

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

TERTULIANO ALVES PEREIRA NETO

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
NOS GENES *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* E *FcyRIIa* EM PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE ORAL**

Alfenas/MG

2017

TERTULIANO ALVES PEREIRA NETO

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
NOS GENES *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* E *FcyRIIa* EM PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE ORAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Co-orientador: Prof. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Pereira Neto, Tertuliano Alves

Avaliação da frequência de polimorfismos de nucleotídeo único nos genes TNF- α , JAK1, VDR, DC-SIGN e Fc γ RIIa em pacientes com paracoccidiodomicose oral / Tertuliano Alves Pereira Neto. -- Alfenas/MG, 2017.

84 f.

Orientador: Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Manifestações orais de doenças. 3. Paracoccidiodioses. 4. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 5. Fator de Necrose Tumoral alfa. 6. Janus Quinase 1. I. Malaquias, Luiz Cosme Cotta. II. Título.

CDD-579.5



TERTULIANO ALVES PEREIRA NETO

“AVALIAÇÃO DE FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES *TNF α* , *JAK1*, *VDR*, *CD209* EM DE PACIENTES COMPARACOCCIDIOIDOMICOSE ORAL”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 26 de julho de 2017.

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Cosme Cotta Malaquias

Profa. Dra. Leticia de Almeida
Instituição: UNESP

Assinatura: Leticia de Almeida

Profa. Dra. Lívia Máris Ribeiro Paranaíba
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Livia Maris Ribeiro Paranaiba

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por me oferecer a oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias por compartilhar seus ensinamentos, pela paciência, por confiar à mim este trabalho, pelo exemplo de profissionalismo e pela imensa contribuição em minha formação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho pela dedicação, confiança, apoio e suporte para superar todas as dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela atenção que sempre me receberam e por compartilharem seus conhecimentos, experiências e conselhos.

Aos meu pais, Tertuliano e Lucineida por todo amor, carinho, esforço e apoio incondicional para que eu tivesse todas as oportunidades possíveis em todos os momentos.

À Maiza, minha namorada que sempre esteve comigo, mesmo à distância, pelo amor, conforto, confiança e compreensão desde o início.

Ao meu irmão Lucas e ao amigo Marcelo pela amizade e companheirismo, pelo suporte dado quando necessário e pelas alegrias e bons momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Alessandro Antonio Costa Pereira e ao Laboratório de Patologia da UNIFAL-MG pela disponibilização dos blocos, lâminas e prontuários utilizados nos experimentos.

À Profa. Dra. Alessandra Esteves pela ajuda e paciência no corte dos blocos no início do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann pelo auxílio e conhecimentos divididos durante as análises histológicas.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo companheirismo e pelas experiências compartilhadas durante todo o mestrado.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Vacinas e do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas pela dedicação, auxílio e atenção durante todos os procedimentos.

Aos pacientes que foram incluídos neste estudo, pela permissão e pela enorme colaboração para que este trabalho fosse realizado e pela possibilidade de obter resultados que, de alguma forma contribuam para uma melhoria na saúde e na qualidade de vida de pessoas com paracoccidoidomicose ou em condições de risco.

RESUMO

Fungos do complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides* são agentes causadores da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica e endêmica na América Latina. Lesões orais ocorrem em aproximadamente 80% dos pacientes com a forma crônica e são caracterizadas pela presença de granulomas que podem indicar a extensão da doença, de acordo com sua organização. A evolução da doença depende não somente da virulência do fungo, mas também da integridade da resposta imune e de fatores genéticos do hospedeiro. Dentre este último, destacam-se os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em vários componentes da resposta imunológica. Dentre os SNPs, cujas associações já foram descritas para diversas doenças infecciosas, destacam-se os presentes em genes como *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* e *FcyRIIa*. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência dos SNPs *DC-SIGN* (rs4804803), *FcyRIIa* (rs1801274), *JAK1* (rs11208534), *TNF- α* (rs1800629) e *VDR* (rs7975232) em amostras de DNA de pacientes com PCM oral e verificar se há associações com o padrão de organização dos granulomas nas lesões. Para isso, foram utilizadas 66 amostras de DNA obtidas a partir de biópsias de lesões orais e suas respectivas lâminas para a classificação do granuloma e 106 amostras de DNA de indivíduos saudáveis. A genotipagem foi realizada pelo método de discriminação alélica por PCR em tempo real e os resultados demonstraram que no SNP *VDR* (rs7975232), o genótipo CC (p-valor<0,001, OR = 5,94, IC 95% 2,07 – 17,05) ou indivíduos que carregam o alelo C (p-valor = 0,027, OR = 2,71 IC 95% 1,07 – 6,86 para CC+AC) e o genótipo GG no *DC-SIGN* (rs4804803) (p-valor = 0,032, OR = 3,76, IC 95% 1,06 – 13,38) estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento da PCM oral. Porém, não foram observadas correlações com o tipo de granuloma. Esses dados indicam que as variações derivadas dos SNPs *VDR* (rs7975232) e *DC-SIGN* (rs4804803) estão relacionadas à susceptibilidade da PCM oral nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose oral. *Paracoccidioides brasiliensis*.

Polimorfismo de nucleotídeo único. *TNF- α* . *JAK1*.

VDR. *DC-SIGN*. *FcyRIIa*.

ABSTRACT

Fungi of the complex of species of the genus *Paracoccidioides* are agents that cause Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis and endemic in Latin America. Oral lesions occur in approximately 80% of patients with the chronic form and are characterized by the presence of granulomas that can indicate the level of the inflammatory reaction and the extension of the PCM. The disease evolution depends not only of the fungi strain, but also on the integrity and type of the immune response and on host genetic factors. Among the latter, single nucleotide polymorphisms (SNPs) are highlighted in several components of the immune response. Among the SNPs whose associations have already been described for various infectious diseases, those present in genes such as *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* and *Fc γ RIIa* are highlighted. In this context, this work aimed to evaluate the presence of the SNPs *CD209* (rs4804803), *Fc γ RIIa* (rs1801274), *JAK1* (rs11208534), *TNF- α* (rs1800629) and *VDR* (rs7975232) in the DNA samples from patients with oral PCM and its associations with the organization patterns of the granulomas in the lesions. For this, 66 samples of DNA obtained from oral lesions biopsies and respective slides of the biopsies for granuloma type classification and a control group of 106 DNA samples of healthy individuals were used. Genotyping was performed by real-time PCR and allele discrimination method. The results demonstrate that in the *VDR* (rs7975232) SNP, CC genotype (p-value <0.001, OR = 5.94, 95% CI 2.07 - 17.05), or individuals carrying the C allele (p-value = 0.027, OR = 2.71 CI 95% 1.07 - 6.86) and the GG genotype on *DC-SIGN* (rs4804803) (p-value = 0.032, OR = 3.76, 95% CI, 1.06 - 13.38) are associated with an increased risk of developing oral PCM, but not to the type of granuloma. Thus, the data presented in this work indicate that the variations derived from *VDR* (rs7975232) and *DC-SIGN* (rs4804803) SNPs are related to oral PCM susceptibility in the south/southwest of the state of Minas Gerais.

Keywords: Oral Paracoccidioidomycosis. *Paracoccidioides brasiliensis*. Single nucleotide polymorphism. *TNF- α* , *JAK1*. *VDR*. *DC-SIGN*. *Fc γ RIIa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico hipotético de fungos do gênero <i>Paracoccidoides</i> , evidenciando fatores seletivos que podem intervir sobre seus nichos ecológicos.....	17
Figura 2 - Áreas de prevalência das espécies <i>P. lutzii</i> e <i>P. brasiliensis</i>	18
Figura 3 - Morfologia do <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	19
Figura 4 - Paciente com adenopatia na região cervical e submandibular com linfonodos supurados de aspecto inflamatório.....	23
Figura 5 - Lesões nasais, no lábio inferior e na língua em pacientes com PCM crônica.....	24
Figura 6 - Lesão de aspecto moriforme na gengiva de paciente com PCM.....	26
Figura 7 - Discriminação alélica por PCR em tempo real utilizando as sondas marcadas com os fluoróforos VIC® e FAM™.....	44
Figura 8 - Granuloma denso de arranjo organizado com a presença de agregado de células epitelióides e CGM centralizadas.....	48
Figura 9 - Granuloma frouxo com a presença de grande quantidade de CGM e células inflamatórias dispersas no tecido.....	49
Figura 10 - Exemplo de genotipagem por discriminação alélica analisada em PCR em tempo real.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos polimorfismos nos genes <i>DC-SIGN</i> , <i>FcyRIIa</i> , <i>JAK1</i> , <i>VDR</i> e <i>TNF-α</i>	45
Tabela 2 - Dados demográficos de pacientes com PCM oral e do grupo controle.....	47
Tabela 3 - Distribuição genotípica para os polimorfismos estudados em pacientes afetados PCM oral e no grupo controle.....	52
Tabela 4 - Distribuição alélica para os polimorfismos estudados em pacientes portadores com lesões orais na PCM e no grupo controle.....	54
Tabela 5 - Frequências genotípicas dos SNPs analisados de acordo os tipos de granuloma.....	56
Tabela 6 - Frequências alélicas dos SNPs analisados de acordo os tipos de granuloma.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	- Célula Apresentadora de Antígenos
Célula NK	- Célula <i>Natural Killer</i>
Célula Th	- Célula T <i>helper</i>
Célula Treg	- Célula T regulatória
CGM	- Células gigantes multinucleadas
dbSNP	- SNP <i>database</i>
DC	- Célula dendrítica
EHW	- Equilíbrio de Hardy Weinberg
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção enzimática
gp43	- Glicoproteína de 43 kDa
gp130	- Glicoproteína de 130 kDa
HE	- Hematoxilina-eosina
IFN	- Interferon
IgA	- Imunoglobulina A
IgE	- Imunoglobulina E
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
JAK1	- Janus quinase 1
MGB	- <i>Minor groove binder</i>
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OR	- <i>Odds Ratio</i>
PAMP	- Padrão molecular associado ao patógeno
PAS	- Ácido periódico-Schiff
PCM	- Paracoccidiodomicose
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PMN	- Células polimorfonucleares
PRR	- Receptor de reconhecimento padrão
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
STAT	- Transdutor de sinal e ativador da transcrição

- TCR** - Receptor de célula T
- TGF** - Fator de transformação do crescimento
- TNF** - Fator de necrose tumoral
- VDR** - Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	O AGENTE ETIOLÓGICO.....	17
2.2	A PARACOCIDIOIDOMICOSE (PCM)	20
2.3	ASPECTOS GERAIS DAS LESÕES ORAIS GRANULOMATOSAS.....	26
2.4	RESPOSTA IMUNE NA PCM.....	28
2.5	POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP)	31
2.5.1	Definição	31
2.5.2	SNPs nos genes <i>TNF-α</i>, <i>JAK1</i>, <i>VDR</i>, <i>DC-SIGN</i> E <i>FcyRIIa</i>	33
2.5.2.1	<i>TNF-α</i> - Fator de necrose tumoral alfa	33
2.5.2.2	<i>JAK1</i> - Janus quinase 1.....	34
2.5.2.3	<i>FcyRIIa</i>	35
2.5.2.4	<i>DC-SIGN</i>	36
2.5.2.5	<i>VDR</i> - Receptor de Vitamina D.....	37
2.5.3	Associação entre SNPs e a PCM	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	41
4.1.1	Pacientes com PCM oral	41
4.1.2	Grupo controle	42
4.2	DESPARAFINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	42
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO A PARTIR DE TECIDOS PARAFINADOS.....	43
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS DO GRUPO CONTROLE.....	44

4.5	GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL	44
4.6	CLASSIFICAÇÃO DO PADRÃO HISTOLÓGICO DOS GRANULOMAS	46
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	48
5.2	CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DOS GRANULOMAS NAS LESÕES.....	48
5.3	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA NOS SNPS ESTUDADOS	50
5.4	FREQUÊNCIA ALÉLICA NOS SNPS ESTUDADOS.....	54
5.5	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SNPS ANALISADOS E A CLASSIFICAÇÃO DOS GRANULOMAS	55
5.5.1	Frequência genotípica	55
5.5.2	Frequência alélica	58
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica e endêmica na América Latina, causada por fungos dimórficos do complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides* e, atualmente, estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas estejam infectadas por esses microrganismos, sendo 2% de indivíduos com a doença ativa (RESTREPO; TOBON; CANO, 2015).

Em geral, a PCM atinge com maior frequência trabalhadores rurais de lavoura, sendo adquirida por via respiratória através da inalação de partículas ou propágulos infectantes e caso ocorra a conversão desses propágulos para a forma leveduriforme do fungo e se a infecção não for controlada pelo sistema imune do hospedeiro, os pacientes podem desenvolver as manifestações clínicas características da doença (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). O pulmão é o principal órgão afetado, seguido da pele, mucosas, linfonodos, glândulas adrenais e em menor frequência do intestino, sistema nervoso central, ossos e baço (BOCCA et al., 2013).

Uma das principais manifestações clínicas da PCM é a presença de lesões orais, caracterizadas histologicamente pela presença de granulomas formados por macrófagos epitelióides, células gigantes multinucleadas (CGM) e intenso infiltrado inflamatório (FORTES et al., 2011). É comum a classificação dos granulomas em frouxo ou denso, de acordo com os tipos de organização histológica. Sendo frequente a presença de granulomas frouxos em casos severos e disseminados e granulomas densos em casos moderados e localizados da doença (DE ABREU E SILVA et al., 2013a; FORTES et al., 2011).

Os fungos do complexo *Paracoccidioides* ainda apresentam fatores associados à virulência que os permitem combater e superar as defesas do hospedeiro, como a capacidade de adesão em proteínas da matriz extracelular e em células epiteliais pulmonares e a transição de conídeos para formas leveduriformes (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016).

Dessa forma, o desenvolvimento de manifestações clínicas e a evolução da doença dependem não somente da virulência da cepa infectante do patógeno, mas também do grau e do tipo de resposta imune desencadeada, da integridade do sistema imunológico e de fatores genéticos do hospedeiro (BOCCA et al., 2013).

Dentre os fatores genéticos, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) figuram entre os componentes mais estudados, os quais podem definir juntamente com outros elementos, a resistência ou susceptibilidade do indivíduo à uma doença, bem como sua extensão, prognóstico ou resposta a um tratamento (LEE et al., 2013; LING et al., 2015; SHASTRY, 2009).

Os SNPs podem exercer uma influência sobre a transcrição gênica, sobre a estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) e dependendo de fatores como a localização da variação e do tipo de substituição, poderão ocorrer modificações estruturais e funcionais em proteínas, as quais podem gerar uma alteração de um determinado fenótipo (SHASTRY, 2009).

Alguns estudos demonstram a relação entre doenças infecciosas e polimorfismos em genes que codificam citocinas, receptores celulares e enzimas envolvidas na resposta a doenças infecciosas, incluindo a PCM (BOZZI et al., 2009; DETTOGNI et al., 2015; ZHAO et al., 2017). Dentre os genes de interesse na PCM, o *fator de necrose tumoral – α (TNF- α)*, está envolvido na modulação de uma resposta imune eficaz e a quadros subclínicos da doença, atuando sobretudo na formação de granulomas e no controle da infecção, assim como a janus quinase 1 (*JAK1*), a qual está envolvida na sinalização de várias citocinas, incluindo as classes de interferons (IFN) do tipo I, II e III, dentre as quais, pode-se citar a IFN- γ , que representa um perfil de resposta protetora ao *P. brasiliensis*, atuando na ativação de células fagocíticas (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016; MARQUES, 2012)

Igualmente importantes na resposta a PCM, os genes *DC-SIGN (CD209)*, *FcyRIIa* e o *receptor de vitamina D (VDR)*, codificam receptores que atuam no reconhecimento e apresentação de antígenos do fungo, na ligação e modulação da atividade de anticorpos e na regulação das funções da vitamina D, respectivamente (BAEKE et al., 2010; GUNN; ALTER, 2016; PUSTYLNIKOV et al., 2014). Desta forma, de acordo com variações genéticas nesses componentes, o hospedeiro pode apresentar diferentes perfis de resistência e susceptibilidade, bem como manifestações clínicas e histológicas que refletem o tipo de resposta e a interação do sistema imune com o fungo (DE ABREU E SILVA et al., 2013a; SHASTRY, 2009)

Para um melhor entendimento das individualidades genéticas de indivíduos com PCM e do papel de polimorfismos nos genes *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* e *FcyRIIa* ao nível da resposta imunológica na PCM, propõe-se neste trabalho

determinar a frequência e a possível associação desses SNPs com pacientes afetados por PCM oral e o padrão de organização dos granulomas das lesões.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos itens deste capítulo estão descritas informações gerais sobre os temas abordados neste trabalho, obtidas após o estudo de diversas publicações.

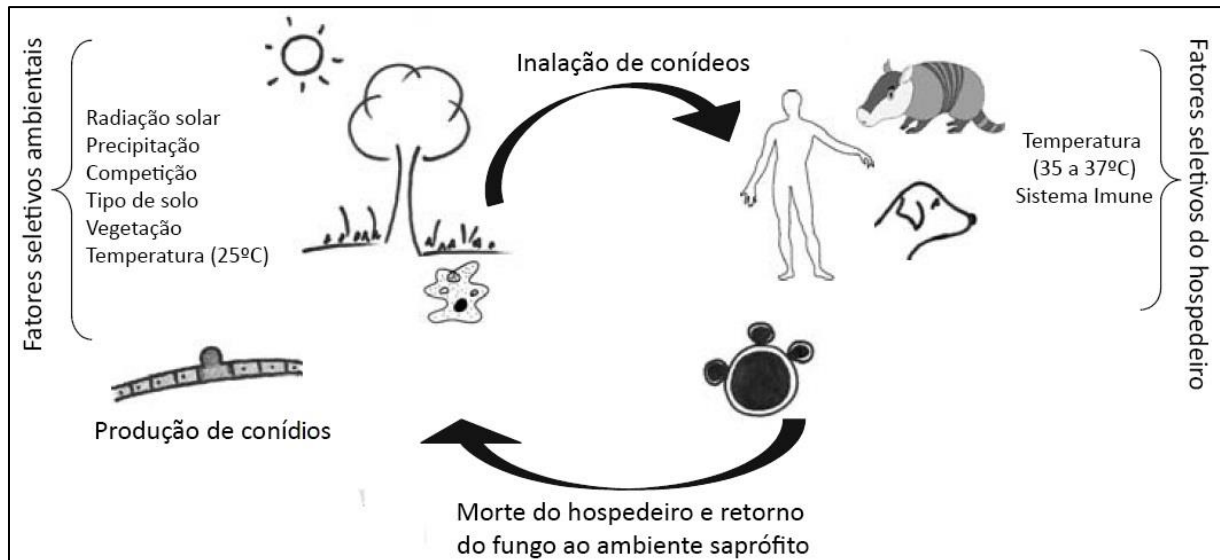
2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO

Fungos do gênero *Paracoccidoides* possuem dimorfismo termo dependente e em condições naturais, à temperatura ambiente (25° C), observa-se sua forma miceliana (“forma M”), e em temperaturas de 35 a 37°C, esses fungos crescem na forma leveduriforme (“forma Y”). Quando conídios produzidos pela forma M são inalados pelo hospedeiro, esses propágulos atingem o pulmão, onde há condições favoráveis de temperatura para que ocorra sua diferenciação para a forma Y, estabelecendo assim a doença (BOCCA et al., 2013)

A forma M do fungo apresenta hifas finas e septadas, onde se encontram os conídios ou propágulos infectantes. Por sua vez, a forma Y exibe células esféricas ou ovais de tamanho variável com a presença de multibrotamentos (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016)

De acordo com estudos geoespaciais, o fungo ocorre preferencialmente em locais que possuam altos índices pluviométricos durante o ano, alta permeabilidade do solo, abundância de vegetação e temperaturas entre 18 e 25° C, destacando-se assim, a ligação direta entre o clima e sua distribuição geográfica em um ambiente favorável para sua esporulação e dispersão (Figura 1) (BOCCA et al., 2013). A forma M do fungo é descrita como saprófita, a qual absorve nutrientes da matéria orgânica em decomposição presente no solo, tanto de origem vegetal quanto animal (DESJARDINS et al., 2011). A forma Y geralmente está associada a animais vertebrados, sendo isolada de algumas espécies de tatu (*Dasypus novemcinctus*, *Tolypeutes tricinctus* e *Cabassous centralis*), considerado o reservatório natural do fungo, e em menor frequência em cães, preguiças-de-dois-dedos, coelhos, ovelhas e aves (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016).

Figura 1 - Ciclo biológico hipotético de fungos do gênero *Paracoccidioides*.



Fonte: adaptado de BAGAGLI et al. (2008)

O fungo *P. brasiliensis* foi a primeira espécie isolada do gênero e a princípio taxonomicamente classificada como um fungo pertencente à ordem Moniales e família Moniliaceae. Nessa sistemática clássica, o *P. brasiliensis* foi considerado um fungo imperfeito, isso aconteceu, pois não foram encontradas estruturas sexuais que permitiam uma classificação mais precisa, entretanto, com avanços em técnicas moleculares, foi possível classificá-lo como um microrganismo pertencente à ordem Onygenales e à família Onygenaceae, juntamente com fungos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Lacazia loboi* e *Histoplasma capsulatum* (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002). Entretanto, estudos de sequências de DNA mostram que a ordem Onygenales contém clados que não correspondem às famílias previamente descritas, desta forma foi proposta uma nova família nessa ordem, denominada Ajellomycetaceae, que inclui gêneros anamorfos como *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e o *Paracoccidioides*, sendo em geral, todos esses fungos saprobióticos e patogênicos associados a animais vertebrados (BIALEK et al., 2000; UNTEREINER et al., 2004).

Em outras análises de sequências de DNA do *P. brasiliensis* foram observadas a existência de diferentes linhagens do fungo: S1 (espécie filogenética 1), grupo com isolados encontrados na Argentina, Brasil, Peru, Venezuela e um isolado de pinguim na Antártida, PS2 (espécie filogenética 2), encontrada no Brasil e Venezuela, e a PS3 (espécie filogenética 3), grupo com isolados da Colômbia (MATUTE et al., 2006). Na

Venezuela foi isolada uma quarta linhagem filogenética do *P. brasiliensis*, a PS4, a qual ainda se encontra pouco caracterizada (BOCCA et al., 2013).

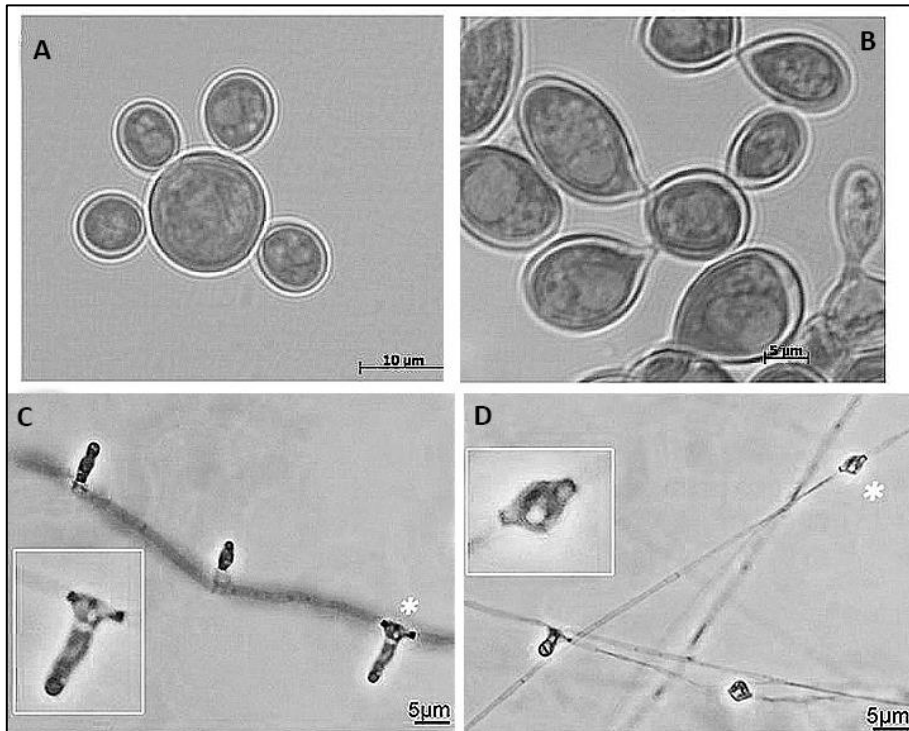
Baseado em dados moleculares e filogenéticos, Teixeira et al. (2009) propôs a identificação de um novo grupo de espécies dentro do gênero *Paracoccidioides*, o “*Pb01-like*”, que por apresentar diferenças genômicas e morfológicas em relação às outras linhagens, foi denominado de *P. lutzii*, cuja prevalência é maior nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Figura 2). A forma Y de ambas as espécies não apresenta diferenças significativas quanto a sua morfologia, exceto pelo tamanho de seus brotamentos (Figura 3) (SIQUEIRA et al., 2016), a forma M do *P. lutzii* produz conídios alongados em forma de bastão, ao contrário de *P. brasiliensis*, em que essas estruturas são menores e com formato ovalado. Essas diferenças podem ser utilizadas para o diagnóstico da espécie (BOCCA et al., 2013).

Figura 2 - Áreas de prevalência das espécies *P. lutzii* e *P. brasiliensis*



Fonte: GEGEMBAUER et al. (2014)

Figura 3 - Morfologia de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*



Fonte: adaptado de SIQUEIRA et al. (2016) e TEIXEIRA et al. (2014)

Nota: Células leveduriformes de *P. lutzii* (A) e *P. brasiliensis* (B) apresentando formato esférico e presença de multibrotamentos. Conídios de aparência alongada da forma miceliana de *P. lutzii* (C) e de *P. brasiliensis* com formato ovalado (D).

As populações geneticamente distintas do *P. brasiliensis* tendem a apresentar taxas de infecção diferentes, observadas pela razão desproporcional de 9:1 nas linhagens S1 e PS2, além disso, há diferenças na habilidade de produzir conídios infectantes entre essas duas linhagens, com S1 exibindo uma produção maior de propágulos se comparada a PS2 (TEIXEIRA et al., 2014).

2.2 A PARACOCIDIOIDOMICOSE (PCM)

A PCM é uma doença tropical negligenciada e, no Brasil, sua notificação é obrigatória apenas nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo portanto, difícil o acesso a dados precisos sobre sua real incidência no país (MATO GROSSO DO SUL, 2005; MINAS GERAIS, 2008; SÃO PAULO, 2008;

MARTINEZ, 2010). Entretanto, através do teste intradérmico com paracoccidioidina foi demonstrado um alto percentual de indivíduos com a infecção assintomática em áreas endêmicas (MARQUES, 2012). Por meio desse teste é possível observar que a prevalência da infecção em regiões endêmicas pode atingir até 75%, sendo de 1 a 2% dos indivíduos com a doença ativa (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012).

Aproximadamente 80% dos casos de PCM registrados na América Latina ocorrem no Brasil, sobretudo nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, onde a incidência anual é de um a quatro casos por 100.000 habitantes por ano, com taxa de mortalidade aproximada de um caso por um milhão de habitantes por ano nas populações infectadas, além de 51% das mortes associadas a infecções fúngicas serem atribuídas à PCM (MARTINEZ, 2015).

Entre as doenças granulomatosas, a PCM é menos frequente se comparada à tuberculose, porém, mais frequente quando comparada a histoplasmose, com os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Rondônia apresentando as maiores taxas de incidência e mortalidade. Destaca-se ainda, que a incidência pode aumentar significativamente de forma temporária em regiões com grandes mudanças socioambientais (MARTINEZ, 2015).

Em países como Argentina, Venezuela e Colômbia, a incidência da doença é muito menor se comparada ao Brasil, ocorrendo aproximadamente dois a três casos por um milhão de habitantes (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012).

A região sul de Minas Gerais apresenta elevada endemicidade para essa micose, segundo dados obtidos por um estudo do Grupo de Pesquisa em Imunologia do Sul de Minas Gerais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), em áreas rurais do município de Alfenas, aproximadamente 47% dos participantes da pesquisa apresentaram positividade para o teste intradérmico com paracoccidioidina, ocorrendo principalmente em indivíduos do gênero masculino de 30 a 50 anos (MAGALHÃES et al., 2014).

Fatores de risco como profissões que envolvam atividades relacionadas ao manejo do solo, como o trabalho na agricultura, fazem com que a PCM tenha um caráter ocupacional, sendo possível observar que na maioria dos casos, os pacientes exerceram alguma atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida, tendo

nesse período ocorrido a primeira infecção pelo fungo, embora as manifestações clínicas se desenvolvam anos após o contato, dependendo de fatores associados à resposta imune do hospedeiro (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Condições agravantes à saúde como tabagismo, alcoolismo, neoplasias, má nutrição ou qualquer outro quadro que ocasione uma deficiência imunológica são frequentemente observados em pacientes com PCM (MARTINEZ, 2010).

A incidência da infecção entre 10 e 20 anos de idade é igual para ambos os sexos, após esse período, há um aumento progressivo da incidência no gênero masculino, 80 a 90% dos indivíduos atingidos são homens de 29 a 40 anos, sendo predominantemente trabalhadores rurais em áreas endêmicas (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Mulheres em idade fértil são menos afetadas pela PCM do que homens, uma vez que estão presentes receptores do hormônio β -estradiol no citoplasma da forma M e da forma Y do fungo, portanto, uma hipótese para essa proteção seria que o estrogênio é capaz de impedir a transição de uma forma a outra, além de estimular o aumento da secreção de interferon- γ (IFN- γ) e a proliferação de células T *helper* do tipo 1 (Th1) (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012).

A frequência de lesões mucocutâneas sugere que as vias aéreas são a principal porta de entrada do patógeno. Por meio da inalação de propágulos infectantes produzidos pela forma M do *P. brasiliensis* ou do *P. lutzii*, após adentrar o organismo do hospedeiro, o fungo deve se converter em sua forma Y, sendo este, um passo importante para o estabelecimento da infecção (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002). Atingindo o sistema respiratório inferior, o fungo pode se disseminar por via linfática ou hematogênica para outros órgãos, o que depende do volume do inóculo, da patogenicidade do microrganismo, além da integridade do sistema imune e da genética do hospedeiro (BOCCA et al., 2013; WANKE; AIDÊ, 2009). Em indivíduos imunocompetentes, o desenvolvimento da infecção pode ser contido e após um período de latência, porém viável, em meio a nódulos fibróticos, um desequilíbrio na relação patógeno-hospedeiro pode ocorrer e, então, a infecção pode progredir e dar origem aos sinais e sintomas da forma crônica da doença, processo denominado reativação endógena, e em menor frequência o desenvolvimento da forma aguda/subaguda através do foco primário da infecção (WANKE; AIDÊ, 2009).

Fatores hormonais, genéticos e nutricionais estão envolvidos no desenvolvimento da infecção e da doença clínica, cuja extensão e severidade são determinadas pela resposta imune do hospedeiro (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Em relação a esse último aspecto, sabe-se que o fungo produz antígenos metabólicos que interagem com o sistema imune do hospedeiro, sendo o principal componente antigênico a glicoproteína de 43 KDa (gp43), a qual é encontrada na superfície da parede fúngica e está associada a fatores associados à virulência e escape pelos quais o fungo se instala nos tecidos do hospedeiro (FORTES et al., 2011).

A habilidade do *P. brasiliensis* de interagir com o hospedeiro é essencial para sua colonização, invasão e crescimento. Mecanismos de aderência, sinalização de moléculas de superfície, e indução de alterações no citoesqueleto são as principais estratégias empregadas pelo *P. brasiliensis* para escapar da resposta inicial do hospedeiro, bem como, auxiliar na sua disseminação pelo organismo (MENDES-GIANNINI et al., 2008).

A grande variedade de manifestações clínicas da PCM resultou em uma classificação que é utilizada como referência em estudos e na clínica. São elas: 1) PCM infecção, forma subclínica e detectável apenas pelo teste intradérmico, e 2) PCM doença, dividida em forma aguda/subaguda e forma crônica (MARQUES, 2012).

A forma aguda/subaguda é responsável por 3 a 5% dos casos da doença e afeta crianças e adultos abaixo de 30 anos de ambos os sexos, possui evolução rápida, que pode durar de poucas semanas a vários meses e em casos graves e moderados o paciente possui três ou mais dos seguintes sintomas: perda de peso total maior que 10%, presença de lesões semelhantes a tumores e linfonodos supurados (Figura 3), além de comprometimento osteo-articular, do sistema nervoso central, de glândulas adrenais e reação para o teste intradérmico com paracoccidiodina negativa (SHIKANAI-YASUDA, 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O envolvimento de linfonodos, assim como ocorre nas doenças histoplasmose, tuberculose, leucemia e linfoma, deve ser destacado e o diagnóstico final pode ser realizado pela detecção de blastos no leucograma ou em biópsias da medula óssea ou linfonodos (BOCCA et al., 2013).

Figura 4 - Paciente com adenopatia na região cervical e submandibular com linfonodos supurados de aspecto inflamatório.

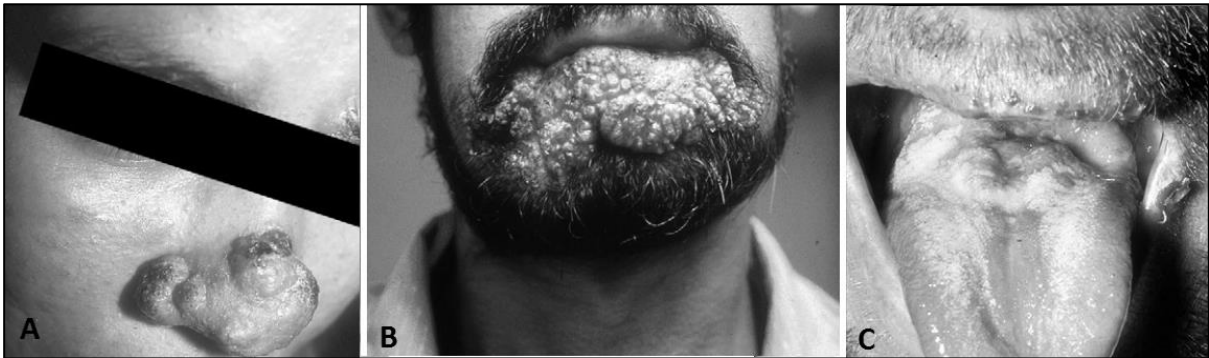


Fonte: MARQUES et al. (2016)

Por outro lado, a forma crônica corresponde a mais de 90% dos casos, ocorre majoritariamente em indivíduos do gênero masculino de 30 a 60 anos de idade e possui uma evolução lenta, com sintomatologia durando de quatro a seis meses, sendo possível observar lesões unifocais (restrita a apenas um órgão) ou multifocais (acomete mais de um órgão simultaneamente) e na maioria dos casos acompanhadas de lesões orais e nasais (Figura 4) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Nas manifestações graves da forma crônica os pacientes apresentam três ou mais dos seguintes sintomas: comprometimento pulmonar, gastrointestinal, de glândulas adrenais e do sistema nervoso central, considera-se ainda, a quantidade de órgãos afetados, a disseminação linfática e hematogênica, além de fatores que causem imunossupressão (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Figura 5 - Lesões nasais (A), no lábio inferior (B) e na língua (C) em pacientes com PCM crônica.



Fonte: RAMOS-E-SILVA e SARAIVA (2008)

Dentro das classificações, há ainda a forma residual ou sequelar da PCM, em que se observam principalmente alterações anatômicas ou funcionais de órgãos que foram comprometidos durante a doença e que revelam cicatrizes fibróticas, assim, é comum a ocorrência de dispneia, enfisema pulmonar, doença obstrutiva pulmonar crônica, rouquidão, estenose de traqueia e laringe, entre outros quadros clínicos (NETO et al., 2011). Na PCM doença e sua forma sequelar, o comprometimento pulmonar deve ser sempre investigado com o auxílio de exames de imagem como raio-X do tórax, cujos achados são caracterizados por infiltrados bilaterais acompanhados com zonas de fibrose (BOCCA et al., 2013).

O tratamento da PCM deve considerar a severidade da doença e o estado clínico de cada paciente. Os derivados de azóis são os mais utilizados em formas leves e moderadas da PCM, dentre eles, o cetoconazol, mostra-se eficaz para o tratamento, porém devido a seus efeitos adversos e baixa absorção, tem sido substituído pelo itraconazol, considerado de 10 a 100 vezes mais ativo em células fúngicas se comparado ao anterior, no entanto seu emprego em formas severas, em que há comprometimento gastrointestinal, deve ser cuidadosamente monitorado, devido a sua possível absorção prejudicada nesse quadro. Derivados de sulfonamidas como a sulfadiazina e sulfametoxazol-trimetoprima, também se mostram eficazes e de baixo custo no tratamento da PCM (SHIKANAI-YASUDA, 2015)

Pacientes com quadros severos devem fazer tratamentos mais prolongados, inclusive por via parenteral, caso ocorra comprometimento gastrointestinal. O principal medicamento utilizado nesses casos é a anfotericina B convencional ou em formulações lipídicas, considerada uma droga fungistática e fungicida, ainda é bastante empregada na PCM severa, apesar de seus efeitos adversos, que incluem hipertensão ou hipotensão arterial e nefrotoxicidade (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

No tratamento da PCM sequelar, tem sido utilizado a combinação de pentoxifilina e itraconazol, a qual induz uma redução da inflamação granulomatosa e fibrose pulmonar, uma das principais sequelas derivadas da doença (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

O diagnóstico padrão ouro é baseado na identificação de elementos fúngicos em exames a fresco pelo teste com hidróxido de potássio 10% (KOH 10%), utilizando amostras de escarro ou raspados de lesões ou pela análise de biópsia das lesões, sendo empregada as colorações de Grocott-Gomori, ácido periódico-Schiff (PAS) ou hematoxilina-eosina (HE). A cultura em ágar Sabouraud pode auxiliar no diagnóstico, embora não proporcione resultados rápidos (WANKE; AIDÉ, 2009).

O diagnóstico sorológico na PCM tem um papel importante durante e depois do tratamento, sendo também utilizado no acompanhamento do paciente. Atualmente os métodos mais utilizados são a imunodifusão dupla em gel de ágar, a contraímunoeletroforese, que pode ser utilizada para definir a severidade da doença e o teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando o antígeno gp43, específico para o *P. brasiliensis* (BOCCA et al., 2013; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Porém, reações cruzadas são comuns em testes sorológicos que utilizam a detecção anticorpos em infecções fúngicas, devido as similaridades antigênicas entre eles, portanto, tem sido proposto a utilização do *Western-blot* como teste confirmatório para a PCM (PERENHA-VIANA et al., 2012).

Algumas doenças como histoplasmose, coccidioidomicose, sífilis, tuberculose, leishmaniose, granulomatose de Wegner, sarcoidose e manifestações estomatológicas de carcinoma espinocelular, apresentam características clínicas semelhantes à PCM e devem ser consideradas em seu diagnóstico diferencial (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005).

2.3 ASPECTOS GERAIS DAS LESÕES ORAIS GRANULOMATOSAS

As lesões orais de pacientes com PCM estão presentes em aproximadamente 80% dos casos da doença em sua forma crônica e representam o principal fator de procura de ajuda profissional entre os pacientes afetados (BRAZÃO-SILVA et al., 2011). Geralmente, essas lesões ocorrem devido a disseminação sistêmica do fungo,

mantendo-se restritas a mucosa oral e em alguns casos afetando ossos da mandíbula (DE ABREU E SILVA et al., 2013a; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008; WEBBER et al., 2014).

Em aproximadamente 60% dos casos há a ocorrência de lesões múltiplas de aspecto hemorrágico pontilhado sobre uma base granulomatosa (estomatite moriforme de Aguiar-Pupo), sobretudo em regiões da gengiva e palato duro, seguidas de lábios, língua e demais mucosas orais (Figura 5) (BRAZÃO-SILVA et al., 2011).

Figura 6 - Lesão de aspecto moriforme na gengiva de paciente com PCM.



Fonte: adaptado de De Paulo; De Faria; Durighetto Júnior (2014)

Histologicamente, as lesões apresentam tecido epitelial hiperplásico e intenso infiltrado inflamatório com a formação de granulomas epitelióides, os quais representam uma resposta imune celular para prevenir a disseminação do fungo. (DE ABREU E SILVA et al., 2013a). Os granulomas são ordenados de forma nodular e formados por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas (CGM) do tipo Langhans e corpo estranho, que circundam o patógeno, cuja presença pode ser observada no interior dessas células ou livres no tecido. É frequente também a presença de uma área central de supuração e de exsudato inflamatório rico em linfócitos, plasmócitos e eosinófilos permeando a reação granulomatosa, juntamente com áreas de fibrose de intensidade variável (FORTES et al., 2011)

Os granulomas podem ser classificados como denso ou frouxo, podendo refletir o estado clínico geral e o nível imunológico do paciente, ou seja, em indivíduos com resposta imunológica íntegra e nas formas localizadas da doença, observam-se

granulomas densos caracterizados por um arranjo organizado e um consistente agregado de células epitelióides, sendo possível observar alguns elementos fúngicos em seu interior, por outro lado, indivíduos com algum comprometimento imunológico e em casos severos e disseminados da doença, pode-se observar o granuloma frouxo de arranjo desorganizado e uma grande quantidade de exsudato, edema, áreas de necrose e grande número de fungos dispersos (DE ABREU E SILVA et al., 2013a; FORTES et al., 2011).

2.4 RESPOSTA IMUNE NA PCM

A via de entrada do fungo ocorre através do trato respiratório, dessa forma a resposta imune inata primária ocorre nos pulmões e é iniciada pela secreção de proteínas antimicrobianas, sendo as lisozimas, lactoferrinas e membros das famílias das defensinas, catelecidinas e pentraxinas, as primeiras proteínas secretadas pelo epitélio alveolar em resposta ao patógeno (CALICH et al., 2008).

Ainda no pulmão, a resposta inata celular ocorre pela atividade de macrófagos alveolares, os quais reconhecem o patógeno através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que interagem com estruturas conservadas do microrganismo, denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (CALICH et al., 2008).

Os PRRs correspondem a vários receptores, principalmente os do tipo *Toll-like* (TLR), receptores do tipo C-lectina e receptores de manose (MR), e sua interação com o patógeno resulta na fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas líticas, além da secreção de quimiocinas e citocinas, levando a expressão de moléculas quimiotáticas e de adesão, que contribuem para a ativação e migração de células inflamatórias ao local da infecção (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). As células do fungo são capazes ainda de ativar a via alternativa do sistema complemento, contribuindo para processos de opsonização e fagocitose pelos macrófagos (CALICH et al., 2008).

Diferentes células estão envolvidas na resposta contra os patógenos, dentre elas as células NK (*natural killer*), as quais em indivíduos imunocompetentes desempenham funções importantes na eliminação direta do patógeno, no

reconhecimento e destruição de células infectadas e na produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta à interação com o fungo (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Entretanto, estudos realizados com o sangue periférico de pacientes com PCM e em modelos animais, mostraram que as células NK apresentam atividade citotóxica diminuída na doença ativa, sugerindo distúrbio imunológico associado à depressão da imunidade celular (FORTES et al., 2011).

A célula T possui receptores de células T (TCR), que reconhecem epítopos de antígenos apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) expressos por células apresentadoras de antígenos (APCs). Os principais exemplos de APCs são os macrófagos, células B e principalmente as células dendríticas (DCs) (CHAPLIN, 2010).

As DCs apresentam antígenos processados às células T *náive*, iniciando a resposta das células T na imunidade adaptativa. Sua ativação ocorre pela interação com o microrganismo ou através de mediadores inflamatórios, aumentando a expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias, além disso, sua ativação está relacionada à secreção de IFN- γ , interleucina - 4 (IL-4), IL-17 e o desenvolvimento aumentado de células T regulatórias (Treg) (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Segundo Almeida et al. (1998), na PCM, as DCs em animais resistentes são mais eficientes na apresentação do antígeno gp43, se comparadas a animais susceptíveis, sendo observado o direcionamento para uma resposta protetora do padrão de resposta de células T helper do tipo Th1.

As células Treg estão presentes de forma expressiva em lesões orais e cutâneas da PCM, indicando um papel importante na modulação da resposta imune na doença (PAGLIARI et al., 2011) De acordo com Felonato et al. (2012), em animais resistentes ao fungo é possível observar uma alta produção de células Treg com maior capacidade supressora, quando comparados aos animais susceptíveis. Ainda segundo os autores, a redução de células Treg resulta em uma infecção menos severa da PCM em ratos, o que indica a atividade supressora dessas células na diminuição do efeito inflamatório da resposta imune. Esses dados, demonstram que apesar de contribuir para a diminuição do dano tecidual ocasionado pelo processo inflamatório, uma eventual ativação excessiva dessas células pode estar associada a um aumento da susceptibilidade à doença, indicando que em condições normais há um equilíbrio para que ocorra simultaneamente o controle da multiplicação do fungo e a prevenção do dano tecidual exacerbado (FORTES et al., 2011).

As células polimorfonucleares (PMN) se encontram em grande quantidade no tecido infectado pelo *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e quando essas células são ativadas, desempenham uma atividade fungicida nos estágios iniciais da doença, através da ação do óxido nítrico e das ROS, os quais atuam reduzindo o nível de metabólitos importantes para o ciclo de vida da célula fúngica (FORTES et al., 2011; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Além disso, as células PMN, ainda podem produzir prostaglandinas E2 e leucotrienos, que possuem funções importantes na modulação resposta inflamatória e na diminuição do dano causado por monócitos (FORTES et al., 2011).

O volume do inóculo e o grau de virulência do fungo podem levar a diferentes padrões de resposta imunológica, assim, a imunorregulação da PCM está associada a padrões de respostas de células do tipo Th1 e Th2, dessa forma, quando ocorre o contato com o fungo, indivíduos com uma resposta imune eficaz, apresentam o desenvolvimento do padrão Th1, juntamente com a formação de um granuloma denso e compacto (FORTES et al., 2011).

A formação de um granuloma denso pode ser prejudicada pela incapacidade do sistema imune em desenvolver uma resposta do tipo Th1, direcionando nesse caso, a resposta para o padrão Th2, o qual é observado em quadros disseminados agudos e crônicos da doença, revelando seu papel não protetor na PCM (FORTES et al., 2011). Assim, nas fases iniciais da infecção, há a prevalência da síntese de TNF- α e de citocinas do padrão de resposta Th1, como IL-2, IL-12 e IFN- γ . Essa resposta resulta em um equilíbrio patógeno-hospedeiro e uma infecção subclínica ou menos severa da PCM (MARQUES, 2012).

Dentre as citocinas, a IFN- γ desempenha um papel protetor na PCM potencializando ações fungistáticas e fungicidas, sendo a maior mediadora da resistência contra o *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, seguida pelo TNF- α e a IL-12, que impedem a disseminação do fungo. Por outro lado, IL-4, IL-5 e IL-10, podem exibir uma ação promotora da doença, sendo encontrados altos níveis dessas citocinas na doença ativa (CANO et al., 1998; FORTES et al., 2011).

Em formas mais severas da doença ocorre uma diminuição da resposta imune celular e conseqüentemente uma diminuição na produção de citocinas do padrão Th1, resultando em altos níveis de IL-4, IL-5 associados ao padrão Th2, IL-10 e fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), que possuem ação supressora do

granuloma, reforçando o papel não protetor dessas células na PCM (FORTES et al., 2011).

As células T que produzem a citocina IL-17, denominadas células Th17, apresentam funções distintas das células Th1 e Th2 (KORN et al., 2009). Infecções fúngicas podem estimular uma resposta Th17 intensa, e na PCM essas células realizam um papel importante em lesões cutâneas e de mucosas, atuando no recrutamento de células PMN para o local da infecção e na remoção de patógenos que não são superados de forma adequada pelas células Th1 e Th2 e que necessitam de uma resposta inflamatória sólida (PAGLIARI et al., 2011).

Na PCM a ativação policlonal de células B leva a produção de anticorpos, sendo possível observar altos títulos das classes IgA, IgG e IgE, entretanto, níveis elevados desses anticorpos estão associados à presença de citocinas supressoras e consequentemente à depressão da resposta imune celular à medida que ocorre a disseminação e aumento da severidade da doença (FORTES et al., 2011).

Diante das características da resposta imune e seus elementos associados à PCM, observa-se que o contato do hospedeiro com o fungo gera uma resposta inflamatória intensa, evidenciada por alterações teciduais significativas e grande fluxo de células ao local da infecção, onde gradativamente granulomas característicos das lesões da PCM serão formados, de acordo com características genéticas e imunológicas dos indivíduos e de aspectos inerentes ao fungo (BOCCA et al., 2013; FORTES et al., 2011).

2.5 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP)

A seguir, estão dispostas as principais informações sobre os SNPs.

2.5.1 Definição

O SNP é uma variação genômica, cuja frequência é igual ou maior que 1% em uma determinada população. As substituições podem ocorrer devido a transições, nas

quais ocorrem trocas de bases de mesma natureza química, isto é, entre duas purinas (adenina/guanina) ou entre duas pirimidinas (citosina/timina) ou ainda devido às transversões, que acontecem devido a trocas de bases de natureza química distinta (BROOKES, 1999).

Acredita-se que a maioria dessas mudanças na sequência do DNA seja estável e não deletéria aos organismos. Os SNPs que não alteram um aminoácido codificado são chamados de sinônimos, ao passo que aqueles que os modificam são denominados não-sinônimos. Esses polimorfismos são observados em indivíduos de uma população e podem influenciar a expressão de um gene ou a conformação do DNA e do RNAm atuando direta ou indiretamente em um determinado fenótipo (BROOKES, 1999; SHASTRY, 2009).

Os SNPs são encontrados em todo o genoma, incluindo éxons, íntrons, regiões intergênicas e acentuadores, desta forma, se comparado a outros tipos de alterações, um SNP em uma região codificadora é mais propenso a produzir um alelo fisiologicamente relevante, que possa impactar diretamente na funcionalidade de uma proteína. Assim estudos tem relatado a associação de SNPs funcionais com várias doenças ou sendo utilizados como marcadores para sua pré-disposição (SCHORK; FALLIN; LANCHBURY, 2000).

O banco de dados SNP *database* (dbSNP), incorporado ao NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), conta com aproximadamente 140 milhões de SNPs em genes humanos, dos quais cerca de 100 milhões foram validados. Os SNPs catalogados possuem um registro indicado por “rs” (refSNP), seguido de um número que é definido pela ordem em que foi depositado no dbSNP (SHERRY et al., 2001).

De acordo com Malkki e Petersdorf (2014), devido a sua característica bialélica, os SNPs podem ser detectados utilizando técnicas que discriminam quaisquer combinações diferentes nos nucleotídeos adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). Segundo os autores ensaios quantitativos em tempo real, mostram-se sensíveis e específicos para a quantificação de DNA, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual oferece uma variedade de marcadores e sondas para a detecção de alterações genéticas.

Dentre os SNPs cujas associações já foram descritas para diversas doenças infecciosas, destacam-se aqueles presentes em genes como *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* e *FcyRIIa*, os quais serão descritos nos itens abaixo.

2.5.2 SNPs nos genes *TNF- α* , *JAK1*, *VDR*, *DC-SIGN* E *FcyRIIa*

Nos itens a seguir são apresentados informações e dados da literatura sobre os SNPs analisados.

2.5.2.1 *TNF- α* - Fator de necrose tumoral alfa

O *TNF- α* é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células como macrófagos, monócitos e células T. Sua função biológica é mediada pelos receptores *TNF-RI* p55 (receptor do tipo I) e *TNF-RII* p75 (receptor do tipo II), presentes na membrana de todas as células, exceto em eritrócitos (POPA et al., 2007).

Dentre as principais funções do *TNF- α* na resposta imune, pode-se citar o estímulo da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, as quais induzem o recrutamento de células PMN e o aumento da fagocitose e da atividade microbicida, além de exercer um papel importante em processos apoptóticos e na formação e manutenção de granulomas (FILLER; YEAMAN; SHEPPARD, 2005; FORTES et al., 2011).

Alterações no nível de produção dessa citocina podem ocorrer devido a variações no gene *TNF- α* , que está localizado no braço curto do cromossomo 6p21.3, dentro da região de Classe III do MHC, a qual é altamente polimórfica (HAJEER; HUTCHINSON, 2001).

Dentre os SNPs, o -308 G>A (rs1800629), na região promotora, é descrito por aumentar a expressão do gene e conseqüentemente o nível de produção da citocina, devido a transição do alelo selvagem G para o alelo variante A (QIDWAI; KHAN, 2011).

Alguns estudos têm indicado associações entre o -308 G>A (rs1800629), doenças infecciosas e os níveis de produção da citocina, assim, de acordo com análises de Mabunda et al. (2015), em Moçambique, indivíduos com o alelo A apresentam um maior risco de desenvolver a tuberculose pulmonar, cujo aumento na produção de *TNF- α* durante a evolução da infecção latente pode ser responsável por um processo inflamatório exacerbado levando a doença ativa. No Brasil um estudo para verificar o efeito do -308 G>A (rs1800629) na produção de *TNF- α* após a estimulo

pelo lipopolissacarídeo e pelo *Mycobacterium leprae* na hanseníase, Cardoso et al. (2011), utilizando cultura de células do sangue total da população de estudo, verificou que àqueles que possuem o alelo A exibem uma produção aumentada da citocina, que apresenta níveis elevados em indivíduos resistentes à doença, dessa forma, indicando que o -308 G>A (rs1800629) pode ser utilizado como um marcador para a resistência a hanseníase.

Por sua vez, na Suíça, Wójtowicz et al. (2014) avaliando a associação entre o SNP e a candidíase intra-abdominal, verificaram que indivíduos com os genótipos AG e GG apresentam um risco maior de desenvolver essa complicação, demonstrando, segundo os autores, que níveis excessivos de TNF- α podem contribuir para o aumento da morbidade de infecções fúngicas em pacientes susceptíveis.

2.5.2.2 *JAK1* - Janus quinase 1

JAK1 é uma proteína tirosina quinase não receptora, que desempenha um papel crucial na sinalização de citocinas como IFNs do tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω) e do tipo II (IFN- γ) (PLATANIAS, 2005). Estruturalmente, essa proteína possui um domínio quinase e um domínio pseudo-quinase cataliticamente inativo e cada um deles se liga a receptores de citocinas através de regiões amino-terminal, após essa ligação, as proteínas JAKs são ativadas e os fosforilam, criando pontos de ancoragem para moléculas de sinalização, que também sofrem fosforilação pelas JAKs ativadas, movendo-se, então, para o núcleo da célula e iniciando a transcrição gênica (YAMAOKA et al., 2004).

Essa proteína é codificada pelo gene *JAK1*, localizado no cromossomo 1p31.3 cujos polimorfismos regulatórios têm sido associados a doenças infecciosas, autoimunes e ao câncer, e dentre os SNPs, sabe-se que o -301 A>G (rs11208534), localizado no íntron 3 do gene, gera uma transição do nucleotídeo A para G, o que pode levar a um padrão de expressão diminuída e supressão dos estágios iniciais da sinalização de citocinas dependentes de *JAK1* (CHEN et al., 2012; SOUZA et al., 2015).

Através de um estudo em uma população da Bahia, Silva et al. (2010) encontraram associações entre polimorfismos em *JAK1* e a dengue hemorrágica,

descrevendo cinco SNPs, sendo o - 301 A>G (rs11208534), associado ao aumento do risco de desenvolver a doença, porém, diferente do informado no dbSNP, os autores relataram variações dos alelos T e C, com os homozigotos TT contribuindo para o aumento do risco de desenvolver a doença. Por sua vez, Souza et al. (2015) não encontraram nenhuma associação entre o - 301 A>G (rs11208534) e o desenvolvimento da febre da dengue ou dengue hemorrágica em indivíduos de Parnaíba, Piauí.

2.5.2.3 *FcγRIIa*

Os receptores do tipo Fcγ (FcγR) são uma família de moléculas expressas na maioria das células do sistema imune e atuam na ligação ao fragmento cristalizável (Fc) de imunoglobulinas da classe IgG, sendo expresso sobretudo em células da linhagem mielóide como monócitos, macrófagos e neutrófilos (CONCETTI; NAPOLIONI, 2010). Os FcγR são divididos em três classes principais: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), sendo o FcγRII o mais frequente em células humanas (BOURNAZOS et al., 2009).

O FcγRII possui baixa afinidade nas ligações às IgGs monoméricas, porém é capaz de se ligar a imunocomplexos através de ligações de baixa afinidade e alta avides, fato importante para o reconhecimento de imunocomplexos durante a resposta imune, ativando efeitos imunoregulatórios como a degranulação de células de defesa e fagocitose (BOURNAZOS et al., 2009).

O receptor FcγRII é codificado por três genes: *FcγRIIa*, *FcγRIIb* e *FcγRIIc*, dos quais o *FcγRIIa* é tido como principal gene expresso entre os FcγRs (CONCETTI; NAPOLIONI, 2010). O *FcγRIIa*, localizado no cromossomo 1q23, apresenta variações genéticas principalmente na forma de SNPs, dentre as quais, uma das primeiras alterações funcionais identificadas foi a -519 G>A (R131H, rs1801274) localizada no éxon 4 e resultante de uma transição do alelo G para A (BOURNAZOS et al., 2009). Esse SNP gera variações estruturais no receptor, as quais diferem entre si de acordo com o aminoácido codificado no resíduo 131: o códon CGT codifica o aminoácido arginina (R) e o códon CAT codifica a histidina (H), então a transição do alelo G para o A (R para H), confere uma maior eficiência na ligação do receptor à subclasse IgG2

e uma afinidade moderadamente superior à IgG3, quando comparada ao alelo G (CONCETTI; NAPOLIONI, 2010; LI; GIBSON; KIMBERLY, 2014).

A associação entre o -519 G>A (rs1801274) e o desenvolvimento de algumas doenças foi demonstrada por estudos como o de Sinha et al. (2008), os quais afirmam que o genótipo AA para esse SNP foi associado significativamente à proteção contra as manifestações clínicas da malária, observadas principalmente em áreas não endêmicas da Índia. Por sua vez, Schuldt et al. (2010) associaram o genótipo GG ao desenvolvimento da malária severa em crianças de Gana.

E na Itália, um estudo em pacientes com fibrose cística, De Rose et al. (2005), afirmam que pacientes que carregam o alelo G para o -519 G>A (rs1801274), possuem um risco maior de adquirir uma infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que esse SNP contribui para a susceptibilidade à infecção pela bactéria .

2.5.2.4 DC-SIGN

DC-SIGN ou CD209 é uma proteína da família de receptores do tipo C-lectina e geralmente é expressa em DCs presentes na pele, pulmão e mucosas, atuando como receptor no reconhecimento e ligação de PAMPs, incluindo glicanos de manose presentes na parede celular do *P. brasiliensis* (TOMAZETT et al., 2005). A DC-SIGN ainda pode realizar uma ligação de alta afinidade com a molécula de adesão ICAM-3 presentes em células T *náive*, permitindo a interação eficiente entre DCs e células T durante a apresentação de antígenos (GEIJTENBEEK et al., 2000). De acordo com essa participação nas interações entre patógeno e hospedeiro, a DC-SIGN demonstra uma forte influência no contato inicial de DCs com uma variedade de microrganismos, como bactérias, vírus e fungos (COSTA et al., 2015).

O receptor é codificado pelo gene *DC-SIGN*, que está localizado no cromossomo 19p13.3 e devido a alta densidade de variações em sua estrutura, vários estudos têm analisado o papel dos polimorfismos nesse gene e sua relação com doenças infecciosas (RYAN et al., 2010; SAINZ et al., 2012; SAKUNTABHAI et al., 2005; SOILLEUX, 2003). Nessas doenças, um dos SNPs mais estudados é o -336 A>G (rs4804803), localizado na região promotora do gene, essa variação resulta em uma alteração na regulação transcricional do *DC-SIGN*, em que o alelo G gera uma

expressão diminuída do gene, enquanto o alelo A aumenta o grau de expressão, mudanças que podem levar a diferentes níveis de funcionalidade do receptor e de síntese de produtos do gene (SAKUNTABHAI et al., 2005).

Analisando a associação de polimorfismos em *DC-SIGN*, Barreiro et al. (2006), sugere que o alelo A do -336 A>G (rs4804803) confere proteção à tuberculose em um estudo na Cidade do Cabo, África do Sul. Entretanto, Da Silva et al. (2014), afirmam que em indivíduos de Recife, o genótipo AA desse SNP está relacionado a susceptibilidade à essa doença. Por sua vez, Ryan et al. (2010) afirmam que em pacientes de Dublin, Irlanda, o aumento da progressão da doença hepática em pacientes com hepatite C crônica está associado ao alelo G decorrente do -336 A>G (rs4804803).

2.5.2.5 *VDR* - Receptor de Vitamina D

O receptor de Vitamina D possui grande importância no sistema imune devido sua natureza imunomodulatória, mediando as funções da vitamina D, que incluem o estímulo da produção de peptídeos antimicrobianos, como as catelecidinas e as defensinas e aumento da capacidade quimiotática e fagocítica de macrófagos, sabe-se ainda, que a vitamina D inibe a secreção de citocinas do padrão Th1, como IL-2, IFN- γ , e promovendo a produção de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 do padrão Th2 (BAEKE et al., 2010; PRIETL et al., 2013).

O gene *VDR*, localizado no cromossomo 12q13.1, codifica esse receptor, cuja funcionalidade por ser afetada por vários SNPs, dentre os quais, pode-se citar o +64978 A>C (rs7975232), também conhecido como *Apal* devido a presença ou ausência de locais de restrição para a enzima de mesmo nome (POON et al., 2012; WANG et al., 2016). Esse SNP está localizado no íntron 8 na região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene e ocorre pela transição do alelo A para o C, alteração descrita por afetar a expressão do *VDR* através da perda de locais de ligação para o fator de transcrição AML-1a na presença do alelo C e gerar menores níveis de expressão do RNAm (ALAGARASU et al., 2012; POON et al., 2012).

Baur et al. (2012), encontraram associações entre o +64978 C > A (rs7975232) e o desenvolvimento de quadros clínicos específicos da hepatite C, segundo os

autores o genótipo CC está associado a uma rápida progressão da fibrose hepática e cirrose em pacientes da Suíça. Ao contrário de Alagarasu et al. (2012), que associaram o alelo C e o genótipo CC à uma redução do risco de pacientes de uma região da Índia desenvolverem dengue sintomática que requer hospitalização. Por sua vez, Neela et al. (2015) afirmam que os genótipos AA e AC aumentam a susceptibilidade à hanseníase em uma população indiana.

2.5.3 Associação entre SNPs e a PCM

Dentre os SNPs avaliados em nosso trabalho, apenas o -308 G>A (rs1800629) no gene *TNF- α* foi incluído em um estudo relacionado à PCM, como demonstrado por Bozzi et al. (2006), que investigaram a relação entre polimorfismos em *IL-10* (-1082 G>A) e *TNF- α* (-308 G>A) na doença, por meio de uma análise por PCR alelo-específico (ASPCR) em amostras obtidas de granulócitos isolados do sangue de indivíduos da região de Belo Horizonte, os autores verificaram que, para o SNP em *IL-10*, o genótipo GG está associado a um aumento no risco de desenvolver a PCM, não sendo encontrado porém, associações entre o -308 G>A no *TNF- α* e a doença.

Em outro estudo, Bozzi et al. (2009), analisando a associação entre SNPs em *IFN- γ* (+874 T>A) e *IL-4* (-590 C>T), utilizando as mesmas técnicas do estudo anterior, puderam afirmar que indivíduos que carregam o alelo C, para -590 C>T em *IL-4*, possuem um maior risco de desenvolver a PCM, além de produzirem níveis mais altos da citocina, no entanto, os autores não encontraram associação significativa entre +874 T>A em *IFN- γ* . Por sua vez, em populações de Botucatu e Uberaba, Mendonça et al. (2015b) não encontraram associações entre o -590 C>T em *IL-4* e a PCM.

Carvalho et al. (2016), investigou a associação entre polimorfismos em *IFN- γ* (+874 T>A), *IL-12 β* (+1188 A>C) e *IL-12R β 1* (641 A>G) e a PCM em um grupo de pacientes da cidade de São Paulo, e de acordo com os autores, para +874 T>A em *IFN- γ* e +1188 A>C em *IL-12 β* não houve associações significativas entre os SNPs e a doença, porém para 641 A>G em *IL-12R β 1*, em indivíduos do sexo masculino o genótipo AA é mais prevalente em formas multifocais da doença, enquanto o genótipo AG é frequente em formas unifocais, sugerindo uma relação entre esses genótipos e as formas clínicas da PCM crônica.

Por sua vez, Lozano et al. (2011) não encontraram nenhuma associação entre a PCM e os SNPs -318 C>T e +49 A>G no gene *CTLA-4*, o qual codifica a proteína CTLA-4 expressa em células T ativadas.

Portanto, observa-se que variações alélicas e genotípicas em genes associados ao sistema imune podem levar a alterações no nível de expressão e na estrutura de componentes do sistema imunológico e conseqüentemente na resposta imune a um dado patógeno. Dessa forma, a determinação da frequência de polimorfismos pode fornecer informações sobre a susceptibilidade, resistência ou mesmo a severidade à PCM, contribuindo para um melhor entendimento da resposta imune do paciente e do desenvolvimento da doença na população de estudo.

3 OBJETIVOS

Nos itens abaixo estão descritos os objetivos gerais e específicos deste trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência dos SNPs *DC-SIGN* (rs4804803), *FcyRIIa* (rs1801274), *JAK1*(rs11208534), *TNF- α* (rs1800629) e *VDR* (rs7975232) em indivíduos afetados por paracoccidiodomicose oral e verificar a possível associação destas frequências com o padrão histológico dos granulomas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Genotipar e determinar a frequência de polimorfismos nos genes *DC-SIGN*, *FcyRIIa*, *JAK1*, *TNF- α* e *VDR* por discriminação alélica utilizando PCR em tempo real em amostras de DNA obtidas a partir de tecidos parafinados de indivíduos afetados por paracoccidiodomicose oral.
- b) Classificar o padrão histológico de granulomas em lesões orais de indivíduos afetados por paracoccidiodomicose oral.
- c) Investigar as relações entre os polimorfismos analisados e os padrões histológicos dos granulomas de indivíduos afetados por paracoccidiodomicose oral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo estão descritas as metodologias utilizadas neste trabalho.

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A seguir são apresentadas informações sobre os grupos de indivíduos analisados neste estudo.

4.1.1 Pacientes com PCM oral

Foi realizado um levantamento de todas as amostras de biópsias de lesões orais, fixadas em formalina tamponada e conservados em blocos de parafina, e as respectivas lâminas histológicas de pacientes com diagnóstico clínico, sorológico e histopatológico para a PCM, presentes no arquivo do Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Parasitologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Os blocos com as biópsias e suas respectivas lâminas estão datados de 1998 a 2015, caracterizando um estudo retrospectivo, e são provenientes de pacientes da mesorregião sul e sudoeste de Minas Gerais. Dados referentes à idade, gênero e diagnóstico final foram obtidos dos prontuários dos pacientes.

Foi incluído no estudo um total de 66 espécimes de lesões previamente diagnosticadas clinicamente, histopatologicamente pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e sorologicamente por imunodifusão radial dupla.

Amostras que apresentaram omissão de dados superior a 45%, devido a falta de informações nos prontuários ou falhas na genotipagem (conforme item 4.5) foram excluídas das análises, assim como lâminas histológicas coradas em HE com baixa qualidade de cortes que não permitiam a classificação dos granulomas (de acordo com o protocolo do item 4.6) .

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UNIFAL-MG e possui parecer aprovado (CAAE nº 13074213.8.0000.5142) (ANEXO I).

4.1.2 Grupo controle

Foram selecionadas aleatoriamente 106 amostras de DNA de indivíduos de um total de 350 amostras presentes no banco de DNA do Laboratório de Vacinas. Estas amostras foram extraídas a partir de sangue total de indivíduos admitidos no Laboratório Central de Análises Clínicas da UNIFAL-MG durante agosto de 2013 a agosto de 2014.

Para obtenção das amostras de sangue total foi coletado um volume de 5 mL do sangue de indivíduos recebidos para exames de rotina, como dosagem de glicose, colesterol e hormônios. Amostras de indivíduos com quadro febril e que realizaram testes diagnósticos para doenças infecciosas foram excluídos do grupo. Foram obtidos ainda, dados demográficos referentes a todos os indivíduos.

Amostras de soro referentes às amostras de DNA foram utilizadas em ensaios de imunodifusão radial dupla para detecção de anticorpos séricos anti-*P.brasiliensis*. Apenas indivíduos com ausência de anticorpos séricos anti-*P.brasiliensis* foram incluídos no estudo.

As análises foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UNIFAL-MG (Protocolo nº 13387313.0.0000.5142) (ANEXO II) e foi obtido um termo de consentimento informado e assinado por todos os indivíduos incluídos no estudo antes de iniciar a coleta das amostras (ANEXO III).

4.2 DESPARAFINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Cerca de 5 a 10 cortes de 5 µm do tecido de cada bloco de parafina foram coletados utilizando micrótomo limpo com etanol 70% e navalhas descartáveis, sendo uma para cada bloco de parafina. O material foi transferido para um microtubo de 2 mL estéril e então submetido ao processo de desparafinização e reidratação.

Conforme descrito por Nascimento et al. (2003), o material foi submetido duas vezes a um banho de 1 mL de xilol por 30 minutos a 65° C e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Após o processo de desparafinização, o xilol foi removido com um banho de 1 mL de etanol 100% e outro de 1 mL de etanol 95%. Na etapa seguinte, o material foi reidratado com dois banhos de etanol 70% e dois de água deionizada.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO A PARTIR DE TECIDOS PARAFINADOS

O DNA foi extraído conforme protocolo descrito por Pikor et al. (2011). Primeiramente, ao tubo contendo material obtido dos cortes de parafina, foram adicionados 419 µL de Tampão de Lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 0.5% SDS) e 11 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguido de incubação a 55°C por cerca de 48 horas para a digestão completa do tecido.

Terminado o tempo de incubação, foi adicionado ao tubo 430 µL de fenol equilibrado (pH 8,0), seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos e então o sobrenadante contendo a fração aquosa foi transferido para outro tubo estéril e o volume estimado. Ao novo tubo foi adicionado um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1), homogeneizado por 1 minuto e logo após realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. Novamente o sobrenadante contendo a fase aquosa foi transferido para outro tubo, adicionado o equivalente a 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e um volume de isopropanol absoluto igual ao do sobrenadante para precipitação do DNA. O tubo então foi incubado em gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante ao final. Nesta etapa ocorreu a formação de um sedimento, o qual foi lavado com 600 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. Logo após, o tubo foi deixado em repouso com a tampa aberta por 20 minutos para a secagem e em seguida o sedimento foi ressuspenso utilizando 30 µL de água deionizada. Ao final, os tubos foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria através do aparelho NanoDrop 2000/2000c (*Thermo Scientific, EUA*), em um comprimento de onda de 260

nanômetros (nm), observando as razões A260/280 e A260/230 para avaliar a pureza do material.

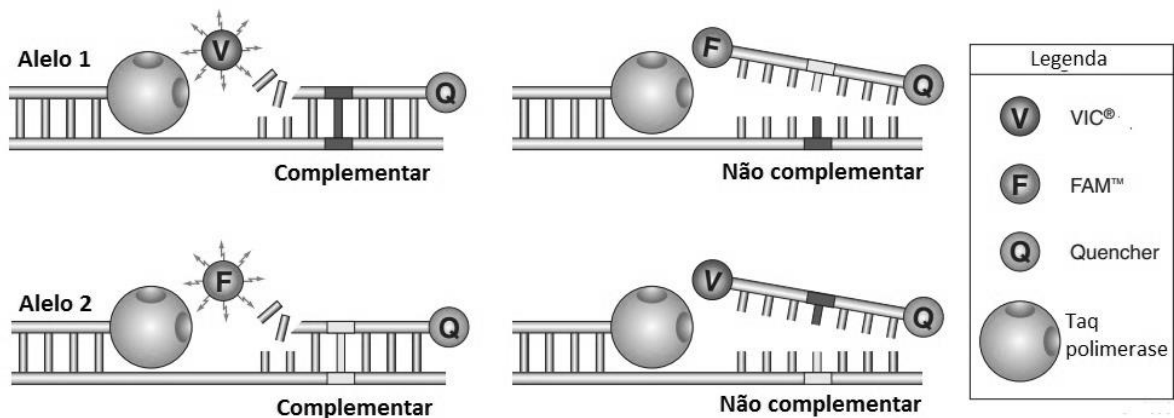
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS DO GRUPO CONTROLE

O DNA genômico das amostras do grupo controle foi extraído do sangue total (300 µL) utilizando o Kit Wizard® (PROMEGA, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado no aparelho NanoDrop 2000/2000c (*Thermo Scientific*, EUA), em um comprimento de onda de 260 nm, sendo verificadas razões A260/280 e A260/230 para avaliar a pureza da amostra.

4.5 GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL

O sistema de discriminação alélica por PCR em tempo real utiliza um par de compostos fluorescentes (fluoróforos) ligados à extremidade 5' de cada sonda. Na extremidade 3', encontra-se um composto que bloqueia a emissão de fluorescência (*quencher*) e um composto denominado *minor groove binder* (MGB), que permite uma discriminação mais precisa dos alelos. Quando há a clivagem das sondas que hibridizam com a sequência complementar pela *Taq* polimerase, os compostos (fluoróforo e *quencher*) se separam e a fluorescência é observada e captada para posterior identificação dos genótipos (Figura 6) (KWOK; CHEN, 2003). Portanto, se o sinal da fluorescência for único, indica homozigose, por outro lado, se houver a emissão da fluorescência dos dois fluoróforos, a heterozigose é detectada (KWOK; CHEN, 2003).

Figura 7 - Discriminação alélica por PCR em tempo real utilizando sondas marcadas com os Fluoróforos VIC® e FAM™.



Fonte: Applied Biosystems (2008)

As amostras de DNA genômico foram submetidas a ensaios para estudo de polimorfismos nos genes *DC-SIGN*, *FcyRIIa*, *JAK1*, *VDR* e *TNF- α* . A genotipagem das amostras foi realizada utilizando o kit *TaqMan® Genotyping Master Mix* (*Thermo Fischer*, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. Oligos e sondas específicas para cada polimorfismo foram obtidas a partir de ensaios comercialmente disponíveis (*Thermo Fischer*, EUA).

Cada ensaio inclui dois pares de *primers* (*senso* e *antisenso*) para amplificação das regiões alvo e duas sondas para a detecção dos alelos. As sondas possuem um *reporter* fluorescente na extremidade 5' (VIC® para o alelo 1 ou FAM™ para o alelo 2), um composto MGB e um *quencher* não fluorescente (NFQ).

As reações foram realizadas em microplacas de 48 poços e cada uma delas foi preparada em um volume final de 5,0 μ L contendo: 2,5 μ L do reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x*, 0,12 μ L do *SNP Genotyping Assay Mix 40x* (específico para cada polimorfismo), 1,38 μ L de água livre de DNase e 1,0 μ L de DNA (\geq 30 ng). A reação foi realizada em termociclador *StepOne Plus Real Time PCR System* (*Life Applied Biosystems*, EUA) nas seguintes condições de ciclagem: 60°C por 30 segundos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 50 ciclos de 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 30 segundos, e então 60°C por 30 segundos. Os dados finais foram analisados no programa *StepOne Software v.2.3* (*Applied Biosystems*, EUA).

Para o controle de qualidade 10% das amostras foram selecionadas aleatoriamente e regenotipadas para todos os SNPs, obtendo-se 100% de concordância entre ambas as análises.

Informações sobre os polimorfismos nos genes analisados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos polimorfismos nos genes *DC-SIGN*, *FcγRIIa*, *JAK1*, *VDR* e *TNF-α*.

Gene	SNP	Localização	Posição	Cromossomo	Efeito
<i>TNF-α</i>	rs1800629	Região Promotora	-308 G>A	6	Aumento da expressão (QIDWAI; KHAN, 2011)
<i>JAK1</i>	rs11208534	Íntron 3	-301 A>G	1	Diminuição da expressão (CHEN et al., 2012)
<i>FcγRIIa</i>	rs1801274	Éxon 4	-519 G>A	1	Variação estrutural (BOURNAZOS et al., 2009)
<i>DC-SIGN</i>	rs4804803	Região promotora	-336 A>G	19	Diminuição da expressão (SAKUNTABHAI et al., 2005)
<i>VDR</i>	rs7975232	Íntron 8	+64978 A>C	12	Diminuição da capacidade transcricional (ALAGARASU et al., 2012)

Fonte: Do autor (2017)

4.6 CLASSIFICAÇÃO DO PADRÃO HISTOLÓGICO DOS GRANULOMAS

As lâminas foram revisadas por um patologista oral experiente e conforme descrito por De Abreu e Silva et al. (2013b), os casos foram divididos em dois grupos de acordo com o padrão de organização do granuloma mais predominante nas lesões e classificados em: 1) granulomas frouxos: formados por microabscessos, necrose, grande quantidade de exsudato inflamatório, edema e fungos dispersos no tecido, e

2) granulomas densos: caracterizados por um intenso agregado de células epitelióides e CGM organizadas centralmente e limitadas por linfócitos e fibroblastos periféricos.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências genótípicas e alélicas foram determinadas por contagem direta e as associações entre os pacientes e o grupo controle foram avaliadas pelo teste qui-quadrado, com a força da associação dos genótipos com a PCM verificada pelo teste *Odds Ratio* (OR), adotando um intervalo de confiança de 95% (IC 95%), o qual foi obtido por regressão logística ajustada para idade e gênero usando os modelos codominante, dominante e recessivo e os genótipos mais frequentes no grupo controle como referência. E para avaliar a associação dos alelos individualmente com a PCM, foi utilizado o teste exato de Fisher em tabelas de contingência 2x2 e calculado o OR com IC de 95% e o alelo mais frequente no grupo controle como referência.

Na investigação da relação entre os genótipos e os tipos de granuloma foi utilizado o teste χ^2 em tabelas de contingência 3x2 ou o teste exato de Fisher para tabelas de contingência 2x2 e em seguida o OR (IC de 95%) para análise do risco, novamente foi utilizado como referência o genótipo/alelo mais frequentes como referência.

Possíveis desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram testados no grupo controle através do teste χ^2 . Em todos os testes foi adotado nível de significância de 0,05 e utilizado os *softwares Bioestat 5.3* (AYRES et al., 2007) e *SPSS Statistics 23.0* (SPSS Inc., Chicago, EUA).

5 RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos em cada análise.

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Foram obtidos 66 blocos de parafina de pacientes admitidos entre 1998 e 2015 contendo biópsias de lesões orais e seus respectivos prontuários obtidos no Laboratório de Patologia da UNIFAL-MG. Os dados demográficos dos pacientes e do grupo controle estão apresentados na tabela 2.

Os pacientes com PCM oral apresentaram uma média de idade de 48,7 anos, com idade mínima de 21 e máxima de 80 anos. Por sua vez, no grupo controle a média de idade foi de 39,1 anos, com mínima de 10 e a máxima de 74 anos.

O gênero masculino foi predominante no grupo de pacientes (81,82%) e no grupo controle (77,36%) e em menor frequência o gênero feminino (18,18% e 22,64%, respectivamente).

Tabela 2 - Dados demográficos de pacientes com lesões orais na PCM e do grupo controle.

Grupos (n)	Idade (anos)		Gênero		p-valor
	Média (dp)	Mínimo-máximo	Masculino (%)	Feminino (%)	
PCM oral (n: 66)	48,7 (11,0)	21-80	54 (81,82)	12 (18,18)	0,565
Controle (n: 106)	39,1 (15,08)	10-74	82 (77,36)	24 (22,64)	

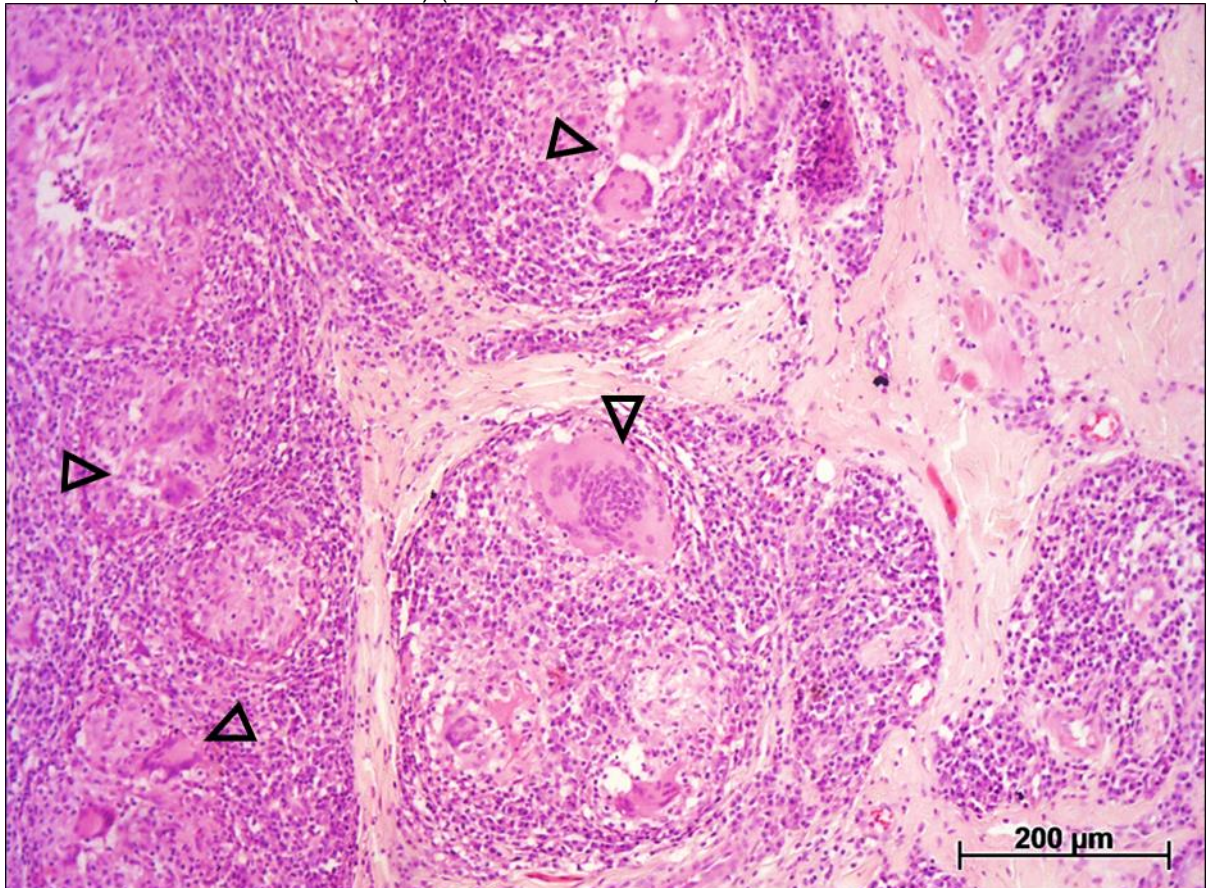
Fonte: Do autor (2017)

Nota: dp: desvio padrão

5.2 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DOS GRANULOMAS NAS LESÕES

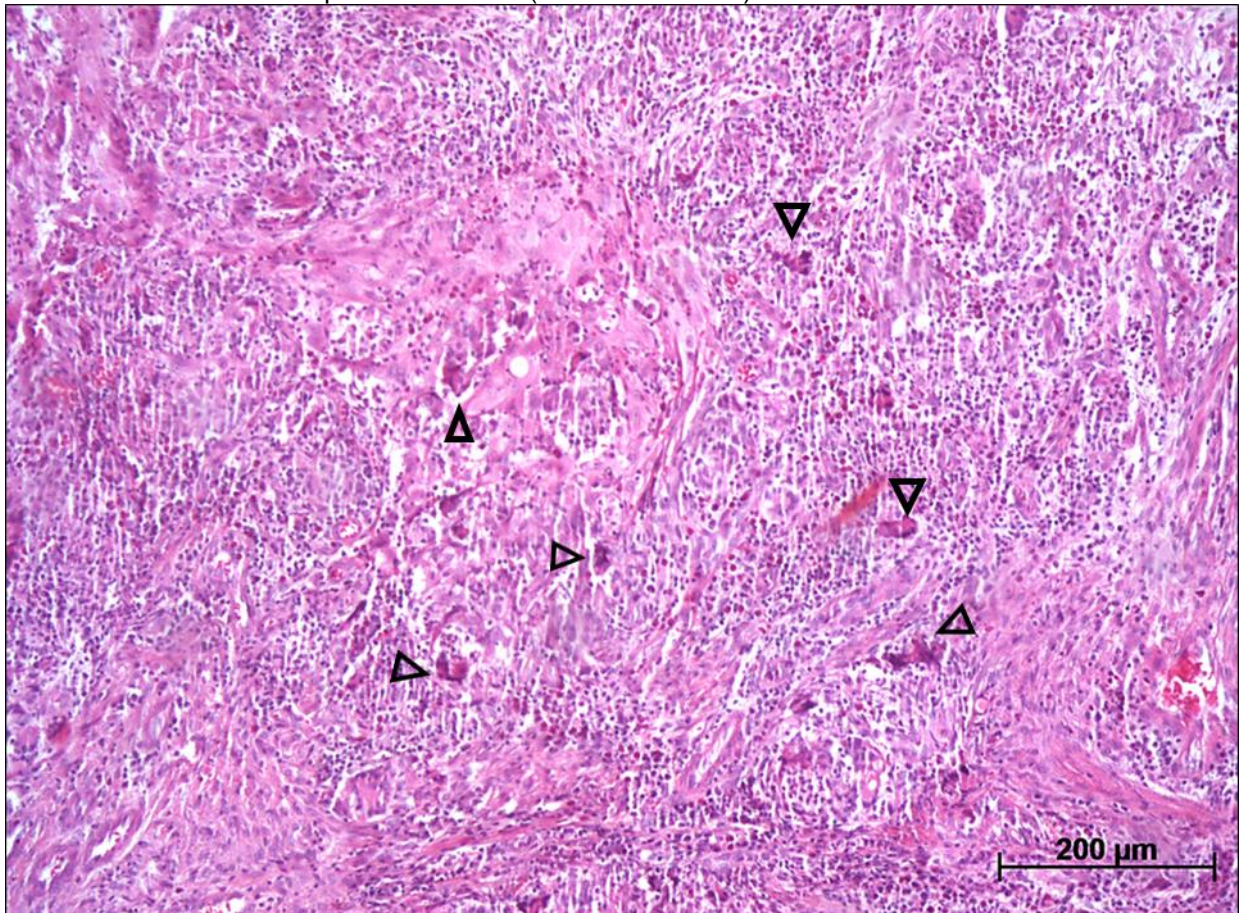
Para a classificação dos granulomas, foram analisadas 62 lâminas histológicas dos pacientes com PCM oral. A análise das lesões revelou uma predominância de granulomas frouxos em 46 casos (74,19%) e lesões com granuloma denso foi observada em 16 casos (25,81%) (Figuras 7 e 8).

Figura 8 - Granuloma denso de arranjo organizado com a presença de agregado de células epitelióides e CGM no interior (setas) (aumento de 100x)



Fonte: Do autor (2017)

Figura 9 - Granuloma frouxo com a presença de grande quantidade de CGM (setas) e células inflamatórias dispersas no tecido (aumento de 100x)



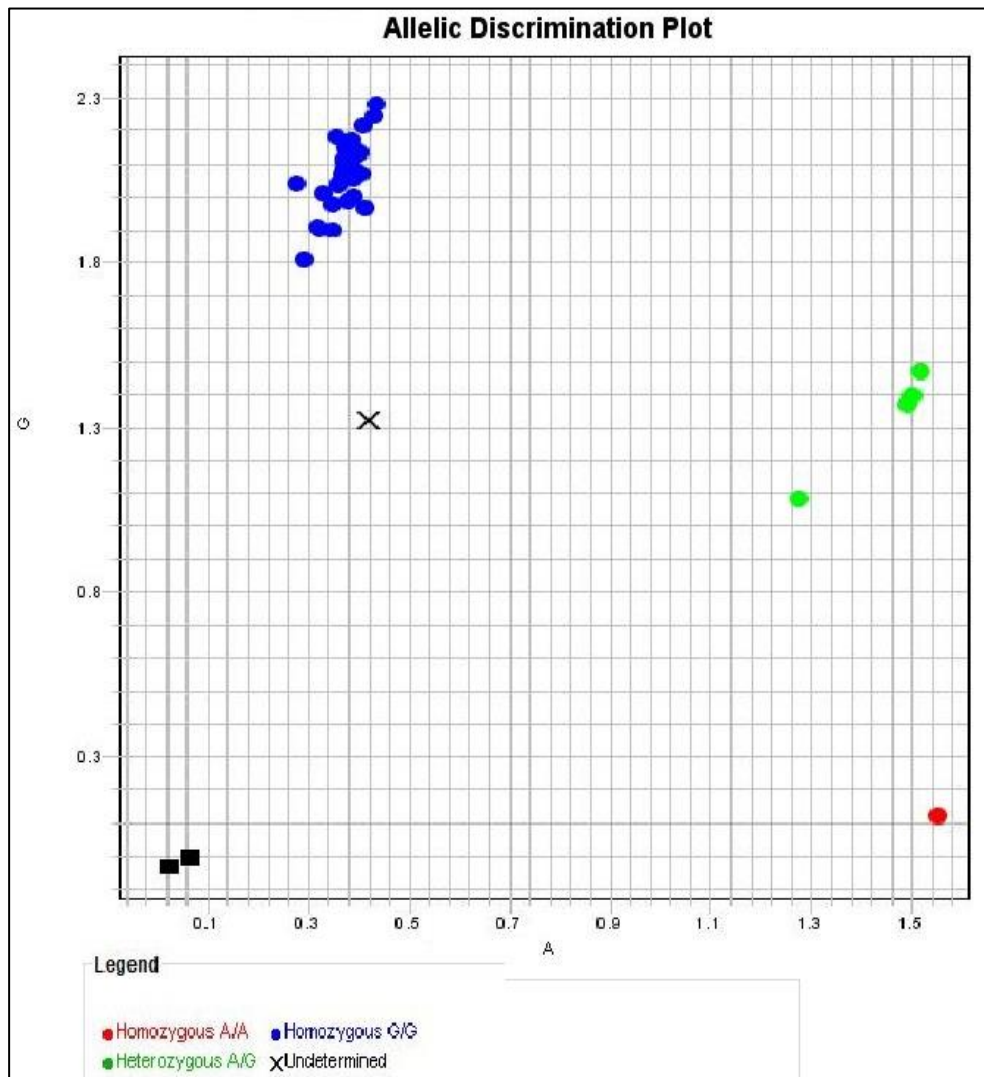
Fonte: Do autor (2017)

5.3 Frequência genotípica nos SNPs estudados

Na figura 9 é mostrado um resultado de genotipagem de amostras por discriminação alélica em PCR em tempo real.

Para os polimorfismos analisados, as distribuições das frequências no grupo controle se encontram em EHW (p -valor $>0,05$), exceto para o SNP -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1* (p -valor = 0,014).

Figura 10 - Exemplo de genotipagem por discriminação alélica analisada por PCR em tempo real



Fonte: Do autor (2017).

Na tabela 3, observa-se a distribuição das frequências genóticas nos dois grupos de indivíduos em cada SNP.

Para o SNP -336 A>G (rs4804803) no *DC-SIGN* houve uma maior frequência do genótipo homocigoto AA, tanto nos pacientes (64,00%), quanto no grupo controle (67,31%), seguido do genótipo GG (20,00%) e AG (16,00%) para indivíduos com PCM oral e AG (25,96%) e GG (6,73%) para os controles. Verifica-se ainda, que houve diferença estatística entre os dois grupos de indivíduos (p-valor = 0,032), com o genótipo GG associado a um aumento do risco de desenvolver a doença com lesões orais (OR = 3,76, IC 95% 1,06 – 13,38 e OR = 4,04, IC 95% 1,16 – 14,13 no modelo recessivo).

Para o SNP -301 A>G (rs11208534) em *JAK1*, a maior frequência dos genótipos foi observada em AA, 66,13% para pacientes com PCM oral e 68,27% para controles, seguidos do genótipo AG, 30,65% e 24,04% e GG, 3,22% e 7,69%, respectivamente. No entanto, para esse SNP, não houve diferença estatística na frequência dos genótipos entre os dois grupos (p-valor = 0,377).

No SNP -308 G>A (rs1800629) no gene *TNF- α* , o genótipo mais frequente em ambos os grupos foi o homozigoto GG, 87,72% para pacientes com PCM oral e 83,72% para o grupo controle, seguido do genótipo AG, 10,53% e 13,95% e AA, 1,75% e 2,33%, respectivamente. Nesse SNP não foram observadas diferenças estatísticas na distribuição dos genótipos entre os grupos (p-valor = 0,804).

Também não foram observadas diferenças estatísticas no -519 G>A (rs1801274) no gene *FcyRIIa* (p-valor = 0,747). Nesse SNP, o genótipo mais frequente foi o GG e o AG, com frequências iguais para os pacientes com PCM oral (39,22%) e AG para o grupo controle (45,10%), seguidos de AA (21,15%) nos pacientes e GG (37,25%) e AA (17,65%) no controle respectivamente.

Por fim, observa-se que para +64978 A>C (rs7975232) no gene *VDR*, a maior frequência no grupo de pacientes ocorreu para o genótipo homozigoto CC (61,11%), seguido de AA (22,22%) e AC (16,67%). Por outro lado, no grupo controle a frequência maior foi observada no genótipo AC (43,37%), acompanhado de AA (39,76%) e CC (16,87%). Neste caso, houve diferença estatística entre os dois grupos de indivíduos (p<0,001), com o genótipo CC contribuindo para o aumento do risco de desenvolver a PCM oral (OR = 5,94, IC 95% 2,07 – 17,05; OR = 2,71, IC 95% 1,07 – 6,86 no modelo dominante e OR = 6,36 IC 95% 2,52 – 15,94 no modelo recessivo).

Tabela 3 - Distribuição genotípica para os polimorfismos estudados em pacientes afetados PCM oral e no grupo controle.

SNP	Genótipo	PCM % (n)	Controle % (n)	p-valor	OR (IC 95%)
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	AA	1,75 (1)	2,33 (2)	0,804	0,73 (0,04 – 12,32)
	AG	10,53 (6)	13,95 (12)		0,54 (0,16 – 1,82)
	GG	87,72 (50)	83,72 (72)		1,00
	Total	100,00 (57)	100,00 (86)		
	¹ GG vs. AA+AG	12,29 (7)	16,28 (14)	0,632	0,57 (0,18 – 1,76)
	² GG+AG vs. AA	98,25 (56)	97,68 (84)	NS	0,80 (0,05 – 13,43)
<i>JAK1</i> (rs1120853)	AA	66,13 (41)	68,27 (71)	0,377	1,00
	AG	30,65 (19)	24,04 (25)		1,51 (0,64 – 3,55)
	GG	3,22 (2)	7,69 (8)		0,69 (0,15 – 3,12)
	Total	100,00 (62)	100,00 (104)		
	¹ AA vs. GG+AG	33,87 (21)	31,73 (33)	0,864	1,27 (0,57 – 2,77)
	² AA+AG vs. GG	96,78 (60)	92,31 (96)	0,324	0,63 (0,14 – 2,78)
<i>FcyRIIa</i> (rs1801274)	AA	21,15 (11)	17,65 (18)	0,747	1,54 (0,50 – 4,70)
	AG	39,22 (20)	45,10 (46)		0,93 (0,40 – 2,17)
	GG	39,23 (20)	37,25 (38)		1,00
	Total	100,00 (51)	100,00 (102)		
	¹ GG vs. AA+AG	60,78 (31)	62,75 (64)	0,861	1,07 (0,49 – 2,35)
	² GG+AG vs. AA	78,84 (41)	82,35 (84)	0,665	1,60 (0,58 – 4,43)
<i>DC-SIGN</i> (rs4804803)	AA	64,00 (32)	67,31 (70)	0,032	1,00
	AG	16,00 (8)	25,96 (27)		0,26 (0,28 – 2,04)
	GG	20,00 (10)	6,73 (7)		3,76 (1,06 – 13,38)
	Total	100,00 (50)	100,00 (104)		
	¹ AA vs. GG+AG	36,00 (18)	32,69 (34)	0,718	1,33 (0,59 – 3,04)
	² AA+AG vs. GG	80,00 (40)	93,27 (97)	0,025	4,04 (1,16 – 14,13)
<i>VDR</i> (rs7975232)	AA	22,22 (12)	39,76 (33)	p<0,001	1,00
	AC	16,67 (9)	43,37 (36)		0,86 (0,27 – 2,74)
	CC	61,11 (33)	16,87 (14)		5,94 (2,07 – 17,05)
	Total	100,00 (54)	100,00 (83)		
	¹ AA vs. CC+AC	77,78 (42)	60,24 (50)	0,041	2,71 (1,07 – 6,86)
	² AA+AC vs. CC	38,89 (21)	83,13 (69)	p<0,001	6,36 (2,52 – 15,94)

Fonte: Do autor (2017)

Nota: PCM: pacientes com PCM oral; n: número de indivíduos; OR: *odds ratio*, 95% IC: Intervalo de Confiança 95%. ¹Modelo dominante; ²Modelo recessivo. Diferenças na quantidade de amostras ocorreram devido a falhas na genotipagem. NS: não significativo

5.4 FREQUÊNCIA ALÉLICA NOS SNPS ESTUDADOS

Com o intuito de investigar o efeito dos alelos de cada SNP na PCM oral a frequência alélica dos dois grupos de indivíduos foi analisada e apresentada na tabela 4.

Para o SNP -519 G>A no gene (rs1800629) no *TNF- α* , observa-se uma maior frequência do alelo G, tanto no grupo de pacientes (92,98%) quanto no grupo controle (90,70%), quando comparado ao alelo A (7,02% e 9,30%, respectivamente), para esse SNP, no entanto, não houve diferenças estatísticas nas frequências dos alelos (p-valor = 0,524). No SNP -308 G>A (rs1801274) no *Fc γ RIIa*, o alelo G também foi o mais frequente nos pacientes (58,82%) e no controle (59,80%), seguido do alelo A, 41,18% e 42,20%, respectivamente. Para esse SNP, também não foi possível verificar significância estatística na distribuição das frequências dos alelos (p-valor = 0,902).

Para o SNP -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1*, ocorreu uma predominância do alelo A nos pacientes (81,45%) e no grupo controle (80,29%) seguido do G em ambos os grupos (18,55% e 19,71%, respectivamente), não ocorrendo diferença estatística entre as distribuições (p-valor = 0,886). De forma semelhante, o alelo A no -336 A>G (rs4804803) no *DC-SIGN* foi o mais frequente nos pacientes (72,00%) e no controle (80,29%), seguido do alelo G (28,00% e 19,71%, respectivamente), não sendo observada diferenças estatísticas entre as frequências (p-valor = 0,110).

No SNP +64978 A>C (rs7975232) no gene *VDR*, observou-se uma maior frequência do alelo C no grupo de pacientes (69,44%), seguido do alelo A (30,56%), por sua vez, no grupo controle o alelo predominante foi o A (61,45%) e, com menor frequência, o alelo C (38,55%). Para esse SNP houve diferenças significativas entre a distribuição alélica dos dois grupos de indivíduos (p-valor<0,001), estando o alelo C associado a um aumento do risco de se desenvolver a PCM oral (OR = 3,62, IC 95% 2,16 – 6,06).

Tabela 4 - Distribuição alélica para os polimorfismos estudados em pacientes portadores com lesões orais na PCM e no grupo controle.

SNP	Alelo	PCM % (n)	Controle % (n)	p-valor	OR (IC 95%)
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	A	7,02 (8)	9,30 (16)	0,524	0,74 (0,30 – 1,78)
	G	92,98 (106)	90,70 (156)		
<i>JAK1</i> (rs1120853)	A	81,45 (101)	80,29 (167)	0,886	1,00 0,93 (0,53 – 1,64)
	G	18,55 (23)	19,71 (41)		
<i>FcγRIIa</i> (rs1801274)	A	41,18 (42)	40,20 (82)	0,902	1,04 (0,64 – 1,69)
	G	58,82 (60)	59,80 (122)		
<i>DC-SIGN</i> (rs4804803)	A	72,00 (72)	80,29 (167)	0,110	1,00 1,58 (0,91 – 2,75)
	G	28,00 (28)	19,71 (41)		
<i>VDR</i> (rs7975232)	A	30,56 (33)	61,45 (102)	p<0,001	1,00 3,62 (2,16 – 6,06)
	C	69,44 (75)	38,55 (64)		

Fonte: Do autor (2017).

Nota: PCM: pacientes com PCM oral; n: número de indivíduos; OR: *odds ratio*, 95% IC: Intervalo de Confiança 95%

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SNPS ANALISADOS E A CLASSIFICAÇÃO DOS GRANULOMAS

Nos itens a seguir, são dispostos os dados obtidos a partir das análises dos SNPs e do os granulomas presentes nas lesões orais de pacientes com PCM oral.

5.5.1 Frequência genotípica

Para investigar o efeito dos SNPs no nível de organização dos granulomas presentes nas lesões da PCM oral, o padrão de organização da reação granulomatosa foi classificado em dois tipos de granulomas (denso e frouxo) e então distribuídos de acordo com os genótipos em cada SNP e apresentados na tabela 5.

No SNP -519 G>A (rs1800629) no gene *TNF- α* foi observada uma predominância dos granulomas denso (86,67%) e frouxo (89,75%) no genótipo GG, e em seguida no genótipo AG, 13,33% e 7,69% e AA, 0,00% e 2,56%, respectivamente,

porém não houve significância estatística nas distribuições, não sendo possível associar o SNP ao tipo de organização do granuloma nas lesões ($p = 0,783$).

Para o -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1* os granulomas denso e frouxo apresentam uma maior frequência no genótipo AA (62,50% e 64,29%, respectivamente). Nos genótipos AG e GG a frequência dos granulomas foi menor: 31,25% e 6,25% para granulomas densos, e 33,33% e 2,38% para granulomas frouxos, respectivamente. Nesse SNP, não ocorreu diferenças estatísticas entre os dois tipos de organização ($p = 0,779$). Foi observada também uma predominância dos dois tipos de granuloma no genótipo AA para o SNP -336 A>G (rs4804803) no DC-SIGN: 61,54% de granulomas densos e 69,70% de granulomas frouxos, distribuições seguidas nos genótipos GG, 15,38% e 21,21%, e AG, 23,08% e 9,09%, respectivamente. Para esse SNP, também não foram observadas diferenças estatísticas entre ambas as classificações (p -valor = 0,418).

No -519 G>A (rs1801274) no gene *FcyRIIa* o granuloma denso foi mais frequente no genótipo GG (50,00%), seguido do genótipo AA (33,33%) e AG (16,67%), por sua vez, o granuloma frouxo foi mais frequente no genótipo AG (47,22%) e em seguida no genótipo GG (33,34%) e AA (19,44%), no entanto, não ocorreram diferenças significativas na distribuição dos dois tipos de organização nos genótipos (p -valor = 0,187).

No +64978 A>C (rs7975232) no gene *VDR* os granulomas densos e frouxos foram predominantes no genótipo CC (57,14% e 60,53%, respectivamente), seguido do genótipo AA (28,57%) e AC (14,29%) para os granulomas densos e AC (18,42%) e AA (21,05%) para os granulomas frouxos, não ocorrendo, porém, diferenças estatísticas nas frequências entre os dois tipos de organização (p -valor = 0,704).

Tabela 5: Frequências genóticas dos SNPs analisados de acordo os tipos de granuloma.

Tipo de granuloma					
SNP	Genótipo	Denso % (n)	Frouxo % (n)	p-valor	OR (IC 95%)
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	AA	0,00 (0)	2,56 (1)	0,783	0,00
	AG	13,33 (2)	7,69 (3)		1,35 (0,22 – 8,25)
	GG	86,67 (13)	89,75 (35)		1,00
	Total	100,00 (15)	100,00 (39)		
<i>JAK1</i> (rs1120853)	AA	62,50 (10)	64,29 (27)	0,779	1,00
	AG	31,25 (5)	33,33 (14)		0,91 (0,26 – 3,13)
	GG	6,25 (1)	2,38 (1)		2,54 (0,15 – 44,37)
	Total	100,00 (16)	100,00 (42)		
<i>FcγRIIa</i> (rs1801274)	AA	33,33 (4)	19,44 (7)	0,187	1,24 (0,26 – 5,91)
	AG	16,67 (2)	47,22 (17)		0,26 (0,04 – 1,48)
	GG	50,00 (6)	33,34 (12)		1,00
	Total	100,00 (12)	100,00 (36)		
<i>DC-SIGN</i> (rs4804803)	AA	61,54 (8)	69,70 (23)	0,418	1,00
	AG	23,08 (3)	9,09 (3)		2,88 (0,48 – 17,24)
	GG	15,38 (2)	21,21 (7)		0,86 (0,15 – 5,00)
	Total	100,00 (12)	100,00 (33)		
<i>VDR</i> (rs7975232)	AA	28,57 (4)	21,05 (8)	0,704	1,5 (0,35 – 6,35)
	AC	14,29 (2)	18,42 (7)		0,67 (0,12 – 3,76)
	CC	57,14 (8)	60,53 (23)		1,00
	Total	100,00 (14)	100,00 (38)		

Fonte: Do autor (2017)

Nota: n: número de indivíduos; OR: *odds ratio*, 95% IC: Intervalo de Confiança 95%

5.5.2 Frequência alélica

Para verificar o efeito de cada alelo sobre o tipo de granuloma, a frequência alélica de cada SNP foi determinada e apresentada na tabela 6. É possível observar no SNP -308 G>A no gene *TNF- α* (rs1800629) uma maior frequência do alelo G em ambos os tipos de granuloma, 93,33% para o denso e 93,59% para o frouxo, seguido do alelo A, 6,67% e 6,41%, respectivamente. Não ocorrendo diferenças significativas entre a distribuição dos alelos entre os dois granulomas (p-valor = 0,983).

Para -301 A>G no *JAK1* (rs11208534), a maior frequência foi observada no alelo A, 78,13% para o granuloma denso e 80,95% para o frouxo, seguido do alelo G, 21,87% e 19,05%, respectivamente. Para esse SNP, não houve diferenças estatísticas entre as distribuições (p-valor = 0,796).

No SNP -519 G>A do *FcyRIIa* (rs1801274), observa-se uma maior frequência do alelo G nos dois tipos de organização, 58,33% para o denso e 56,94% para o frouxo e em seguida o alelo A, 41,67% e 43,06%, respectivamente. As distribuições das frequências nesse SNP não apresentaram diferenças estatísticas (p-valor = NS).

Observa-se no SNP -336 A>G no *DC-SIGN* (rs4804803), uma predominância do alelo A, 73,08% nos granulomas densos e 74,24% nos granulomas frouxos, seguido do alelo G, 26,92% e 25,76%, respectivamente. Nesse SNP, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois grupos (p-valor = NS).

Por fim, no SNP +64978 A>C no *VDR* (rs7975232), ocorreu uma maior frequência do alelo C, 64,29% no granuloma denso e 69,74% no granuloma frouxo, seguido do alelo A, 35,71% e 30,26%, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas entre as frequências nos grupos de granulomas (p-valor = 0,639).

Tabela 6 - Frequências alélicas dos SNPs analisados de acordo os tipos de granuloma.

Tipo de granuloma					
SNP	Alelo	Denso % (n)	Frouxo % (n)	p-valor	OR (IC 95%)
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	A	6,67 (2)	6,41 (5)	0,983	1,04 (0,19 – 5,69) 1,00
	G	93,33 (28)	93,59 (73)		
<i>JAK1</i> (rs1120853)	A	78,13 (25)	80,95 (68)	0,796	1,00 1,19 (0,44 – 3,23)
	G	21,87 (7)	19,05 (16)		
<i>FcyRIIa</i> (rs1801274)	A	41,67 (10)	43,06 (31)	NS	0,94 (0,37 – 2,41) 1,00
	G	58,33 (14)	56,94 (41)		
<i>DC-SIGN</i> (rs4804803)	A	73,08 (19)	74,24 (49)	NS	1,00 1,06 (0,38 – 2,97)
	G	26,92 (7)	25,76 (17)		
<i>VDR</i> (rs7975232)	A	35,71 (10)	30,26 (23)	0,639	1,28 (0,51 – 3,20) 1,00
	C	64,29 (18)	69,74 (53)		

Fonte: Do autor (2017).

Nota: n: número de indivíduos; OR: *odds ratio*, 95% IC: Intervalo de Confiança 95%; NS = Não significativo

6 DISCUSSÃO

As características da resposta imune e os diferentes níveis de susceptibilidade à PCM são determinadas por inúmeros aspectos relacionados tanto ao fungo e ao ambiente quanto a fatores inerentes ao hospedeiro como a integridade imunológica do indivíduo e determinantes genéticos (BOCCA et al., 2013; BOZZI et al., 2006, 2009).

Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o propósito de investigar os SNPs -308 G>A no gene *TNF- α* (rs1800629), -336 A>G no *DC-SIGN* (rs4804803), -519 G>A no *FcyRIIa* (rs1801274), -301 A>G no *JAK1* (rs11208534) e +64978 A>C no *VDR* (rs7975232), envolvidos em diferentes vias da resposta imune, e sua associação com a susceptibilidade e os tipos de organização dos granulomas presentes nas lesões orais de pacientes com PCM oral.

De acordo com nossos conhecimentos, até o presente momento este é o primeiro trabalho a analisar os polimorfismos -336 A>G no *DC-SIGN* (rs4804803), -519 G>A no *FcyRIIa* (rs1801274), -301 A>G no *JAK1* (rs11208534) e +64978 A>C no *VDR* (rs7975232) em pacientes com PCM.

Em nosso trabalho, houve um desvio do EHW na frequência genotípica do grupo controle no SNP -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1*. Em estudos de associação genética em populações, violações no EHW frequentemente ocorrem devido a fatores como estratificação populacional, migração, seleção e mutações ocorridas no gene, gerando dessa forma diferenças entre as frequências esperadas e observadas (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009). Portanto, uma hipótese para a violação no EHW é que tenha ocorrido uma alteração das distribuições genotípicas, gerada pela influência de um alelo específico desse gene, introduzido por meio dos fatores citados acima.

Em nossas análises pudemos verificar que o SNP -336 A>G no gene *DC-SIGN* (rs4804803) está associado a susceptibilidade na PCM oral, sendo o genótipo GG responsável por um aumento de aproximadamente quatro vezes o risco de desenvolver a doença.

Os aspectos funcionais desse SNP foram analisados por Sakuntabhai et al. (2005). Segundo os autores polimorfismos na região promotora do gene afetam os pontos de ligação do fator de transcrição Sp1 diminuindo sua capacidade

transcricional, e dessa forma a presença do alelo variante G pode diminuir o nível de expressão do gene, ocasionando uma menor capacidade de ligação do receptor ao antígeno. Dados confirmados por Barreiro et al. (2006) em uma população da África do Sul e Naderi et al. (2014) em indivíduos do Irã, os quais verificaram um aumento do risco de desenvolver tuberculose e tuberculose pulmonar, respectivamente, associado aos genótipos AG e GG, sugerindo que o reconhecimento do patógeno é prejudicado na doença. Por sua vez, Kobayashi et al. (2011) na Indonésia e Zheng et al. (2011) em uma população da China não encontraram nenhuma associação entre o SNP e a infecção nas populações estudadas.

O receptor DC-SIGN possui um papel importante na função das DCs, as quais tiveram sua ação na infecção pelo *P. brasiliensis* demonstrada por Dos Santos, Ferreira e Almeida (2011). Segundo os autores, as DCs presentes em lesões da pele e mucosa oral de pacientes com PCM atuam de forma eficaz na apresentação de antígenos do *P. brasiliensis*, exercendo um papel importante na resposta imune protetora na doença. Sabe-se ainda que uma grande quantidade de DCs expressando citocinas, que modulam a resposta contra o patógeno, estão presentes ao redor dos granulomas presentes nas lesões da PCM (FORTES et al., 2011). De acordo com Pagliari e Sotto (2003), DCs presentes em granulomas densos expressam níveis mais altos de IFN- γ , ao passo que em granulomas frouxos é observado uma maior quantidade de células expressando IL-5 e IL-10, indicando uma resposta ineficiente contra o fungo nesse tipo de organização.

E avaliando a importância desse receptor no reconhecimento do fungo, Peres da Silva et al. (2015), observaram que carboidratos de vesículas extracelulares, que contribuem para a virulência do *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, são reconhecidos por receptores DC-SIGN, demonstrando seu papel na interação inicial com o patógeno.

Dessa forma, baseado em nossos resultados, alterações na funcionalidade do receptor decorrentes de variações genéticas podem prejudicar a ligação entre a imunidade inata e adquirida mediada pelas DCs e contribuir para uma menor eficiência da atividade do receptor no reconhecimento inicial do fungo e consequentemente levar a um aumento no risco de se desenvolver a PCM, juntamente com lesões orais secundárias.

Para verificar o papel do SNP -336 A>G (rs4804803) na organização da reação granulomatosa na PCM oral, investigamos sua relação com os tipos de granuloma presente nas lesões, porém não encontramos associação entre esse polimorfismo e

as diferentes classificações. Por sua vez, em Dublin, Irlanda, Ryan et al. (2010) analisando histologicamente amostras de biópsia do fígado de pacientes com hepatite C, verificaram que o alelo G está associado a níveis mais altos de fibrose, sugerindo uma maior progressão da doença hepática. Dessa forma, segundo os autores, foi possível associar as variações nesse SNP com a severidade da doença.

Portanto, embora não tenhamos encontrado nenhuma relação entre o -336 A>G (rs4804803) e os padrões de organização granulomatosa, em nosso estudo, esse SNP foi associado a susceptibilidade na doença, indicando que individualmente a expressão diminuída desse receptor exerce uma influência no reconhecimento do fungo, porém não na formação e na definição do tipo de granuloma na resposta inflamatória, a qual pode ser mediada por vários outros tipos celulares e moléculas.

Outro SNP avaliado em nosso trabalho foi o +64978 A>C (rs7975232) no gene *VDR*. Comparando-se as frequências dos genótipos entre os pacientes e os indivíduos controle, observamos diferenças significativas entre as distribuições, destacando-se uma maior frequência do genótipo CC nos indivíduos com PCM oral, sendo observado um aumento do risco de desenvolver a PCM oral de aproximadamente seis vezes nesse genótipo em homozigose ou cerca de três vezes em indivíduos que carregam o alelo C.

De acordo com Alagarasu et al. (2012), nesse SNP a presença do alelo variante C é responsável por prejudicar a ligação do fator de transcrição AML-1a, além de gerar menores níveis de expressão do RNAm, afetando também a expressão do gene, o que prejudicaria a atividade do receptor. Ainda segundo os autores, o alelo C foi observado em menor frequência em pacientes com dengue, quando comparado a indivíduos saudáveis no oeste da Índia, sugerindo que a sinalização defeituosa do *VDR* favorece a expressão de receptores responsáveis pela entrada do patógeno e o aumento da produção de citocinas envolvidas na resposta contra o vírus, devido a ação ineficiente da vitamina D. E segundo Heine et al. (2013), foi observada uma frequência aumentada do alelo C em indivíduos com dermatite atópica, quando comparados a indivíduos saudáveis de uma região da Alemanha, indicando que variações na expressão do *VDR* podem prejudicar a imunidade da pele e promover infecções bacterianas prolongadas que desencadeiam a doença. Por outro lado, na China, Saadi et al. (2009) e na Colômbia Rodriguez et al. (2016) não encontraram associações entre +64978 A>C (rs7975232) no gene *VDR* e a asma e a infecção por *Trypanosoma cruzi*, respectivamente.

Sabe-se que a vitamina D, após a ligação ao VDR, estimula a produção de peptídeos antimicrobianos por células epiteliais e PMN durante infecções bacterianas, fúngicas e virais (FORTES et al., 2011; YAMSHCHIKOV et al., 2009). Dessa forma, com o objetivo de verificar a presença da vitamina D e de catelecidinas em células inflamatórias presentes em lesões orais ocasionados pelo *P. brasiliensis*, Mendonça et al. (2015a), utilizando uma reação de imuno-histoquímica com anticorpos anti-VDR e anti-catelecidina, observaram marcações fracas para o receptor em células gigantes multinucleadas CGM e no citoplasma de macrófagos, observando ainda, que nas amostras com maior quantidade de fungos houve um maior número de células inflamatórias marcadas e a marcação para a catelecidina, apresentou-se intensa em macrófagos. Portanto, foi possível verificar o envolvimento da vitamina D, seu receptor e da catelecidina na resposta imunológica à PCM oral.

Segundo Doss et al. (2010), a catelecidina LL-37 e as defensinas humanas possuem efeitos antimicrobianos e estariam envolvidas na resposta imune no trato respiratório e na mucosa da cavidade oral, atuando na imunidade a diversos patógenos, incluindo fungos. Os autores afirmam que, nesses sítios, alguns tipos de defensinas são produzidas principalmente por células epiteliais, e por sua vez, as catelecidinas são produzidas por neutrófilos recrutados na mucosa, afirmando ainda que a vitamina D desempenha um papel importante na regulação da expressão desses peptídeos.

Além da indução da produção de peptídeos, alguns autores relatam que a vitamina D pode estimular o desenvolvimento de células NKT e Treg e inibir o desenvolvimento de células Th1 e Th17, o que poderia aumentar a susceptibilidade a infecções por microrganismos que dependem deste perfil de resposta ou levar a respostas inflamatórias exacerbadas na sua ausência (BAEKE et al., 2010; JEFFERY et al., 2009; PARISE-FORTES et al., 2000; PRIETL et al., 2013). Algumas doenças granulomatosas estão associadas a distúrbios no metabolismo da vitamina D, embora a formação do granuloma seja dependente de um padrão de resposta Th1 (YANG; CHANG; TSAI, 2000). E frequentemente a resolução dessas doenças são acompanhadas de uma normalização nos níveis de vitamina D (CONRON; YOUNG; BEYNON, 2000)

Desse modo, com a alteração da expressão do gene *VDR* gerada pelo +64978 A>C (rs7975232), funções da vitamina D como o controle de processos inflamatórios pelas células Treg e o estímulo da produção de catelecidinas e

defensinas por células do trato respiratório e da mucosa oral, podem ser prejudicadas, por uma eventual deficiência na ligação do hormônio ao receptor, contribuindo para o desenvolvimento de processos inflamatórios exacerbados e um aumento inicial da disseminação fúngica na PCM oral.

Porém, em nosso estudo o +64978 A>C (rs7975232) não foi associado ao tipo de granuloma, ao contrário de Baur et al. (2012), que observaram aspectos histológicos indicativos de uma progressão mais rápida da fibrose hepática na hepatite C na presença do alelo C, em pacientes da Suíça. E em uma população da Índia, Suneetha et al. (2006), também verificaram uma maior frequência desse alelo em indivíduos com um maior grau de inflamação e fibrose hepática na hepatite B. Portanto, embora o *VDR* tenha um papel importante na resposta inflamatória, incluindo nos granulomas, as alterações nesse gene não são suficientes para definir o tipo de organização granulomatosa em indivíduos com PCM na população analisada em nosso estudo.

Para os SNPs -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1*, -519 G>A no *FcyRIIa* e -308 G>A (rs1800629) no *TNF- α* , não encontramos nenhuma relação com a susceptibilidade à PCM e tampouco ao tipo de granuloma das lesões.

Poucos trabalhos foram publicados sobre o SNP -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1*. Na Bahia, Silva et al., (2010) encontraram correlação desse SNP com o desenvolvimento de sintomas característicos da dengue hemorrágica, como febre alta, hemorragia, falhas circulatórias e baixa contagem de plaquetas. Os autores analisaram 728 SNPs em 56 genes relacionados as vias de modulação de IFNs, verificando que -301 A>G (rs11208534) poderia estar envolvido na resposta celular ao vírus.

Por sua vez, o SNP , -519 G>A no gene *FcyRIIa* foi associado a vários tipos de doenças. Wang et al. (2006), observaram que os genótipos AA e AG nesse SNP estão associados a um risco aumentado no desenvolvimento de linfoma não Hodgkin, em populações de Los Angeles, Detroit e Seattle, EUA. Por outro lado, Sinha et al. (2008), afirma que o genótipo AA está significativamente associado à resistência a malária, sobretudo em áreas não endêmicas da Índia. E Sato et al. (2001), encontraram uma menor frequência do genótipo AA em indivíduos com lupus eritematoso sistêmico no Japão.

Dados semelhantes aos apresentados em nosso trabalho foram publicados por Bozzi et al. (2006), os quais avaliaram a presença do SNP -308 G>A (rs1800629) no

TNF- α , em pacientes com PCM da região de Belo Horizonte. Os autores não encontraram nenhuma relação entre o polimorfismo e alterações nos níveis de produção de *TNF- α* e o risco de desenvolver a doença. Em outros estudos porém, o alelo A foi associado ao aumento do risco de desenvolvimento de asma não alérgica, em uma população mexicana (WU et al., 2007), sepse e morte em pacientes com trauma físico, na Alemanha (MENGES et al., 2008) e a não persistência de sintomas da dengue em pacientes do Espírito Santo (DETTOGNI et al., 2015).

As divergências entre nossos resultados e os obtidos nos estudos desses três SNPs podem ter ocorrido, principalmente, devido aos diferentes *backgrounds* genéticos e a heterogeneidade entre as populações de estudo, além de tamanhos amostrais distintos e possíveis relações com outros SNPs funcionais.

Desse modo, nossos dados demonstram que nas amostras analisadas os SNPs -301 A>G (rs11208534) no gene *JAK1*, -519 G>A no *FcyRIIa* e -308 G>A (rs1800629) no *TNF- α* , não estão associados a susceptibilidade da PCM oral e as diferentes classificações dos granulomas, sendo necessários estudos adicionais para comprovar o efeito desses SNPs na PCM e em características histológicas das lesões.

Por outro lado, o genótipo CC, ou indivíduos que carregam o alelo C, no SNP +64978 A>C (rs7975232) do gene *VDR*, e o genótipo GG no -336 A>G (rs4804803) do gene *DC-SIGN*, foram associados a um aumento do risco para o desenvolvimento da PCM oral, embora não para a definição do tipo de organização histológica dos granulomas. Portanto, nossos dados indicam que as variações derivadas dos SNPs *VDR* (rs7975232) e *DC-SIGN* (rs4804803) estão relacionadas à susceptibilidade da PCM oral no grupo de pacientes analisados. Ainda sendo necessários estudos futuros para confirmar o efeito desses SNPs na doença e na população estudada.

7 CONCLUSÃO

Na população estudada, os genótipos homocigotos GG e CC para os SNPs *DC-SIGN* (rs4804803) e *VDR* (rs7975232), respectivamente, estão associados a susceptibilidade da PCM oral. Para o SNP *VDR* (rs7975232), a presença do alelo C foi associada ao aumento da susceptibilidade da doença. Por outro lado, os SNPs *JAK1* (rs11208534), *FcγRIIa* (rs1801274) e *TNF-α* (rs1800629) não foram associados a PCM oral e não foram encontradas relações entre os SNPs analisados e o tipo de granuloma presente nas lesões.

REFERÊNCIAS

ALAGARASU, K. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with clinical outcomes of dengue virus infection. **Human Immunology**. Nova Iorque, EUA v. 73, n. 11, p. 1194–1199, 2012.

APPLIEDBIOSYSTEMS. **Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Genotyping Experiments**. California, EUA, 2008.

AYRES, M. . et al. **BioEstat. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências médicas**. Belém, PA, 2007.

BAEKE, F. et al. Vitamin D: Modulator of the immune system. **Current Opinion in Pharmacology**. Illinois, EUA v. 10, n. 4, p. 482–496, 2010.

BARBOSA DE PAULO, L. F.; SILVA DE FARIA, L.; FRANCISCO DURIGHETTO, A. Endemic oral paracoccidioidomycosis: Clinical presentation, management, and outcomes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 109–110, 2014.

BARREIRO, L. B. et al. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 2, p. 0230–0235, 2006.

BAUR, K. et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 111) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. **Liver International**, v. 32, n. 4, p. 635–643, 2012.

BIALEK, R. et al. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3190–3, 2000.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–91, 2013.

BOURNAZOS, S. et al. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 2, p. 244–254, 2009.

BOZZI, A. et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. **Human immunology**, v. 67, n. 11, p. 931–9, 2006.

BOZZI, A. et al. Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 212–217, 2009.

BRAZÃO-SILVA, M. T. et al. Paracoccidioidomycosis: A series of 66 patients with oral lesions from an endemic area. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. 189–195, 2011.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.

CALICH, V. L. G. et al. Innate immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 223–236, 2008.

CANO, L. E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800–806, 1998.

CARDOSO, C. C. et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 8, p. 1256–1263, 2011.

CHAPLIN, D. D. Overview of the Immune Response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 9, p. S3-23, 2010.

CHEN, K. et al. JAK1 gene polymorphisms are associated with the outcomes of hepatitis B virus infection, but not with α interferon therapy response in a Han Chinese population. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 16, n. 10, p. 1206–1210, 2012.

CONCETTI, F.; NAPOLIONI, V. Insights into the Role of Fc Gamma Receptors (FcRs) Genetic Variations in Monoclonal Antibody-Based Anti-Cancer Therapy. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 5, p. 197–204, 2010.

CONRON, M.; YOUNG, C.; BEYNON, H. L. Calcium metabolism in sarcoidosis and its clinical implications. **Rheumatology**. Oxford, England, v. 39, n. 7, p. 707–713, 2000.

COSTA, P. N. et al. Frequency of SNP -336A/G in the promoter region of CD209 in a population from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9395–9403, 2015.

DA SILVA, R. C. et al. Association of CD209 and CD209L polymorphisms with tuberculosis infection in a Northeastern Brazilian population. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 8, p. 5449–5457, 2014.

DE ABREU E SILVA, M. À. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis-a literature review. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 189–199, 2013a.

DE ABREU E SILVA, M. À. et al. Interrelationship of clinical, histomorphometric and immunohistochemical features of oral lesions in chronic paracoccidioidomycosis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 42, n. 3, p. 235–242, 2013b.

DE ALMEIDA, S. R. et al. Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cellular immunology**, v. 190, n. 1, p. 68–76, 1998.

DE PAULO; DE FARIA; DURIGHETTO JÚNIOR. Endemic oral paracoccidioidomycosis: Clinical presentation, management, and outcomes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 109 - 110

DE ROSE, V. et al. Fcγ receptor IIA genotype and susceptibility to *P. aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 13, n. 1, p. 96–101, 2005.

DESJARDINS, C. A. et al. Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing Paracoccidioidomycosis. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 10, p. e1002345, 2011.

DETTOGNI, R. S. et al. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. **Human Immunology**, v. 76, n. 10, p. 717–723, 2015.

DOS SANTOS, S. S.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1–8, 2011.

DOSS, M. et al. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. **Journal of**

leukocyte biology, v. 87, n. 1, p. 79–92, 2010.

FELONATO, M. et al. Anti-CD25 Treatment Depletes Treg Cells and Decreases Disease Severity in Susceptible and Resistant Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

FILLER, S. G.; YEAMAN, M. R.; SHEPPARD, D. C. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41 Suppl 3, n. Suppl 3, p. S208–S212, 2005.

FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 516–524, 2011.

GEGEMBAUER, G. et al. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 575–585, 2000.

GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. **Yeast**, v. 33, n. 10, p. 113–128, 2016.

GUNN, B. M.; ALTER, G. Modulating Antibody Functionality in Infectious Disease and Vaccination. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 11, p. 969–982, 2016.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. **Human Immunology**, v. 62, n. 11, p. 1191–1199, 2001.

HEINE, G. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 4, p. 855–858, 2013.

HOLANDA, F. M. C. et al. Polymorphisms on IFNG, IL12B and IL12RB1 genes and paracoccidioidomycosis in the Brazilian population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 245–251, 2016.

JEFFERY, L. E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 Combine to Inhibit T Cell Production of Inflammatory Cytokines and Promote Development of Regulatory T Cells Expressing CTLA-4 and FoxP3. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5458–5467, 2009.

KOBAYASHI, K. et al. Association of CD209 polymorphisms with tuberculosis in an Indonesian population. **Human Immunology**, v. 72, n. 9, p. 741–745, 2011.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 485–517, 2009.

KWOK, P. Y.; CHEN, X. Detection of single nucleotide polymorphisms. **Curr Issues Mol Biol**, v. 5, n. 2, p. 43–60, 2003.

LEE, J. C. et al. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 57–69, 2013.

LI, X.; GIBSON, A. W.; KIMBERLY, R. P. Fc Receptors. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 382, p. 1–25, 2014.

LING, Q. et al. Baseline factors associated with treatment response in patients infected with hepatitis C virus 1b by stratification of IL28B polymorphisms. **Archives of Virology**, v. 160, n. 4, p. 1105–1112, 2015.

LOZANO, V. F. et al. Polymorphism analysis of the CTLA-4 gene in paracoccidioidomycosis patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 220–226, 2011.

MABUNDA, N. et al. Gene polymorphisms in patients with pulmonary tuberculosis from Mozambique. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 1, p. 71–76, 2015.

MAGALHÃES, E. M. D. S. et al. Prevalence of Paracoccidioidomycosis Infection By Intradermal Reaction in Rural Areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 281–285, 2014.

MALKKI, M.; PETERSDORF, E. W. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by 5' nuclease allelic discrimination. **Methods in Molecular Biology**, v. 882, p. 173–182, 2012.

MARQUES, S. A. Paracoccidiodomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 610–615, 2012.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidiodomycosis : acute-subacute clinical form, juvenile type. **An Bras Dermatol.** v. 91, n. 3, p. 384–386, 2016.

MARTINEZ, R. Paracoccidiodomycose: A dimensão do problema de uma doença negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 480, 2010.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidiodomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, p. 11–20, 2015.

MATO GROSSO DO SUL. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Resolução nº 693/SES/MS de 12 de dezembro de 2005. Dispõe sobre a obrigatoriedade de Notificação Compulsória de Doenças e Agravos.** Cuiabá, Mato Grosso do Sul, 2005.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidiodes brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interactions of *Paracoccidiodes brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 237–248, 2008.

MENDONÇA, L. D. S. et al. Avaliação do papel da vitamina d e catelicidina na resposta imune em lesões bucais por *Paracoccidiodes Brasiliensis*. In: I Simpósio Integrado - UNIFAL-MG, 2015. **Resumos**, p. 2502, 2015a.

MENDONÇA, M. S. et al. High interleukin-4 expression and interleukin-4 gene polymorphisms are associated with susceptibility to human paracoccidiodomycosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 781–785, 2015b.

MENGES, T. et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. **Critical care medicine**, v. 36, n. 5, p. 1456–62, e1-6, 2008.

MINAS GERAIS. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Resolução SES nº 1481 de 16 de maio de 2008. Acrescenta agravos estaduais a Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências.** Belo Horizonte,

2008.

NADERI, M. et al. CD209 promoter -336 A/G (rs4804803) polymorphism is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeast Iran. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 3, p. 171–175, 2014.

NASCIMENTO, E. M. et al. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma DNA extraction from paraffin material protocol in order to analyse microssatellites in uterine leiomyoma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 3, p. 253–255, 2003.

NEELA, V. S. K. et al. Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. **Human Immunology**, v. 76, n. 6, p. 402–405, 2015.

NETO, J. M. L. et al. Sequelae lesions in the larynxes of patients with paracoccidioidomycosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, p. 39–43, 2011.

PAGLIARI, C. et al. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, n. 5, p. 263–267, 2011.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **American Journal of Dermatopathology**, v. 25, n. 2, p. 107–112, 2003.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia**, n. Figura 1, p. 274–278, 2005.

PARISE-FORTES, M. R. et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Medical mycology**, v. 38, n. 1, p. 51–60, 2000.

PERENHA-VIANA, M. C. Z. et al. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 4, p. 616–619, 2012.

PERES DA SILVA, R. et al. Extracellular vesicles from Paracoccidioides pathogenic

species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. **Scientific reports**, v. 5, n. August, p. 14213, 2015.

PIKOR, L. A et al. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 49, p. 3–5, 2011.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 375–386, 2005.

POON, A. H. et al. Very important pharmacogene summary for VDR. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 22, n. 10, p. 758–63, 2012.

POPA, C. et al. The role of TNF- in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **The Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 4, p. 751–762, 2007.

PRIETL, B. et al. Vitamin D and immune function. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2502–2521, 2013.

PUSTYLNIKOV, S. et al. Targeting the C-type Lectins-Mediated Host-Pathogen Interactions with Dextran. **J Pharm Pharm Sci**, v. 17, n. 3, p. 371–392, 2014.

QIDWAI, T.; KHAN, F. Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 6, p. 522–547, 2011.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. DO E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 26, n. 2, p. 257–269, 2008.

RESTREPO, A.; TOBON, A.; CANO, L. **Paracoccidioides brasiliensis**. In **Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**, Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). 8. ed. [s.l.] Elsevier: Philadelphia, 2015.

RODRIGUEZ, D. A. L. et al. Evaluation of VDR gene polymorphisms in Trypanosoma cruzi infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 31263, 2016.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **American Journal of**

Epidemiology, v. 169, n. 4, p. 505–514, 2009.

RYAN, E. J. et al. Variant in CD209 promoter is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, v. 71, n. 8, p. 829–832, 2010.

SAADI, A. et al. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study. **BMC medical genetics**, v. 10, p. 71, 2009.

SAINZ, J. et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary aspergillosis infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2012.

SAKUNTABHAI, A. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature genetics**, v. 37, n. 5, p. 507–13, 2005.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 40, n. June 2001, p. 225–242, 2002.

SATO, H. et al. FcγRIIIa polymorphism in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 10, n. 2, p. 97–101, 2001.

SCHORK, N. J.; FALLIN, D.; LANCHBURY, J. S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clin Genet**, v. 58, n. 4, p. 250–264, 2000.

SCHULDT, K. et al. FCGR2A functional genetic variant associated with susceptibility to severe malarial anaemia in Ghanaian children. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 7, p. 471–475, 2010.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE SÃO PAULO. **Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose**. São Paulo, São Paulo, 2008.

SHASTRY, B. S. SNPs : Impact on Gene Function and Phenotype. **Methods Mol Biol**, v. 578, p. 3–22, 2009.

SHERRY, S. T. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic acids**

research, v. 29, n. 1, p. 308–11, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M. A et al. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 1, p. 31–37, 2015.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23–34, 2012.

SILVA, L. K. et al. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 11, p. 1221–1227, 2010.

SINHA, S. et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. **Malaria journal**, v. 7, p. 13, 2008.

SIQUEIRA, I. M. et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). **Medical Mycology**, v. 54, n. 2, p. 177–188, 2016.

SOILLEUX, E. J. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? **Clinical science**. Londres, Inglaterra, v. 104, p. 437–446, 2003.

SOUZA, L. G. et al. Prevalência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs11208534 A/G no gene JAK1 em estudo de caso-controle na cidade de parnaíba - PI. In: III Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste - UFPI. **Resumos**, 2015.

SUNEETHA, P. V. et al. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNFα and TNFα gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 5, p. 856–863, 2006.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2009.

TEIXEIRA, M. M. et al. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

TOMAZETT, P. K. et al. The cell wall of Paracoccidioides brasiliensis: insights from its transcriptome. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 2, p. 309–325, 2005.

UNTEREINER, W. A et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

WANG, L. Y. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with end-stage renal disease and the development of high-turnover renal osteodystrophy in a Chinese population. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 1–8, 2016.

WANG, S. S. et al. Common genetic variants in proinflammatory and other immunoregulatory genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9771–9780, 2006.

WANKE, B.; AIDÉ, M. A. Chapter 6—paracoccidioidomycosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. August, p. 1245–1249, 2009.

WEBBER, L. P. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis diagnosis based on oral lesions. **Contemporary clinical dentistry**, v. 5, n. 2, p. 213–6, 2014.

WÓJTOWICZ, A. et al. Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor- α Increase Susceptibility to Intra-Abdominal Candida Infection in High-Risk Surgical ICU Patients*. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 4, p. e304–e308, 2014.

WU, H. et al. Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 4, p. 616–622, 2007.

YAMAOKA, K. et al. The Janus kinases (Jaks). **Genome biology**, v. 5, n. 12, p. 253, 2004.

YAMSHCHIKOV, A. V et al. VITAMIN D FOR TREATMENT AND PREVENTION OF INFECTIOUS DISEASES: A SYSTEMATIC REVIEW OF RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS. **Endocr Pract**, v. 15, n. 5, p. 438–449, 2009.

YANG, W. C.; CHANG, I. T.; TSAI, B. L. Hypercalcemia in renal transplant patients with tuberculosis. **Transplantation Proceedings**, v. 32, n. 7, p. 1882–1883, 2000.

ZHAO, J. et al. Association of the ACE, GSTM1, IL-6, NOS3, and CYP1A1 polymorphisms with susceptibility of mycoplasma pneumoniae pneumonia in Chinese children. **Medicine**, v. 96, p. 15, 2017.

ZHENG, R. et al. Relationship between polymorphism of DC-SIGN (CD209) gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis in an eastern Chinese population. **Human Immunology**, v. 72, n. 2, p. 183–186, 2011.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estabelecimento da carga fúngica em tecidos parafinados de pacientes portadores de Paracoccidioidomicose por PCR em tempo real

Pesquisador: Luiz Cosme Cotta Malaquias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13074213.8.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 270.652

Data da Relatoria: 10/05/2013

Apresentação do Projeto:

Adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Adequado ao proposto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios, ainda que indiretos, superam os riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é metodologicamente exequível, inclusive dentro do prazo estabelecido pelo cronograma, e pela natureza do material a ser analisado, não apresenta riscos aos cedentes deste.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na folha de rosto, não está preenchido e assinado o campo com a anuência do responsável pela Instituição proponente, autorizando a execução do projeto.

Recomendações:

Sem recomendações diretas. Preencher no campo "Instituição proponente", o Termo de compromisso do responsável pela Instituição. A autorização do responsável técnico do serviço de patologia bucal garante acesso ao material de estudo, não excluindo a assinatura do Termo de compromisso.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 270.652

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado ao proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto adequado ao proposto.

ALFENAS, 13 de Maio de 2013

Assinador por:

Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

ANEXO B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa para as amostras utilizadas no grupo controle.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da Dengue

Pesquisador: Luiz Felipe Leomil Coelho

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

Versão: 2

CAAE: 13387313.0.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 292.311

Data da Relatoria: 03/06/2013

Apresentação do Projeto:

Aborda a investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da Dengue em Minas Gerais. Foco principal nas variações do hospedeiro.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecer a prevalência de fatores de risco sorológicos e genéticos para o desenvolvimento de dengue e suas formas mais graves na população de quatro regiões do estado de Minas Gerais (Centro, Centro-Oeste, Sul e Zona da Mata) e correlacionar os dados obtidos com dados epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: Mínimos inerente a qualquer coleta de sangue. A coleta será feita por profissionais especializados em condições de biosegurança.

Benefícios: Os resultados de testes sorológicos e moleculares poderão ser apresentados aos pacientes, quando poderão ter conhecimento do seu histórico de infecção e resposta imune aos quatro tipo de dengue vírus, bem como da existência de polimorfismos genéticos que

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 292.311

podem

aumentar a predisposição de quadros mais severos de dengue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto muito bem estruturado, inclusive com financiamento já aprovado por agência de fomento (CNPq).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE completo, em duas vias, com endereço/telefone do CEP e pesquisador responsável.

Folha de Rosto adequado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 04 de Junho de 2013

Assinador por:

Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

ANEXO C - Modelo do termo de consentimento assinado por indivíduos do grupo controle



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) no projeto de pesquisa **"Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da Dengue em Minas Gerais"**. Os avanços na área de controle de doenças como a dengue ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo do estudo é investigar se existe associação entre a variação encontrada nas manifestações clínicas da dengue com as variações (mutações) que podem existir no vírus da dengue e em entre os indivíduos (pacientes). Desta forma, esta pesquisa poderá auxiliar no controle da dengue e, futuramente, no tratamento dos pacientes.

Caso você aceite participar desta pesquisa, será necessária a coleta de uma amostra de sangue, feita por equipe devidamente especializada. A sua amostra de sangue será levada ao laboratório e utilizada para o presente estudo que pesquisará anticorpos contra os quatro tipos de vírus da dengue. Também investigará alguns genes que possam estar envolvidos com o desenvolvimento da doença.

Sua participação não é obrigatória. Cabe a você decidir se deseja participar ou não da pesquisa. Não há riscos para sua saúde, e o único desconforto é a picada da agulha. Para participar deste estudo, você não terá nenhum custo, e nem receberá qualquer ajuda financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

_____, ____ de _____ de 20__

Assinatura do (a) participante

Assinatura do (a) pesquisador (a)

Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:
CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UNIFAL-MG: RUA GABRIEL MONTEIRO DA SILVA, 700, PRÉDIO
O - SALA 409-B, TEL: (35) 3299-1318. 15:00-17:00, DIARIAMENTE, NOS DIAS LETIVOS