

Leishmaniose visceral e susceptibilidade genética

Visceral leishmaniasis and genetic susceptibility

Amanda Farage Frade

Laboratório de Alergia e Imunologia, Instituto do Coração, FMUSP

Resumo. A leishmaniose visceral é uma grave doença infecciosa causada por um protozoário intracelular obrigatório do gênero *Leishmania*. A doença abrange um grande espectro de manifestações clínicas que podem variar desde infecções assintomáticas, passando pela forma clássica da doença caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre e caquexia, chegando até formas mais graves com sangramentos que podem evoluir para a morte. Alguns fatores podem alterar a gravidade das manifestações clínicas, sendo um deles a predisposição genética. Por meio da pesquisa de polimorfismos genéticos é possível avaliar quais os genes que podem estar relacionados com a susceptibilidade à infecção e com a predisposição às formas mais graves da doença.

Palavras-chave. *Leishmaniose visceral, polimorfismos genéticos, genes candidatos, imunogenética.*

Abstract. Visceral leishmaniasis is a serious infectious disease caused by an obligate intracellular protozoan of the genus *Leishmania*. The disease encompasses a wide spectrum of clinical manifestations, which can range from asymptomatic cases, to the classical form of the disease characterized by hepatosplenomegaly, fever and wasting, and even the more severe bleeding that can progress to death. Some factors can alter the severity of clinical manifestations, among them the genetic predisposition. Through research of genetic polymorphism it is possible to evaluate which genes may be related to susceptibility to infection and predisposition to the most severe forms of the disease.

Keywords. *Visceral leishmaniasis, genetic polymorphism, candidate genes, immunogenetic.*

A Leishmaniose Visceral

O presente artigo trata-se de uma revisão e tem como objetivo principal introduzir ao leitor conhecimentos na área de imunogenética da leishmaniose visceral e susceptibilidade genética à infecção, discutido no contexto de publicações recentes sobre polimorfismos genéticos na leishmaniose visceral.

A leishmaniose visceral (LV) ou Kala-azar (febre-negra) é uma doença crônica que ataca os órgãos internos, principalmente o fígado, baço, medula óssea e linfonodos (Kaye et al. 2004). Essa doença é causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao complexo donovani do gênero *Leishmania* (Badaró et al. 1986), como *Leishmania donovani* no velho mundo e *L.chagasi/infantum* no novo mundo (Siveira 2010), que infectam preferencialmente macrófagos, (Lukes et al. 2007).

Pesquisando os aspectos moleculares da relação vetor-parasita e as interações hospedeiro-vetor da leishmaniose, Sacks e Kamhawi verificaram que a doença pode ser transmitida por mais de 29 vetores diferentes nas Américas, e que no Brasil o vetor principal da leishmaniose visceral é *Lutzomyia longipalpus* (Sacks and Kamhawi 2001).

A doença é endêmica em 88 países, com prevalência de 12 milhões de casos e incidência estimada em 500.000 casos/ ano (Fig. 1). No Brasil ocorrem 3000-5000 casos/

ano (Berman 2006). A doença é predominantemente pediátrica (Malla and Mahajan 2006), com um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde o acometimento tegumentar leve até o envolvimento visceral grave. A resposta imune contra a *Leishmania* é modulada por vários fatores do hospedeiro como estado nutricional, idade e herança genética, assim como fatores intrínsecos do parasito, como a espécie e a cepa. A infecção é geralmente auto-limitada e assintomática, mas eventualmente evolui para a forma mais grave, caracterizada por febre, caquexia profunda, hepatoesplenomegalia, sangramentos graves e eventualmente morte se não tiver tratamento adequado (Blackwell et al. 1997; Caldas et al. 2005).

Fatores genéticos podem favorecer o desenvolvimento da LV e levar diferentes formas clínicas da doença, o que justifica a busca de genes associados a patologia, como possíveis marcadores de susceptibilidade (Ettinger, Duggal et al., 2009, Jeronimo, Duggal et al., 2007, Karplus, Jeronimo et al. 2002).

Resposta Imune do hospedeiro

É possível avaliar o tipo de resposta formada contra o parasita pesquisando-se os níveis plasmáticos de citocinas. Em indivíduos com a forma ativa da leishmaniose visceral observa-se um balanço nas respostas inflamatórias e reguladoras (Th1/Th2), com altos níveis plasmáticos

Contato do autor:

affrade@yahoo.com.br

Recebido 05out2010

Aceito 22mar2011

Publicado 22jul2011

de citocinas IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10. (Barral-Netto et al. 1992; Peruhype-Magalhães et al. 2006). Elevados níveis plasmáticos das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10 e TGF- β podem ser encontrados durante a doença ativa, e um decréscimo dos níveis é observado após a cura. Entretanto, mesmo após a cura, já foi verificado que os níveis IFN- γ e IL-10 continuaram elevados, sugerindo a coexistência de padrões Th1/Th2 tanto nos pacientes com LV ativa como nos indivíduos curados.

Em casos mais graves da doença pode ocorrer uma falha na geração de IFN- γ , e a ausência desta citocina leva à baixa produção de fatores microbicidas dos macrófagos como o óxido nítrico (NO) e os radicais livres de oxigênio (ROs) (Jeronimo et al. 2007a). Elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , (Barral-Netto et al. 1992; Caldas et al. 2005; McConville and Handman 2007) também influenciam na sobrevivência da *Leishmania* dentro dos macrófagos ao impedir a superprodução das moléculas leishmanicidas, como NO e ROs, e estão diretamente correlacionadas com a progressão e gravidade da doença (Barral-Netto et al. 1992).

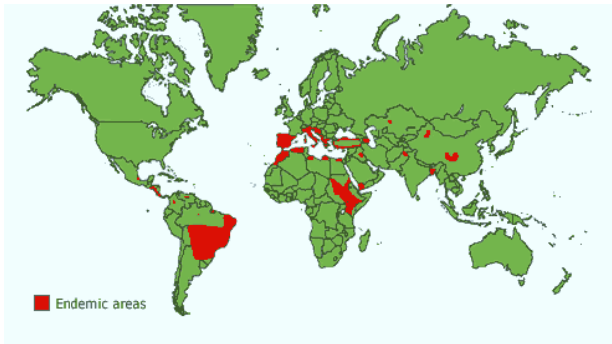


Figura 1. Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral. [Figura retirada do site: www.who.int/tdroid/dw/leish_map.htm. (WHO 2003)].

Polimorfismo genético e susceptibilidade genética à LV

A co-existência de variação de alelos em um local cromossômico (lôcus) é chamada de polimorfismo genético. O sítio onde possa existir diferentes versões de uma seqüência cromossômica ou apenas a mudança de um único alelo é chamado polimórfico. Um alelo pode ser definido como polimórfico se ele estiver presente em uma freqüência maior que 1% na população. (Simmons and Snustad 2006).

Há diversos tipos de polimorfismos. Entre eles, os polimorfismos de seqüências repetitivas ou Small tandem repeats (“STRs”) são caracterizados por repetições de seqüências com dois a cinco nucleotídeos também conhecidas como microsátélites. Nos Variable number of tandem repeats (“VNTR”) ou minisátélites, pode-se verificar um número variável de repetições com seqüências de nucleotídeos maiores. Finalmente, os Single Nucleotide Polymorphisms (“SNPs”) mostram variação de apenas um único nucleotídeo, e contam na casa dos milhões, distribuídos por todo o genoma (Lewin 2001).

Os polimorfismos tipo SNP podem influenciar

muitos fatores de risco associados a doenças. Um grande número destes polimorfismos de nucleotídeo único de interesse está localizado em regiões que precedem a fase de leitura aberta do gene ou em regiões intergênicas que regulam sua expressão. Eles podem determinar fenótipos que expressam diferentes quantidades das proteínas codificadas, sendo considerados “polimorfismos funcionais”, ou levam a modificações da própria proteína. Polimorfismos podem também ser considerados como marcadores genéticos, já que são transmitidos juntamente com outros genes em ligação (linkage), localizados em regiões cromossômicas vizinhas, que podem, por sua vez, impactar na suscetibilidade à doença. (Simmons and Snustad 2006).

Os primeiros estudos realizados para mensurar o impacto genético na susceptibilidade à LV foram realizados em modelos experimentais de camundongos. Por meio desses estudos, foi possível confirmar a presença de diversos genes de susceptibilidade ao desenvolvimento das diferentes formas de LV (Blackwell 1996; Blackwell et al. 2009).

A influência de fatores genéticos do homem relacionados ao desenvolvimento das diferentes formas de leishmaniose tem sido evidenciada por meio de estudos de larga escala, na forma de varredura do genoma dos indivíduos - “Genome wide scanning” (Bucheton et al. 2003a; Jamieson et al. 2007; Jeronimo et al. 2007a) e também em estudos de genes candidatos, nos quais é feita uma avaliação do grau de associação entre uma variante polimórfica e a presença da doença propriamente dita ou de alguma característica específica da doença (Blackwell et al. 2009; Bucheton et al. 2003b; Jeronimo et al. 2007b; Peacock et al. 2002).

Fatores de risco e genes relacionados à susceptibilidade genética na LV

Os estudos de ligação baseiam-se no fato de que dois loci gênicos situados no mesmo cromossomo e muito próximos um do outro tendem a ser herdados conjuntamente (ligados). Nesse tipo de estudo são analisados grandes números de trios de famílias (pai, mãe e filho) para se detectar possíveis regiões cromossômicas de susceptibilidade genética. Por meio desta abordagem, já foi possível identificar genes de susceptibilidade tanto para leishmaniose visceral quanto para leishmaniose mucosa, mostrando haver, de fato, a influência de fatores genéticos na susceptibilidade ao desenvolvimento da LV (Barral-Netto et al. 1992; Bucheton et al. 2003a; Jeronimo et al. 2007a).

O primeiro estudo de ligação para identificar genes de susceptibilidade à LV foi feito em pacientes e suas famílias em uma vila do Sudão, endêmica para *L. donovani*. Este estudo demonstrou haver uma forte ligação entre a presença da doença sintomática e a segregação de variantes genéticas na região do cromossomo 22q12 (Bucheton et al. 2003a).

Outro estudo de 59 famílias com casos de LV também realizado no Sudão encontrou ligação dos genes IL4 e IFNGR1 com susceptibilidade à LV, porém não confirmou os genes identificados no estudo de Bucheton (Mohamed et al. 2003).

Em uma zona endêmica na cidade de Natal, Brasil, foram estudadas famílias de pacientes com LV, e seus contactantes, como as famílias e residentes nas casas vizinhas. Foram analisados 405 marcadores de microsátélites em 1254 indivíduos, e identificadas quatro regiões de interesse nos cromossomos 2, 13, 15 e 19, relacionadas a genes que conferem proteção imunológica contra a infecção por *L. donovani* (Jeronimo et al. 2007a). No mesmo ano, o grupo de pesquisadores de Natal, analisando 102 famílias da mesma região endêmica em estudo de genes candidatos, pesquisou polimorfismos na região cromossômica 5q23-q31.1. O estudo indicou que os genes LECT2, TFG-BI e IL4 podem influenciar o desfecho da infecção por *L. donovani* (Jeronimo et al. 2007b).

Recentemente, Ettiger e col. também estudaram uma população do nordeste do Brasil e compararam grupos de indivíduos infectados com *Leishmania* com fenótipos diferentes da doença: pacientes sintomáticos, assintomáticos e as respectivas famílias. Foi encontrada grande associação entre susceptibilidade a LV e genes de resposta imune presentes no cromossomo 22, independentemente da forma clínica da doença, concordando com o estudo de Bucheton e col., 2003a (Ettiger et al. 2009). Estes dados sugerem que indivíduos que herdaram determinados alelos nessa região cromossômica podem estar mais predispostos a desenvolver formas sintomáticas de infecções por *Leishmania*.

Estudos de genes candidatos

Por meio de estudos de genes candidatos é possível selecionar polimorfismos em genes alvos diretamente envolvidos na resposta imune do hospedeiro, associando as diferenças alélicas e/ou genotípicas encontradas na população com a susceptibilidade à doença ou com características específicas da doença. É uma abordagem útil, quando não há famílias, isto é, quando as amostras são provenientes de indivíduos não relacionados. De modo geral, é o tipo de estudo mais adequado para identificar genes que possam ter alguma associação na susceptibilidade a doenças, como no caso de genes que codificam citocinas. Este tipo de abordagem exige cuidados na escolha da população, e, em especial, a escolha dos grupos controles para comparação dos resultados obtidos.

Existem poucos estudos de genes candidatos no Brasil para se avaliar a susceptibilidade à LV. Em um estudo de genes candidatos, nosso grupo mostrou que a presença do alelo T no polimorfismo TGFB1 -509C/T conferiu um risco duas vezes maior para a infecção por *Leishmania* (leishmaniose visceral) em regiões endêmicas dos estados do Maranhão e Piauí, sugerindo que a presença deste polimorfismo pode estar associada com a susceptibilidade à infecção à LV, e com eventos de hemorragia [(Frade et al. 2010)in press].

A grande maioria dos estudos de associação alélica realizados até agora para encontrar genes de susceptibilidade a infecção têm sido de fraco poder estatístico e com tamanhos amostrais pequenos. De fato, os estudos não foram confirmados em coortes independentes, análise importante para se evidenciar um forte poder estatístico.

Porém, com a formação de grandes bancos de DNA em países endêmicos como a Índia e o Brasil, torna-se possível realizar estudos de associação do genoma completo. Alguns destes estudos já estão em andamento como o estudo do “Wellcome Trust Case Control Consortium”. Os dados de pesquisas na área de imunogenética devem acrescentar novas informações acerca dos genes e mecanismos que influenciam a susceptibilidade à VL (Blackwell et al. 2009). Para os leitores interessados a se aprofundar no assunto, a revisão de Blackwell e col., compila de forma detalhada todos os polimorfismos já estudados na LV, tanto na infecção humana como na infecção experimental.

Agradecimento

À Dra. Lea Campos de Oliveira pela consistente revisão do artigo.

Bibliografia

- Badaró R, Carvalho EM, Rocha H, Queiroz AC, Jones TC (1986) *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* 1: 647-9.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG (1992) Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-8.
- Berman J (2006) Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res* 123: 289-94
- Blackwell JM (1996) Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology* 112 Suppl: S67-74.
- Blackwell JM, Black GF, Peacock CS, Miller EN, Sibthorpe D, Gnananandha D, Shaw JJ, Silveira F, Lins-Lainson Z, Ramos F, Collins A, Shaw MA (1997) Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1331-45.
- Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, Mishra A, Mohamed HS, Peacock CS, Raju M, Sundar S, Wilson ME (2009) Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol* 31: 254-66.
- Bucheton B, Abel L, El-Safi S, Kheir MM, Pavék S, Lemainque A, Dessein AJ (2003a) A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *Am J Hum Genet* 73: 1052-60.
- Bucheton B, Abel L, Kheir MM, Mirgani A, El-Safi SH, Chevillard C, Dessein A (2003b) Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun* 4: 104-9.
- Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A (2005) Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5: 113.
- Ettiger NA, Duggal P, Braz RF, Nascimento ET, Beaty TH, Jeronimo SM, Pearson RD, Blackwell JM, Moreno L, Wilson ME (2009) Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. *Ann Hum Genet* 73: 304-13.
- Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW (2010) Western

- Blotting Method (TESAcruzi) as a Supplemental Test for Confirming the Presence of anti-Trypanosoma cruzi Antibodies in Finger Prick Blood Samples from Children Aged 0 to 5 years in Brazil. *Acta Trop.*
- Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, Shaw MA, Silveira F, Shaw JJ, Jeronimo SM, Blackwell JM (2007) Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun* 8: 84-90.
- Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, Pontes NN, Lacerda HG, Queiroz PV, Gomes CE, Pearson RD, Blackwell JM, Beaty TH, Wilson ME (2007a) Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 196: 1261-9.
- Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Lacerda HG, Miller EN, Cordell HJ, Duggal P, Beaty TH, Blackwell JM, Wilson ME (2007b) Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun* 8: 539-51.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201: 239-53.
- Lewin B (2001) De genes a genoma. In: ARTMED (ed) *Genes VII*, VII edn, São Paulo, pp 39-42.
- Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholova E, Haralambous C, Pratlong F, Obornik M, Horak A, Ayala FJ, Miles MA (2007) Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9375-80
- Malla N, Mahajan RC (2006) Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J Med Res* 123: 267-74.
- McConville MJ, Handman E (2007) The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol* 37: 1047-51.
- Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, Peacock CS, Khalil EA, Cordell HJ, Howson JM, El Hassan AM, Bereir RE, Blackwell JM (2003) Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes Immun* 4: 351-5.
- Peacock CS, Sanjeevi CB, Shaw MA, Collins A, Campbell RD, March R, Silveira F, Costa J, Coste CH, Nascimento MD, Siddiqui R, Shaw JJ, Blackwell JM (2002) Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. *Genes Immun* 3: 350-8.
- Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R (2006) Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146: 124-32.
- Sacks D, Kamhawi S (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-83.
- Simmons MJ, Snustad P (2006) Genética Evolutiva. In: Koogan G (ed) *Fundamentos de genética*. 4 ed., vol 1, Rio de Janeiro, pp 802-805.
- Siveira FC, CEP (2010) *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. *Rev Pan-Amaz Saude*, vol 1, pp 18-28.
- WHO OmdS (2003) *Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral*. vol 2010.