do século XX, todos os casos de LT no Brasil eram atribuídos a *L. braziliensis*. A partir deste período as técnicas laboratoriais foram aprimoradas, maior número de estudos ecológicos, e epidemiológicos foi realizado, e outras espécies de leishmanias foram descritas. Em 1993, a OMS considerou as leishmanioses como a segunda doença causada por protozoário de maior importância em saúde pública (Aguilar *et al.*, 1989, OMS 1994).

#### 1.1.2 Dados epidemiológicos

A LTA vem sendo descrita em quase todos os países do continente americano, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru. No Brasil apresenta-se em todas as regiões geográficas e sua incidência tem aumentado, nos últimos anos, em todos os estados. No período de 1980 a 1990 foram registrados 154.103 casos, outra estimativa abrangendo os anos de 1995 a 1999, aponta 388.155 casos autóctones de LT. Comparando-se os valores absolutos e o coeficiente de detecção (CD), houve um aumento de 13.654 casos/ano para 30.550 casos/ano e de 10,45 casos/100.000 habitantes para 18,63 casos/100.000 habitantes nestes dois períodos respectivamente (FOLLADOR *et al.*, 1999; GONTIJO & CARVALHO, 2003; BASANO & CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e recentemente na Amazônia. O Ministério da Saúde (MS) registrou média anual de 32 mil novos casos de LT no País, tendo a região Norte notificado aproximadamente 45% destes casos predominando nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a região Nordeste, 26% dos casos, principalmente no Maranhão, Bahia e Ceará; região Centro-Oeste, 15% com maior número de casos em Mato Grosso; a região Sul, 3,0% destacando-se o Paraná (MARZOCHI, 1992; GONTIJO & CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

### 1.1.3 Agentes etiológicos, vetores, e reservatórios.

Nas Américas são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, e, mais recentemente as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (SILVEIRA, 2001).

Alguns critérios para incriminar efetivamente uma determinada espécie de flebotomíneo como vetora de leishmaniose foi sugerida, tendo dois tipos de critérios: essenciais (E) e complementares (C). São eles: antropofilia (E), distribuição espacial em concordância com a ocorrência dos casos de infecção humana (E), atração por mamíferos reservatórios de leishmanias (E), os exemplares experimentalmente infectados com *Leishmania* devem manter, em laboratório, todas as etapas do desenvolvimento parasitário (C), entre outros (KILLICK-KENDRICK & WARDE, 1981; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), são considerados reservatórios da LT às espécies que garantam a circulação de leishmanias na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço. Para definir uma espécie como reservatório, é necessário estabelecer alguns parâmetros como: status taxonômico do animal, distribuição geográfica do hospedeiro e do parasita dentro da área de distribuição do hospedeiro, distribuição microrregional do parasita e reservatórios em distintos ecossistemas dentro de um mesmo bioma, prevalência da infecção entre distintas subpopulações de hospedeiros, a saber: machos e fêmeas, adultos e jovens, entre outros parâmetros (BRASIL, 2007).

Infecções por leishmanias que causam a LT foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos, e eqüídeos). Reservatórios silvestres: foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados, e canídeos silvestres. Com relação aos animais domésticos não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como reservatórios, considerados como hospedeiros acidentais da doença. Nestes animais a LT pode se apresentar como uma doença crônica com manifestações semelhantes as da doença humana (BRASIL, 2007).

A expressão clínica da LTA é variável e depende de alguns fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (CARVALHO, 2002). Dependendo da espécie do parasito e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, o espectro da doença varia de lesões autocicatrizantes, a lesões disseminadas, e fatais (ROMÃO *et al.*, 2007).

A partir da inoculação das formas promastigotas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito, e a resposta imunológica do hospedeiro. Vários setores do sistema imune são ativados, mas à resposta imune celular, específica para *Leishmania*, tem um papel crucial no controle da infecção (BRASIL, 2007). Embora a infecção inicial possa não apresentar sinais e sintomas, o parasita (*Leishmania*) no organismo pode persistir num curso crônico, resultando na doença propriamente dita (WHO, 1990), a doença crônica pode estar associada à exarcebação ou a completa anergia da resposta imune do hospedeiro, resultando na incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção (FOLI *et al.*, 1995).

## 1.2. Aspectos Imunológicos (Sistema Imune)

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e no impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, associadas geralmente com alto índice de mortalidade. É conhecido também que nas doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é superior ao dos que apresentam a doença, mostrando que a maioria das pessoas tem a capacidade de destruir esses agentes e impedir a progressão da infecção. Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, evidências têm mostrado que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com a complexa interação entre o agente e o sistema imune do hospedeiro, podendo causar dano tecidual (PASARE, 2004; CASTELLANO, 2005).

Os neutrófilos, eosinófilos, e macrófagos exercem sua ação microbicida de forma mais ampla contra vários tipos de agentes, e são células importantes para a defesa do hospedeiro. Lima *et al.*, (1997), demonstraram que neutrófilos são células importantes para controlar a disseminação da infecção por *L. major*. Oliveira *et al.*, (1998), demonstraram que eosinófilos ativados produzem NO (óxido nítrico) estando estas células envolvidas na atividade microbicida das formas amastigotas do *L. major*. O macrófago célula importante na defesa contra agentes intracelulares, após serem ativados pelos linfócitos T auxiliares (*helper*) se

tornam a principal célula efetora na eliminação das formas amastigotas da *Leishmania* (LIMA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1998; MACHADO, 2004; BRASIL, 2007).

O sistema imune comunica-se através da secreção de citocinas. Diferente dos hormônios, as citocinas têm uma atuação parácrina (atuação local, próxima às células que as produzem), ou autócrina (diretamente sobre as células que as produzem), e apenas ocasionalmente entram no sistema circulatório para agirem como mediadores endócrinos (MIYAJIMA *et al.*, 1992; KISHIMOTO *et al.*, 1994). As que são liberadas pelos linfócitos Th 1 (linfócitos T *help* tipo 1) são caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatórios), que incluem o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e as secretadas pelas células Th2 (linfócitos T *help* tipo 2) são caracterizadas como inibitórias (anti-inflamatórias) incluindo as interleucina-4, e 6 (IL-4 e IL-6). Dentre estas citocinas secretadas pelos linfócitos, o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  têm demonstrado possuir um importante papel no controle das infecções (MACHADO, 2004; BRASIL, 2007).

As manifestações clínicas das leishmanioses e sua severidade dependem da espécie e dos fatores intrínsecos ao parasito como a resposta imune produzida pelo hospedeiro infectado (MALLA & MAHAJAN, 2006). Modelos experimentais com diferentes linhagens de camundongos foram estudados a fim de se obter um melhor entendimento para infecções humanas e mecanismos imunológicos e genéticos de resistência frente a *Leishmania*. Linhagens de camundongos C57BL/6, C3H/HeJ e CBA normalmente resistentes a *Leishmania major* conseguem curar a lesão espontaneamente, esta resistência depende da geração de uma resposta Th1, com produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com a conseqüente indução do óxido nítrico (FONSECA *et al.*, 2003), já os camundongos BALB/c que são susceptíveis quando infectados pela mesma espécie, desenvolvem lesões progressivas e disseminadas mediada pela resposta Th2 com secreção das citocinas IL-4 e IL-10 (LAUNOIS *et al.*, 1995; MATTNER *et al.*, 1996; KOPF *et al.*, 1996; HIMMELRICH *et al.*, 2000). Assim a resistência à infecção pela *L. major* está ligada a uma resposta do tipo Th1, enquanto que a resposta Th2 está envolvida com a susceptibilidade à infecção.

O NO produzidos pelas células inflamatórias é efetivo contra diversos patógenos, como o *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992) *M. leprae* (ADAMS *et al.*, 1991) *L. major* (GREEN *et al.*, 1990), produzidos a partir da oxidação da L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) (PALMER *et al.*, 1998; QUEIROZ & BATISTA 1998). As

citocinas são importantes moduladoras da expressão desta enzima, citocinas do tipo Th1 induzem a produção de iNOS (DRAPIER *et al.*, 1988) enquanto que o perfil Th2 inibe a indução (BALDA & PACHECO-SILVA, 1999).

Estudos têm mostrado que a expressão de IFN- $\gamma$  é um dos maiores estímulos para a ativação de macrófagos em infecções agudas, sendo um fator relevante na morte de alguns parasitas intracelulares pela via óxido nítrico (NO)-dependente, ativando macrófagos e estimulando a produção do TNF- $\alpha$ . Esta desenvolve importante função na amplificação da produção de óxido nítrico eliminando o parasito (SILVA *et al.*, 1995; D'OLIVEIRA-Jr *et al.*, 2002).

Uma vez expresso o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  irão produzir produtos oxigenados e óxido nítrico, dois componentes importantes para destruição da *Leishmania*, onde nos dá a idéia de que pacientes com altos níveis destas citocinas possam ter uma melhor chance de cura da doença (D'OLIVEIRA Jr *et al.*, 2002). O TNF- $\alpha$  também é responsável pela ativação policlonal de células B tendo uma considerável indução da resposta imune humoral com produção de anticorpos anti-*Leishmania*, sendo uma proteína importante no processo inflamatório (LIEW *et al.*, 1989; BRASIL, 2007).

Este conceito de que uma potente resposta Th1 seja protetora deve ser visto com reserva, pois, após, estimulado com antígeno de *Leishmania* as células de sangue periférico (CMSP) de indivíduos infectados com as formas cutânea e mucosa, produzem grande quantidade de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , e pouca IL-10. Como o sistema imune não destrói completamente as leishmanias, a forte resposta destas citocinas secretadas pelo linfócito Th1 leva a ocorrência de uma reação inflamatória intensa e a dano aos tecidos, resultando no aparecimento de úlceras na pele e mucosa. Assim a produção acentuada de TNF- $\alpha$  e de NO tem importante participação no dano tecidual (JESUS, 1998; MACHADO, 2002).

Estes dados indicam que uma atuação equilibrada do sistema imunológico é importante para a contenção do parasito sem destruição tecidual, fazendo com que, embora possa continuar presente, o agente infectante não cause doença no homem (MACHADO, 2004).

Por possuir uma atividade antitumoral, antimicrobicida, e antiviral o TNF é considerado uma citocina chave na imunidade do hospedeiro, além de induzir o crescimento

tissular, diferenciação de tecidos e imunoregulação. Em indivíduos sadios seus níveis variam entre não detecção a 50 pg/mL, níveis superiores a 100pg/mL estão geralmente associados a morbidade (AGUILLÓN *et al.*, 2001). Esta citocina estimula a síntese de vários grupos de moléculas de adesão celular, induz mudanças vasculares, afetando a adesão de leucócitos promovendo a atividade pro coagulante, podendo ocorrer choque séptico, devido à coagulação intravascular disseminada, se estes efeitos ocorrerem em grande escala (BEG *et al.*, 1996). O aumento de seus níveis está relacionado com a patogênese de doenças associadas ao CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade) principalmente aquelas com um componente inflamatório e auto-imune a exemplo do lúpus eritematoso sistêmico, diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, processos infecciosos como choque séptico e crônico e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AGUILLÓN *et al.*, 2001).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida por macrófagos em resposta a uma vasta variedade de agentes infecciosos defendendo o hospedeiro contra infecções causadas por microorganismos, tal como: *Baccillus Calmette-Guérin*, *Clamydia trachomatis* (KINDLER *et al.*, 1989) *Listeria monocytogenes* (HAVELL, 1987) *Trypanossoma cruzi* (WIRTH & KIERSZENBAUM, 1988) e *Plasmodium chabaudi adami* (CLARK *et al.*, 1987).

Evidências indicam que a variação na produção de citocinas pode estar associada a diferentes polimorfismos genéticos, determinando a resposta imune durante a doença. Diferentes formas alélicas de vários genes de citocinas são conhecidas até o momento, inclusive os polimorfismos de base única (*SNPs-Single Nucleotide Polimorphisms*) no promotor do TNF nas posições -238 e -308. Nestes polimorfismos ocorrem mutações que podem estar associadas a diferenças na expressão gênica e secreção da proteína, embora existam controvérsias (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Estudos relacionados às leishmanioses têm mostrado a influência de vários polimorfismos genéticos na resistência ou susceptibilidade da doença, pois muitos dos polimorfismos parecem estar ou não relacionados ao aumento do TNF- $\alpha$  (SCUDERI *et al.* 1986; CABRERA *et al.*, 1995).

### 1.3 Polimorfismos genéticos

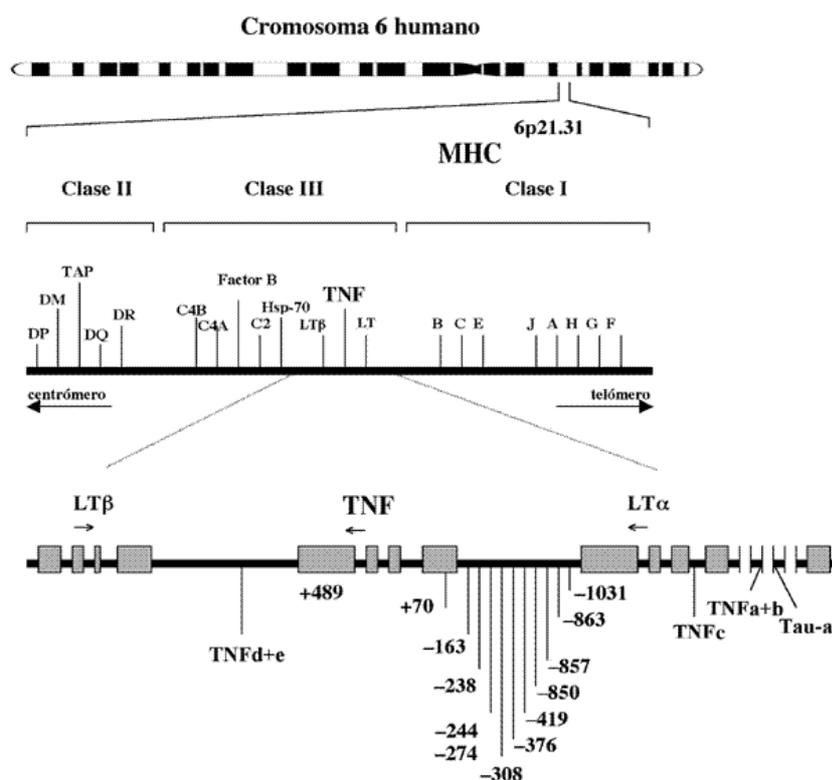
Dentre os vários tipos de polimorfismo de DNA, existem os SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) que são substituições de uma única base dentro da seqüência gênica analisada ou ainda os VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) que são polimorfismos representado pelos microssatélites, que possuem repetições de 2 a 8 bases repetidas “in

*tandem*”, dentro de uma região flanqueada por seqüências não repetitivas (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1990; EDWARDS *et al.*, 1991) e pelos minissátélites, com repetições de 10 a 100 (CHAMBERS & MCAVOY, 2000). Os microssátélites, ou STRs (*Short Tandem Repeats*), são marcadores que contêm muitos alelos em cada *locus*. Com a utilização da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), estes marcadores podem ser amplificados a partir de iniciadores situados nas regiões não repetitivas flanqueadoras (WEIR, 1992), gerando produtos que variam, geralmente, entre 100 e 300 pb (SCHUMM, 1997; DOLINSKY & PEREIRA, 2007).

Estes marcadores são amplamente utilizados na genética, sendo úteis não só na construção de mapas genéticos (MURRAY *et al.*, 1994; CAVALLI-SFORZA 1996) identificação genética (LINS *et al.*, 1996) e estudos populacionais (GILL & EVETT, 1995), como, também, para análises de ligação (HUANG, *et al.*, 1991; DOLINSKY & PEREIRA, 2007). Certas doenças neurodegenerativas, como distrofia miotônica, e doença de Huntington, assim como, a Síndrome do X frágil é causada pelas expansões, instáveis e anormais (aumento excessivo), do número de repetições, “*in tandem*”, de trinucleotídeos (WEBER & WONG, 1993), situadas dentro, ou nas proximidades dos genes responsáveis por estas doenças (ROSENBERG, 1996).

Os microssátélites estão distribuídos em regiões codificantes de proteínas, regiões não traduzidas (UTRs), e íntrons. Dados substanciais indicam que não somente as expansões, assim como, as contrações em regiões que codificam proteínas podem levar a um ganho ou perda de função do gene via mutação *frameshift*, podendo também assim liderar a mudança na produção de TNF $\alpha$  (LI *et al.*, 2004).

O gene *TNF* está localizado dentro do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade) no cromossomo 6p21.3 no HLA região de classe III, a 250 Kb centromérico da *HLA-B* e 850Kb telomérico da classe II HLA-DR (HAMAGUCHI *et al.*, 2000) possui cerca de 12kb de comprimento consistindo em dois genes arranjados, “*in tandem*”, proximamente ligados, que codificam as citocinas proinflamatórias TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  (figura 1).



**Figura 1: Localização cromossômica do TNF**

Alelos TNF são encontrados em forte desequilíbrio de ligação com alelos HLA de classe I e II, bem como outros alelos da mesma região e provavelmente, defeitos regulatórios ou estruturais nos genes *TNF* podem contribuir para patogênese de doenças associadas ao HLA (MAKHATADZE, 1998). Os genes do *TNF* possuem muitas regiões polimórficas, incluindo regiões de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e *STRs* entre esta, estão cinco microssatélites, os quais suas seqüências já foram identificadas, consistindo de repetições “*in tandem*” de dinucleotídeos, os quais foram chamados de *TNFa*, *TNFb*, *TNFc*, *TNFD* e *TNFe* cada um com 14, 7, 2, 7, 4 alelos respectivamente demonstrado na tabela 1 (UDALOVA *et al.*, 1993; TSUKAMOTO, 1998).

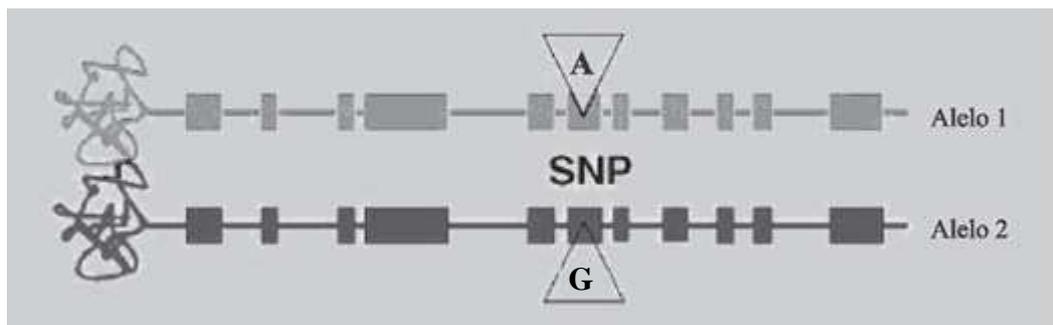
Alguns estudos nos genes de citocinas mostraram que diversos polimorfismos em regiões reguladoras destes genes podem ser responsáveis pela variabilidade na produção destas citocinas (WILSON *et al.*, 1997; PRAVICA *et al.*, 1999). A maioria destes polimorfismos são do tipo SNPs localizados na região promotora e no próprio éxon em regiões intrônicas (microssatélites). O estudo das freqüências alélicas e genotípicas destes polimorfismos únicos de nucleotídeos nos genes de citocinas pode ser útil em estudos com

populações saudáveis de diversas regiões, estudo de associação com doenças infecciosas e autoimunes e estudos antropológicos (FRANCESCHI *et al.*, 2009).

O aumento da expressão do TNF com conseqüente desenvolvimento de enfermidades inflamatórias crônicas e autoimunes poderia ser explicada pela presença de polimorfismos em seu gene, se tem sugerido que tanto a variabilidade das regiões promotoras, como a participação de fatores de transcrição associados, modulariam a taxa de resposta secretora desta citocina (PRAVICA *et al.*, 1999).

Muitos polimorfismos identificados na região promotora foram associados à regulação da transcrição do TNF (WILSON *et al.*, 1997). SNPs localizados na posição -308 e -208 da região promotora do *TNF* tem sido comumente estudado, ambos os polimorfismos são caracterizados por substituições de uma guanina (G) por uma adenina (A), que modifica o sitio de transcrição e afeta a taxa de transcrição (KROEGER *et al.*, 1997; CAVALEIRO & FONSECA, 2004) (Figura 2), que induz uma migração eletroforética diferencial em gel de poliacrilamida pela modificação da dupla hélice (POCIOT *et al.*, 1995). O polimorfismo na posição -308 afeta a expressão do gene onde o raro alelo A resulta no aumento da taxa de transcrição “*in vitro*” (BOUMA *et al.*, 1996; KUBASZEK *et al.*, 2003; DITTIMAR *et al.*, 2009). Já o também raro alelo A na posição -238 tem sido associado com a redução na produção de TNF (SHAW *et al.*, 2001), sendo possível uma forte interação entre estes dois marcadores (KROEGER *et al.*, 2000).

Estudos de famílias apresentaram uma herança de 60% de variabilidade na produção do TNF entre indivíduos podendo ser geneticamente determinada. Esta citocina tem sido bem caracterizada como uma das moléculas mais importantes nas respostas imunológicas, inflamatórias e fisiopatológicas. Estudos têm sugerido que os polimorfismos dos genes *TNFs* podem estar relacionados com a susceptibilidade ou severidade em várias doenças inflamatórias e parasitárias (CAMPELO, 2007; VERWEIJ, 2007).



**Figura 2:** Figura mostrando um Polimorfismo de nucleotídeos únicos, uma substituição de base de Adenina (A) pra Guaina (G).

Estudos realizados com o polimorfismo do gene do *TNF* demonstraram que a presença do alelo A (*TNF2*) um SNP na posição-308 está associada com a susceptibilidade a várias enfermidades como: malária cerebral, hanseníase e leishmaniose tegumentar (McGUIRE *et al.*, 1994; CABRERA *et al.*, 1995; ROY *et al.*, 1997). Por outro lado um SNP na posição -238, associado à diminuição da transcrição do *TNF- $\alpha$* , na presença do alelo mutante-238A serve como elemento protetor em paciente com artrite reumatóide (VERWEIJ, 2007), dengue e HIV (HILL *et al.*, 1996). Injeções de *TNF* em lesões infectada dos ratos diminuíram o tamanho da mesma, demonstrando assim ter uma importante função em mediar à proteção do hospedeiro contra as leishmanioses (LIEW *et al.*, 1989). Estes dados demonstraram que a variação genética dentro do *loci TNF* é importante na susceptibilidade a doenças.

Determinar se uma variante polimórfica é diretamente responsável por um fenótipo ou se está associada a alguma doença, torna-se difícil quando o gene em questão está situado na região CPH, devido ao forte desequilíbrio de ligação entre os alelos de genes situados nessa região. Associações entre haplótipos CPH e fenótipos *TNF- $\alpha$*  podem não ser atribuídos ao próprio *TNF- $\alpha$* , mas sim a variações presentes em genes ligados ao *TNF- $\alpha$*  que direta ou indiretamente regule sua expressão. Deste modo é importante mostrar o efeito funcional direto das variantes polimórficas nas posições -308 e -238, para que possamos interpretar corretamente os estudos de associação relacionados a marcadores *TNF- $\alpha$* .

## 2. JUSTIFICATIVA

Uma das principais regiões consideradas endêmicas de LT do estado da Bahia é o Sudoeste, que juntamente com a região Sul formam o maior circuito de produção de LT no Estado (COSTA, 2005).

Dados do Centro de Referência de Doenças Endêmicas Pirajá da Silva (CERDEPS/PIEJ-SESAB) mostraram que entre os anos de 1995 e 2000 foram notificados 273 casos, sendo que (137) 50,2% eram procedentes do distrito de Florestal-Município de Jequié (BA). Costa 1986 evidenciou durante um surto na mesma região uma prevalência de 31,1% o que torna a localidade de Florestal uma área de grande importância para o estudo da doença, por ser considerada uma área de risco, segundo o Ministério da Saúde (MS) que define como tal a região que apresenta notificação de um ou mais casos de LT nos últimos dez anos e que mantém uma periodicidade na produção de casos (MS, 2007).

Para definir estratégias e ações de controle e prevenção para LT, devem ser considerados tanto os aspectos epidemiológicos quanto aspectos genéticos (SOSA-ESTANI *et al.*, 2001; BRASIL, 2007). Para a prevenção das doenças não devemos observar somente a exposição dos indivíduos a fatores ambientais, mas sim o efeito recíproco da susceptibilidade genética e esses fatores. Mesmo que o risco relativo a um determinado fator de risco seja alto, devemos também considerar a existência de um risco atribuível, onde nem toda a ocorrência de uma doença, possa ser devido a uma exposição específica, desta forma, do ponto de vista clínico, se faz importante ter em mente o efeito entre fatores genéticos e ambientais na causa e expressão de uma doença (GORDIS, 2004).

Nossa perspectiva é que com este estudo possamos estabelecer o perfil epidemiológico da área de estudo, correlacionando os fatores de risco já bem estabelecidos na literatura com os diferentes grupos de indivíduos infectados e não infectados a partir de inquérito epidemiológico na população e caracterizar marcadores moleculares (*SNP-Single Nucleotide Polymorphism*) da região promotora do TNF- $\alpha$ , que poderão estar envolvidos na susceptibilidade ou resistência da doença LT na comunidade de Florestal-BA. A associação de algumas doenças a variações genéticas no *locus* TNF e nos STRs encontrados neste gene indica uma necessidade de se avaliar as frequências de alguns marcadores ai situados, nos indivíduos susceptíveis e resistentes a infecção por *Leishmania sp*, com o objetivo de avaliar a

influência destes fatores nesta enfermidade. A possível associação destes marcadores (SNPs) do TNF com esta doença tem grande importância clínica, pois poderá contribuir para prevenção, tratamento promovendo novos alvos terapêuticos e diagnóstico mais efetivo. Além de identificar subgrupos da população com risco aumentado para a infecção.

### **3. HIPÓTESE**

A hipótese de nosso estudo é que indivíduos infectados por *Leishmania sp* tenham relato de maior contato a possíveis fatores de risco que favoreçam uma maior exposição ao flebótomo, por conseguinte, maior taxa de infecção por *Leishmania sp* e que cada subgrupo da população apresente diferentes frequências alélicas e genotípicas, entre os polimorfismos na posição -308 e -238 da região promotora do *TNF*, podendo existir assim, uma possível associação com a resistência ou susceptibilidade à doença.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral:

- Caracterizar alelos e genótipos do TNF que possam estar relacionados com susceptibilidade e resistência *Leishmania sp.*
- Estabelecer a prevalência dos fatores de risco para aquisição da infecção por *Leishmania*, existente na comunidade.

### 4.2 Específicos:

#### 4.2.1 Primários

- Estimar as frequências alélicas genótípicas relacionadas com susceptibilidade e resistência a *Leishmania sp.*;
- Comparar as frequências dos alelos e genótipos do TNF nos indivíduos positivos e negativos no exame sorológico ELISA;

#### 4.2.2 Secundários

- Estimar a prevalência da infecção por *Leishmania sp* em uma comunidade rural de área endêmica da Bahia;
- Conhecer o perfil sócio-econômico, cultural, e demográfico da população a ser estudada;
- Correlacionar a ocorrência de infecção a variáveis ambientais, sociais e demográficas da população;

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

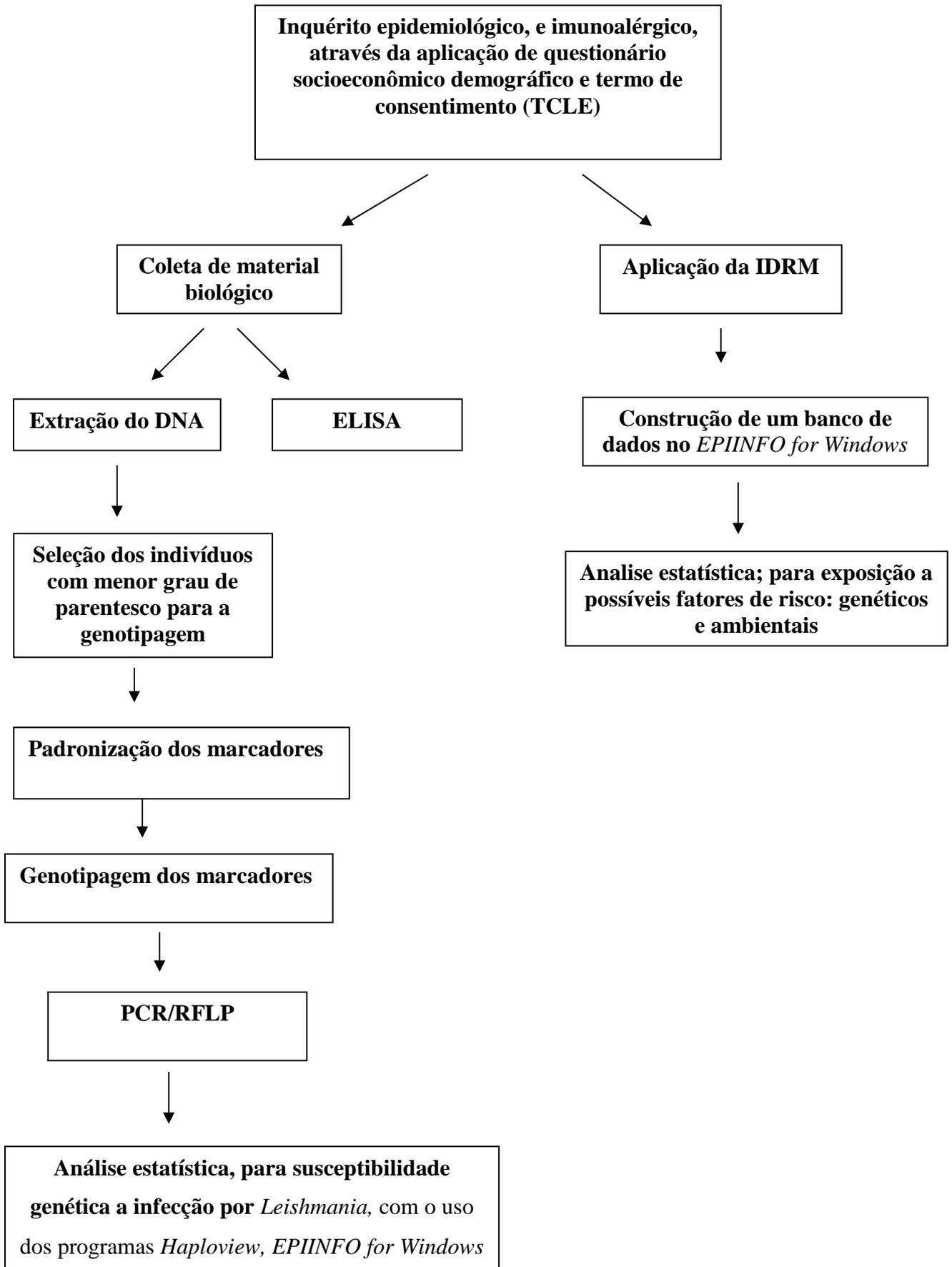
Este estudo é parte integrante de um projeto maior coordenado por Dr. Jackson Costa, pesquisador titular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ-BA, intitulado “Relação Parasita-Hospedeiro na co-infecção HIV x *Leishmania sp* e sua evolução para a Leishmaniose Tegumentar” financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e PRONEX (CNPq e FAPESB).

### 5.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, analítico, observacional desenvolvido em duas etapas:

- 1ª etapa: estudo de corte transversal - foi conduzido um inquérito epidemiológico e imunoalérgico (anexo I), através da aplicação de questionário socioeconômico, demográfico, e realização dos exames imunológicos, intradermorreação de Montenegro (IDRM), e sorológico (enzyme linked immunosorbant assay/ELISA), que nos permitiu calcular a prevalência da infecção por *Leishmania sp* e possíveis fatores de risco para a infecção da mesma;
- 2ª etapa: estudo analítico: foram avaliados os polimorfismos genéticos do “*loci*” do TNF para comparar 3 subgrupos da população, infectado, (infectado/doente) e não infectado, a fim de se obter alguma associação deste “*loci*” com a susceptibilidade e resistência a infecção por *Leishmania sp*.

## 5.2 Desenho do Estudo



### 5.3 Área do Estudo

Após análise dos dados do Ministério da Saúde (MS), Secretaria de Saúde da Bahia/ (SESAB) e do Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva (CERDEPS/PIEJ)-SESAB/Bahia, identificou-se como área ideal para o desenvolvimento do estudo a região Sudoeste compreendendo o distrito de Florestal (Município de Jequié).

Distrito de Florestal - pertence ao município de Jequié, situado na zona da mata Atlântica, apesar do evidente desmatamento que permite visualizar a floresta tropical primária somente em poucas áreas próximas as serras. Apresenta clima quente e úmido com precipitação média de 1.200mm/ano, umidade relativa média do ar de 78% e temperatura oscilando entre 16 e 37°C, relevo acidentado.

Possui uma altitude que varia entre 600 à 800 metros acima do nível do mar, distante 30km da cidade de Jequié (sede do Município), seu acesso se dá através da rodovia BR-330 com pavimentação asfáltica. Interliga-se ainda ao município de Gandú pela BR-330/BR-101 até a cidade de Salvador/Bahia (Figura 3).



**Figura 3: Localização geográfica do município de Jequié, local onde foi desenvolvido o estudo (fonte: [http://www.a-bahia.com/diretorio/index.php?cat\\_id=528](http://www.a-bahia.com/diretorio/index.php?cat_id=528))**

A população do distrito de Florestal, cuja colonização teve início na década de 40, é constituída em sua maioria de descendentes de africanos, portugueses e indígenas. De acordo com o último censo do IBGE em 2000, o distrito possuía cerca de 6.907 habitantes, densidade

demográfica de 32,9 hab/km<sup>2</sup>, sendo que 88,5% da população reside na área rural (Prefeitura Municipal de Jequié, 2005).

A área rural é composta de “fazendas” com distâncias variadas da sede do distrito, limites imprecisos e acessos através de estradas de terra. As habitações localizam-se geralmente em clareiras, sendo desprovidas, algumas vezes de água encanada, mas possuindo luz elétrica. As atividades agrícolas concentram-se nas plantações de cacau, banana e outras culturas de subsistências. O difícil acesso, especialmente nos períodos de chuva, à falta de saneamento básico, e apenas um posto de saúde com atendimento médico permanente, constituem fatores que contribuem para que a maior parte da população residente na área rural sofra as conseqüências da pobreza em que vive (Figuras 4 e 5).

O índice de analfabetismo é de 60% na população rural. A sede do Distrito de Florestal compõe-se de uma rua principal e cinco ruas transversais. Possui fornecimento de energia elétrica e água encanada e tratada. Nos últimos cinco anos, a média de pacientes com a forma cutânea atendidos no CERDEPS/PIEJ procedente de Florestal foi de 28 casos/ano, enquanto que, para a forma mucosa foi <1 caso.



**Figura 4:Aspecto de uma moradia encravada em clareira aberta na mata, ao redor mostra relevo e vegetação encontrada na região de Florestal (fonte: Jackson Costa)**



**Figura 5: Aspecto do relevo e vegetação encontrada na região de Florestal (Distrito de Jequié)**  
**(fonte: Jackson Costa)**

#### 5.4 Sujeitos do Estudo:

Através das fichas dos pacientes que foram tratados no PIEJ vindos de Florestal foi feita uma pesquisa sobre a área de procedência destes, assim selecionamos aleatoriamente as famílias que se situavam nessas áreas para participarem do inquérito imunoalérgico. O referente inquérito realizado no Distrito de Florestal constatou de 129 famílias, perfazendo um total de 480 indivíduos, onde visamos avaliar a prevalência da infecção/doença LT nesta área e sua susceptibilidade genética.

Uma equipe formada por médicos, biólogos, enfermeiras, estudantes de graduação e agentes de saúde, foram treinados e orientados anteriormente para a realização dos questionários, coleta de sangue e aplicação da IDRM e sua leitura, para isso várias viagens ao campo foram necessárias para a realização deste inquérito.

O instrumento utilizado na pesquisa foi um questionário aplicado em forma de entrevista, desenvolvido e validado no projeto maior do qual faz parte, onde continham informações socioeconômicas, preenchidos em algumas visitas na região de Florestal área em

que o estudo foi realizado (Anexo1). Durante a aplicação dos questionários foi realizada a coleta de sangue para extração do DNA e realização do ELISA além da aplicação das IDRMs feitos na residência com a devida autorização, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 2).

Durante a realização do referido inquérito foram avaliados diversas variáveis, dando-se ênfase aos aspectos sócio-demográficos (renda familiar, atividade exercida, escolaridade, esgotamento, destino de dejetos e lixo, tipo de roupa no trabalho, presença de animais e reservatórios de *Leishmania sp*; da moradia, tipo de cobertura das casas, número de cômodos, tipo de piso, borrifação, uso de mosquitoireiro) além do perfil dos indivíduos (idade, sexo, raça, procedência) da área estudada dos indivíduos incluídos no inquérito, realizando uma análise dos dados coletados, buscando identificar possíveis fatores associados a maior risco de infecção pela *Leishmania sp* no distrito de Florestal.

Destes indivíduos que fizeram parte do inquérito, foram formados três subgrupos. O primeiro composto por indivíduos que informaram ter tido a doença anteriormente e apresentaram ELISA(+), considerados infectados para *Leishmania sp*, o segundo subgrupo composto pelos indivíduos que apresentaram ELISA(-) (controles), e o terceiro subgrupo composto pelos indivíduos que apresentaram ELISA(+), e não apresentaram anteriormente a doença. Todos os grupos de indivíduos são de uma mesma área e tiveram a mesma chance de exposição. Foram avaliados possíveis fatores de risco (variáveis de exposição) a infecção, e as frequências alélicas e genotípicas do gene do *TNF- $\alpha$* , visando analisar os diferentes polimorfismos apresentados nos três grupos.

#### 5.5 Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo indivíduos maiores de um ano de idade, com mais de seis meses de residência no local, que preencheram os questionários e concordaram em assinar o TCLE para coleta do sangue e aplicação do IDRMs.

#### 5.6 Critérios de exclusão:

Foram excluídos indivíduos que não concordaram em participar do estudo e se recusaram a assinar o TCLE, com menos de seis meses de residência no local estudado e que pediram para ser retirado do estudo em qualquer momento da realização do mesmo.

## 5.7 Coleta do Material Biológico:

Para a coleta do sangue realizada no domicílio do indivíduo foi formada uma equipe capacitada para a função, estes estavam munidos de todo material necessário para a execução do trabalho, como: seringas descartáveis, tubos *vacutainers* com EDTA, algodão embebido em álcool isopor com galerias e gelo artificial, garrote, escalpe, caixa para descarte de materiais perfuro cortantes e biológicos. Para a extração do DNA e sorologia foi coletado 15ml de sangue de cada indivíduo, após a assepsia do local, estes sangues foram mantidos refrigerados no tubo devidamente identificado dentro de isopor com gelo até serem rapidamente levados para o laboratório do CERDEPS/PIEJ no município de Jequié, onde foram estocados até serem levados ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz/CPqGM-FIOCRUZ, Bahia.

## 5.8 Avaliação para Exposição ao Parasito

Para avaliar se os indivíduos foram infectados com a *Leishmania sp*, realizou-se juntamente com os inquéritos, a IDRМ, e posteriormente foram feitos o teste sorológico ELISA para detectar anticorpos anti-*Leishmania*.

## 5.9. Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

A IDRM foi realizada em 215 (44,8%) indivíduos dos 480 indivíduos selecionados como amostra, devido o prazo para a leitura das IDRMs aplicadas ser de 48 a 72hs, Florestal ser uma região acidentada de difícil acesso, com casas muito distantes umas das outras, os indivíduos estarem ausentes durante as leituras das IDRMs por terem que sair para trabalhar ou ir a feira na zona urbana, muitos resultados das IDRMs foram perdidas diminuindo o tamanho amostral.

O antígeno utilizado foi preparado da seguinte maneira: formas promastigotas de leishmanias foram lavadas duas vezes em solução salina tampão (pH 7,2), centrifugadas e resuspensas em água destilada e sonicadas (cinco períodos de um minuto a 20KHz a 4°C). Amostras da suspensão foram utilizadas para a determinação do conteúdo usando o micrométodo de Kjeldahl (CUBA *et al.*, 1986). A solução foi ajustada à concentração de  $5 \times 10^6$  flagelados mortos contendo 30µg/mL, com salina fenolada sendo estes antígenos conservados a 4°C. Injetou-se com seringa do tipo tuberculina 0,1mL da suspensão de antígeno de Montenegro via intradérmica, na face anterior do antebraço direito. O antígeno

utilizado foi proveniente do laboratório de Imunoparasitologia/LIP do CPqGM/FIOCRUZ-Bahia.

A leitura da reação foi efetuada com 48 a 72 horas após o inóculo, utilizando régua milimetrada; a interpretação baseou-se na área de induração apresentada, sendo adotados os seguintes valores de referência: <5mm (= negativo), ≥5mm (= positivo) (PESSOA & PESTANA, 1941; CUBA *et al.*, 1984).

#### 5.10 Sorologia para *Leishmania* (Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay - ELISA )

A sorologia ELISA foi feita no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) - CPqGM por um profissional experiente na realização do teste sorológico para anticorpos anti- *leishmania sp.* Realizando 343 sorologias para *leishmania sp.*, pois nem todos os indivíduos aceitaram fazer a coleta de sangue.

Foram coletados 8 a 15ml de sangue em tubos tipo “vacutainer” sem heparina, deixando-se coagular à temperatura ambiente. Realizou-se em seguida centrifugação da amostra e separação do soro com pipetas do tipo “Pasteur” de forma asséptica, sendo à amostra colocada em tubos estéreis, identificadas, e datadas. Posteriormente, estes soros foram mantidos a uma temperatura de 4°C em refrigerador, para serem acondicionados em caixas térmicas e transportados para o Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz/Ba onde foram submetidos à técnica de ELISA, que consta das seguintes etapas:

Preparação do antígeno - cepa de *L. amazonensis* foi cultivada em meio LIT (infusão de fígado e triptose) com 10% de soro bovino fetal. Parasitas foram recuperados na fase logarítmica, após três lavagens com tampão fosfato (PBS) pH 7,0 a 4°C por 10 minutos, foram ajustados a uma concentração de  $5 \times 10^9$  parasitas/ml para preparação de antígeno. Parasitas foram lisados em água destilada estéril por 10 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento rápido. O material foi então centrifugado a 16.000xg em centrífuga (Eppendorf 5402) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (solução antigênica) será estocado em pequenas alíquotas, e a sua concentração protéica verificada utilizando o método de LOWRY *et al.*, (1951).

Diluição do soro: Em placas de microtitulação com fundo redondo foram preparadas às diluições do soro, adicionando-se 10µL de PBS pH 7,4 contendo 0,005% Tween 20

(PBS/Tween). Em seguida, transferiu-se 20 $\mu$ L desta diluição de soro para a placa sensibilizada com o antígeno, a qual já irá conter 80 $\mu$ L, ficando uma diluição final de 1:100.

Reação: Placas de microtitulação (NUNC-Intermed, Denmark) foram sensibilizadas com antígeno de *L. Lamazonensis* na concentração de 10 $\mu$ L/mL (0,1mL/poço ) em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 incubadas durante a noite a 4°C. Antes do início da reação, as placas serão lavadas 3 vezes co PBS Tween e incubadas com soros diluídos a 1:100 por uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem da placa sensibilizada, colocou-se 150 $\mu$ L de solução de bloqueio em cada poço e deixar de 1 a 2 horas na estufa a 37°C. Após a lavagem com PBS Tween como descrito acima foi adicionado o conjugado anti-IgG humano (cadeia gama específico) ligado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical Company). Novamente após esta incubação, as placas foram lavadas e adicionadas 100 $\mu$ L/poço de substrato. O substrato utilizado foi o p-nitrofenilfosfato dissódico (SIGMA), diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 com 1mL de MgCl<sub>2</sub> na concentração de 1mg/mL. Após 20 minutos à temperatura ambiente, estando os controles positivos com uma coloração esverdeada, a reação será interrompida com a adição de NaOH a 3M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro multicanal para leitura de placas de microtitulação com filtro 405nm (Titesk-multican Spectrophotometer Flow-Laboratories Ayreshire Scotland).

O resultado foi expresso em absorbância e as diferenças das amostras que foram analisadas devem ser consideradas ao se expressarem os resultados, mas independentemente do método escolhido para relatá-los, foi necessário determinar o limite de reatividade ou “cut-off”. Valores acima do limiar de reatividade eram considerados positivos.

#### 5.11. Marcadores e Indivíduos Selecionados para Análise Genética:

As análises genéticas foram realizadas no laboratório de parasitologia e extensão (LAPEX) –CPqGM por um profissional com experiência nas técnicas genéticas realizadas neste trabalho.

Foram utilizados marcadores (SNPs) localizados na posição -238 e -308 da região promotora do TNF- $\alpha$  localizados dentro do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade). Para o estudo destes marcadores foram selecionados os indivíduos com menor grau de parentesco para evitar que determinado genótipo e/ou alelo sejam privilegiados.

Estes marcadores que estão localizados na posição -308 e -238 na região promotora do TNF, possuem respectivamente 107 e 165 pares de bases (tabela 1), ambos possuem um sítio de restrição artificial produzido pelos *primers* durante a amplificação dessas regiões, para a atuação das enzimas *NcoI* e *Bam-HI* (tabela 1)

**Tabela 1: Características dos SNPs da região promotora do TNF nas posições -308 e -238**

TNF	-308	-238
Tamanho (pb)	107	165
Enzima de restrição	<i>NcoI</i>	<i>Bam-HI</i>

A enzima *NcoI* reconhece a sequência C\*CATGG (alelo G) do TNF 308 cortando o fragmento em 87 e 20 pb. No caso do alelo A não há local de restrição e no gel o fragmento migra mais lentamente porque tem 107 pb. Já a enzima *Bam-HI* reconhece a sequência G\*GATCC (alelo G) do TNF-238 fragmentando a sequência do gene em 142 e 23pb.

#### 5.12 Extração de DNA

O sangue coletado foi levado ao Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva–CERDEPS-SESAB/Bahia, onde foi adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) para conservar, antes de ser guardado no freezer, posteriormente tal material, foi levado para o Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz em caixas de isopor, para a extração do DNA genômico das células mononucleares a partir do protocolo de tratamento com proteinase K e extração com Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico.

Lavagem para a obtenção do pelet (DNA): cerca de 2mL de sangue foi colocado em um tubo Falcon devidamente identificados de 50mL, foi completado com salina e centrifugado por 1.000 rpm /10', a salina foi descartada, e iniciou-se a lise das hemácias com 20mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1X. Logo após foi adicionado 2,0mL de PBS 10X para bloquear a lise, e foi centrifugado por 1.000rpm/10'. O sobrenadante foi descartado, e a lise foi repetida por mais três vezes.

O pelet foi ressuspensão em 250µL de TEN (10-10-0,15), onde foi adicionado 7,4µL de SDS 20%, 10µL de proteinase K (10mg/mL) e incubado a 65°C por 2h ou 37°C over night. A solução foi colocada em um tubo de eppendorf de 1.5mL, também identificado, onde foi adicionado 250µL de TEN (10-10-0,65), 250µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, que foi vigorosamente agitada, antes de ser centrifugada a 10.000/10'. A fase aquosa foi recuperada em outro tubo de eppendorf de 1.5mL, onde foi completado com etanol absoluto e levado ao freezer a -70°C por 2h ou a -20°C over night para precipitar. Depois da fase de precipitação o pellet foi centrifugado por 10.000rpm/20', o etanol foi descartado e adicionou-se ao tubo 1mL de etanol 70%. O pellet foi novamente centrifugado por 10.000rpm/10' e o etanol descartado, o pellet ficou secando na bancada antes de ser ressuspensão em 50µL de água para PCR.

-Preparação do TEN (10-10-0,15): foi adicionado em um tubo Falcon de 50mL, 200 µL de Tris-Base (1,5M pH7,5), 3mL de EDTA (100mM pH8,0), 0,262g NaCl e completado com 30mL de água pirogênica.

-Preparação do TEN (10-10-0,65): foi adicionado em um tubo Falcon de 50mL, 200 µL de Tris-Base (1,5M pH7,5), 3mL de EDTA (100mM pH8,0), 1,13g NaCl e completado com 30mL de água pirogênica.

### 5.13 Amplificações dos segmentos de DNA

Para a região promotora do TNF $\alpha$  foi utilizado PCR (Polimerase Chain Reaction) seguido de digestão por endonucleases de restrição (PCR-RFLP). A localização cromossômica, bem como as seqüências iniciadoras que foram usadas para amplificar os segmentos de DNA de cada “*loci*” estão na Tabela 2.

**Tabela 2: Seqüências iniciadoras usadas para amplificar o segmento de DNA para cada “*loci*”**

<i>Loci</i>	Localização cromossômica	Seqüências iniciadoras	Referência bibliográfica
TNF-238	6p21.3	5'AGGATACCCCTCACACTCCCCATC 3'AAACAGACCACAGACCTGGTC3'	D'Alfonso & Richiardi 1993
TNF-308	6p21.3	5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG3'	3' Wilson 1986

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se uma mistura de reação constituída por:

- . 18,2 µl de água para PCR;
- . 3,00µl de tampão 10X (Tris-HCl 200 M pH 8,4 e KCl 500 mM) fornecido com a enzima;
- . 1,5µl MgCl<sub>2</sub>
- . 0,25 µl de solução de dNTP;
- . 0,5 µl de cada iniciador, específico para cada *locus*;
- . 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase.

O volume de cada um dos componentes, utilizados na mistura de reação da PCR, foi multiplicado pelo número de amostras a serem analisadas e misturados em tubos de 1,5mL para garantir a homogeneidade das reações.

Uma alíquota de 100 ng de cada amostra do DNA genômico estocado foi distribuída em microtubos de 200µl, devidamente identificados, o termociclador TC-3000 Techne (Barloworld Scientific, USA) foi previamente aquecido a 94°C antes de se colocar os microtubos contendo a mistura da PCR que foram imediatamente submetidos ao programa correspondente ao *locus* a ser analisado. Em todas as análises, foram utilizados como controle negativo um tubo com água para PCR no lugar do DNA.

#### 5.14 Programas Utilizados

Para os SNPs da região promotora foram utilizados os mesmos programas:

94°C- 3' para aquecimento do termociclador

94°C- 30'' para desnaturação das fitas do DNA

55°C-30'' para anelamento dos *primers*

72°C- 1' para extensão das fitas

72°C- 7' para extensão final

### 5.15 Ensaio de PCR-RFLP

Os produtos amplificados dos SNPs na posição -238 e -308 da região promotora resultaram em tamanhos de fragmentos de 165pb e 107pb respectivamente estes fragmentos no alelo normal contem um sítio polimórfico, o qual são reconhecidos pela enzima de restrição *Bam*H1(TNF-238) e *Nco*I (TNF-308). Ambos marcadores foram submetidos ao mesmo protocolo para restrição:

10µl da PCR

2µl de buffer de clivagem (10X), fornecido com a enzima

0,5 µl (10U) da enzima de restrição da *Invitrogen*

7,5 de água para PCR

Os microtubos que contendo o produto da PCR e a solução de clivagem (produto da PCR, tampão para enzima, enzima de restrição específica para cada fragmento e água deionizada autoclavada) foram colocados em banho-maria a 37°C, por um período de quatro horas, para que os segmentos contendo os sítios de restrição fossem clivados e submetidos à separação eletroforética.

### 5.16 Separação Eletroforética

Após a amplificação pela PCR os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel não-desnaturante de poliacrilamida a 6% pra visualização das bandas.

O gel de poliacrilamida a 6% foi preparado em um Becker onde foi adicionado 20mL de acrilamida a 30%, 20mL de TBE 5x, 59mL de água pirogênica, juntamente com os catalizadores da reação de polimerização do gel, TEMED 20µL e persulfato de potássio (PSA) 100µl em que foram adicionados à mistura do gel imediatamente antes de verter a mistura entre as placas de vidro separadas por espaçadores plásticos, um pente foi colocado na borda superior das placas formando poços no gel. Após a polimerização do gel o pente foi retirado e os poços foram lavados com TBE 1x onde posteriormente foram aplicadas 7µL de amostras de DNA amplificado juntamente com 3µL de azul de bromofenol. O gel polimerizado foi montado em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE 1x e presas com auxílio dos prendedores plásticos. Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem (100V), durante 1:00h para os dois marcadores. Os produtos amplificados cortados pela enzima de restrição foram

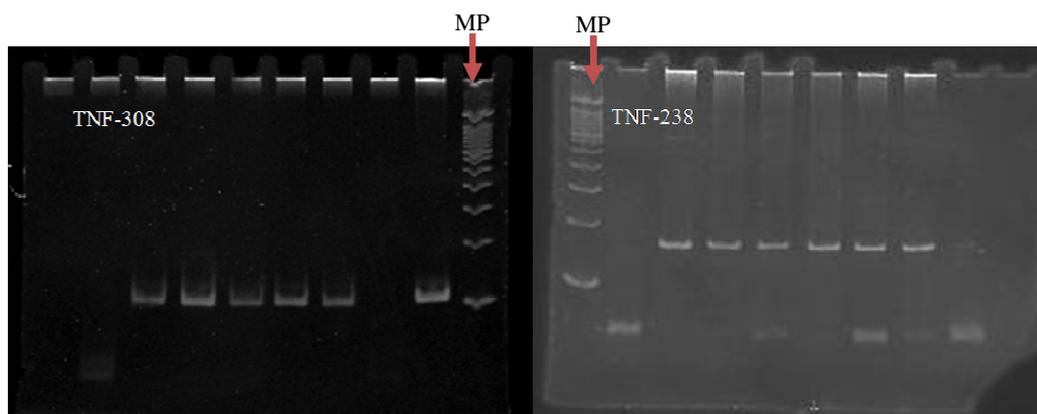
submetidos a um gel desnaturante de poliacrilamida a 10%, onde a corrida para estes “loci” durou 1:30h na mesma voltagem. Foram aplicados no gel 10µL da solução de clivagem somados a 3µL de azul de bromofenol.

O gel de poliacrilamida a 10% foi preparado em um Becker onde foi adicionado 33mL de acrilamida a 30%, 20mL de TBE 5X, 46mL de água pirogênica, juntamente com os catalizadores da reação de polimerização do gel, TEMED 20µl e persulfato de potássio (PSA) 100µl.

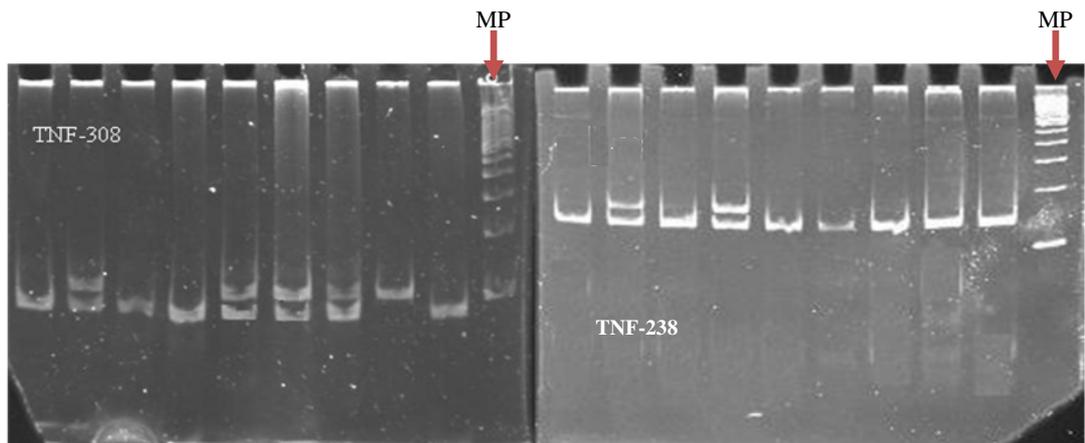
### 5.17 Visualização das Bandas

A visualização das bandas foi possível com a coloração por Brometo de Etídio que segue as seguintes etapas: primeiramente o gel é colocado em uma vasilha contendo Brometo de Etídio onde fica por alguns minutos para que este se intercale nas bases do DNA, logo após este gel é colocado em outra vasilha contendo água para retirada do excesso de brometo e colocado sob exposição da luz ultravioleta em um fotodocumentador para ser visualizado e fotografado. Verificou se a especificidade e a qualidade da amplificação através da comparação com um marcador de peso molecular (ladder 100pb).

Os fragmentos amplificados e digeridos pelas enzimas para cada loci podem ser visualizados nas figuras abaixo



**Figura 6: Visualização dos fragmentos amplificados para o locus da região promotora do TNF nas posições -308 e -238 respectivamente. Gel de poliacrilamida a 6% corado com brometo de etídeo. MP- marcador de peso molecular de 100pb**



**Figura 7: Visualização dos fragmentos de restrição para o locus da região promotora do TNF nas posições -308 e -238 respectivamente. . Gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo. MP- marcador de peso molecular de 100pb.**

## 6.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise de possíveis fatores associados ao risco de infecção pela *Leishmania sp*, foi realizado a partir dos dados obtidos através da aplicação dos questionários, e da aplicação das IDRMs e a sorologia (ELISA), onde foi construído um banco de dados no *EPIINFO2000 for Windows*. Para a análise descritiva, foram usadas as frequências relativas e absolutas das características sócio-demográficas (renda familiar, atividade que exerce, escolaridade, esgotamento, destino de dejetos, e lixo, tipo de roupa no trabalho, presença de animais e reservatórios de *Leishmania sp*), de moradia (tipo de cobertura das casas, número de cômodos, tipo de piso, borrifação, uso de mosquiteiro), e perfil dos indivíduos (idade, sexo, raça, procedência).

Para análise dos polimorfismos genéticos foram obtidas as frequências genotípicas por contagem direta dos genótipos visualizados nas fotografias dos géis. Após a contagem direta foi realizado um banco de dados no programa Genepop (RAYMOND & ROUSSET, 1995) para a análise de população, onde foi verificada a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e diferenciação genética entre os grupos, este teste estatístico é utilizado para determinar se existe diferença entre as populações comparadas par a par, onde a hipótese nula ( $H_0$ ) testada é de que a distribuição alélica observada é idêntica entre as populações.

## **7.0 ASPECTOS ÉTICOS:**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de pesquisa Gonçalo Moniz, parecer nº 79/2005- CEP/CPqGM/FIOCRUZ. Os indivíduos foram informados sobre o estudo, onde puderam concordar ou não em participar do mesmo, os exames realizados foram de baixo poder invasivo, com pouco risco aos participantes. Os que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, participando assim do estudo epidemiológico e de marcadores genéticos na susceptibilidade à infecção por *Leishmania* e desenvolvimento da leishmaniose (doença). Foi garantido à todos os participantes acompanhamento caso houvesse algum problema decorrente do estudo.

## 8.0 RESULTADOS

Das 129 famílias que participaram do inquérito, 104(80,6%) dos chefes de famílias pertenciam ao sexo masculino e possuíam como atividade principal o trabalho no campo 86(66,0%), com uma média de 51 anos de idade, a maior parte destas famílias 81(69,8 %) recebia menos que um salário mínimo por mês (tabela 3).

**Tabela 3: Frequência das variáveis sociais dos (n=129) chefes de família da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

<b>Características</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	104	80,6
Feminino	25	19,4
<b>Idade (n=128)</b>		
13 a 24	5	3,9
25 a 50	61	47,7
51 a 70	43	33,6
71 a 90	19	14,8
<b>Atividade principal</b>		
Rural	86	66,0
Doméstica	15	11,6
Aposentado	22	17,1
Comerciante	02	1,6
Serviços gerais	04	3,7
<b>Renda (n=116)</b>		
< 1 salário mínimo	81	69,8
1 a 2 salários mínimos	27	23,3
2 a 4 salários mínimos	03	2,6
> 5 salários	02	1,7
ni*	03	2,6

\* não informaram

A análise das variáveis que se refere às condições de moradia mostra que 84(66,7%) das residências eram construídas de alvenaria, seguido de adobe 36(28,6%), quase todas as casas eram cobertas por telhas 107(90,7) e com piso de cimento 64(50,4%), ou cerâmica 55(43,3%). Pouco mais que a metade das moradias tinha como fonte de água a rede pública 70(54,3%), seguida de rio e riacho 45(34,8%). A maioria das casas 105(81,4%), também tinha energia elétrica (tabela 4).

**Tabela 4: Frequência das variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias (n=129) na comunidade rural Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

<b>Características</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Tipo (n=126)</b>		
Alvenarias	84	66,6
Taipa	04	3,2
Adobe	36	28,6
Não rebocada	02	1,6
<b>Piso (n=126)</b>		
Cerâmica	55	43,3
Cimento	64	50,4
Chão batido	08	6,3
<b>Tipo cobertura</b>		
Telha	117	90,7
Palha	06	4,7
Outros	04	3,0
ni*	02	1,6
<b>Energia elétrica</b>		
Sim	105	81,4
Não	24	18,6
<b>Origem da água</b>		
Rede pública	70	54,3
Poço comum	13	10,1
Rio, riacho	45	34,8
Chafariz	01	0,8

\*ni – não informaram

Com relação às variáveis associadas aos hábitos de moradia, observamos que 71(55,0%) dos moradores queimavam seus lixos, mas um alto percentual 47(36,4%) lançava estes no terreno próximo a sua casa, como mostra a tabela 5.

Cerca de 91(70,5%) famílias, cria em sua residência algum tipo de animal doméstico, sendo que 58(62,4%) referiram criar mais de um tipo de animal em sua residência. Apesar de 102(79%) das famílias queixarem-se de presença de mosquitos no domicílio, apenas 18(14%) destas famílias tinham o hábito de usar repelente e 10(7,8%) mosquiteiros (tabela 5).

**Tabela 5: Freqüência das variáveis relacionadas ao hábito de moradia das famílias (n=129) na comunidade rural Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

<b>Características</b>	<b>Freqüência absoluta</b>	<b>Freqüência relativa</b>
<b>Destino dos dejetos</b>		
Rede de esgoto	02	1,6
Fossa séptica	18	14,0
Fossa negra	09	7,0
Vala	40	31,0
Outros	54	41,0
ni*	06	4,5
<b>Destino do lixo</b>		
Carro da prefeitura	03	1,6
Terreno baldio	47	36,4
Queimado	71	55,0
Mais que uma opção	05	3,9
Outros	03	3,1
<b>Animais domésticos</b>		
Sim	91	70,5
Não	36	27,9
ni*	02	1,6
<b>Espécie de animal doméstico (n=93)</b>		
Cão	22	23,6
Gato	7	7,5
Galinha	4	4,3
Outros	2	2,2
Mais que uma opção	58	62,4
<b>Presença de mosquitos</b>		
Sim	102	79
Não	16	12,4
ni*	11	8,6
<b>Uso de repelentes</b>		
Sim	18	14,0
Não	110	85,3
ni*	01	0,8
<b>Uso de mosquiteiros</b>		
Sim	10	7,8
Não	119	92,2

\* ni – não informaram

As análises das variáveis relacionadas ao ambiente demonstraram que 91(70,5%) dos domicílios se situavam próximo às matas, rios, e criação de galinhas. Foi observado ainda,

que em 100(77,5%) domicílios, havia descrição de diversos tipos de animais nos seus arredores. (tabela 6).

**Tabela 6: Frequência das variáveis relacionadas ao ambiente peri-domiciliar das famílias (n=129) da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

<b>Características</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Animais nas imediações</b>		
Cão	15	11,6
Gato	03	2,3
Sariguê	01	0,8
Mais que uma opção	100	77,5
*ni	10	7,8
<b>Residência próxima</b>		
Rio ou lago	24	18,6
Mata	13	10,1
Criação de galinhas	01	0,8
Mais que uma opção	91	70,5

\*ni – não informaram

### **Estudo Epidemiológico:**

No que diz respeito à associação das variáveis relacionadas ao padrão familiar com a infecção por LT, observamos que aqueles domicílios o qual não havia água encanada, propiciando com que seus moradores a buscassem em rios e poços, apresentaram maior prevalência a infecção 1,9 e 2,0 vezes mais, respectivamente, quando comparado a indivíduos residentes em domicílios em que havia água encanada, com significância estatística de 0,02 (tabela 7). Apesar de não ter sido estatisticamente significativa as casas que eram cobertas de palha, com construção tipo taipa ou adobe, chão batido, sugeriram uma maior prevalência à infecção por *Leishmania sp.* com prevalência de 2,1; 1,6 e 1,2.

**Tabela 7: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias (n=129) e a LT na comunidade de Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

<b>Variáveis</b>	<b>IDRM</b>				Razão de prevalência	<i>p</i> -valor
	<b>Sim (n=39)</b>		<b>Não (n=89)</b>			
	<b>n°</b>	<b>%</b>	<b>n°</b>	<b>%</b>		
<b>Origem da água</b> (n=128)						0,02
Rede pública	16	22,9	54	77,1	Referência	
Poço comum	06	46,2	07	53,8	2,0	
Rio, riacho	20	44,4	23	55,6	1,9	
<b>Tipo</b> (n=126)	<b>n°</b>	<b>%</b>	<b>n°</b>	<b>%</b>		0,42
Alvenaria	26	31,0	58	69,0	Referência	

Tabela 7: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias (n=129) e a LT na comunidade de Florestal, Município de Jequié, Bahia (Continuação).

Variáveis	Histórico de LT na residência				Razão de prevalência	de <i>p-valor</i>
	Sim		Não			
	nº	%	nº	%		
<b>Tipo (n=126)</b>						
Taipa/Adobe	16	38,0	26	62,0	1,2	
<b>Piso (n=127)</b>						0,56
Cerâmica	17	30,9	38	69,1	Referência	
Cimento	21	32,8	43	67,2	1,1	
Chão batido	04	50,0	04	50,0	1,6	
<b>Cobertura (n=127)</b>						0,07
Telha	37	31,6	80	68,4	Referência	
Palha	04	66,7	02	33,3	2,1	

Das 41 famílias que apresentaram algum indivíduo na residência infectado por *Leishmania sp.* segundo o IDRM, 21 (51,2%) tinham como hábito jogar lixo no terreno baldio, já os que queimavam, tiveram uma menor prevalência a infecção, quando comparados aos que jogavam lixo no terreno ou aos que queimavam e jogavam no terreno baldio (mais que uma opção), sugerindo ser um fator de proteção, dado este não significativo estatisticamente. Quanto ao destino dos dejetos, aquelas famílias cujo dejetos eram lançados em fossas negras ou valas apresentaram uma maior prevalência a infecção 1,2 vezes mais, este resultado não foi estatisticamente significativo. Apesar de também não ter sido significante estatisticamente, as casas que tiveram relato de presença de animais domésticos apresentaram 1,1 x maior prevalência a infecção, sendo que esta prevalência aumentava quando as famílias relavam ter mais que uma espécie de animal doméstico no domicílio (3,2x) o que sugerem ser um fator de risco para a doença (tabela8).

Tabela 8: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias (n=129) e a LT em comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.

Variáveis	Histórico de LT na residência				Razão de prevalência	<i>p-valor</i>
	Sim		Não			
	nº	%	nº	%		
<b>Destino do lixo (n=123)</b>						0,06
Terreno baldio	15	31,9	32	68,1	Referência	
Queimado	20	28,2	51	71,8	0,9	
Mais de uma opção	03	60,0	02	40,0	1,9	
<b>Destino dos dejetos</b>						0,35
Fossa séptica	05	25,0	15	75,0	Referência	
Fossa negra/ Vala	15	30,6	34	69,4	1,2	

**Tabela 8: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao padrão de moradia das famílias e a LT em comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia (continuação).**

Variáveis	Histórico de LT na residência				Razão de prevalência	de <i>p-valor</i>
	Sim		Não			
Destino dos dejetos (n=123)	nº	%	nº	%		
Outros	22	40,7	32	59,3	1,6	
<b>Possui animais domésticos</b>						0,87
Não	12	31,5	26	68,5	Referência	
Sim	30	33,1	61	66,9	1,1	
<b>Espécie de animal doméstico (n=98)</b>						0,09
Gato	01	12,5	07	87,5	Referência	
Cão	06	26,1	17	73,9	2,0	
Galinha	01	25,0	03	75,0	2,0	
Mais de uma opção	25	39,7	38	60,3	3,2	
<b>Uso mosqueteiro (n=57)</b>						0,001
Sim	03	30,0	07	70,0	Referência	
Não	39	32,8	08	67,2	3,19	

No que diz respeito ao ambiente peri-domiciliar com infecção, quando comparamos as casas próximas somente a matas, com casas próximas somente a rios, observamos uma prevalência maior da infecção nas famílias em que sua residência estava próximo a mata, dado este não significativo com *p-valor* = 0,84, mas que sugere que residências próximas a matas tenha uma prevalência maior a infecção.

**Tabela 9: Análise da associação entre as variáveis relacionadas ao ambiente peri-domiciliar das famílias (n=129) e a LT, em comunidades rurais do distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

Variáveis	Histórico de LT na residência				Razão de prevalência	de <i>p-valor</i>
	Sim		Não			
Animais imediações nas	nº	%	nº	%		
Cão	04	26,7	11	73,3	Referência	0,67
Gato	02	50,0	02	50,0	1,9	
Mais de uma opção	32	32,0	68	68,0	1,2	
<b>Residência próxima</b>						0,84
Rio ou lago	07	29,2	17	70,8	Referência	
Mata	05	38,5	08	61,5	1,3	
Mais de uma opção	30	32,6	62	51,6	1,2	

Como esperado, as tabelas 10 e 11 demonstram uma razão de prevalência maior em quem já tinha histórico de LT, com 79%, e 67% respectivamente de redução em quem não teve histórico,  $p < 0,005$ .

Dos testes intradérmicos de Montenegro possíveis de ser lidos, 215(44,8%) da amostra, 62(28,9%) foram positivas, e 36(58,8%) não tiveram histórico de LT (tabela 10).

**Tabela 10: Indivíduos que relataram ter tido LT pregressa, e que realizaram o teste intradérmico de Montenegro (IDRM), na área rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia (n=215)**

	IDRM				Razão de prevalência	p-valor
	Positivo		Negativo			
	nº	%	nº	%		
<b>História de LT</b>						0,000
Não	36	19,5	149	80,5	Referência	
Sim	26	92,9	2	7,1	4,8	
Total	62	100	153	100		

Com relação ao exame Elisa realizado, 343(71,5%) da amostra total, 94(27,4%) foram positivas, tendo assim uma prevalência de 27,4%, destes indivíduos infectados por *Leishmania sp.* conforme o resultado do Elisa, 67(71,2%) não tiveram história pregressa de LT (tabela 11).

**Tabela 11: Indivíduos que relataram ter tido LT pregressa, e que realizaram o teste ELISA, na área rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia (n=343)**

Variável	ELISA				Razão de prevalência	p-valor
	Positivo		Negativo			
	nº	%	nº	%		
<b>História de LT</b>						0,000
Não	67	22,2	235	77,8	Referência	
Sim	27	65,8	14	34,2	3,0	
Total	94	100	249	100		

A tabela 12 mostra que do total de indivíduos que fizeram parte do inquérito, 271(56,7%) pertencem ao sexo masculino, faixa etária de 25 a 50 anos 154(32,3%). Corroborando com o perfil rural da região 164(34,1%) tiveram como função principal o trabalho rural.

**Tabela 12: Frequência das variáveis sociais e laborais de cada indivíduo da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia (n=480)**

<b>Características</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	271	56,7
Feminino	209	43,3
<b>Idade</b>		
00 a 12	108	22,8
13 a 24	115	24,1
25 a 50	154	32,3
51 a 70	66	13,7
71 a 90	35	7,2
<b>Ocupação</b>		
Aposentado	32	6,8
Dona de casa	82	17,2
Escolar	116	24,3
Lavrador	164	34,1
Outros	14	2,6
ni *	72	15,0

\*ni – não informaram

No que se refere à faixa etária e a IDRM, os indivíduos situados entre 61 a 90 anos apresentaram maior frequência de IDRM(+) (51,9%), e maior prevalência da infecção, seguidos dos 50 a 60 anos de idade que apresentou 47,4%, ver tabela 13. O sexo masculino teve 1.1 vezes maior prevalência que o feminino, porém não mostrou diferença significativa (0,73). Cerca de 34,1% dos indivíduos estudados, tiveram como função principal o trabalho rural (tabela 12). Quando associado com a IDRM observou-se que dos indivíduos que trabalhavam no campo 30(47,6%) já haviam sido infectados por *Leishmania sp.* (tabela 13).

**Tabela 13: Associação entre sexo, idade, e atividades laborais com o teste intradérmico de Montenegro (IDRM) em comunidades rurais do Distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

<b>Variáveis</b>	<b>IDRM</b>				<b>Razão de prevalência</b>	<b>p-valor</b>
	<b>Positivo</b>		<b>Negativo</b>			
	<b>n°</b>	<b>%</b>	<b>n°</b>	<b>%</b>		
<b>Sexo</b>						<i>0,730</i>
Feminino	30	28,0	77	72,0	Referência	
Masculino	32	30,2	74	69,8	1,1	
<b>Idade</b>						<i>0,000</i>
00 a 05	01	4,2	23	9,8	Referência	
6 a 19	11	18,6	48	81,4	4,4	
20 a 49	09	19,6	38	80,9	4,7	
50 a 60	27	47,4	30	52,6	11,2	
61 a 90	14	51,9	13	48,1	12,4	

**Tabela 13: Associação entre sexo, idade, e atividades laborais com o teste intradermico de Montenegro (IDRM) em comunidades rurais do Distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia (Continuação).**

Variáveis	IDRM				Razão de prevalência	<i>p</i> -valor
	Positivo		Negativo			
	nº	%	nº	%		
<b>Ocupação</b>						0,004
Escolar	09	15,5	49	84,5	Referência	
Lavrador	30	47,6	33	52,4	3,1	
Aposentado	03	33,3	06	66,7	2,1	
Doméstica	16	34,0	31	66,0	2,2	
Outros	01	14,3	06	85,7	0,9	

A tabela 14 nos mostra também uma redução na razão de soro prevalência para o sexo feminino, mas sem significância estatística ( $p=0,20$ ), os indivíduos mais velhos e trabalhadores rurais tiveram uma maior prevalência à infecção por *Leishmania sp* com significância estatística semelhantes, corroborando com a tabela 13 no que se refere à associação com a IDRM.

**Tabela 14: Associação entre sexo, idade, e atividades laborais com ELISA em indivíduos estudados no distrito de Florestal, Município de Jequié, Bahia.**

Variáveis	ELISA				Razão de prevalência	<i>p</i> -valor
	Positivo		Negativo			
	nº	%	nº	%		
<b>Sexo</b>						0,200
Feminino	39	24,4	121	75,6	Referência	
Masculino	55	29,4	132	70,6	1,2	
<b>Idade</b>						0,001
00 a 05	02	7,7	24	92,3	Referência	
6 a 19	07	7,8	83	92,2	1,0	
20 a 49	46	31,9	98	68,1	4,1	
50 a 60	16	44,6	20	55,6	5,8	
61 a 90	23	45,1	28	54,9	5,9	
<b>Ocupação</b>						0,001
Escolar	08	10,3	70	89,7	Referência	
Lavrador	49	41,2	70	58,8	4,0	
Aposentado	10	35,7	18	64,3	3,5	
Domestica	21	31,3	46	68,7	3,0	
Outros	01	10,0	09	90,0	0,97	

Através das frequências genotípicas observadas em cada um dos locos analisados, apresentado na tabela abaixo (tabela 15), foi verificado se a população encontra se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde a H0 testada é que os acasalamentos estão ocorrendo ao acaso. O loco TNF-308 mostrou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p= 0,464$ ) ao

contrário do loco TNF-238, que demonstrou uma deficiência na frequência de heterozigotos para está região, podendo também ser visto na tabela 16. Nesta tabela ainda observa-se que não existiu diferença entre os três grupos infectados/doentes, infectados/não doentes e não infectados para os locos TNF -238 e TNF-308 com  $p\text{-valor}=0,45$  e  $0,90$ . Desta forma estas duas regiões não mostraram ter valor para a infecção por *Leishmania sp.*

**Tabela 15: Frequência relativa dos heterozigotos observados (Ho) e esperados (He) para os diferentes locos a fim de verificar se estão em equilíbrio de Hardy- Weinberg (HW)**

TNF	Ho <sup>1</sup>	He <sup>2</sup>	HW $p_{val}$
-308	0,267	0,243	0,4639
-208	0,028	0,054	0,0050

1 - heterozigose observada;

2 - heterozigose esperada

A tabela 16 abaixo também mostra que não existiu diferença neste estudo entre os três grupos infectados/doentes, infectados/não doentes e não infectados para os locos TNF -238 e TNF-308 com  $p\text{-valor}=0,45$  e  $0,90$ . Desta forma estas duas regiões não mostraram estar associada a infecção de LT nesta amostra.

**Tabela 16: Distribuição genotípica dos SNPs nas posições -238 e -308 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  entre os três grupos.**

	ELISA+/HISTÓ+	ELISA-/HISTÓ-	ELISA+/HISTÓ-	$p\text{-valor}$
<b>-238</b>	<b>N=20</b>	<b>n=81</b>	<b>n=44</b>	<b>0,45</b>
GG	20(100%)	78(96,2%)	42(93,3%)	
GA	0	2(2,5%)	2(4,5%)	
AA	0	1(1,3%)	1(2,2%)	
<b>-308</b>	<b>N=20</b>	<b>n=67</b>	<b>n=44</b>	<b>0,90</b>
GG	15(75%)	48(71,6%)	32(72,1%)	
GA	5(25%)	18(26,9%)	12(27,9%)	
AA	0	1(1,5%)	0	

Não existe diferença entre os dois grupos de infectados/doentes (ELISA+/HISTÓRICO+) e infectados/não doentes (ELISA+/HISTÓRICO-) tanto para a relação de dominância como de co-dominância entre os alelos do TNF -308, o alelo A mostrou ter uma maior susceptibilidade para a doença (OR=1,13), mas não mostrou significância estatística ( $p=0,86$ ). Este resultado apresentado na tabela abaixo mostra a carência na associação destes genótipos dos dois genes situados na região promotora do TNF na resistência a desenvolver a doença (tabela 17).

O TNF -238 se assemelhou ao TNF -308 onde também não existiu diferença entre os dois grupos de infectados/doentes e infectados/não doentes tanto para a relação de dominância como de co-dominância. A tabela mostra ainda que a presença do alelo A como dominante também apresentou uma maior susceptibilidade para a o desenvolvimento da doença (OR=2,00), mas assim como o loco do TNF-308 não mostrou significância estatística ( $p = 0,54$ ).

**Tabela 17: Distribuição genotípica dos SNPs na posição -308 da região promotora do gene do TNF- $\alpha$  entre os grupos de infectados e doentes para as diferentes relações de dominância.**

<b>-308</b>	<b>ELISA+/HISTÓ+</b>	<b>ELISA+/HISTÓ-</b>	<b>p-valor</b>	<b>OR (IC)</b>
	<b>n=20</b>	<b>n=44</b>		
<b>codominância</b>			<i>0,86</i>	
GG	15	32		
GA	5	12	/	
AA	0	0		
<b>dominância (G)</b>			<i>0,54</i>	0,47 (0,01-18,1)
GG/AG	20	44		
AA	0	0		
<b>dominância (A)</b>			<i>0,91</i>	1,13(0,29-4,49)
GG	15	32		
GA/ AA	5	12		
<b>-238</b>				
<b>codominância</b>			<i>0,49</i>	
GG	20	41		
GA	0	2		
AA	0	1		
<b>dominância (G)</b>			<i>0,97</i>	0,95 (0,06-28,2)
GG/AG	20	43		
AA	0	1		
<b>dominância (A)</b>			<i>0,54</i>	2,00 (0,19-50,7)
GG	20	41		
GA/ AA	0	3		

Entre os três grupos, segundo a tabela 18 não houve diferença na distribuição alélica tanto para a posição -238 como para a posição -308 com  $p= 0,55$  e  $0,91$  respectivamente, não havendo assim influência destes alelos na susceptibilidade da população na infecção.

**Tabela 18: Distribuição alélica dos SNPs nas posições -238 e-308 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  entre os diferentes grupos.**

	<b>ELISA+/HISTÓ+</b>	<b>ELISA-/HISTÓ-</b>	<b>ELISA+/HISTÓ-</b>	
<b>-238</b>	<b>n=20</b>	<b>n=81</b>	<b>n=44</b>	<b><i>p-valor</i></b>
f(G)	1	0,975	0,955	0,27
f(A)	0	0,025	0,045	
<b>-308</b>	<b>n=20</b>	<b>n=67</b>	<b>n=43</b>	
f(G)	0,875	0,850	0,860	0,91
f(A)	0,125	0,150	0,140	

Comparado os grupos de infectados ELISA(+)/Histórico(-), e infectados/doentes ELISA(+)/Histórico(+), conforme sua distribuição alélica para o gene do *TNF- $\alpha$*  nas posições -238 e -308 observamos que o alelo *TNF\*G* se apresentou como um fator de proteção tanto para o TNF-238 como para o TNF-308, sendo que este dado não mostrou significância estatística com um *p-valor* de 0,81 e 0,86 respectivamente, não existindo assim alguma associação entre os alelos dessas regiões com a susceptibilidade a desenvolver a doença (tabela 19).

**Tabela 19: Distribuição alélica dos SNPs nas posições -238 entre os infectados e doentes**

	<b>Elisa(+)</b>	<b>Hist.(-)</b>	<b>Elisa (+)</b>	<b>Hist(+)</b>	<b><i>p- valor</i></b>	<b>OR</b>
<b>-238</b>	n=44	(%)	n=20	(%)		
f(G)		0,955		1	0,78	7,83
f(A)		0,045		0		
<b>-308</b>						
f(G)		0,860		0,875	0,86	1,14
f(A)		0,140		0,125		

A tabela 20 mostra a relação entre o TNF-308 e o tempo de cura entre os pacientes, que fazem parte do grupo de infectados/doente.

**Tabela 20: Tabela de avaliação clínica e o genótipo do TNF-308 dos indivíduos infectados/doentes.**

<b>Tempo de cura em anos</b>	<b>TNF-308</b>	<b>Tempo de cura em anos</b>	<b>TNF-308</b>
6	AG	3,7	AG
5	AG	4,6	GG
6	GG	3,9	AG
3	GG	4,7	GG
3,7	GG	2,7	GG
2,8	GG	6	AG
3,8	GG	6,2	GG
4,8	GG	3	GG
5,2	GG	3,8	GG
5,3	GG	6	GG
4,5	GG		

O gráfico abaixo mostra a carência na associação dos genótipos do TNF-308 no tempo de cura dos pacientes com p-valor de 0,4070. (gráfico 1)

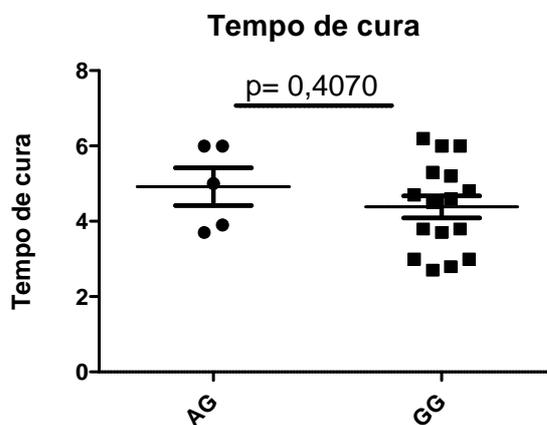


Gráfico 1: Média do tempo de cura para cada genótipo do TNF-308 – Teste Mann-Whitney

## 9.0 DISCUSSÃO

### 9.1 Características socioeconômicas demográficas e ambientais:

As características demográficas de uma população são fundamentais para o entendimento da morbidade da população como também para o planejamento de ações preventivas e de controle para as doenças infecto parasitárias. Tais doenças ocupam um papel relevante entre as causas de morte no Brasil se revestindo de importância por seu expressivo impacto social, já que está diretamente associado à pobreza e a má qualidade de vida, relacionada com condições de moradia, alimentação e higiene precária. (PAES & SILVA, 1999)

A população de Florestal apresentou um baixo poder aquisitivo, onde 69,8% das famílias apresentaram uma renda familiar menor que um salário mínimo por mês. Santos *et al.* (2000), em seu estudo na região de Corte de Pedra também zona rural, encontrou uma porcentagem semelhante (66,7%) de famílias que recebia por mês um salário ou menos que um salário mínimo mensal. Este quadro foi encontrado também por Nascimento *et al.* (2005) na localidade Jardim Tropical leste da Ilha de São Luís do Maranhão com 65% das famílias recebendo menos que um salário mínimo. Na avaliação do IPEA (Instituto de pesquisa econômica aplicada), este cenário de vulnerabilidade confirma a atualidade e urgência da reforma agrária como única forma de superar as condições precárias de vida e a pobreza que caracteriza o meio rural brasileiro.

Em relação à distribuição da população por faixa etária observou-se que 154(32,3%) da população pertenciam a indivíduos adultos de 25 a 50 anos de idade, diferente da encontrada por Santos *et al.* (2000), onde a faixa etária mais frequente foi de crianças e adolescentes de 6-15 anos, este achado pode ser explicado pela evasão da população jovem do distrito de Florestal em busca de melhores condições, e também pela diminuição das taxas de natalidade e mortalidade, além de ser a faixa etária mais efetiva como mão de obra na região.

O sexo masculino obteve uma pequena predominância em relação ao sexo feminino (56,7%) resultado este que se assemelha aos de Nunes *et al.* (2006) com 50,6% de homens na população do Brejo de Mutambal distrito rural de Varzelândia Minas Gerais, e González *et al.* (2000) com 68,5% de homens compondo uma comunidade rural da Venezuela. Esta maior prevalência de homens em comunidades rurais pode ser consequência da maior migração do

sexo feminino nos últimos anos no chamado feminização dos fluxos migratórios ou dos deslocamentos populacionais (BILAC, 1995; LISBOA, 2007).

Na área de estudo a maioria da população tem como profissão exercida o trabalho de campo (34,1%) traçando o perfil laborativo da região, demonstrando a pobreza e o subemprego na comunidade, dado que corrobora com os achados de Nunes *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2000 e Rebelo *et al.*, 2009. Estando grande parte da população de Florestal dentro de grupos considerados de risco, sendo estes grupos de alto risco para aquisição da doença: agricultores, obreiros de fazendas, madeireiro, caçadores, excursionistas e naturalistas (DOURADO *et al.* 1989; GONZÁLEZ *et al.* 2002)

Assim o perfil da região e da população de Florestal, torna-os mais susceptíveis a infecção. Segundo Sosa-Estani (2001), existem três fatores importantes responsáveis pelo incremento de casos da doença em determinadas áreas: a destruição das florestas, as profundas alterações do meio ambiente, e a situação sócio-econômica.

As condições ambientais de uma população estão estreitamente relacionadas com as condições sócio-econômicas das famílias e têm um importante papel no desenvolvimento de doenças infecto-parasitárias. Constitui como indicador importante para avaliar incrementos na qualidade de vida: o acesso à água potável, destino do lixo, e moradia adequada (TONIAL & SILVA, 1997).

A comunidade de Florestal vive com boa estrutura de moradia, e energia elétrica, porém encontramos ainda uma parte das famílias em condições precárias de habitação, onde suas casas em 28,6% são construídas de adobe e 4,7% das casas com cobertura tipo palha, números inferiores aos dados de Silveira *et al.*, 1997; Caldas, 1998; Santos *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2005, onde encontraram uma predominância de construção tipo taipa e adobe e cobertura palha, que segundo estes autores este tipo de moradia de construções mais abertas pode favorecer a entrada do vetor. Segundo o PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios) 1991, existem diferenças marcantes entre os estados do Nordeste quanto ao tipo de moradia das famílias.

Quanto ao abastecimento de água 45,7% das casas da comunidade em questão não possuía água encanada, dado abaixo do encontrado por Caldas (1998), em um estudo feito em duas comunidades do município de Raposa em São Luis do Maranhão, Vila Nova e Bom

Viver, onde a minoria respondeu não possuir água encanada (26,1% e 11,7%) e muito acima do encontrado por Nascimento *et al.*, 2005, onde apenas 2,5% das habitações possuíam água encanada. Podendo esta água muitas vezes ser canalizada de fontes naturais, que chegam aos domicílios para uso diverso sem qualquer tratamento prévio (VANZELI & KANAMURA 2007), pois a localização de residências afastadas torna difícil o acesso a serviços públicos.

Em relação ao destino dos dejetos na comunidade de Florestal apenas 15,6% das moradias possuíam rede de esgoto ou fossa séptica, geralmente as necessidades fisiológicas eram feitas fora de casa em valas (31,0%). Apenas 1,6% das casas que fizeram parte do inquérito tinham coleta pública do lixo, a maior parte da população queimava ou jogava no terreno próximo a sua casa (55,0% 36,4% respectivamente, fatos já observados por Caldas 1998 e Gama *et al.*, 1998. O acúmulo de lixo e dejetos na região do peridomicílio atrai alguns mamíferos, e animais sinantrópicos (reservatórios) que irão favorecer a formação da biocenose artificial da LT no qual o homem faz parte (GOMES, 1983).

A ausência de animais domésticos nas residências da comunidade de Florestal, ocorreu em apenas (27,9%) das casas, similar aos achados de Santos, *et al.*, 2000, e Caldas, 1998, que constataram a ausência de animais em 19,6% e 13,4% respectivamente, corroborando com o novo padrão de família no Brasil onde temos as famílias com seres humanos e seu animal doméstico. Sendo que são encontrados mais que uma espécie de animais no ambiente domiciliar (CALDAS, 1998). A presença de animais domésticos pode aumentar o risco de infecção ao homem visto que o sangue destes animais pode exercer atração sobre os flebótomos transmissores, possibilitando que estes insetos invadam o ambiente domiciliar, expondo seus moradores (BARROS *et al.* 1985; PEDROSA, 2007).

Como a transmissão se dá através da picada do inseto transmissor, perguntamos no inquérito sobre a presença de mosquitos em suas residências, 79% referiram existir mosquitos no domicílio, percentuais próximos aos de Caldas, 1998, com 63,8% na comunidade de Vila Nova e 67,4% em Bom Viver. A domiciliação do vetor pode ser estimulada pela destruição de seus ecótipos, onde encontram nas residências abrigos e alimentação farta representada pelos moradores, animais domésticos e pelo acúmulo de lixo, que propicia a proliferação do vetor, fatos observados na comunidade (BARROS *et al.* 1985; BRASIL 1996). Apesar da presença dos mosquitos a maioria dos indivíduos não utilizava proteção individual como o uso de repelentes ou mosquiteiros.

A localização das casas, próximas à criação de animais, rios ou matas é uma característica relevante na epidemiologia das leishmanioses (MARZOCHI *et al.* 1997). Todas as casas em Florestal apresentaram animais em seu peridomicílio, e 70,5% das residências situavam-se próximas a matas, rios e criações de animais, dados que se assemelham à outras regiões rurais florestais estudadas por Caldas *et al.*, 2001; Teodoro *et al.*, 2007.

## 9.2 Estudo epidemiológico

Os moradores que não possuíam água encanada em seus domicílios tiveram uma prevalência maior dos que possuíam água encanada, o que indica que a maior parte se deslocava para buscar água, fato que os deixava expostos ao vetor, este dado é concordante com os achados de Caldas *et al.*, 2001, e Nascimento *et al.*, 2005. Passos *et al.*, 2001, em seu trabalho na região metropolitana de Belo Horizonte, encontrou um risco relativo para ausência de água encanada de 2,43 (IC 1,09-5,42) para a infecção.

Os domicílios visitados, onde foi evidenciada a simplicidade de sua construção como casas cobertas de palha, construção tipo taipa ou adobe, chão batido, sugeriram uma maior razão de prevalência à infecção, apesar de não ter sido significativo estatisticamente estes dados corroboram com Caldas *et al.*, 2001, onde este cita que casas de construções mais abertas podem favorecer a entrada do vetor, predominando a cobertura palha e construção tipo palha . O adobe de barro é um material sujeito a erosão e fenestração causada pelas chuvas, ventos e atritos, que possibilita a circulação dos vetores (SANTOS *et al.*, 2000), estes dados corroboram com os achados de Pedrosa, 2007 onde encontrou uma significância estatística entre material de parede durável com a redução de LTA.

Os indivíduos que jogavam lixo no terreno baldio tiveram maior prevalência à infecção quando comparado as que queimavam seus lixos, dado que também não mostrou significância estatística  $p = 0,06$ . Segundo a literatura os lixos atraem um maior número de flebótomos para próximo das residências, a reorganização e limpeza do peridomicílio contribuem para o controle da densidade do flebótómíneo (TEODORO *et al.*, 2003) A ausência de boas condições de higiene no peridomicílio, e a proximidade a pequenos capões de matas favorece a concentração de flebótomos, e de mamíferos reservatórios de *Leishmania* no peridomicílio (LIMA, 2000).

Segundo Caldas *et al.*, (2001), casa com cobertura palha, paredes de taipa, piso de chão batido, ausência de abastecimento de água e coleta de lixo apresentaram prevalência maior de infecção pelo IDRM e ELISA.

A presença de animais domésticos obteve uma maior prevalência a infecção principalmente quando se tratava de varias espécies, dado similar aos de Pedrosa, (2007), e Nascimento *et al.*, 2005, onde contrário a este estudo obteve uma relação estatisticamente significante entre presença de animais domésticos, e positividade da IDRM. Entretanto a presença isolada do cão assim como neste estudo não teve relação com a infecção. Animais domésticos incrementam o risco quando se encontram em número de igual ou superior a três (SOSA- ESTANI *et al.*, 2001; TEODORO *et al.*, 1995). Isto contribui com os achados que associam a LT com a presença de animais como galinhas, suínos, vacas, eqüinos e cachorros em domicílio e peridomicílio (VELA, 1996; REBELO, 2009). A positividade de cães, eqüinos e roedores domésticos infectados por *Leishmania* sugere a participação dos mesmos na domiciliação da LT (FOLLADOR *et al.*, 1999). Sosa-Estani *et al.*, (2001) mostra um risco significativo na transmissão de leishmaniose em ambiente domiciliar precário com presença de animais domésticos. Sendo assim, basta que a infecção entre em circuito peridoméstico, por intermédio de animais sinantrópicos ou domésticos, para que a doença se estabeleça e se incremente devido às condições insalubres e miseráveis de vida (MARTINS *et al.*, 2004).

Pesquisas realizadas por diversos autores (FOLLADOR *et al.*, 1999; CAMPBELL-LEDUM *et al.*, 2001, VANZELI & KANAMURA, 2007) demonstraram que as infecções podem ocorrer no peridomicílio, e estão associadas a moradias próximas a florestas. Neste estudo encontramos que casas próximas a matas tiveram uma maior prevalência, não mostrando porém, significância estatística.

As casas próximas ás matas na comunidade de Florestal deixam os indivíduos mais expostos ao vetor, aumentando assim a possibilidade de serem infectados. Corroborando desta forma com os diversos trabalhos que afirmam que alterações ambientais implicam diretamente quanto ao risco do homem adquirir a infecção, pois se atribui as formas de ocupação dos ambientes florestais como fator determinante para aquisição da mesma (FALQUETO *et al.*, 1986; FOLLADOR *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2004; VANZELI & KANAMURA *et al.*, 2007).

As moradias próximas aos rios com bosque, e animais domésticos ajudam à propagação do vetor no domicílio, e peridomicílio, tanto em ambientes rurais como periurbanos (SOSA-ESTANI, 2001).

No que se refere ao sexo, e infecção, tanto para o IDRM quanto para ELISA o sexo feminino apresentou uma pequena proteção com razão de prevalência de 0,92 e 0,83 respectivamente, mas não foi significativa estatisticamente (0,73 e 0,20). Esta carência de associação quanto ao sexo pode ser devida à existência de um ciclo de transmissão da infecção na região do peridomicílio, e domicílio (DOURADO *et al.*, 1989; FOLLADOR *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2008). Alguns autores justificam a infecção entre as mulheres, pela exposição destas nos horários vespertinos na região do peridomicílio para atividades próprias do lar como: lavar roupas, e louças, varrer o pátio e molhar o jardim (GONZÁLEZ *et al.*, 2000)

Contrário ao encontrado em nosso estudo, Nunes *et al.*, 2006, em seu trabalho encontrou uma maior predominância de homens infectados com um OR para a população masculina de 1,67 com significância de  $p = 0,002$ . O que corrobora com os achados de vários outros estudos (MARTINS *et al.*, 2004; CHAGAS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; REBELO *et al.*, 2009). Demonstrando uma transmissão extradomiciliar já que este gênero passa a maior parte do tempo fora do domicílio, por estar hipoteticamente relacionado à inserção nas atividades produtivas.

A correlação entre idade e infecção também não diferenciou quanto aos testes realizados (IDRM e ELISA), sendo ambos significantes, mostrando que existe uma relação entre infecção e idade, este estudo mostrou que a prevalência da infecção aumentava com a idade, semelhante ao encontrado por Dourado *et al.*, 1989, que observou um crescimento contínuo da taxa de infecção quando se observava as faixas etárias mais jovens até as faixas de 55 a 74 anos, onde se situava o pico da infecção com uma prevalência de 56,3%. Barreto *et al.*, 1981, também verificou o aumento na taxa de infecção a partir do grupo de 21-30 anos, estes dados corroboram com os achados de Gonzalez *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2004, e Silva *et al.*, 2007. Nunes *et al.*, 2006, observou que o OR crescia diretamente com a idade. Vale ressaltar que estas faixas com índice maior de infecção são as faixas mais solicitadas para as atividades laborais.

O tipo de ocupação, assim como, a idade mostrou correlação com a infecção constatada pelo IDR, e pelo teste sorológico ELISA. Os lavradores tiveram maior prevalência à infecção seguido dos aposentados, e das domésticas. Resultado encontrado que se assemelha à outros autores. Dourado *et al.*, 1989, observando a relação entre infecção por *Leishmania*, e a ocupação desempenhada pelos indivíduos, viu que os lavradores, e garimpeiros são os mais infectados (66,8%) do que os indivíduos que exercem outras ocupações inclusive as donas de casa (39,0%). Martins *et al.*, 2004, encontrou um predomínio da doença em lavradores seguidos também pela ocupação doméstica, e estudantes, dados que corroboram com Nogueira & Sampaio *et al.*, 2001, que em seu estudo verificou que a ocupação com maior prevalência a infecção foi a de trabalhadores ligados ao meio rural 29(7,1%), outros grupos que tiveram prevalência importante foram os estudantes (17,1%) e as donas de casa (14,9%). Chagas *et al.*, 2006, referiram que indivíduos com atividades de trabalho nas proximidades ou em contato direto com a floresta apresentaram maior número de casos de LT.

A maior parte da comunidade de Florestal é composta por homens lavradores, nas faixas etárias mais ativas para o trabalho desenvolvido no campo, tais como, aragem de terra, plantio, e colheita, atividades que recaem no período diurno estendendo-se quase sempre à noite o que permite um maior contato com o vetor, o mesmo perfil foi encontrado por Santos *et al.*, 2000, em um estudo na região de Corte de Pedra –BA, e por Silva *et al.*, (1979), em estudos pioneiros na região de Buriticupu, MA, onde já discorria sobre a incidência da doença, sobretudo em lavradores adultos do sexo masculino, onde estes estavam mais propícios à transmissão. Esta descrição têm relação direta com o padrão de cobertura vegetal encontrada na região onde predominava as florestas. O presente estudo reafirma os achados descritos por Silva *et al.*, (1979) , que encontrou maior incidência da doença em adultos e trabalhadores rurais.

O perfil descrito confere a LT caráter de doença profissional. Contudo o aumento de mulheres atendidas, assim como pessoas com ocupação domésticas e estudantes, demonstra certa alteração nesse caráter que se deve a transmissão peridomiciliar, ou intradomiciliar. A elevação de mulheres atingidas pode ser devido ao fato de estarem atuando em áreas antes restritas ao sexo masculino, opinião que concorda com os autores Nogueira & Sampaio, 2001.

### 9.3 Prevalência a infecção por *Leishmania* sp.

O teste de Montenegro constitui uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos, para verificar a exposição prévia da população aos antígenos dos parasitos do gênero *Leishmania*, considerando ter mais de 90% de sensibilidade e especificidade aplicada a amostras representativas da população rural de áreas determinadas, é considerado um bom teste para avaliar o caráter endêmico da LT (FOLLADOR *et al.*, 1999; GOZÁLEZ *et al.*, 2000). Onde nossos dados corroboram com estes autores visto que foi encontrado apenas 1,0% de falsos negativos, contrário ao ELISA que obteve um número maior 6%.

Testes sorológicos são de utilidade clínica limitada para o diagnóstico da LT, forma onde a sensibilidade e especificidade são baixas. Ao contrário, esses mesmos testes são altamente sensíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV). O problema relacionado ao seu uso no diagnóstico da LV consiste na especificidade, pois há falso positivo em infecções assintomáticas por *Leishmania* ou em outras doenças infecciosas (LOUREIRO *et al.*, 1998).

A prevalência na comunidade de Florestal foi dada com a utilização do teste de Montenegro (IDRM), e do exame sorológico ELISA, sendo que os valores dessa prevalência foram praticamente similares para ambos os testes. A IDRM acusou uma prevalência de 28,9%, enquanto que, o ELISA identificou uma prevalência de 27,4%.

Estas prevalências, ou porcentagens de positividade se mostraram similares a outras populações rurais como em Las Rosas e Valle Hondo com prevalências respectivas de 22,6% e 24,8% (AGUILAR, 1985). Nunes *et al.*, 2006, aplicando a IDRM em 1120 no Brejo de Mutambal distrito rural de Varzelândia Minas Gerais, e lendo 1020 identificou 282(27,6%) de casos positivos, já a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pelo RIFI e ELISA mostrou positividade em 127(13,1%) e 170(17,5%). Segundo o autor a alta prevalência de reatividade ao Montenegro (27,6%) dos casos tem sido assinalada em outras áreas onde a LT é endêmica.

Prevalências superiores também foram encontradas em outras comunidades rurais dentre elas estão: uma comunidade rural da Venezuela (33,9% de prevalência) (GONZÁLEZ *et al.*, 2000), e em Lençóis na Bahia (43,3% de prevalência) (DOURADO *et al.*, 1989).

#### 9.4 Fatores genéticos

No presente estudo, todas as análises foram feitas por comparações das frequências gênicas e alélicas do *loci* do *TNF* entre os grupo infectados doentes, infectados não doentes e não infectados não doentes, com objetivo de se verificar a frequência dos alelos na amostra, bem como verificar prováveis associações com as condições sorológicas, para tentar desvendar os motivos pelos quais os indivíduos respondem diferentemente à infecção por *Leishmania*, onde estes podem, ou não desenvolverem a doença LT (infectados e infectados/doentes).

##### **TNF-308**

O polimorfismo da região promotora do *TNF* na posição -308 não mostrou diferença significativa entre os genótipos ( $p$ -valor = 0,90) e os alelos ( $p$ -valor = 0,91) nos três diferentes grupos analisados. Quando analisado os grupos de infectados doentes e infectados não doentes para se avaliar se existe associação deste polimorfismo do *TNF* com a susceptibilidade de desenvolver a doença, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre estes grupos, tanto para as relações de co-dominância, dominância do alelo \*G, e dominância do alelo \*A com  $p$ -valor respectivo de 0,86, 0,54, 0,91. Mas vale ressaltar que os indivíduos que possuíam o alelo \*A tinham uma maior susceptibilidade de desenvolver a doença (OR=1,14), sugestionando ser um fator de risco, mas este dado não apresentou significância estatística com  $p$ -valor = 0,86. Desta forma um estudo deve ser realizado novamente em amostras maiores, visto o pequeno número de indivíduos envolvidos neste trabalho, que pode ter influenciado na significância estatística do estudo.

Esses achados se assemelham a outros estudos, relacionados com o polimorfismo do *TNF* -308 onde se tem tentado associar as frequências alélicas e genotípicas desse polimorfismo à susceptibilidade e/ou resistência a várias enfermidades, tendo o alelo *TNF*-308\*A como fator de risco (AGUILLÓN *et al.*, 2002).

Marcos *et al.*, (2009), também não encontrou associação no polimorfismo do *TNF*-308 e doença alcoólica do fígado (ALD) em 11 estudos realizados. Milner *et al.* (1999), estudando ovário policístico também não encontrou diferença significativa ( $p > 0,005$ ) entre os três grupos PCO (ovário policístico) PCOS (Síndrome do ovário policístico) e sujeitos sem PCO, onde o alelo raro *TNF*-308\*A (TNFA/A e TNFG/A) apresentou uma frequência de 29% em

sujeitos PCO, 30% em indivíduos PCOS e 25% em indivíduos sem PCO. Assim como, os achados citados anteriormente, Lucotte *et al.*, (2000), com objetivo de verificar a associação entre o polimorfismo bialélico da região promotora do TNF- $\alpha$  na posição -308 em 74 pacientes franceses com esclerose múltipla comparando com 75 controles, não encontrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Semelhante a Lucotte *et al.*, (2000), He *et al.*, (1995) e Braun *et al.*, (1996) que também não encontraram correlação entre pacientes com esclerose múltipla, e o polimorfismo na posição -308 do TNF- $\alpha$ .

Em outro estudo de caso e controle ao avaliar a associação entre diabetes mellitus tipo I, com o polimorfismo em questão, não encontrando correlação significativa (OR = 1,62  $p = 0,076$ ), apesar de o alelo raro \*A ter sido mais frequente no grupo de pacientes (BORASKA *et al.*, 2008).

Ao avaliarem a frequência do polimorfismo -308 em brasileiros com periodontite crônica e com saúde periodontal. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a frequência alélica ( $\chi^2 = 2.610$ ,  $p > 0.05$ ) e a genotípica ( $\chi^2 = 2.547$ ,  $p = 0.636$ ) entre os dois grupos avaliados, sugerindo que o polimorfismo nesta região não está associado com periodontites na população brasileira (MENEZES *et al.*, 2008). Lee & Song (2009), estudando uma doença inflamatória dos tecidos conjuntivos que é por sua vez responsável pela inflamação nas articulações da coluna ou das grandes articulações (Espondilite anquilosante-EA) com o *SNP* da posição -308 do TNF- $\alpha$  realizou uma meta análise onde nenhuma associação entre EA e o alelo \*A do TNF- $\alpha$  -308 foi encontrado (OR = 0.911; 95% CI 0.512, 1.286;  $p = 0.636$ ), assim como os genótipos AA, AG e GG.

Ao contrario de nosso estudo alguns autores mostraram associação deste polimorfismo na posição -308 da região promotora do TNF. Dentre eles, Cabrera *et al.*, (1995), apresentou um estudo com leishmaniose mucocutânea (LCM) realizado com indivíduos da Venezuela em que pacientes LCM tiveram uma significativa ( $p < 0,005$ ) e alta frequência do alelo TNF-308\*A (0,18) quando comparado com controles sadios (0,069), além de ter sido associado à condição heterozigota com o risco relativo à doença (RR=3,5;  $p < 0,005$ ). Eles sugeriram que a susceptibilidade a forma mucosa da doença pode estar relacionada com o polimorfismo na região regulatória afetando a produção do TNF- $\alpha$ .

Danis *et al.*,(1995), observaram que o alelo *TNF-308\*A* era 3 vezes maior em indivíduos caucasianos com artrite reumatóide (AR), e lúpus eritematoso sistêmico (LES) do que na população anglo saxônica normal. Em um estudo também realizado com artrite reumatóide foi encontrado um aumento na frequência do genótipo heterozigoto A/G do *TNF-308* em indivíduos com AR, quando comparado aos indivíduos saudáveis (95% intervalo de confiança 1,05-8,08; OR. 2,9) . O alelo *TNF-308\*A* também foi mais freqüente em indivíduos com AR (95% intervalo de confiança 1.01-7.298; OR. 2,7) do que em indivíduos sadios (OREGÓN-ROMERO, 2008).

Em um estudo sobre a ocorrência do alelo *TNF-308\*A* nos pacientes com AR ( artrite reumatóide), e controles foi encontrado respectivamente uma frequência de 23% e 10% com um OR(odds ratio) de 2.8 o que sugere uma associação entre a presença do alelo e a doença, mas este achado não foi significativo com um *p- valor* de 0,051 (CUENCA *et al.*,2003). O que contrasta com Danis *et al.*,(1995), que encontraram uma alta frequência do alelo \*A em indivíduos caucasianos com AR. Cuenca *et al.*, (2003), cita em seu estudo que um aspecto para a interpretação deste estudo é a diferente distribuição do alelo \*A em grupos étnicos distintos Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo (CUENCA *et al.*, 2001), citam sobre a diferença nas frequências genótípicas dos polimorfismos na posição -308 encontrada na população chilena comparada a dos europeus, para o alelo \*A homozigoto e heterozigoto onde foi encontrado respectivamente uma frequência de 0.6 e 4.0%; 16.3 e 30% entre as duas populações. Outros estudos como os de Cabrera *et al.*, (1995), e Danis *et al.*,(1995), também contrastam com este estudo.

Em um estudo de caso e controle com risco de asma e o presente *SNP* do *TNF- $\alpha$*  Witte *et al.*, (2002), analisaram 511 indivíduos, sendo 236 casos com asma, e 275 controles sem histórico de asma. O autor encontrou uma associação positiva entre o alelo *TNF-308\*A* e indivíduos asmáticos, e essa relação foi fortificada em casos em que o indivíduo possuía asma aguda, o OR foi ajustado para aqueles que carregavam um ou dois alelos *TNF-308\*A* versus aqueles que não possuíam tal alelo (OR 1.86; IC 1,03-3.34; *p* = 0,04). Os sujeitos que tinham ancestralidade europeu-americana esta associação foi reforçada (OR 3.16; IC 1.04-9.66; *p*=0,04).

Mcguire *et al.*, (1999), também em um estudo de caso e controle com malária cerebral encontrou uma associação positiva com o alelo \*A do *TNF 308* mas este mesmo alelo não foi associado com anemia da malária.

Pacientes com doença meningocócica, independente de terem morrido estavam mais propensos a ser homozigotos para o alelo *TNF -308\*A* (OR=1,93; IC 95% 1,08-3,46) do que heterozigoto para este marcador (OR=0,79; IC 95% 0,64-0,97) comparando com a coorte de controle. Voluntários homozigotos para o alelo raro \*A expressou altos níveis de RNA mensageiro de TNF, onde também secretaram maiores concentrações de TNF após a exposição a *N. meningitidis*, nenhuma influência de morte após a infecção foi relacionada ao marcador (READ *et al.*, 2009).

Ming-Shih *et al.*, (2006) em um estudo de caso e controle, submeteu a análise genotípica para este marcador 202 pacientes com câncer de pulmão adequando a idade e sexo e 205 indivíduos saudáveis. A distribuição das frequências genotípicas do TNF 308 A/G foram significativamente diferentes entre os pacientes com câncer de pulmão, e os controles saudáveis,  $p < 0,0001$ . O OR para câncer de pulmão foi observado em indivíduos com genótipos do TNF -308 AA e AG comparado com o genótipo GG (OR de 3,75, IC 95% 2,38-5,92,  $p < 0,0001$ ).

### **TNF-238**

Os polimorfismos da região promotora do TNF na posição -238 também não mostraram diferença significativa com  $p = 0,49$  para os genótipos e  $p=0,22$  para os alelos quando associados aos três diferentes grupos analisados. As relações de co-dominância, dominância do alelo \*G e do alelo \*A não apresentou significância estatística quando associados aos grupos de infectados, infectados/doente, mas assim como o polimorfismo do TNF-308 o alelo\*A, também sugeriu envolvimento na susceptibilidade a desenvolver a doença (OR=7,83) resultado também não significativo ( $p=0,78$ ), onde assim como o TNF-308 este polimorfismo pode ser repetido em amostras maiores.

Lee & Song, (2009), realizou uma meta análise que reuniu 2.247 indivíduos, a fim de se estudar uma possível correlação entre o polimorfismo na região promotora na posição -238 e a espondilite anquilosante (EA), os autores nesta meta análise não encontraram associação

entre EA e o alelo raro \*A (OR para o alelo \*A = 0.930; 95% IC 0.498, 1.737;  $p = 0.821$ ). Análise por subgrupos de etnicidade e HLA-B27 não mudaram o resultado para associação.

Um estudo de caso e controle com objetivo de se determinar a frequência genotípica e alélica do *TNF* 238 em 204 pacientes com glaucoma de esfoliação, e 204 indivíduos saudáveis foi verificada uma ausência de correlação entre as frequências e os grupos ( $p = 0,25$ ), o alelo *TNF238\*G* apresentou um *Odds Ratio* (OR) de 0.64 IC=0.33-1.46  $p=0,25$  (MOSSBÖCK *et al.*, 2009)

Uma meta análise onde foi revisada todas as publicações até janeiro de 2009 sobre a variação na região promotora do *TNF $\alpha$*  na posição -238 e o risco de diabetes mellitus tipo II, verificou que o OR global (IC 95%) para o genótipo AA e AG *versus* o genótipo GG para o *TNF $\alpha$*  -238 foi de 1,15 (0.92-1.44), em populações europeias e asiáticas foi respectivamente 1.18 (0.92 -1.51) e 1.13 (0.62-2.04), não encontrando associação entre o polimorfismo do *TNF*-238 e o risco para *diabetes mellitus tipo 2* (FENG *et al.*, 2009).

Mcguire *et al.*, (1999), estudando uma população de Gâmbia, encontrou uma associação positiva significativa do alelo *TNF*-238\*A com anemia da malária grave com um OR de 2,5 ( $p < 0,01$ ). Ming-Shih *et al.*, (2006), além de ter encontrado associação entre os genótipos do *TNF* 308 AA e AG e a ocorrência de câncer de pulmão, ele também achou uma correlação entre a mesma doença e o genótipo GG, em que a razão de chance (OR) para câncer de pulmão observado para os indivíduos com *TNF* -238 AA e AG *versus* o genótipo GG foi de OR = 0,26; IC95% 0,13-0,50;  $p < 0,001$ , o alelo \*A mostrou uma função protetora contra o câncer de pulmão.

O *TNF $\alpha$*  é uma citocina que também tem função de inibidor parácrina dos melanócitos, além de ser um importante mediador da imunidade, desempenha um papel crítico em doenças auto-imunes, desta forma Laddha *et al.*, (2008), realizou um estudo de caso e controle com 120 pacientes e 153 indivíduos saudáveis pareados por idade na população de Gurajat onde a prevalência da doença foi de 8,8%, para analisar o polimorfismo de nucleotídeo único na posição -238 da região promotora do *TNF* e seu papel na susceptibilidade ao vitiligo, a distribuição da frequência genotípica, e alélica do *TNF* -238 G/A foram significativamente diferentes em indivíduos com vitiligo e saudáveis  $p < 0,0016$ ;  $p < 0,001$  respectivamente. Sugerindo ser um fator de risco para a susceptibilidade da população de Gurajat.

O risco de cirrose foi associado ao alelo \*A do *TNF-238* com OR de 1.47 e IC 95% 1.05-2.07 (MARCOS *et al.*, 2009). Também foi encontrada associação deste mesmo alelo com a infecção por hepatite C em outro estudo que utilizou como amostra 82 indivíduos com hepatite C crônica e 99 controles a frequência do alelo \*A foi significativamente alta no grupo com hepatite C (18.7%) comparado com o controle (3.5%)  $p < 0.009$ , podendo este polimorfismo ser um fator que contribui para o desenvolvimento da hepatite crônica (HÖHLER *et al.*, 1999).

## 10.0 CONCLUSÃO

A população de Florestal é composta em sua maioria por indivíduos adultos do sexo masculino com a faixa etária mais ativa para o trabalho de campo. A maior parte da população da comunidade vive com boa estrutura de moradia e energia elétrica, mas ainda com um déficit importante no esgotamento sanitário e renda mensal baixa recebendo menos que um salário mínimo.

Os resultados apresentados sobre as condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida são relevantes na epidemiologia da LT. Apesar de alguns dados não terem sido estatisticamente significativo, alguns fatores de risco analisados demonstraram maiores prevalências a infecção (IDRM+), dentre eles estão: indivíduos do sexo masculino, adultos, trabalhador rural, sendo este dado significativo estatisticamente. Indivíduos que criam mais que uma espécie de animal doméstico, ou que tem mais que um tipo de animal próximo à residência, domicílio próximo a matas e rios, cobertura tipo palha, lixo no terreno, ausência de água encanada.

Observou-se também uma menor prevalência de infecção em indivíduos com boas condições de moradia (cobertura de telha e piso de cerâmica), que não possuíam ou tinha apenas uma espécie de animal doméstico em casa, quintal limpo (onde os indivíduos queimavam seus lixos). Assim existem alguns fatores responsáveis pelo aumento de casos da doença na área, como falta de saneamento básico, situação econômica precária, construções inadequadas, convívio com animais silvestres ou mesmo domesticados.

Desta forma uma estratégia de controle seria a abordagem dos focos de transmissão peridomiciliar e domiciliar, implementando às condições de saneamento para evitar o acúmulo de lixo e detritos, que possam atrair roedores e pequenos mamíferos, além de um eficiente sistema de vigilância epidemiológica. Com relação ao estudo dos marcadores genéticos da região promotora do TNF, nas posições -238 e -308, não foi encontrada associação com a susceptibilidade ou resistência à LT, mas vale ressaltar que o alelo\*A mostrou ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença, resultado estatisticamente não significativo, sugerindo a realização de novos estudos com amostragem ampliada para esclarecimento desta questão, visto o tamanho reduzido da amostra utilizada.

## 11.0 LIMITAÇÕES DO ESTUDO:

Algumas limitações foram encontradas neste estudo entre elas estão:

O tamanho reduzido de nossa amostra, por se tratar de uma população rural, pequena, onde existe endogamia, havendo a necessidade de selecionar a amostra, para não se incluir indivíduos consangüíneos, que poderiam vir a favorecer a maior frequência de um alelo, assim devido ao número limitante da amostra, um menor efeito genético pôde ser detectado, além do que existe a necessidades de se elucidar

Também se fez necessário a realização da estratificação da amostra por etnicidade através dos marcadores específicos de população PSAs (*Population Specific Alleles*), estes marcadores, apresentam alelos com altos diferenciais de frequência entre populações, aplicáveis em estimativas de mistura étnica nos níveis populacional e individual, assim a frequência dos polimorfismos nestes marcadores se distribuem de forma diferente entre os grupos étnicos. Dentro das doenças em que as citocinas possuem um papel crucial, é imprescindível se determinar a incidência exata das variáveis polimórficas em cada população.

Existe também a possibilidade de envolvimento de outros polimorfismos no gene do TNF- $\alpha$  com a susceptibilidade, ou resistência a LT, pois também devemos ter em mente que a maioria das enfermidades é de origem multigênica, e não determinada apenas por um único fator.

Quando nos tratamos de estudos sobre imunogenéticas, é importante conhecer o grupo étnico o qual a população pertence, e quais outros fatores genéticos podem estar influenciando o resultado. Tornando desta forma o estudo mais fidedigno sem nenhum ou com menor número de viés.

## **12.0 DIFICULDADE DO ESTUDO:**

Foram encontradas algumas dificuldades com relação ao trabalho de campo e laboratorial, no campo algumas IDRMs realizadas foram perdidas, pois no dia da leitura, muitos indivíduos não se encontravam em sua residência, diminuindo ainda mais a amostra para o estudo. No que se refere ao trabalho de laboratório, houve dificuldades para obtenção de reagentes, a alíquota de sangue para extração de DNA estava hemolisada e a qualidade do DNA extraído não estava boa, o que prejudicou a amplificação, sendo necessário várias extrações

### **13.0 PERSPECTIVA DO ESTUDO:**

O resultado do estudo epidemiológico foi consistente quando comparados a outros estudos já realizados. Provavelmente as políticas assistenciais e específicas para o campo dos governos federal, ajudaram a melhorar o perfil sócio-demográfico dessa região. Novos estudos também serão necessários para entender possíveis diferenças entre diferentes áreas, a fim de conhecer e corrigir se necessário, as bases de dados e conseqüentemente melhorar a qualidade destas, para que as informações utilizadas pelos gestores sejam eficientes nas definições de políticas públicas, no planejamento e tomadas de decisão.

Novos estudos com estes e marcadores situados na região do *TNF* são necessários para se esclarecer o efeito do alelo \*A no desenvolvimento da doença, utilizando uma amostragem ampliada e estratificada por etnia. Também se faz necessário estudo haplotípicos destes marcadores associados a outros na mesma região para verificar se existe influencia em conjunto destes com a infecção/doença LT.

## 14.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L.B.; FRANZBLAU, S.G.; VAVRIN, Z.; HIBBS, J.B. JR.; KRAHENBUHL, J.L. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *Journal Immunology*. 147: 1642-1646, 1991.

AGUILAR, C. Leishmaniasis tegumentária em los caseríos Solano y Valle Hondo Del Estado Cojedes. Participación de los animales domésticos. Tese (tese de doutorado) Universidade de Carabobo, Valência , 126 pag 1985.

AGUILLÓN, J.C.; ESCOBAR A.; FERREIRA, V.; AGUIRRE, A.; FERREIRA, L.; MOLINA, M.C. Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysaccharide (LPS) -stimulated ex vivo blood culture assays. *European Cytokine Network*. 12: 105-110, 2001.

AGUILLÓN, J.C.G.; CRUZAT, A. C.; CUENCA, J.M.; CUCHACOVICH, M.T. Tumor necrosis factor alpha genetic polymorphisms a risk factor in disease. *Revista Médica do Chile*. 130: 1043-1050, 2002.

ASHFORD RW, DESJEUX P, DERAADT P. Estimation of risk infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitology Today* 3:104-105, 1992.

BALDA, C.A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos da diabetes melito tipo 1. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 45: 175-180, 1999.

BARRETO, A.C.; CUBA, C.AC.; MARSDEN, P.D.; VEXANAT, J.A.; De-BELDER, M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 90: 415-424, 1981.

BARROS, G.C.; SESSA, P.A.;MATTOS, E.A.;CARIAS, V.R.D.; MAYRINK, W.; ALENCAR, J.T.A.; FALQUETO,A.; JESUS, A.C. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista de Saúde Pública, São Paulo*.19: 146-156, 1985.

BASANO, SA & CAMARGO, LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*.7: p328-334, 2004.

BEG, A.A.; BALTIMORE D. An essential role for NF-kB in preventing TNF-a-induced cell death. *Science*. 274: 782-78, 1996.

BILAC, E.D. Gênero, família e migrações internacionais. In PATARRA, Neide L. (coord.). Emigração e Imigração internacionais no Brasil. *Contemporâneo*. São Paulo, Funap. 1995.

BORASKA, V.; SKRABIC, V.; CULIC, V. C.; BECIC, K.; KAPITANOVIC, S.; ZEMUNIK T. Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population. *Biology Research*. 41: 157-163, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2. Ed. Brasília. 2007.

BRAUN, N.; MICHEL, U.; ERNST, B.P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF- $\alpha$  production. *Neuroscience let*. 215: 75-78, 1996.

CABRERA BM, SHAW MA, SHARPLES C, WILLIAMS H, CASTES M, CONVI JT and BLACKWELL JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*.182:1259-1264,1995.

CALDAS, A.J.M. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de Leishmaniose visceral americana na ilha de São Luís – Maranhão Brasil. Dissertação. (Dissertação em saúde e ambiente). Universidade Federal do Maranhão. Maranhão, 150p. 1998.

CAMPBELL-LENDRUM, D.; DUJARDIN, J.P.; MARTINEZ, E.; FELICIANGELI, M.D.; PEREZ, J.E. PASSERRAT DE SILANS. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 159-162, 2001.

CAMPELO V, DANTAS, RO, SIMÕES RT, MENDES-JUNIOR, CT, SOUSA SMB, SIMÕES AL, AND DONADI EA. TNF microsatellite alleles in Brazilian chagasic patients. *Digestive Diseases Science*.52:3334-3339, 2007.

CARVALHO LRC, FONTES CJF, HUEB M, GUEDES AM, AFONSO LCC, MELO MN. Leishmaniose Tegumentar no estado de Mato Grosso (Brasil): estudo clínico, laboratorial e terapêutico. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 77: 45-56, 2002.

CARVALHO, M. W. P. Polimorfismos genéticos em indivíduos infectados por HIV. Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 109p 2004.

CASTELLANO LRC. Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. *VITAE Academia Biomédica Digital*. 25: 1-10, 2005.

CAVALLI-SFORZA LL, MENOZZI P, PIAZZA A. The History and Geography of Human Genes. *Princeton University Press*, USA, 1996.

CHAGAS, A.C.; PESSOA, F.A.C.; MEDEIROS, J.F.; PY-DANIEL, V.; MESQUITA, E.C.; BALESTRASSI, D.A. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios- Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileiro de epidemiologia*. 9: 186-192, 2006.

CHAMBERS, G.K.; MacAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. *Biochemistry and Molecular Biology of Comparative Biochemistry and Physiology*, 126: 455-476, 2000.

CHUEN-MING, S.; YAO-LING, L.; HUI-LING, C.; WEI, C.; GEE-CHEN, C.; MING-CHIH, C.; LONG-Y. Association of TNF- $\alpha$  polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*. 15-20, 2006.

CLARK IA, NH HUNT, GA BUTCHER and WB COWDEN. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) *in vivo* by recombinant IFN-gamma or tumor necrosis factor and its enhancement by butylated hydroxyanisole. *Journal of Immunology*.139:3493-3496, 1987.

COSTA, J.M.L. Estudo da Leishmaniose Cutânea Difusa no Estado do Maranhão – Brasil: Avaliação Terapêutica e Correlação do Perfil Imunológico entre os Pacientes e seus Familiares. Tese (Doutorado em Medicina) Universidade Federal de São Paulo- São Paulo, 190 pag, 1998.

COSTA, JML. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*, Salvador.75: 3-16, 2005.

CUENCA, J.; CUCHACOVICH, M.; PÉREZ, C.; FERREIRA, L.; AGUIRRE, A. SCHIATTINO, I.; SOTO, L.; CRUZAT, A.; SALAZAR-ONFRAY, F.; AGUILLÓN, J.C. - 308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and *ex vivo* lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 42: 308-313, 2003.

CUENCA, J.; PE´REZ, C.; AGUIRRE, A.; SCHIATTINO, I., AGUILLÓN, J.C. Genetic polymorphism at position 2308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): Implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. *Biology Research*, 34:237–41. 2001.

D'OLIVEIRA JUNIOR, MACHADO P, BACELLAR O, CHENG LH, ALMEIDA, RP, and CARVALHO, EM. Evaluation of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v:35: p.7-10, 2002.

DANIS, V.A.; MILLINGTON, M.; HYLAND, V.; LAWFORD, R.; HUANG, Q.; GRENNAN, D. ncreased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Diseases Markers*.12:127–133, 1995.

DOLINSKY, L.C. & PEREIRA, L.M.C.V. DNA Forense. *Saúde e Ambiente* 2:1-22, 2007

DOURADO, M.I.C.; NORONHA, C.V.; ALCANTARA, N.; ICHIHARA, M.Y.T.; LOUREIRO, S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo em localidades do Estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública*, São Paulo. 23: 2-8, 1989.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J.B. JR. Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *European Journal Immunology*. 18: 1587-1592, 1988.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American Journal of Human Genetics*. 49:746-756, 1991.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum – likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology Evolution* 12: 921-927, 1995.

FALQUETO, A; COURA, JR; BARROS, GC; GRIMALDI JR, G; SESSA, PA; CARIAS, VRD; JESUS, AC; ALENCAR, JTA; Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.81:155-163, 1986.

FENG R.; LI Y.; ZHAO, D.; WANG C.; NIU Y.; SUN C. Lack of association between TNF 238 G/A polymorphism and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Acta Diabetologica*. 2009.

FOLI, B.A.; SAVILLE, M.W.; YARCHOAN, R. Effects of the th-1 and th-2 stimulatory cytokines interleukin-12 and interleukin-4 on human immunodeficiency virus replication. *Blood*. 85: 2114-2123, 1995.

FOLLADOR, I; ARAUJO, C; CARDOSO, MA; TAVARES-NETO, J; BARRAL, A; MIRANDA, JC. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:497-503, 1999.

FONSECA, S.G.; ROMÃO, P.R.; FIGUEIREDO, F.; MORAIS, R.H.; LIMA, H.C.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *European Journal Immunology*. 33: 2297-2306, 2003.

FRANCESCHI, D.A.S.; VIEL, D. O.; SELL, A.M.; TSUNETO, L.T.; VISENTAINER, J.E.L. Optimization of the PCR-SSP methodology in the identification of TNF and IL2 genetic polymorphisms. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 31: 241-246.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Centro Nacional de epidemiologia. Programa Nacional de controle das leishmanioses. *Manual do controle das leishmanioses*, 2000.

GAMA, M.E.A.; BARBOSA, J.S. PIRES, B.; CUNHA, A.K.B.; FREITAS, A.L.; RIBEIRO, I.R. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. 14: 381-390,1998.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine- dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal Immunology*. 10: 2501-2506, 1992.

GILL, P. & EVETT, I. Population genetics of short tandem repeat (STR) loci. *Genetic*.96:69-87, 1995.

GOMES, A.C. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar. Observações naturais sobre o ritmo diário de atividade de *Ps. intermedius* em ambiente floresta e extraflorestal. *Revista de saúde pública*, 17: 23-30, 1983.

GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:71-80, 2003.

GONZÁLEZ, RM; DEVERA R.;MADRID R. SUDAN C.Z. Evaluación de un brote de leishmaniasis tegumentaria americana en una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.33: 31-37, 2000.

GORDIS, L. Epidemiologia. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2004.

GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B. JR.; NACY, C.A. (). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine dependent killing mechanism. *Journal Immunology*. 144: 278-283, 1990.

GRIMALDI-Jr. G, TESH RB, MECMAHON-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *American Journal of Medicine Tropical Hygiene*. 41:687-725, 1989.

HAMAGUCHI, K.; KIMURA, A.; SEKI, N.; HIGUCHI, I. T.; YASUNAGA, S.; TAKAHASHI, M.; SASAZUKI, T.; KUSUDA, Y.; OKEDA, T.; ITOH, K.; SAKATA, T. Analysis of tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-B and -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese. *Tissue Antigens*. 55: 10-16, 2000.

HAVELL, E.A. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *Journal of Immunology*. 139:4225-4231, 1987.

HE, B.; NAVIKAS, V.; LUNDAHL, J. Tumor necrosis factor alpha -308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *Journal Neuroimmunology*, 63: 143-147, 1995.

HILL, A.V.S.; RUWENDE, C.; MCGUIRE, W.; BELLAMY, R.; COLEMAN, E.; ALI, S.; LOKE, H.; CORRAH, T.; SNOW, R.; MARSH, K.; GREENWOOD, B.; MCADAM, K.J.W.P.; WHITTLE, H.C.; KWIATKOWSKI, D. Association of the TNF-238 promoter polymorphism with susceptibility to tuberculosis and malaria in Africa. *Human Immunology*.47:118, 1996.

HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; BIEDERMANN, T.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOCKSLEY, R.M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J.A. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *Journal Immunology*. 164: 4819- 4825, 2000.

HÖHLER, T.; KRUGER, A.; GERKEN, G.; SCHNEIDER, P.M.; MEYERZUM BÜSCHENFELDE, K.H.; RITTER, C. A tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clinical & Experimental Immunology*. 111: 579-582, 1999.

HSIA, R.Y.; HALPERN, J.; Leishmaniasis. *Infectious Diseases*. 2008. webpage. <http://emedicine.medscape.com/article/783750-overview>. Acesso em março de 2009.

HUANG, TH, HEJTMANCIK JF, EDWARDS A, PETTIGREW AL, HERRERA CA, HAMMOND HA, CASKEY CT, ZOGHBI HY.; LEDBETTER DH. Linkage of the gene for an X-linked mental retardation disorder to a hypervariable (AGAT)<sub>n</sub> repeat motif within the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) *loci* (Xq26). *The American Journal Human Genetic* 49:1312-1319, 1991.

JESUS RA, ALMEIDA RP, LESSA H, BACELLAR O, CARVALHO EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.31:143-148, 1998.

KARPLUS TM, JERONIMO SMB; CHANG H; HELMS BK; BURNS TL; MURRAY JC, MITCHELL AA, PUGH EW. BRAZ RFS. BEZERRA FL, and WILSON ME. Association between the tumor necrosis factor *loci* and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infection and Immunity*. 70:6919-6925, 2002.

KHOO, S.H. Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. *AIDS*. 11:423-428, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis. *Medical Veterinary Entomology*. 4: 1-4, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, D.H. Transmition of leishmaniasis by the bait ofphlebotomine sandfly: possible mechanism. *Revista sociedade brasileira de medicina tropical*. 75: 152-154, 1981.

KINDLER EA, SAPPINO AP, GRAU GE, PIQUET PF, VASSALLI P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56:731-734, 1989.

KISHIMOTO, T.; TAGA, T.; AKIRA, S. Cytokine signal transduction. *Cell*. 76: 253-262, 1994.

KOPF, M.; BROMBACHER, F.; KOHLER, G.; KIENZLE, G.; WIDMANN, K.H.; LEFRANG, K.; HUMBORG, C.; LEDERMANN, B.; SOLBACH, W. IL-4- deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *Journal Experimental Medicine*. 184: 1127-1136, 1996.

KROEGER A, AVILA EV, MORISON L. Insecticide impregnated curtains to control domestic transmissión of cutaneous leishmaniasis in Venezuela:cluster randomised trial.*BMJ*.325:810-813, 2002.

KROEGER, K.M., CARVILLE, K.S. The -308 Tumor necrosis factor-promoter polymorphism effects transcription. *Molecular Immunology*. 34: 391-399, 1997.

KROEGER, K.M.; STEER, J.H.; JOYCE, D.A.; ABRAHAM, L.J. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 12:110-9, 2000

LADDHA, N.C.; DWIVED, M.; GANI, A.R.; PATEL, K. J.; OZA, T.G.; JAIN, B.; BEGUM, R. Association of TNF -308 and -238 promoter polymorphisms with vitiligo susceptibility in Gujarat population.(poster) 2008.

LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Lainson R, Shaw JJ, eds. The leishmaniasis. London: *Academic Press*; p.1-120. 1987.

LAINSON, R., Leishmania e Leishmaniose com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paranaense de Medicina*, 11: 29-40, 1997.

LAUNOIS, P.; OHTEKI, T.; SWIHART, K.; MACDONALD, H.R.; LOUIS, J.A. In susceptible mice, *Leishmania major* induces very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1. *European Journal Immunology*. 25: 3298-3307, 1995.

LEE, Y.H.; SONG, G.G. Lack of association of TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms with ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Rheumatology*, 48: 1359-1362, 2009.

LI, Y.C, KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology Evolution* 21:991-1007, 2004.

LIEW, F.Y., PARKINSON C., MILLOTT S, SEVERN A, and CARRIER. M. Tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) in Leishmaniasis: TNF $\alpha$  mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. 69:570-573, 1989.

LIMA, A.P. Distribuição da leishmaniose tegumentar e análise da sua ocorrência em ambientes antrópicos, no Estado do Paraná, Brasil. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Londrina-Paraná, 110 pag, 2000.

LIMA, H.C.; BLEYENBERG, J.A.; TITUS, R.G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitology Today*. 13: 81-82, 1997.

LINDENBERG, A. A úlcera de bauru e seu micróbio. *Revista medica de São Paulo*. 12: 116-120, 1909. Apud. TOLEZANA, J.E. Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89: 427-434, 1994.

LINS, A.M., SPRECHER, C.J.; PUERS, C. and SCHUMM, J.W. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat *loci*--silver stain and fluorescence detection. *Biotechniques* .20:882-889, 1996.

LISBOA, T. K. Fluxos migratórios de mulheres para o trabalho reprodutivo: a globalização da assistência. *Estudos Feministas*, Florianópolis, 15: 000, 2007.

LOUREIRO, C.C.P.; DADALTI, P.; GUTIERREZ, M.C.G.; RAMOS E SILVA, M. Leishmaniose: Métodos diagnósticos. *Folha Médica*. 117: 131-134, 1998.

LUCOTTE, G.; BATHELIER, C.M.G. TNF-alpha polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -238 and -308 promoter alleles, but the microsatellite allele a11 is associated with the disease in French patients. *Center of Molecular Neurogenetics*. 6: 78-80, 2000.

MACHADO P, ARAUJO C, DA SILVA AT, ALMEIDA RP, D'OLIVEIRA JR A, BITTENCOURT A. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infection Diseases*. 2002.

MACHADO P, ARAUJO C, DA SILVA AT, ALMEIDA RP, D'OLIVEIRA JR A, BITTENCOURT. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing development of an ulcer. *Clinic Infection Diseases*. 34 2002.

MACHADO, P.R.; ARAUJO, M.I.A.S.; CARAVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismo de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*.79:647-664, 2004.

MAKHATADZE, N. Tumor necrosis factor: Genetic organization and biological implications. *Human Immunology*. 179:571-579, 1998

MALLA, N.; MAHAJAN, R.C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian Journal of Medical Research*. 123: 267-274, 2006.

MARCOS, M.; GÓMEZ-MUNUERA, M.; PASTOR, I.; GONZÁLEZ-SARMIENTO, R.; LASO, F.J. Tumor Necrosis Factor Polymorphisms and Alcoholic Liver Disease: A HuGE Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology*. 170: 948-956, 2009.

MARTINS, LM; REBELO, JMM.; COSTA, JML; SILVA, AR; FERREIRA, LA. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Caderno de Saúde Pública*, 20:735-743, 2004.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 63: 82-104, 1992.

MARZOCHI, MCA; MARZOCHI, KBF. Leishmaniose em áreas urbanas *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30:162-165,1997.

MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; DI PADOVA, K.; BEHIN, R.; GATELY, M.K.; LOUIS, J.A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *European Journal Immunology*. 62: 1553-1559, 1996.

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

MCGUIRE, W.; KNIGHT, J.C.; HILL, A.V.; ALLSOPP, C.E.; GREENWOOD, B.M. KWIATKOWSKI, D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *Journal Infectious Diseases*. 179: 287-290, 1999.

MENEZES, N.G.; COLOMBO, A.P.V. Lack of association between the TNF-308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians. *Brazilian Oral Research*. 22: 322-327, 2008.

MILNER, C.R.; CRAIG, J.E.; HUSSEY, N.D.; NORMAN, R.J. No association between the -308 polymorphism in the tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) promoter region and polycystic ovaries. *Molecular Human Reproduction*. 5: 5-9, 1999.

MIYAJIMA, A.; KITAMURA, T.; HARADA, N.; YOKOTA, T.; ARAI, K. Cytokines receptor and signal transduction. *Revista Immunology*, 10: 295-331, 1992.

MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; FERREIRA, M.E.M.C.; TEODORO, U. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do estado do Paraná, Sul do Brasil. 24: 1291-1303, 2008.

MOSSBÖCK, G.; RENNER, W.; EL-SHABRAWI, Y.; FASCHINGER, C., SCHMUT, O.; WEDRICH, A.; ZIMMERMANN, C.; WEGER M. TNF- $\alpha$  -308 G>A and -238 G>A polymorphisms are not major risk factors in Caucasian patients with exfoliation glaucoma. *Molecular Vision*, 15: 518-522, 2009.

MURRAY, J.C. BUETOW KH, WEBER JL, LUDWIGSEN S, SCHERPBIER-HEDDEMA T, MANION F, QUILLEN J, SHEFFIELD, VC, SUNDEN S, DUYK GM. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science* 265:2049-2054, 1994.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUZA, E.C.; SILVA, L.M.; LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; BEZERRA, G.F.B; VIANA, G.M.C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública, RJ*, 6: 1801-1807, 2005.

NELSON, B.J.; RALPH, P.; GREEN, S.J.; NACY, C.A. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effects reactions to the suppressive effects of TGF- $\beta$ . *Journal Immunology*. 146: 1849-1857, 1991.

NOGUEIRA, L.S.C.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro*. 76: 51-62, 2001.

NUNES, A.D.; PAULA, E.V.; TEODORO, R.; PRATA, A.; SILVA-VERGARA, M.L. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública, RJ*, 22: 1343-1347, 2006.

O'REILLY, D.A. DUNLOP S, SARGEN K, DEMAINE A, WILKINSON S, KINGSNORTH AN. Tumour necrosis factor microsatellite haplotypes are associated with chronic pancreatitis. *Journal of Pancreas*. 7:14-26, 2006.

OLIVEIRA MM, SILVA JCS, COSTA JF, AMIM LH, LOREDO CCS, MELO H, QUEIROZ, LF, MELLO FCQ, LAPA E SILVA JR, KRITSKI AL, SANTOS AR. Distribuição de polimorfismo de base única (SNPs) no gene de TNF- $\alpha$  (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: Marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB?. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 30:461-467, 2004.

OLIVEIRA, KB; REICHE, MV Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. *Journal of Cutaneous Pathology* v, 34:27-32, 2006.

OLIVEIRA, S.H.; FONSECA, S.G.; ROMÃO, P.R.; FIGUEIREDO, F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunology*. 20: 405-412, 1998.

OREGÓN-ROMERO, E.; QUEZADA, S.L.R.; HERNÁNDEZ, R.E.N.; VILLALOBOS, H.R.; BONILLA, G.M.; MEDINA, A.G.B.; BORUNDA, J.A.; BAÑUELOS, J.G.; VALLE, J.F.M. Tumor Necrosis Factor [alpha]-308 and -238 Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis. Association With Messenger RNA Expression and TNF- $\alpha$ . *Journal of Investigative Medicine*. 56: 937-943, 2008.

PAES, N.A.; SILVA, L.A.A. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição. *Revista Panamericana de Saúde Pública*. 6: 99-109, 1999.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333: 664-666.

PASARE C, MEDZHITOV R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*.16: 23-6. 2004.

PASSOS, V.M.A.; SANDHI, M.B.; ROMANHA, A.J.; KRETTLI, A.U.; VOLPINI, A.C.; GONTIJO, C.M.F.; FALCÃO, A.L.; LIMA-COSTA, M.F.F. Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêutico e evolutivos. *Revista Brasileira de medicina Tropical*. 34: 5-12, 2001.

PEDROSA, F.A. Fatores de risco para leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de Alagoas, Brasil. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) Universidade Federal de Pernambuco- Recife, 84 pag, 2007.

POLYMEROPOULOS, M.H.; RATH, D.S.; XIAO, H.; RATH, D.S.; MERRIL, C.R. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Research*. 19: 3753, 1991.

PRAVICA, V.; ASDERAKIS, A.; PERREY, C.; HAJEER, A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur. J.Immunogenet*, 26:1-3, 1999.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. *Química Nova*. 22: 584-590, 1999.

RAYMOND, M. &. ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2, 3.2): Population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal Hered* .86:.248-249, 1995.

READ, R.C.; TEARE, D.M.; PRIDMORE, A.C.; NAYLOR, S.C.; TIMMS, J.M.; KACZMARSKI, E.B.; BORROW, R.; WILSON, A.G. The tumor necrosis factor polymorphism TNF (-308) is associated with susceptibility to meningococcal sepsis, but not with lethality. *Critical Care Medicine*, 37: 1237-1243, 2009.

REBÊLO, J.M.M.; JÚNIOR, A.N.A.; SILVA, O.; MORAES, J.L.P.; NASCIMENTO, F.R.F.; PEREIRA, Y.N.O.; COSTA, J.M.L. Foco emergente de leishmaniose tegumentar (LT) no entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Nordeste, Brasil. *Gazeta médica da Bahia*. 79: 103-109, 2009.

REZAIEYAZDI, Z.; AFSHARI, J. T.; SANDOOGHI M.; MOHAJER, F. Tumour necrosis factor  $\alpha$  -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. 28: 189-191, 2007.

ROMÃO, P.R.T.; DIAS, R.O.; CRUZ, K.K.; MARQUES, F.C.S.; MONTEIRO.M.C. *Leishmaniasis: immune response and antioxidants mechanisms of evasion*. (2007) webpage. <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/viewFile/2/1>. Acesso em março de 2009.

ROMÃO, P.R.T.; FONSECA, S.G. MORAES, R.H.; CRUZ, A.K.; HOTHERSALL, J.S.; NORONHA-DUTRA, A.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. transcription. *Molecular Immunology*, 34:391-399.1997.

ROSENBERG RN. DNA-triplet repeats and neurologic disease. *The New England Journal of Medicine* 335:1222-1224, 1996.

SALOMÃO, R. Plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with visceral Leishmaniasis (Kalazar). Association with activity of the disease and clinical remission following antimonial therapy. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*.38:113-118, 1996.

SANTOS, J.B.; LAUAND, L.; SOUZA, G.S.; MACÊDO, V.O. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. *Caderno de Saúde Pública, RJ*, 16: 701-708, 2000.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI D.; EXCOFFIER L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SCHUMM, J.W. Genetic identity: new approaches to DNA fingerprint analysis, *Promega Notes* 58:12-20, 1997.

SCUDERI, P.; LAM, K.S. & RYAN, K.J. Raised Serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infection. *Lancet*.2:1364-1365, 1986.

SILVA, A.R.; MARTINS, G.; MELO, J.E.M. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (Estado do Maranhão), Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 21: 43-50, 1979.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infection and Immunity*. 63: 4862-4867, 1995.

SILVA, L.M.R.; CUNHA, P.R. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas-São Paulo (SP) e região; magnitude do problema e desafios. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 82: 515-519, 2007.

SILVEIRA, F.T. Patogenia da leishmaniose tegumentar americana: caracterização clínica, histopatológica e imunológica da leishmaniose disseminada, com ênfase na *Leishmania (L.) amazonensis*. 2001. 181 (f). Tese de doutorado: Faculdade de Medicina da USP; São Paulo.

SILVEIRA, T.G.; TEODORO, U.; LONARDONI M.V.; GUILHERME, A.L.; TOLEDO M.; RAMOS, M. Epidemiologic aspects of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of the state of Paraná, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 12: 141-147, 1996.

SILVIA JS, VESPA GN, CARDOSO MA, ALIBERTI JC and CUNHA FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infection and Immunity*. 63:4862-4867, 1995.

SKRABA, CM; MATSUBARA, FM ZANZARINE, PD; VENZAZZI EAS;ROBERTO, ACBS; LONARDONI, MVC; ARRAES, SMAA.*et al.* Diagnóstico e acompanhamento de pacientes suspeitos de Leishmaniose tegumentar americana. *IV Fórum de Extensão e Cultura da UEM: Perspectivas da Extensão Universitária e da Prestação de Serviços*. Arq Mundi.,10: 257-259, 2006.

SOSA-ESTANI, SS; SEGURA, EL; GOMES, A.; SALOMÓN, OD.; PERALTA, M.; COUTADA,V.;RUIZ, LM. Leishmaniose cutânea no Norte da Argentina. Fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34: 511-517, 2001.

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The Journal Human Genetics*. 68: 978-989, 2001.

TEODORO, U. Características Ecológicas de Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em habitats antrópicos, município de Jussara, Paraná, Brasil. **Tese de doutorado**, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995.

TEODORO, U.; LIMA, EM; SPINOSA, RP; BARBOSA,O.C.; FERREIRA,M.E.M.C.; SILVEIRA,T.G.V. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do estado do Pará-Brasil: Variação sazonal e atividade noturna. *Revista. Saúde Pública*,2:190-94,1993.

TEODORO, U.; SILVEIRA T.G.V.; SANTOS, D.R.; SANTOS, E.S.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; KÜHL, J.B.; ALBERTON, D.; Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos, no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*.;19: 1801-1813, 2003.

TEODORO; U.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; DIAS, A.C.; ABBAS M.; ALBERTON, D.; SANTOS, D.R. Light and hems as attraction factors of *Nyssomyia whitmani* in rural área, Sourthern Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 41. 41:83-388, 2007.

TITUS, R.G.; THEODOS, C.M.; SHANKAR, A.H.; HALL, L.R. Interactions between *Leishmania major* and macrophages. *Immunology Series*. 60: 437-459, 1994.

TOLEZANA, J.E. Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89: 427-434, 1994.

TONIAL, S.R.; SILVA, A.A.M. Saúde, nutrição e mortalidade infantil no Maranhão. São Luís. UFMA: Secretaria do Estado da Saúde: UNICEF, 115p, 1997.

TSUKAMOTO, K, OHTA N, SHIRAI Y, EMI M. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) *loci*. *Journal Human Genetic*.43:278-279, 1998.

UDALOVA I.A, NEDOSPASOV A, WEBB GC, CHAPLIN DD, TURETSKAYA RL. Highly informative typing of the human TNF *loci* using six adjacent polymorphic markers. *Genomics*. 16: 180-186, 1993.

USSUI, C.A; NEVES, V. L. F. C. Leishmaniose Tegumentar Americana. São Paulo: Sucen, 2001. p. 1-4. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/dencas/leishteg/texto-leshmaniose-tegumentar.htm>>. Acesso em: 11 janeiro 2008.

VANZELI, A.C.;KANAMURA, H.Y. Estudo de fatores socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. *Revista panamericana de infectologia*. 9: 20-25, 2007.

VELA, J.S.A. Fatores de risco para a transmissão de leishmaniose cutânea em crianças de 0-5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 92 pag. 1996.

VERWEIJ, C.L. Tumour necrosis factor gene polymorphism as severity markers in rheumatoid arthritis. *Annals Rheumatic Diseases*.58:120-126, 2007.

WEBER, J.L. and WONG,C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2:2223-1128, 1993.

WEIR, B.S. Population genetics in the forensic DNA debate. *Proceedings of the National Academy of the Science USA* 89:1123-11659,1992.

WHO (World Health Organization) / OPS (Organização Panamericana de Saúde). *Leishmaniasis en las Americas. Situacion actual y alternativas para su control*.Oficina Sanitária Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de Salud, 38p., 1996.

WHO (World Health Organization) / OPS (Organização Panamericana de Saúde). *Neglected Tropical Diseases*. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO\\_CDS\\_NTD\\_IDM\\_2007.3\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf). Acessado em abril 2009.

WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; MCDOWELL, T.L.;MCDEVITT, H.O.; DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 94: 3195-3199, 1997.

WIRTH JJ. & KIERSZENBAUM F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *Journal of Immunology*. 141:286, 1988.

WITTE, J.S.; PALMER L. J.; O'CONNOR, D.R.; HOPKINS, P.J.; HALL J.M. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFa -308 and risk of asthma. *European Journal of Human Genetics*. 10: 82-85, 2002.

## 15.0 ANEXOS

### 13.1 Anexo I - INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO E IMUNOALÉRGICO

#### QUESTIONÁRIO FAMILIAR

Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – Fundação Oswaldo Cruz/BA

(Laboratório de Imunoparasitologia – LIP)

Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva – CEDERPES/PIEJ

CASA Nº: \_\_\_\_\_

DATA DO PREENCHIMENTO

Dados de Identificação	
<b>1</b> –Nome: _____	
_____ Apelido: _____	
<b>2</b> – Nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: _____	
<b>3</b> – Sexo: (1) M (2) F (9) NSI	
<b>4</b> – Cor: (1) Branca (2) Negra (3) Parda (4) Amarela (9) NSI	
<b>5</b> – Última procedência: _____	
<b>6</b> – Residência atual: _____	
<b>7</b> – Há quanto tempo? _____	
<b>8</b> – Endereço para contato: _____	
_____	
Referência: _____	
<b>9</b> – Situação conjugal: (1) casado (2) solteiro (3) morando junto (4) separado (5) divorciado (6) viúvo (9) NSI	
<b>10</b> – Atividade principal: _____	
<b>Dados demográficos e sociais</b>	
<b>11</b> - Quantos moram na residência: _____	
<b>12</b> – Lê e escreve? (1) Sim (2) Não (9) NSI Pai: (1) Sim (2) Não (3) Só assina (4) Ignorado Mãe: (1) Sim (2) Não (3) Só assina (4) Ignorado	
<b>14</b> – Quantas pessoas trabalham na casa? _____	
<b>15</b> – Qual a renda mensal? (1) <1 salário (2) 1 a 2 salários (3) 2 a 4 salários (4) >5 salários (9) NSI	
<b>16</b> – De onde vem a água da casa para beber? (1) Rede pública – água encanada (2) Poço artesiano (3) Poço comum, cacimba (4) Rio, riacho, lagoa (5) Chafariz (6) Outros: _____	
<b>17</b> – Qual o destino dos dejetos? (1) Rede de esgoto (2) Fossa séptica (3) Fossa negra (4) Vala (5) Outros (9) NSI	
<b>18</b> – Onde se joga o lixo? (1) Carro de lixo da prefeitura (2) Terreno baldio (3) Queimado (4) Outros (9) NSI	
<b>19</b> – Há energia elétrica na Residência? (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>Reservatórios/moradia</b>	
<b>20</b> – Você reside em casa: (1) Própria (2) Alugada (3) Cedida (4) Outros	
<b>21</b> – Tipo de Moradia: (1) Alvenaria (2) Palha (3) Taipa (4) Adobe (5) Não rebocada (9) NSI	
<b>22</b> – Tipo de cobertura: (1) Telha (2) Palha (3) Laje (4) Outros (9) NSI	
<b>23</b> – Tipo de piso: (1) Cerâmica (2) Cimento (3) Chão batido (4) outros	
<b>24</b> – Número de cômodos: (1) 01 (2) 02 (3) 03 (4) > 03	
<b>25</b> – Quantas pessoas dormem em um mesmo cômodo (média)? (1) 01 (2) 02 (3) 03 (4) > 03	
<b>26</b> – Borrifação no último ano: (1) Sim (2) Não Tipo: _____	
<b>27</b> – Utilização de produtos tradicionais como repelentes: (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>28</b> – Uso de Mosquiteiros: (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>29</b> – No trabalho. Qual tipo de roupa é usada? (1) Calça comprida (2) Bermuda (3) Calção (4) Sem camisa (5) Camiseta (6) Camisa manga longa (7) Outros (9) NSI	
<b>30</b> – Proteção dos pés: (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>31</b> – Existem animais domésticos na casa? (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>32</b> – Espécie de animal: (1) Cão (2) Gato (3) Galinha (4) Cavalo (5) Outros (9) NSI	
<b>33</b> – Nas imediações de sua casa há presença de animais? (1) Cão (2) Gato (3) Sariguê (4) Raposa (5) outros	
<b>34</b> – Na sua casa e ou imediações há presença de mosquitos? (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>35</b> – Existem criadouros de mosquito na residência ou próximo a ela? (1) Sim (2) Não (9) NSI	
<b>36</b> – A residência fica localizada próximo: (1) Terrenos alagados (2) Esgotos a céu aberto (3) Rio ou lago (4) Criação de porcos (5) Mata (6) Criação de galinhas (9) NSI	
<b>37</b> – Há pessoas com LT ou que tiveram LT na residência? (1) Sim (2) Não (9) NSI	

38 – Nome da pessoa que teve ou está com a doença LTA.

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_ Ano \_\_\_\_\_  
Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_ Ano \_\_\_\_\_

39 – Foi tratado?

(1) Sim (2) Não (9) NSI

40 - Com que?

(1) Antimoniais pentavalentes (2) Medicação caseira (3) Regressão espontânea (4) Outros (9) NSI

41 – Existência de pessoas com LT na vizinhança no último ano?

(1) Sim (2) Não (9) NSI

**Exames Laboratoriais realizados:**

1ª Fase: IDR (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Leitura (48/72h) \_\_\_\_\_ mm (+) ou (-)

2ª Fase: IDR (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Leitura (48/72h) \_\_\_\_\_ mm (+) ou (-)

1ª Fase: ELISA (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) \_\_\_\_\_

2ª Fase: ELISA (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) \_\_\_\_\_

**Classes Econômicas:**

**Posse de itens: circular o quadrado correspondente**

	Não tem	Tem			
		1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	2	3	4	5
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	2	3	4	4
Automóvel	0	2	4	5	5
Empregada mensalista	0	2	4	4	4
Aspirador de pó	0	1	1	1	1
Máquina de lavar	0	1	1	1	1
Videocassete ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	2	2	2	2
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	1	1	1	1

42. Classificação Econômica Brasil  
Total de pontos para posse de itens

POSSE

**43. Grau de instrução do chefe de família**

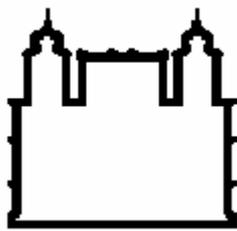
- (0) Analfabeto/primário incompleto
- (1) Primário completo/ginasial incompleto
- (2) Ginasial completo/colegial incompleto
- (3) Colegial completo/superior incompleto
- (5) Superior completo

OBS: primário corresponde hoje da 1ª. à 4ª. Série do ensino fundamental (antigo primeiro grau), o ginasial da 5ª. à 8ª. Série do ensino fundamental e o colegial correspondente ao antigo segundo grau.

INSTRUÇÃO

Total de pontos para grau de instrução do chefe de família

## 13.2 Anexo II - QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL



### INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO E IMUNOALÉRGICO

#### QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – Fundação Oswaldo Cruz/BA  
(Laboratório de Imunoparasitologia – LIP)  
Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva – CEDERPES/PIEJ

CASA Nº: \_\_\_\_\_ DATA DO PREENCHIMENTO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### Dados de Identificação

- 1 - Nome: \_\_\_\_\_ Apelido \_\_\_\_\_  
2 - Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
3 - Sexo: (1) Masculino (2) Feminino (9) NSI  
4 - Cor: (1) Branca (2) Negra (3) Parda (4) Amarela (9) NSI  
5 - Última procedência \_\_\_\_\_  
6 - Residência atual \_\_\_\_\_  
7 - Há quanto tempo? \_\_\_\_\_  
8 - Endereço para contato \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Ponto de Referência: \_\_\_\_\_  
10 - Situação conjugal do entrevistado:  
(1) casado (2) solteiro (3) morando junto (4) separado (5) divorciado (6) viúvo (9) NSI  
11 - Atividade principal do entrevistado: \_\_\_\_\_  
12 - Teve LT ou apresenta alguma sintomatologia sugestiva?  
(1) Sim (2) Não (9) NSI  
13 - Foi tratado?  
(1) Sim (2) Não (9) NSI  
14 - Com que?

- (1) Antimonial pentavalente (Glucantime) (2) Medicação caseira  
(3) Regressão espontânea (4) Outros (9) NSI

#### Exames Laboratoriais realizados:

1ª Fase: IDRM (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Leitura (48/72h) \_\_\_\_\_ mm (+) ou (-)

2ª Fase: IDRM (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Leitura (48/72h) \_\_\_\_\_ mm (+) ou (-)

1ª Fase: ELISA (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) \_\_\_\_\_

2ª Fase: ELISA (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) \_\_\_\_\_

### 13.3 Anexo III – TERMO DE CONSENTIMENTO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O objetivo desta pesquisa é determinar o que leva algumas pessoas a desenvolverem a doença leishmaniose tegumentar (ferida brava). Nós estamos convidando você e a sua família para participarem deste estudo, porque vocês residem em uma região onde a LT é comum. Nós acompanharemos sua família com visitas domiciliares, com objetivo de identificar se alguém da família foi infectada pelo parasita que causa a leishmaniose tegumentar. Para isto, nós consultaremos as pessoas que moram em casa. Solicitaremos que vocês doem um pouco de sangue (aproximadamente uma colher de sopa = 15cc). Este sangue será usado para avaliar a resposta imune ao parasita que causa leishmaniose, realização de hemograma e extração de DNA que serão utilizados em estudos para determinar fatores genéticos envolvidos com o desenvolvimento de doenças infecciosas, como leishmaniose e tuberculose, e doenças auto-imunes. Nós também realizaremos os testes intradérmicos para determinar exposição a leishmaniose. Se alguém apresentar algum sinal de doença será encaminhado a um centro de saúde ou hospital para realização de exames laboratoriais e tratamento, caso seja necessário.

#### **PROCEDIMENTOS**

Abaixo está descrito o procedimento a ser seguido para aqueles que concordarem em participar:

1. Responder um questionário referente a sua saúde;
2. Realização de exame físico;
3. Doação de sangue, você poderá ingerir sua dieta normalmente no dia da doação. Nós faremos a assepsia do seu braço com álcool e em seguida usaremos o torniquete. Nós coletaremos sangue do seu braço, utilizando técnica estéril.
4. O teste intradérmico será realizado através da colocação dos antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro) na face anterior do antebraço, utilizando seringas de 1cc. Retornaremos após 48 horas para avaliar a resposta e entregar o resultado dos exames realizados.

#### **RISCOS**

Os riscos possíveis associados à participação neste estudo são os seguintes: Os riscos relacionados à coleta de sangue são sangramentos ou equimoses, infecção e desmaio. Os riscos do teste cutâneo são infecção e uma área grande de endureção cujo tratamento será feito utilizando esteróide tópico.

#### **BENEFÍCIOS**

Os benefícios em participar deste estudo são que você, os membros de sua família serão monitorizados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a LT. Para os doadores de sangue, não há benefício aparente. No entanto, espera-se que os resultados deste estudo sejam medidas mais efetivas para o controle da LT.

Além de nossa pesquisa, nós realizaremos testes sanguíneos e de pele que podem indicar se você tem algum problema médico. Nós trataremos os problemas médicos mais simples. Não haverá ônus para você em decorrência dos testes ou tratamento que realizaremos. Para problemas médicos mais complexos, você será encaminhado a um posto de saúde ou hospital. Este estudo não reembolsará por tratamento realizado.

## CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

Registro da participação neste estudo será mantido confidencial, até o limite permitido pela lei. No entanto, agências Federais regulamentadoras no Brasil, o comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/Ba), pode inspecionar e copiar registros pertinentes a pesquisa e estes podem conter informações identificadoras.

Nós guardaremos os registros de cada indivíduo, em sala trancada, e somente os médicos trabalhando na equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número para ser utilizado no laboratório. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente não será revelada. Resultados serão relatados de forma sumarizada e o indivíduo não será identificado.

## DANO ADVINDO DA PESQUISA

Se houver algum dano ou se algum problema ocorrer decorrente deste estudo, o tratamento médico será fornecido sem ônus para o paciente e será providenciado pelo Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa ou médico que esteja trabalhando com ele. Se houver despesas oriundas de outras clínicas ou hospitais, cada indivíduo será responsável pelas despesas.

## PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Toda participação é voluntária. Não há penalidade para alguém que decida não participar neste estudo. Ninguém também será penalizado se decidir desistir de participar do estudo, em qualquer época. O tratamento para a LT não será diferente caso você decida participar ou não desta pesquisa.

## PERGUNTAS

Estimulamos que vocês façam perguntas a respeito da pesquisa. Se houver alguma pergunta, por favor, contate o Dr. Jackson M.L.Costa (71) – 3356-8782 Ramal 261 no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/Ba).

Nome da pessoa (*letra de forma*): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Responsável

\_\_\_\_\_  
Testemunha

Família \_\_\_\_\_

## COMPROMISSO DO INVESTIGADOR

Eu discuti as questões acima apresentadas com os indivíduos participantes no estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a este projeto.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador