

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELLEN CHRIS WEINSCHUTZ MENDES

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1*, CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1,
MASP-3 E MAp44 E SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE

CURITIBA

2015

HELLEN CHRIS WEINSCHUTZ MENDES

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1*, CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-1,
MASP-3 E MAP44 E SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Análises Clínicas, Linha de pesquisa Imunogenética da Hanseníase, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara José de Messias-Reason

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Angelica B. Winter Boldt

Curitiba
2015

Mendes, Hellen Chris Weinschutz

Polimorfismos do gene MASP1, concentrações séricas de MASP-1, Masp-3 e Map44 e suscetibilidade à hanseníase / Hellen Cris Weinschutz Mendes – Curitiba, 2015.

105 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Messias-Reason

Coorientadora: Professora Dra. Angelica B. Winter Boldt

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. MASP1. 2. MASP-3. 3. Map44. 4. Serina protease associada a MBL. 5. Complemento. 6. Via das lectinas. 7. Hanseníase. I. Messias-Reason, Iara José. II. Boldt, Angelica B. Winter. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

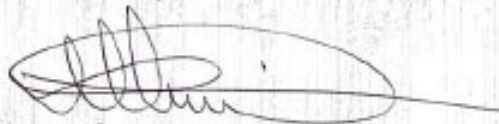
CDD 616.998

TERMO DE APROVAÇÃO

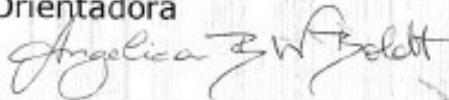
HELLEN CHRIS WEINSCHUTZ MENDES

Título: "Polimorfismos do gene *MASP1*, concentrações séricas de *MASP-1*, *MASP-3* e *MAP44* e susceptibilidade a Hanseníase"

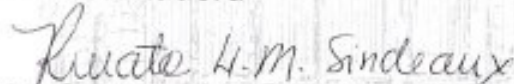
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



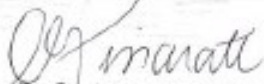
Prof^a. Dr^a. Iara José de Messias Reason
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Angelica Beate Winter Boldt
Co-orientadora



Prof^a. Dr^a. Renata Helena Monteiro Sindeaux
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Pincœrati
Universidade Positivo

Curitiba, 23 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador e Autor da vida de onde provém todo o conhecimento, o amor, a criatividade e a capacidade intelectual. A este Eterno e Vivo Deus, a quem também me refiro como Pai, sou grata pelo dom vida, pelas pessoas que Ele coloca em meu caminho e por todas as portas abertas.

A minha orientadora e professora Dra. Iara Messias-Reason, por ter me aceitado e me acolhido tão bem neste grupo. Por todas as aulas de sistema complemento, pelos importantes *insights* nas reuniões de sextas-feiras, pelos elogios, críticas, ideias, correções e por sempre depositar a sua confiança em mim, sem reservas.

A minha co-orientadora Dra. Angelica Boldt, pela paciência em responder às inúmeras perguntas e e-mails, por também sempre depositar confiança em mim, me ensinando e me motivando com entusiasmo. Por todo o conhecimento de genética a mim transferido, o qual será sempre muito valorizado.

Aos professores Steffen Thiel, Jens C. Jensenius e todo o grupo de pesquisa da Universidade de Aarhus, na Dinamarca. Por terem me recebido e me integrado totalmente ao grupo, fazendo minha estadia de 3 meses neste país, inesquecível, cheia de aprendizado e muito valiosa. Sempre lembrarei deste grupo e da linda Aarhus com muito carinho. *Tak for det!*

Aos professores Shirley Utiyama, Renato Nishihara e Luiza Gremski, pelas ideias, apoio e ensinamentos de imunologia, assim como ao técnico Marcos pela crucial ajuda no preparo de amostras.

A todos os colegas do Laboratório de Imunopatologia e às queridas cientistas, que me acompanharam nesta etapa, em especial a Sandra J. Catarino, por estar sempre pronta a ajudar em inúmeras ocasiões e a Marcia H. Beltrame, por ter me dado dicas preciosas nas árduas otimizações de PCRs. E também a querida amiga que fiz neste Mestrado, Juliana Spezia, pelo

companheirismo e por compartilhar comigo de muitos momentos importantes ao longo desta etapa.

Aos meus pais Wilson e Salete Weinschutz, por serem em grande parte os responsáveis pelo que conquistei aqui e na vida toda, pelo amor incondicional que nunca mediu esforços e por tornar este amor concreto em atitudes, mostrando o quanto acreditam em mim! Por muitas vezes serem o meu porto seguro ao longo desta, e de tantas outras caminhadas.

Enfim, agradeço profundamente ao meu companheiro de jornada que sempre me motivou e acreditou em mim, mostrando a importância que dá aos meus sonhos. A você que sempre me lembra do nosso principal propósito de vida em Deus. Diego meu amor, as minhas conquistas são tão suas quanto minhas e, sem você na minha vida, eu não teria começado e muito menos, terminado este projeto!

“No fim, não importa o quão boa foi nossa performance ou o quão grande é o que conquistamos – uma vida sem coração não vale a pena ser vivida.”

John Eldredge

RESUMO

A hanseníase é causada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*, que infecta principalmente macrófagos e células Schwann do hospedeiro. A lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas (FCNs) reconhecem padrões de açúcares e resíduos acetilados (PAMP), respectivamente, em uma ampla variedade de patógenos, incluindo o *M. leprae*. Este reconhecimento desencadeia a transativação das serina-proteases 1 e 2, associadas a MBL (MASP-1 e MASP-2), e em seguida, a ativação da via das lectinas do sistema complemento. O gene *MASP1* apresenta diversos polimorfismos que estão associados à modulação das concentrações de MASP-1 e de mais duas outras proteínas, resultantes de processamento alternativo do pré-mRNA: MASP-3 e a forma não-enzimática MAp44, ambas envolvidas na regulação negativa do sistema complemento, através da competição pelos sítios de ligação aos PAMP nas moléculas de reconhecimento. Neste estudo, avaliamos possível associação entre polimorfismos do gene *MASP1* e concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44 em 389 indivíduos da população brasileira e 210 da dinamarqueses (segundo grupo controle), assim como com a susceptibilidade à hanseníase em 196 pacientes e 193 controles do Sul do Brasil. As amostras foram genotipadas por PCR sequência-específica multiplex para *g.8113G>A* (rs7609662) e *g.8795C>T* (rs13064994), localizados no intron 01, e *g.61897C>G* (rs72549262), *g.62223C>T* (rs1109452) e *g.62224G>A* (rs850314), localizados no exon 12 do gene *MASP1*. Os níveis séricos das proteínas foram quantificados com ensaio imunofluorimétrico cronometrado (TRIFMA). Pacientes com hanseníase apresentaram concentrações séricas de MASP-3 e MAp44 menores do que controles (medianas: 4603 ng/ml vs. 5606 ng/ml para MASP-3, $p < 0.005$; 1732 vs. 2350 ng/ml para MAp44, $p < 0.0001$). Pacientes com a forma lepromatosa de hanseníase também apresentaram concentrações reduzidas de MASP-3 e MAp44, quando comparados a não-lepromatosos ($P = 0,0016$ e $P < 0,0001$). Houve também uma associação entre a presença do alelo T para o SNP rs1109452 e níveis séricos elevados de MASP-1 e diminuídos de MASP-3 nos três diferentes grupos analisados. O haplótipo GC CCG se associou com a susceptibilidade à hanseníase ($P = 0,028$, $OR = 1,43$ [IC95% = 1,04-1,94]). O haplótipo do exon 12 apresentou associação com os níveis de MASP-3 em controles ($P = 0,012$) e no grupo comparação ($P = 0,0006$), e os genótipos destas variantes também apresentaram associação com níveis de MAp44 em pacientes ($P = 0,023$), e com os níveis de MASP-3 nos controles ($P = 0,024$) e no grupo de dinamarqueses ($P < 0,0001$). Concentrações baixas de MAp44 e MASP-3 em pacientes com hanseníase podem ser decorrentes de polimorfismos no gene *MASP1*. Este efeito pode estar aliado a possível consumo das proteínas no processo da doença e/ou baixa produção das mesmas nesses indivíduos.

Palavras-chave: *MASP1*, MASP-3, MAp44, serina protease associada a MBL, complemento, via das lectinas, hanseníase.

ABSTRACT

Leprosy is caused by the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*, which infects mainly macrophages and Schwann cells of the host. The mannose-binding lectin (MBL) and Ficolins (FCNs) recognize sugar patterns and acetylated molecules (PAMP) respectively in a wide range of pathogens including *M. leprae*. This recognition triggers the transactivation of mannan-binding lectin serine protease 1 and 2 (MASP-1 e MASP-2) followed by the activation of complement system lectin pathway. *MASP1* gene presents several polymorphisms associated to the modulation of MASP-1 concentration as well as two other proteins resulting from alternative processing of pre-mRNA: MASP-3 and the non-enzimatic MAp44, both involved in the down-regulation of complement system by competing for PAMP binding sites at the recognition molecules. Here, we aimed to assess possible associations between *MASP1* gene polymorphisms and the serum levels of MASP-1, MASP-3 and MAp44 in 389 individuals from Brazil and 210 from Denmark (second control group), as well as with susceptibility to Leprosy in 196 patients and 193 control subjects from South Brazil. Samples were genotyped by multiplex sequence-specific PCR for *g.8113G>A* (rs7609662) and *g.8795C>T* (rs13064994) located in intron 01 and *g.61897C>G* (rs72549262), *g.62223C>T* (rs1109452) and *g.62224G>A* (rs850314) located in exon 12 of *MASP1* gene. Protein serum levels were quantified by time-resolved immunofluorometric assays (TRIFMA). Leprosy patients presented lower MASP-3 and MAp44 serum levels (median: 4603 ng/ml vs. 5606 ng/ml for MASP-3, $p<0.005$; 1732 vs. 2350 ng/ml for MAp44, $p<0.0001$). Patients presenting the lepromatous clinical form of Leprosy also showed lower MASP-3 and MAp44 serum levels when compared to non-lepromatous patients ($P=0.0016$ and $P<0.0001$). There was an association between the *T* allele of rs1109452 with higher MASP-1 and lower MASP-3 serum levels in all three groups. The GC CCG haplotype was related to susceptibility to Leprosy ($P=0.028$, OR=1.43 [CI95%=1.04-1.94]). The exon 12 haplotype distribution is associated to MASP-3 levels in controls ($P=0.012$) and Danish ($P=0.0006$), and the genotypes of this variants, also revealed an association with MAp44 levels in patients ($P=0.023$), with MASP-3 levels in controls ($P=0.024$) and MASP-3 levels in the Danish cohort group ($P<0,0001$). Low MASP-3 and MAp44 serum levels in leprosy may be conferred by haplotypes/genotypes of *MASP1* gene in addition to possible protein consumption and/or low production in leprosy patients.

Key-words: *MASP1*, MASP-3, MAp44, MBL-associated serine-protease, complement, lectin pathway, leprosy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de um hansênico na Idade Média.	21
Figura 2. Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873.	22
Figura 3. Cortes histopatológicos mostrando invasão de nervos por <i>M. leprae</i>	24
Figura 4. Manchas na epiderme características do início da hanseníase.	25
Figura 5. Critérios utilizados para diagnóstico.	27
Figura 6. Investimento em pesquisas de doenças tropicais no Brasil(2003-2010)	28
Figura 7. Prevalência da hanseníase no mundo.	29
Figura 8. Coeficiente de detecção de hanseníase por região geográfica no Brasil.	30
Figura 9. A influência de diferentes fatores na infecção e evolução da hanseníase.	33
Figura 10. As três vias de ativação do complemento, proteínas envolvidas e produtos.	35
Figura 11. Representação do complexo de dímeros de MASP e MBL ligando-se a estrutura de carboidratos na superfície de um patógeno.	37
Figura 12. Esquema ilustrando o papel proposto por MBL/MASP-1 na coagulação.	39
Figura 13. Esquema ilustrativo do gene <i>MASP1</i> e das proteínas codificadas..	40
Figura 14. Paciente portador da Síndrome 3MC	44
Figura 15. Plot de desequilíbrio de ligação em <i>MASP1</i>	51
Figura 16. Localização dos SNPs e iniciadores no intron 01.....	52
Figura 17. Localização dos SNPs e iniciadores do exon 12.....	53
Figura 18. Padrão eletroforético da PCR-SSP.	56
Figura 19. Padrão eletroforético da PCR-SSP Multiplex	58
Figura 20. Esquema ilustrativo das etapas do ensaio TRIFMA.....	61
Figura 21. Ativação do complemento e atividade fagocítica.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: SNPs de <i>MASP1</i> já descritos na literatura.	45
Tabela 2. Características dos pacientes de Hanseníase	47
Tabela 3. Características dos controles e comparação com pacientes.....	48
Tabela 4. Frequência alélica dos SNPs do gene <i>MASP1</i> selecionados.....	50
Tabela 5. Sequência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos produzidos. .	54
Tabela 6. Exemplo de interpretação de resultado e atribuição de genótipo	58
Tabela 7. Equilíbrio Hardy-Weinberg dos haplótipos em pacientes	63
Tabela 8. Equilíbrio Hardy-Weinberg dos haplótipos no grupo controle.....	63
Tabela 9. Equilíbrio Hardy-Weinberg nos haplótipos no grupo comparação	64
Tabela 10. Frequências dos alelos das variantes do Intron 01 nos três grupos.	64
Tabela 11. Frequência dos alelos das variantes do Exon 12 nos três grupos..	65
Tabela 12. Diferença na distribuição dos haplótipos do gene <i>MASP1</i> entre pacientes com hanseníase e controles.	66
Tabela 13. Diferença na distribuição dos genótipos de rs72549262 em Pacientes e Controles	83
Tabela 14. SNPs de <i>MASP1</i> estudados até o momento.	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentração sérica de MASP-1 em controles e pacientes	68
Gráfico 2. Concentrações séricas de MASP-1 e formas clínicas de hanseníase	69
Gráfico 3. Concentração sérica de MASP-3 em controles e pacientes	70
Gráfico 4. Concentração sérica de MASP-3 em pacientes com hanseníase lepromatosa	71
Gráfico 5. Concentração sérica de MASP-3 e formas clínicas de hanseníase.	72
Gráfico 6. Concentração sérica de MAp44 em controles e pacientes	73
Gráfico 7. Concentração de MAp44 em pacientes com hanseníase lepromatosa.	74
Gráfico 8. Concentração de MAp44 e formas clínicas da hanseníase.	75
Gráfico 9. Correlação de MASP-3 e MAp44 em controles	77
Gráfico 10. Correlação de MASP-3 e MAp44 em pacientes.....	78
Gráfico 11. Correlação de MASP-3 e MAp44 em dinamarqueses	78
Gráfico 12. Correlação de MASP-1 e MAp44 em pacientes.....	79
Gráfico 13. Correlação de MASP-1 e MAp44 em dinamarqueses	80
Gráfico 14. Correlação de MASP-1 e MASP-3 em dinamarqueses	81
Gráfico 15. Genótipos da variante <i>g.8795C>T</i> e concentrações de MASP-3 nos três grupos	82
Gráfico 16. Concentrações de MAp44 e genótipos da variante <i>g.61897C>G</i> em dinamarqueses.....	84
Gráfico 17. Genótipos da variante <i>g.62223C>T</i> e concentração de MASP-1 nos três grupos	85
Gráfico 18. Genótipos da variante <i>g.62223C>T</i> e concentrações de MASP-3.	86
Gráfico 19. Genótipos da variante <i>g.62224G>A</i> e concentração de MASP-3 ..	87
Gráfico 20. Presença e GC CCG em controles e pacientes.....	90
Gráfico 21. Haplótipos do exon 12 e concentração sérica de MASP-3	91
Gráfico 22. Genótipos das variantes do intron 01 e concentração de MASP-3	92
Gráfico 23. Genótipos de variantes do Exon 12 em controles.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3MC	- Síndromes <u>M</u> alpuech, <u>M</u> ichels e <u>M</u> ingarelli- <u>C</u> arnevale
CCP	- <u>C</u> omplement <u>C</u> ontrol <u>P</u> rotein
CMI	- <u>C</u> ell- <u>m</u> ediated <u>i</u> mmunity
COLEC	- <u>C</u> olectina
CRE	- <u>C</u> entro <u>R</u> egional de <u>E</u> specialidades
CUB	- <u>C</u> omplement <u>C</u> 1r/ <u>C</u> 1s, <u>U</u> egf, <u>B</u> mp1
DNA	- <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
dNTP	- <u>D</u> esoxi <u>n</u> ucleotídeo <u>t</u> ri <u>fos</u> fatado
EDTA	- <u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic <u>a</u> cid
EGF	- <u>E</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
ELISA	- <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
FCN	- <u>F</u> icolina
HC	- <u>H</u> ospital de <u>C</u> línicas
HDSPR	- <u>H</u> ospital de <u>D</u> ermatologia <u>S</u> anitária do <u>P</u> araná
HSA	- <u>H</u> uman <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
IC	- Intervalo de <u>c</u> onfiança
IDH	- Índice de <u>D</u> esenvolvimento <u>H</u> umano
IL	- <u>I</u> nterleucina
MAC	- <u>M</u> embrane <u>A</u> ttack <u>C</u> omplex
Maf	- <u>M</u> inor <u>a</u> llele <u>f</u> requency
MASP	- <u>M</u> annose-binding <u>l</u> ectin- <u>A</u> ssociated <u>S</u> erine <u>P</u> rotease
MAP	- <u>M</u> annose-binding <u>l</u> ectin- <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein
MBL	- <u>M</u> annose- <u>b</u> inding <u>l</u> ectin
MBP	- <u>M</u> annan- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
<i>M. leprae</i>	- <u>M</u> ycobacterium <u>l</u> eprae
mRNA	- <u>M</u> essenger <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
NCBI	- <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> iot <u>e</u> chnology <u>I</u> nformation
OMS	- <u>O</u> rganização <u>M</u> undial da <u>S</u> aúde
OR	- <u>O</u> dds <u>R</u> atio
OxLDL	- <u>O</u> xidized <u>l</u> ow- <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
PACRG	- <u>P</u> arkin <u>c</u> oregulated <u>g</u> ene <u>p</u> rotein

PAMP	- <i><u>P</u>athogen-<u>a</u>ssociated <u>m</u>olecular <u>p</u>attern</i>
PARK	- <i><u>P</u>arkin</i>
pb	- <i><u>P</u>ares de <u>b</u>ases</i>
PCR	- <i><u>P</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
PCR-SSP	- <i><u>P</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction - <u>S</u>equence <u>s</u>pecific <u>P</u>rimer</i>
PQT	- <i><u>P</u>oli-<u>q</u>uimio<u>t</u>erapia</i>
RNA	- <i><u>R</u>ibonucleic <u>a</u>cid</i>
SINAN	- <i><u>S</u>istema de <u>I</u>nformação de <u>A</u>gravos de <u>N</u>otificação</i>
SISA	- <i><u>S</u>istema <u>I</u>ntegrado de <u>S</u>aúde</i>
SNP	- <i><u>S</u>ingle <u>N</u>ucleotide <u>P</u>olymorphism</i>
SP	- <i><u>S</u>erina-<u>p</u>rotease</i>
TRIFMA	- <i><u>T</u>ime-<u>r</u>esolved <u>I</u>mmunofluorometric <u>A</u>ssay</i>
UFPR	- <i><u>U</u>niversidade <u>F</u>ederal do <u>P</u>araná</i>
UTR	- <i><u>U</u>n<u>t</u>ranslated <u>r</u>egion</i>
WHO	- <i><u>W</u>orld <u>h</u>ealth <u>o</u>rganization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Principal	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DA LEITURA	20
3.1 A hanseníase	20
3.1.1 Histórico da doença.....	20
3.1.2 Etiologia	23
3.1.3 Formas clínicas e diagnóstico da doença.	25
3.1.4 Hanseníase: uma doença negligenciada	27
3.1.5 Epidemiologia.....	29
3.1.6 Suscetibilidade genética à hanseníase	31
3.1.7 Estudos com genes e proteínas dos sistema complemento e hanseníase.....	33
3.2 O Sistema Complemento	34
3.2.1 A via das lectinas	36
3.2.2 Proteína MASP-1 e o gene <i>MASP1</i>	38
3.2.3 MASP-3.....	41
3.2.4 MAp44.....	42
3.3 Polimorfismos do gene <i>MASP1</i>	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Casuística	46
4.1.1 Pacientes	46
4.1.2 Grupo Controle.....	48
4.1.3 Grupo de Dinamarqueses	48
4.2 Extração de DNA	49
4.3 Seleção de SNPs de interesse do gene <i>MASP1</i> e desenho de iniciadores	49
4.4 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)	55

4.4.1 PCR-SSP do Exon 12 de <i>MASP1</i>	55
4.4.2 PCR-SSP Multiplex – Intron 01 e Exon 12	56
4.5 Ensaio de quantificação sorológica para Masp-3 e MAp44.	59
4.6 Análise estatística.....	61
5. Resultados E DISCUSSÃO	63
5.1 Polimorfismo do gene <i>MASP1</i>	63
5.2 Concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44.....	66
5.2.1 MASP-1	67
5.2.2 MASP-3.....	70
5.2.3 MAp44.....	72
5.2.4 Correlação entre a concentração das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44.....	77
5.3 Associação das concentrações séricas de MASPs com as variantes do intron 01 rs7609662 e rs13064994 do gene <i>MASP1</i>.....	81
5.4 Associação das concentrações de MASPs com as variantes do exon 12: rs7254262, rs1109452 e rs850314.....	82
5.5 Associação entre haplótipos do gene <i>MASP1</i> e concentrações séricas das proteínas.	89
6 – CONCLUSÕES	94
10. Referências	95
ANEXOS	104
APÊNDICE.....	106

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório dos fagócitos mononucleares e células de Schwann do hospedeiro. O Brasil apresenta a segunda maior prevalência desta doença no mundo, considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença negligenciada. O longo período de incubação apresentado pelo *M. leprae* bem como a gama de manifestações clínicas que se relaciona com a resposta imunológica do infectado proporciona excelente campo de investigação da regulação imunológica em infecções (MONOT et al., 2009).

O sistema complemento é formado por mais de 35 proteínas plasmáticas e de membrana celular. Uma vez ativado, este sistema promove a opsonização e eliminação de patógenos e células alteradas, induzindo uma série de atividades biológicas que constituem um importante mecanismo efetor da imunidade inata e sinalizador da imunidade adaptativa. A via das lectinas é uma das três vias de ativação do sistema complemento. Nesta via, o reconhecimento de padrões de açúcar ou de resíduos acetilados pela lectina ligante de manose (MBL), coletina 11 (COLEC11) ou por um dos três tipos de ficolinas L, M ou H (FCNs), induz uma cascata de reações que culmina com a opsonização e fagocitose e/ou lise da célula-alvo. Para a ativação, é necessário que oligômeros de MBL, COLEC11 ou FCNs formem um complexo com homodímeros das serina proteases MASP-1 e MASP-2. Nesse contexto, MASP-1 ativa MASP-2 e ambas atuam cooperativamente no processo de formação da C3 convertase (DEGN et al., 2012) (KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013)

O gene *MASP1* codifica três diferentes proteínas através da recomposição alternativa do seu pré-mRNA: MASP-1, MASP-3 e a forma truncada MAp44. Recentes evidências tem demonstrado que MAp44 e MASP-3 tem habilidade de inibir a ativação do complemento pela via das lectinas (GABORIAUD et al., 2013) (ROORYCK et al., 2011) (DEGN et al., 2009). Embora *MASP1* apresente polimorfismos com variantes frequentes, grande

parte desses ainda não foram investigados com relação ao seu impacto funcional e associação com doenças.

A interação entre moléculas de superfície do *M. leprae* e os receptores de complemento CR1 e CR3 dos fagócitos foi descrita há mais de 20 anos (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991). Estudos posteriores demonstraram que sonicados da bactéria ligavam MBL (GARRED et al. 1994). Contudo, a resposta do hospedeiro à infecção pelo *M. leprae* é variável, sendo decorrente de fatores genéticos e epigenéticos, próprios de cada indivíduo, além de sua interação com os fatores ambientais aos quais está exposto (ALCAÏS et al., 2005).

Altas concentrações de MBL e baixas concentrações de MASP-2, por exemplo, assim como polimorfismos associados a estes fenótipos, já foram relacionados com a susceptibilidade à doença (DE MESSIAS-REASON et al., 2007) (BOLDT et al., 2013). A MASP-1 também é responsável, juntamente com estas proteínas, pelo combate a diferentes infecções. Porém, o gene *MASP1* tem sido pouco estudado quanto à influência de seus polimorfismos na modulação da concentração e eficiência funcional dos seus produtos proteicos, assim como quanto à sua relação com a susceptibilidade a doenças infecciosas, como a hanseníase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Analisar a possível associação entre a suscetibilidade à hanseníase e às suas diferentes formas clínicas e polimorfismos do gene *MASP1* e concentrações séricas das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44.

2.2 Objetivos específicos

- Definir haplótipos de polimorfismos do gene *MASP1* através de técnica de PCR-SSP
- Estimar a frequência da distribuição de polimorfismos de *MASP1* investigados e de seus respectivos haplótipos em pacientes com hanseníase, controles (doadores de sangue) e em uma população dinamarquesa.
- Verificar relação entre os haplótipos de *MASP1* e as concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44
- Avaliar as concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44 em pacientes com hanseníase e controles
- Investigar possível associação entre haplótipos de *MASP1* e concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44 e a hanseníase e suas diferentes formas clínicas.

3. REVISÃO DA LEITURA

3.1 A hanseníase

A hanseníase, ou Mal de Hansen, também conhecida na antiguidade como lepra (*leprosy* em inglês), é uma doença infecciosa de evolução lenta e crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que infecta macrófagos e células de Schwann do hospedeiro, afetando principalmente o sistema nervoso periférico, mucosas e pele. É considerada a doença mais antiga do mundo e leva este nome em homenagem ao cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen, que a descreveu em 1873.

Os pacientes acometidos pela hanseníase foram marcados por vergonha e desgraça durante todo o percurso da história. Esforços no sentido de eliminar o estigma social da doença tem sido efetivos, sendo que atualmente a poliquimioterapia representa uma importante ferramenta na sua erradicação. Porém segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo após a Índia (WHO – *Weekly epidemiological record*, 2010), e a doença continua com muitas perguntas que ainda não foram respondidas (MEIMA, 2004).

3.1.1 Histórico da doença

Por meio de análises do DNA do *M. leprae*, sugere-se que este bacilo tenha surgido na África, espalhando-se em seguida, para a Ásia e América do Sul (MONOT et al., 2009). De fato, há registros de que esta doença afeta a humanidade há pelo menos 4000 anos, desde o Egito antigo. Sua interpretação como punição diabólica ou divina foi mencionada por Hipócrates e seus seguidores, entre 500 a 400 a.C. O termo “lepra” origina-se do latim “*lepros*”, que significa mancha ou sujeira (SASAKI; TAKESHITA; OKUDA, 2001). A

hanseníase é considerada uma doença milenar com registros desde os tempos bíblicos,

“E aproximou-se dele um leproso que, rogando-lhe, e pondo-se de joelhos diante dele, lhe dizia: Se queres, bem podes limpar-me. E Jesus, movido de grande compaixão, estendeu a mão, e tocou-o, e disse-lhe: Quero, sê limpo. E, tendo lhe dito isto, logo a lepra desapareceu, e ficou limpo.”

Marcos 1: 40-42 (Bíblia, versão: Almeida corrigida e revisada fiel)

Uma das características mais marcantes da hanseníase é o estigma social, resultado das deformidades causadas pela doença e da falta de cura, que por séculos afligiu a humanidade. Por volta do século XII, a alta prevalência de hanseníase no Oriente Médio e na Europa, levou a igreja católica a criar os leprosários para isolamento dos doentes e profilaxia da doença. Nesta época, os pacientes eram obrigados a carregar sinos para anunciar a sua presença (Fig. 1).



9. A LEPER

Figura 1. Representação de um hanseníaco na Idade Média.
Disponível em: http://www.historyfish.net/clay/clay_hospitals_five.html. Acesso em Agosto de 2013.

Em seguida, com a melhoria das condições socioeconômicas da população europeia ocorreu uma redução na endemia da doença. Durante este período (meados do século XVIII), originaram-se os primeiros focos da doença na Ásia e África. Na América do Sul, os primeiros casos de hanseníase surgiram durante o período da colonização, sendo que os primeiros relatos da doença no Brasil datam de 1600 (Brasil/Ministério da Saúde, 2001).

Em 1873, o médico Gerhard H. A. Hansen (Fig. 2) identificou o bacilo *M. leprae* em amostras de seus pacientes, refutando o conceito de que a doença fosse hereditária. Contudo, até cerca de um século atrás, a doença era considerada incurável e havia pouco apoio financeiro à sua investigação. A situação geral da doença melhorou após a disponibilização da dapsona para o tratamento em 1945, todavia sem atrair a atenção de cientistas e médicos.



Figura 2. Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873.
FONTE: (MARMOR M. F., 2002).

Essa situação mudou drasticamente na década de 1960, com uma extraordinária coincidência do pensamento científico e de descobrimentos que levou a uma "idade de ouro" na investigação da hanseníase. Em um capítulo sobre "O Espectro Imunopatológico da Hanseníase", Olaf Skinsnes (1964) apresentou a primeira formulação completa do que é considerado, ainda hoje,

o conceito básico de compreensão da doença, ou seja: que a diversidade clínica, patológica e microbiológica, é o resultado da diversidade da imunidade celular ao *M. leprae* (MATSUO, 2005). Outro passo importante foi dado quando Ridley e Jopling (1966) publicaram o sistema de classificação da doença, baseado na clínica e em achados histopatológicos, e coerente com a base teórica de Skinsnes . Alguns anos mais tarde, observou-se que o *M. leprae* passou a desenvolver resistência a dapsona. Este fato levou a OMS, em 1982, a recomendar a poliquimioterapia (PQT), combinando rifampicina, dapsona, clofazimina, ofloxacina e minociclina, dependendo da forma clínica e do estágio da doença.

3.1.2 Etiologia

O *M. leprae* é um bacilo aeróbio em forma de bastonete, envolto por uma camada de lipídios, ácido micólico e polissacarídeos característicos de micobactérias, encontrado principalmente em países tropicais. Por ser uma micobactéria intracelular obrigatória que carece de muitos genes necessários para a sobrevivência independente, seu cultivo em meio de cultura é inviável, porém pode ser obtido após inoculação em animais, especificamente camundongos e tatus *Daspus novemcinctus* (McMURRAY, D. N., 1996). A parede celular complexa torna difícil a destruição de bactérias deste gênero, fato também relacionado a sua lenta replicação.

Apesar da forma exata de transmissão do bacilo ainda ser incerta, acredita-se que esta se faz por gotículas de saliva e secreções nasais. A quantidade de bacilos contidos em lesões na mucosa nasal varia de dez mil a dez milhões (CHARLES; SHEPARD, 1960). Alguns autores acreditam que a doença também pode ser transmitida a humanos pelo tatu (TRUMAN et al., 2011) (MEYERS; WALSH, 1986). O contato constante de uma pessoa sadia com uma infectada pelo *M. leprae*, pode aumentar as chances de contrair a doença, principalmente quando se trata de indivíduos que compartilham a mesma com infectados. Além disso, o contato constante com o bacilo pode

determinar a gravidade e a forma da doença que o indivíduo pode vir a desenvolver (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

A exata via de transmissão do *M. leprae* ainda não foi completamente descrita. Rees e McDougall (1977) obtiveram sucesso na transmissão experimental com aerossóis contendo *M. leprae* em camundongos imunossuprimidos, o que sugere uma possibilidade semelhante em seres humanos (MCDUGALL; REES, 1977). Resultados promissores foram também relatados em experiências com ratos, através da introdução do *M. leprae* pela cavidade nasal. Em resumo, a entrada pela via respiratória parece ser a rota mais provável, embora outras vias, como a da pele lesionada, não devem ser excluídas.

O *M. leprae* infecta macrófagos e as células de Schwann, que formam a mielina dos nervos periféricos (Fig. 3). O tempo de incubação após a infecção com *M. leprae* varia de 2 a 7 anos, sendo algumas vezes ainda mais longo. Devido ao acometimento dos nervos, um dos primeiros sintomas da doença é a supressão da sensação térmica, ou seja, a incapacidade de diferenciar entre o frio e quente no local afetado. Mais tardiamente, a lesão pode causar diminuição da sensação de dor no local (ARAÚJO M. G., 2005).

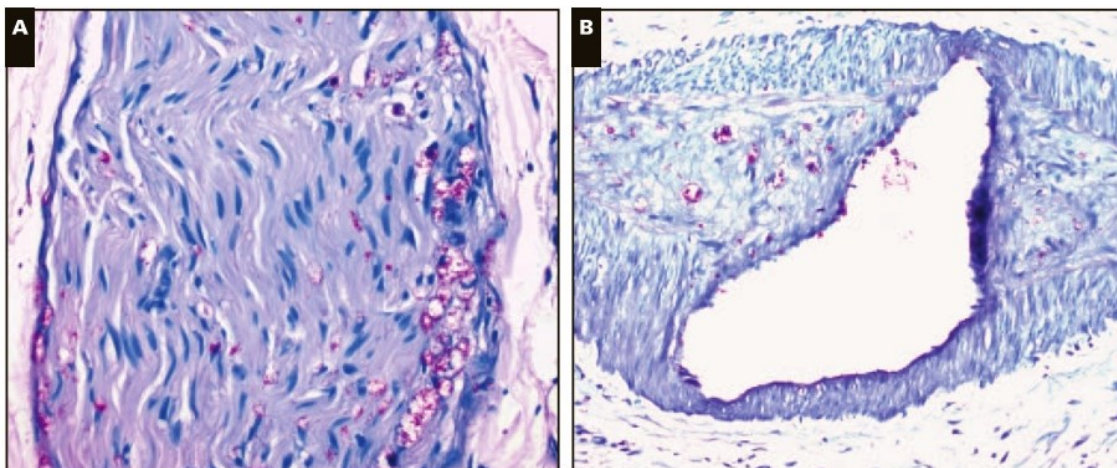


Figura 3. Cortes histopatológicos mostrando invasão de nervos por *M. leprae*. (*Mycobacterium leprae* em coloração vermelha) Fonte: (HAN et al., 2008)

3.1.3 Formas clínicas e diagnóstico da doença.

Segundo Ridley e Jopling (1966), a hanseníase é classificada de forma espectral e dividida em dois principais grupos, tuberculoide e lepromatosa (também denominada virchowiana), constando entre elas a forma interpolar dimorfa (ou borderline), baseadas num espectro de resistência do hospedeiro (ARAÚJO M. G., 2005).

A hanseníase indeterminada é a forma inicial da doença, e consiste na maioria dos casos em manchas de coloração mais clara (Fig. 4), podendo ser discretamente avermelhada, com alteração de sensibilidade à temperatura e, em alguns casos, diminuição da sudorese. A partir do estado inicial, a doença pode permanecer estável na maior parte dos casos, ou pode evoluir para as formas tuberculoide ou lepromatosa, dependendo do tipo de resposta imune, da predisposição genética e de fatores ambientais. Em alguns casos, a doença pode adotar vários cursos intermediários entre estes dois tipos principais, sendo, então, denominada hanseníase dimorfa ou borderline (Ministério da Saúde, 2009).



Figura 4. Manchas na epiderme características do início da hanseníase. (Forma indeterminada)

FONTE: WHO – Guia para eliminação de Hanseníase, 2000.

Segundo a OMS, a hanseníase virchowiana (ou lepromatosa) é a forma multibacilar (caracterizada por mais de cinco manchas pelo corpo), sendo encontrada em pacientes com pouca ou nenhuma resistência imunológica ao

M. leprae. Pacientes que desenvolvem esta forma da doença apresentam baixa imunidade mediada por células, sendo que as citocinas mais presentes (interleucinas IL-4, -5 e -10) caracterizam uma resposta do tipo Th2 (ALTER et al., 2011). Em tais casos os macrófagos, as próprias células de defesa que se destinam a destruir o bacilo através de fagocitose, tornam-se ambiente propício para o bacilo, desempenhando o papel de hospedeiro, permitindo sua multiplicação enquanto o transporta pela corrente sanguínea. A evolução crônica da hanseníase virchowiana caracteriza-se pela infiltração progressiva e difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo afetar, ainda, linfonodos, fígado e baço.

Já a forma clínica tuberculoide ocorre em pacientes com resposta celular eficiente contra o bacilo. Dessa forma, o sistema imune contém a disseminação do bacilo pela formação de granulomas, sendo a resposta celular do tipo Th1 (MISCH et al., 2010). De fato RNAm de citocinas associadas a resposta Th1 (IL-2 e IFN- γ) estão presentes em lesões de pacientes com a forma tuberculoide da doença (DOCKRELL et al., 1996). Nessa forma de hanseníase, as manchas são bem delimitadas e assimétricas, e geralmente são encontradas apenas poucas lesões no corpo (< cinco).

O Ministério da Saúde do Brasil adotou a classificação de Ridley e Jopling e propôs uma sinopse baseada principalmente na aparência das lesões, na sensibilidade da pele do paciente e nas características baciloscópicas, com o intuito de facilitar o diagnóstico da doença (Fig. 5). As diferentes formas de hanseníase se dividem em paucibacilar com ausência ou poucos bacilos, ou multibacilar, com muitos bacilos disseminados de tamanhos e aspectos variados.

Características			
Clínicas	Baciloscópicas	Formas clínicas	Classificação operacional vigente para a rede pública
Áreas de hipo ou anestesia, parestesias, manchas hipocrômicas e/ou eritemohipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pêlos	Negativa	Indeterminada (HI)	Paucibacilar (PB)
Placas eritematosas, eritemato-hipocrômicas, até 5 lesões de pele bem delimitadas, hipo ou anestésicas, podendo ocorrer comprometimento de nervos	Negativa	Tuberculóide (HT)	
Lesões pré-foveolares (eritematosas planas com o centro claro). Lesões foveolares (eritematopigmentares de tonalidade ferruginosa ou pardacenta), apresentando alterações de sensibilidade	Positiva (bacilos e globias ou com raros bacilos) ou negativa	Dimorfa (HD)	Multibacilar (MB) mais de 5 lesões
Eritema e infiltração difusos, placas eritematosas de pele, infiltradas e de bordas mal definidas, tubérculos e nódulos, madarose, lesões das mucosas, com alteração de sensibilidade	Positiva (bacilos abundantes e globias)	Virchowiana (HV)	

Figura 5. Critérios utilizados para diagnóstico.

Tabela utilizada para fins diagnósticos, baseada nas características apresentadas pelo paciente.

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/MS (2009)

3.1.4 Hanseníase: uma doença negligenciada

Doenças negligenciadas representam um grupo de infecções endêmicas em populações de baixa renda, habitando regiões subdesenvolvidas e em desenvolvimento nos continentes asiático, africano e americano. De acordo com o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos, *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) estas doenças são parcialmente ignoradas pelas grandes indústrias farmacêuticas, programas de saúde pública (Fig. 7), iniciativas governamentais e mídia. A OMS lista 17 doenças como negligenciadas, incluindo a leishmaniose, doença de Chagas, cisticercose e hanseníase, as quais são responsáveis por um grande número de óbitos e sequelas, que afligem aqueles que moram nas áreas mais atingidas (HOTEZ, 2007).



Figura 6. Investimento em pesquisas de doenças tropicais no Brasil (2003-2010)

Fonte: Ministério da Saúde, disponível em http://www.sbmt.org.br/site/corpo_texto/123#.Uh4PidKkqxW, acesso em Agosto/2013.

Existe uma clara relação entre o grau de pobreza e a incidência das doenças consideradas negligenciadas. Os países com os menores IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) são, também, os que possuem maior número de casos com estas doenças (LINDOSO *et al.*, 2009). Entre eles está o Brasil, que, mesmo tendo mostrando um importante crescimento econômico nos últimos anos, ainda detém a 85ª posição no ranking de IDH (UNDP – *United Nations Development Programme*, 2012) e apresenta endemia de muitas doenças, incluindo a hanseníase. Portanto, as doenças negligenciadas representam um peso substancial para a saúde pública nos países em desenvolvimento e respondem por 11,4% da carga global de doenças. Lamentavelmente apenas 1% dos 1.393 novos medicamentos comercializados entre 1975 e 1999 foram desenvolvidos para tratamento das doenças negligenciadas (TROUILLER *et al.*, 2002).

Mesmo apresentando considerável número de novos casos, a hanseníase apresenta uma baixa incidência, comparada com outras doenças tropicais negligenciadas. Programas para diagnósticos e tratamento de hanseníase precisam ser integrados com outros serviços de forma rentável e

sustentável. Em muitos países, os serviços de controle da hanseníase são combinados com os serviços de tuberculose ou serviços de dermatologia, ou ainda, integrados em cuidados de saúde primários, enquanto outros ainda lidam com a dificuldade do diagnóstico e tratamento precoce (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Recentes notícias, no entanto, revelaram no município de Sinop no Mato Grosso (uma das regiões híper-endêmicas da hanseníase), uma queda significativa no número de novos casos, devido a uma campanha de combate a doença (<http://www.sonoticias.com.br/noticia/saude/sinop-secretaria-aponta-reducao-no-numero-de-novos-casos-de-hanseniase>).

3.1.5 Epidemiologia

Indivíduos ao redor de todo o mundo podem ser afetados pela hanseníase. No entanto, a doença é mais comum em áreas quentes e úmidas, sendo que a grande maioria dos casos se concentra em seis países: Índia, Indonésia, Myanmar, Nigéria, Brasil e Sudão (Fig. 8).

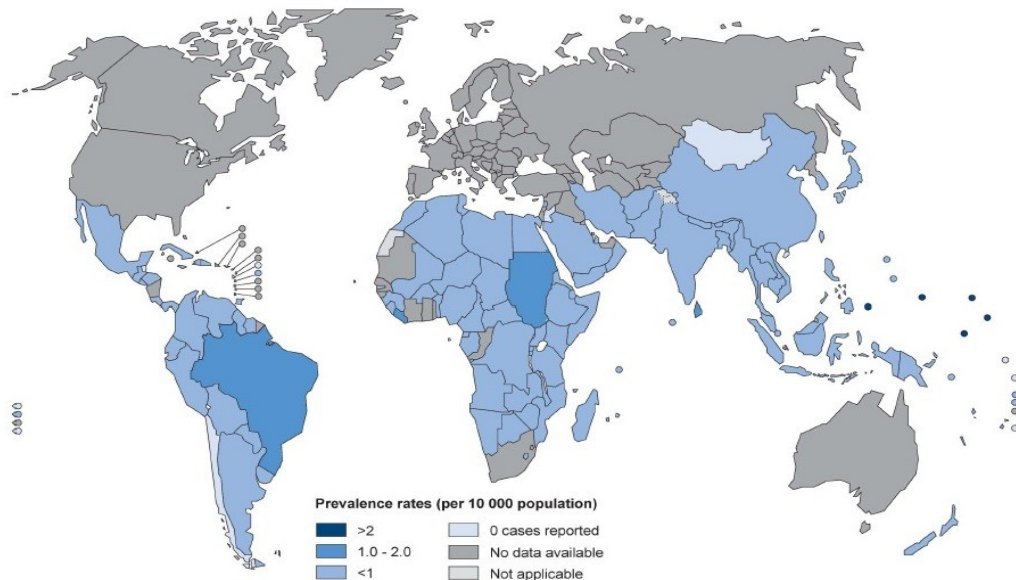


Figura 7. Prevalência da hanseníase no mundo.
FONTE: World Health Organization (WHO, 2011)

Embora o Brasil tenha mostrado um declínio na taxa de novos casos (Fig. 9), o país ainda ocupa o segundo lugar no mundo na prevalência de hanseníase. A Índia reporta o maior número de casos (133 717), seguida do Brasil (37 610) e Indonésia (17 260) e estima-se que cerca de 81% de todos os novos casos ocorra nestes três países, onde a doença é considerada endêmica (ref do boletim OMS).



Figura 8. Coeficiente de detecção de hanseníase por região geográfica no Brasil.
 FONTE: Sinam/SVS-MS, 2011.

No ano de 1991, a OMS estabeleceu a meta de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública até o ano de 2000 (Boletim da OMS 2005). Esta eliminação foi definida então como o alcance de uma prevalência de < 1:10.000 habitantes. O programa de eliminação de fato teve êxito na distribuição da poliquimioterapia eficaz porém, a campanha de eliminação deixou a desejar em aspectos como o planejamento para enfrentar os desafios futuros da hanseníase, a prioridade dada à doença no financiamento de pesquisas e a interação entre os vários serviços de atenção ao paciente (LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005). Além disso, o coeficiente de detecção de

casos novos não foi reduzido satisfatoriamente nos países com maior incidência de hanseníase, como é o caso do Brasil, assim como da Índia. Isso sugere que a transmissão não foi controlada adequadamente somente com antibióticos, e que a doença continua, de fato, a ser um problema de saúde pública (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

A vacina Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) contra a tuberculose é recomendada pelo programa estendido da OMS a todos recém-nascidos (<http://www.who.int/immunization/diseases/tuberculosis/en/>) e principalmente para a proteção de pessoas que coabitam com pacientes de hanseníase (CUNHA et al., 2004). No entanto, este é um assunto controverso e resultados de uma meta-análise indicaram que a vacina BCG confere uma proteção de aproximadamente 26% (95% [IC 14-37%]), sendo esta ainda mais deficiente para as formas paucibacilares da doença (SETIA et al., 2006).

3.1.6 Suscetibilidade genética à hanseníase

Estima-se que aproximadamente 95% das pessoas sejam naturalmente resistentes à hanseníase. Contudo, a resposta imune à infecção pelo *M. leprae* é heterogênea (ALCAÏS et al., 2005), sendo afetada por fatores ambientais e genéticos, próprios de cada indivíduo. Os fatores não genéticos que podem influenciar na progressão da doença incluem: hormônios sexuais, idade, exposição ao agente etiológico e estado imunológico. Segundo WALLACE C. et al (2003), em muitas populações africanas, a hanseníase é mais comum em mulheres do que em homens, já a hanseníase lepromatosa é mais frequente em homens. A exposição frequente, como o compartilhamento de residência, também aumentam as chances de desenvolvimento da doença.

Além disso, a diversidade genômica limitada de isolados de *M. leprae* tem levado a sugerir que fatores intrínsecos da micobactéria não tenham um papel relevante na definição do espectro clínico da doença (CASANOVA; ABEL, 2002). Já evidências sugerem que variantes genéticas do hospedeiro desempenham um papel fundamental na expressão clínica da doença (SAUER et al., 2015) (WALLACE; CLAYTON; FINE, 2003) (Fig. 6). Análises de

segregação realizadas com o objetivo de estabelecer o modelo de herança de uma determinada característica, demonstraram que a suscetibilidade à hanseníase apresenta de fato um componente genético significativo (ALCAÏS et al., 2005). Em uma destas análises nas ilhas Désirade, Antilhas Francesas, encontrou-se evidência de que um gene recessivo ou codominante aumenta a susceptibilidade à hanseníase *per se* (predisposição a desenvolver a doença, independentemente da forma clínica) (ABEL; DEMENAI, 1988). Em outro trabalho realizado com famílias de uma população do estado de Amazonas, com grande número de infectados por *M. leprae*, análises de segregação independente detectaram a existência de um gene controlando a susceptibilidade a hanseníase *per se*, herdada através de um modelo de codominância com a frequência do alelo de pré-disposição estimada de 0,22 (LÁZARO et al., 2010).

Em trabalhos realizados com pacientes vietnamitas e brasileiros observou-se que variantes na região reguladora dos genes *PARK2* (que codifica uma proteína ubiquitina ligase E3, denominada parkina) e *PACRG* (gene co-regulado com parkina), representam fatores de risco à hanseníase (MIRA et al., 2004). Estudos genéticos tem demonstrado uma possível relação da hanseníase com a doença de Crohn. Especula-se que a proteína NOD2 e a proteína quinase RIPK2 iniciam um processo de sinalização que envolve ubiquitinação através de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF) e que seja possível a participação de parkina neste processo (SAUER et al., 2015). Vários estudos de ligação e associação demonstraram também o envolvimento de alelos e haplótipos do complexo HLA, em particular, HLA-DR2 e HLA-DR3, ambos de classe HLA II, como importantes fatores de risco genético para susceptibilidade a subtipos da hanseníase (MIRA et al., 2003). Os autores sugerem ainda que são necessários muitos estudos neste campo para desvendar melhor a herdabilidade em hanseníase.

Outro estudo revelou uma forte associação entre uma variante na região promotora do gene *TNFA* e hanseníase em uma população brasileira, e esta associação parece estar restrita a indivíduos brasileiros (CARDOSO et al., 2011). Mutações genéticas raras que causam susceptibilidade a infecções com micobactérias foram encontradas também em genes que codificam citocinas como o IFN γ (interferon gama) e a IL12 (interleucina 12) (WANG et al., 2010).

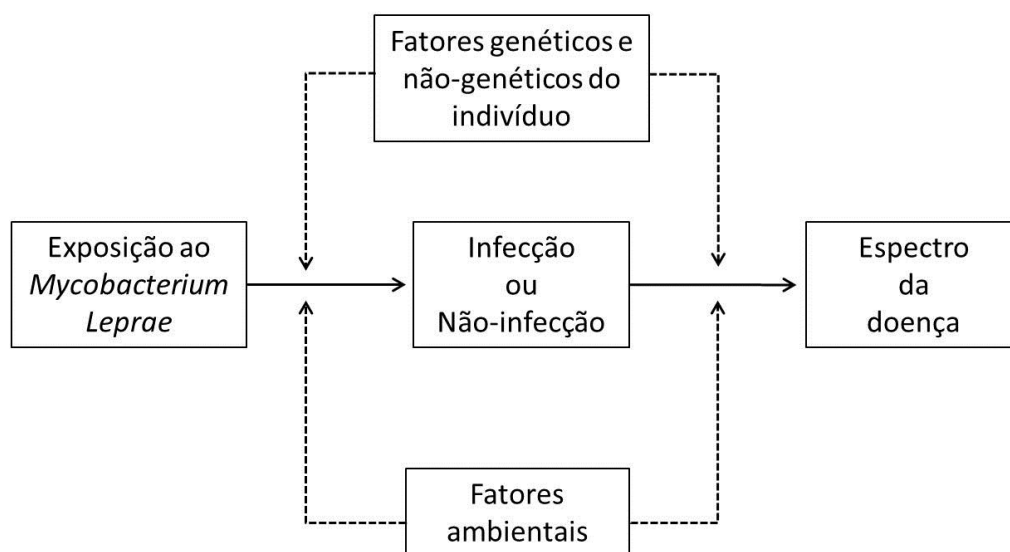


Figura 9. A influência de diferentes fatores na infecção e evolução da hanseníase. FONTE: Adaptado de WALLACE C., 2003.

3.1.7 Estudos com genes e proteínas dos sistema complemento e hanseníase.

Diferentes estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital das Clínicas, onde grande parte deste projeto foi desenvolvido, tem demonstrado associação de certos polimorfismos de genes do sistema complemento com a hanseníase. Através de PCR-SSP multiplex, 11 polimorfismos do gene *MASP2* foram haplotipados nos mesmos indivíduos dos três grupos utilizados neste presente estudo, pacientes de hanseníase, controles brasileiros e dinamarqueses. Boldt et al.(2013), observaram que baixas concentrações da proteína MASP-2 e alguns dos polimorfismos associados, aumentaram a susceptibilidade a hanseníase e sua forma virchowiana, em particular (BOLDT et al., 2013).

Ainda estudos dos polimorfismos na região promotora e do exon 1 do gene *MBL2* demonstraram que polimorfismos de *MBL2* possuem um papel na susceptibilidade a hanseníase e suas diferentes formas clínicas (MESSIAS-REASON et al., 2007). Dornelles et al., (2006), observaram uma associação

negativa entre níveis reduzidos de MBL e a forma lepromatosa da doença e (DORNELLES; PEREIRA-FERRARI; MESSIAS-REASON, 2006).

Além das associações encontradas com MASP-2 e MBL, polimorfismos da região promotora e do exon 8 do gene *FCN2*, que codifica a proteína Ficolina-2, também foram analisados na hanseníase. A distribuição de haplótipos funcionais de *FCN2* entre pacientes e controles apresentou diferença significativa, sugerindo da mesma forma um possível papel da Ficolina-2 na resposta do hospedeiro a infecção com o *M.leprae* (DE MESSIAS- REASON; KREMSNER; KUN, 2009).

3.2 O Sistema Complemento

O complemento foi descrito no final do século XIX como um componente termo-sensível do plasma normal, que aumentava a opsonização e eliminação de bactérias e células infectadas. De certo modo, esta atividade complementava a atividade antibacteriana de um anticorpo, justificando o uso do termo “complemento” por *Paul Ehrlich*, nessa mesma época. Por volta de 1930, *Jackie Stanley* observou o importante efeito opsonizante de C3b (JANEWAY C.A. et al., 2002). Além disso, por meio de muitos estudos recentes, têm-se demonstrado múltiplas funções deste sistema que vão além daquelas descritas inicialmente.

O complemento é composto por aproximadamente 35 proteínas plasmáticas e de membrana celular. Estas interagem entre si, induzindo uma série de respostas biológicas na imunidade inata, que consiste na primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores. Ainda na fase precoce de uma infecção, o sistema complemento pode ser ativado por três vias: a clássica, a alternativa e a das lectinas (Fig. 10). Cada uma destas vias difere nos padrões de reconhecimento do patógeno e tem, como objetivo final, eliminar o patógeno invasor através da opsonização, formação do complexo de ataque a membrana (MAC) e ativação do processo inflamatório.

A via clássica inicia-se pela ligação do complexo de C1 (que consiste de moléculas de C1q, C1r e C1s) através de sua molécula de reconhecimento C1q

homodímeros de serina-proteases associadas a MBL-1 e 2 (MASP-1 e MASP - 2, respectivamente), a vários grupos de hidratos de carbono ou acetilados sobre a superfície de patógenos (PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos). Como C1s, MASP-2 induz a formação da C3 convertase, C4b2a, porém sua ativação é dependente de MASP-1. MASP-1 também cliva C2 e C3.

A ativação da via alternativa depende de baixo grau de hidrólise espontânea de C3 no plasma que leva à formação de C3b. Este C3b liga o Fator B (homólogo a C2) para formar o complexo C3bB. A clivagem do Fator B pelo Fator D forma a convertase da via alternativa C3, C3bBb. A properdina estabiliza este complexo. A C3 convertase cliva C3 em fragmentos C3b, que se ligam covalentemente ao lado do local de ativação do complemento (levando a opsonização). Esse processo amplifica a cascata e promove a fagocitose, bem como a resposta inflamatória e da imunidade adaptativa. Além disso, há a formação da C5 convertase que leva a clivagem de C5 em C5a e C5b e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). A C5a atua como uma potente anafilotoxina e C5b forma um complexo com C6 e C7, o qual é inserido na membrana celular. Posteriormente, moléculas de C8 e 10-18 moléculas de C9 ligam-se a este complexo, resultando em um MAC totalmente funcional (C5b-9). As três vias convergem para esta via terminal comum, culminando com a lise celular e morte (ABBAS, AK; Lichtman, AH; PILLAI, 2008).

3.2.1 A via das lectinas

A via das lectinas iniciada por MBL, COLEC11 ou FCNs através da ligação a padrões de manose ou de outros açúcares ou ainda a resíduos acetilados (no caso de ficolinas), leva à ativação das serina proteases associadas a MBL (MASPs) 1 e 2. Estas clivam C4 e C2, desencadeando a cascata do complemento (JANEWAY, 2002) (Fig. 11), conforme descrito no item anterior.

As MASPs tem revelado importante papel na opsonização após a formação de complexos com ficolina-L (TENNER et al., 1995). Estudos realizados em modelo animal, tem sugerido um importante papel da forma ativa

de MASP-3 na via alternativa (IWAKI et al., 2011). Iwaki et al sugerem que a MASP-3 está envolvida na opsonização de bactérias via deposição de C3, e propõem também que tanto MASP-1 como MASP-3 são essenciais nos processos de fagocitose e eliminação de patógenos.

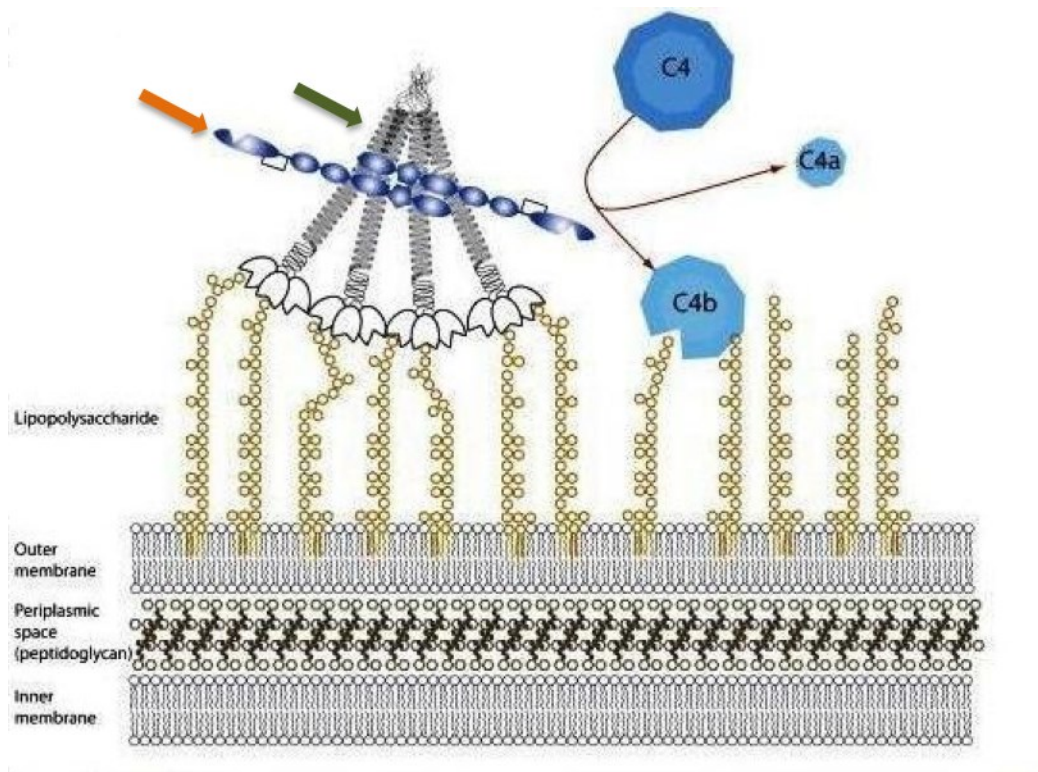


Figura 11. Representação do complexo de dímeros de MASP e MBL ligando-se a estrutura de carboidratos na superfície de um patógeno.

LEGENDA: A flecha verde indica um oligômero de MBL e a flecha laranja indica um dímero de MASPs.

FONTE: DEGN et al., 2009.

Por se tratarem de moléculas liotrópicas (um único gene controlando diversas características do fenótipo, muitas vezes não relacionadas), a deficiência das moléculas de reconhecimento da via das lectinas, assim como das MASPs podem ter um impacto em diferentes aspectos da resposta imune, incluindo a resposta adaptativa, e aumentar a susceptibilidade à infecções e à doenças autoimunes. Uma concentração inferior a 100 ng/mL de MBL no plasma em humanos, por exemplo, tem sido relacionada à formação de oligômeros incapazes de ativar o complemento. Esta baixa concentração está associada a polimorfismos genéticos comuns na maioria das populações

humanas (KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013). Estes SNPs têm sido relacionados com a suscetibilidade e gravidade de diversas enfermidades, incluindo a hanseníase e malária (DE MESSIAS-REASON et al., 2007) (BOLDT et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram associação de polimorfismos do gene *MASP2* com hepatite pelo vírus C, doença de Chagas, febre reumática e hanseníase (BELTRAME et al., 2014) (CATARINO et al., 2014) (BOLDT; LUZ; MESSIAS-REASON, 2011). Concentrações séricas de MBL também foram sugeridos como marcadores de susceptibilidade à artrite reumatoide (GOELDNER et al., 2014). Por fim, polimorfismos e haplótipos associados à regulação das concentrações plasmáticas das ficolinas L e M também se mostraram associadas com a susceptibilidade à hanseníase (DE MESSIAS- REASON; KREMSNER; KUN, 2009).

3.2.2 Proteína MASP-1 e o gene *MASP1*

No início dos anos 90, MASP-1 foi identificada como uma serina protease de 100 kDa denominada de P100, com semelhanças estruturais a C1s, compondo um fator bactericida reagente à linhagem Ra de *Salmonella typhimurium* (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011). A MASP-1 é sintetizada principalmente no fígado e sua expressão é aumentada em resposta à IL-6 durante a resposta de fase aguda. Está presente no soro humano em uma média de 4.000 – 30.000 ng/mL, sendo a serina protease que apresenta maior abundância no sangue (SALLENBACH et al., 2011).

Após a identificação de MASP-2 em 1997 (THIEL S. et al., 1997) e da sua capacidade de auto-ativação, clivando C2 e C4 e gerando a C3 convertase, acreditou-se que MASP-1 possuía apenas um papel auxiliar na ativação da via das lectinas (AMBRUS et al., 2003) (MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2000). Porém, o fato de MASP-1 apresentar uma concentração até dez vezes maior que MASP-2, gerava questionamentos sobre seu verdadeiro papel na via das lectinas.

Em modelo experimental com camundongos deficientes de MASP-1 e MASP-3 observou-se atividade significativamente menor de deposição de C3 e C4, a qual foi restaurada com a adição de MASP-1 recombinante (TAKAHASHI et al., 2008). Estudos subsequentes demonstraram ausência de ativação da via das lectinas no soro de um indivíduo geneticamente deficiente em MASP-1, sendo a mesma restaurada após adição de proteína MASP-1 recombinante (THIEL et al., 2012). Simultaneamente, Héja D. *et al* (2012) observaram que a inibição de MASP-1 bloqueava a ativação da via das lectinas, e que MASP-1 era responsável pela produção de 60% do fragmento C2a da C3 convertase (HÉJA et al., 2012). Esses trabalhos reforçaram o papel crucial de MASP-1 no sistema complemento, pois além de realizar auto-ativação, MASP-1 ativa MASP-2 com vinte vezes mais eficácia do que a MASP-2 ativa o seu próprio zimogênio (HÉJA et al., 2012).

Além de seu papel crucial na ativação do complemento pela via das lectinas, MASP-1 está envolvida na ativação da cascata de coagulação (Fig. 13) (DOBÓ et al., 2014). De fato, alguns fatores da cascata da coagulação são potenciais substratos de MASP-1, incluindo fibrinogênio, protrombina, fator XIII e inibidor da fibrinolise ativado pela trombina (TAFI). Esse papel representa uma importante relação entre os sistemas de coagulação sanguínea e do complemento.

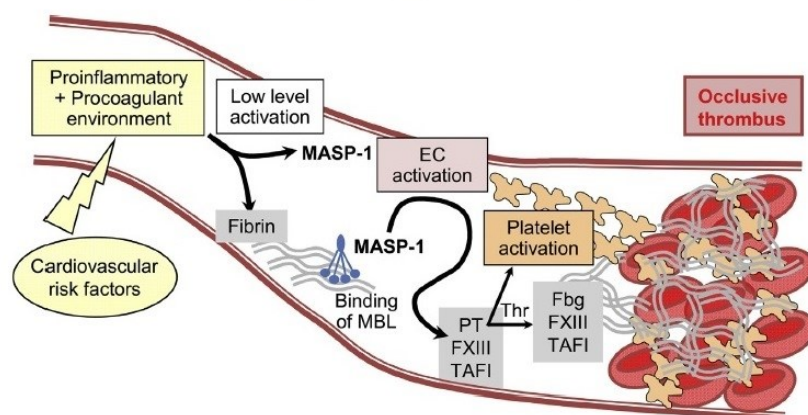


Figura 12. Esquema ilustrando o papel proposto por MBL/MASP-1 na coagulação. FONTE: Dobó et al., 2014.

Além disso, a estrutura do domínio serina-protease de MASP-1 exibe capacidade para interação com diversos substratos e proteínas, além da cascata da coagulação (KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013). Megyeri et al., (2009) demonstraram que MASP-1 ativa células endoteliais através de uma série de processos incluindo a clivagem de receptores associados a proteases (PARs) (MEGYERI et al., 2009).

O gene *MASP1* está localizado no cromossomo 3, na região q27-28 e codifica para três diferentes proteínas através da recomposição alternativa do seu mRNA: MASP-1, MASP-3 e a forma truncada Map44 (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011). O gene compreende 18 exons, o exon 1 não é traduzido e os exons 2 a 11 codificam os domínios de regulação CUB1- EGF-CUB2-CCP1-CCP2, dos quais os primeiros oito assim como o exon 10 e 11 codificam os cinco domínios N-terminais compartilhados por MASP-1 e MASP-3 (Fig. 13).

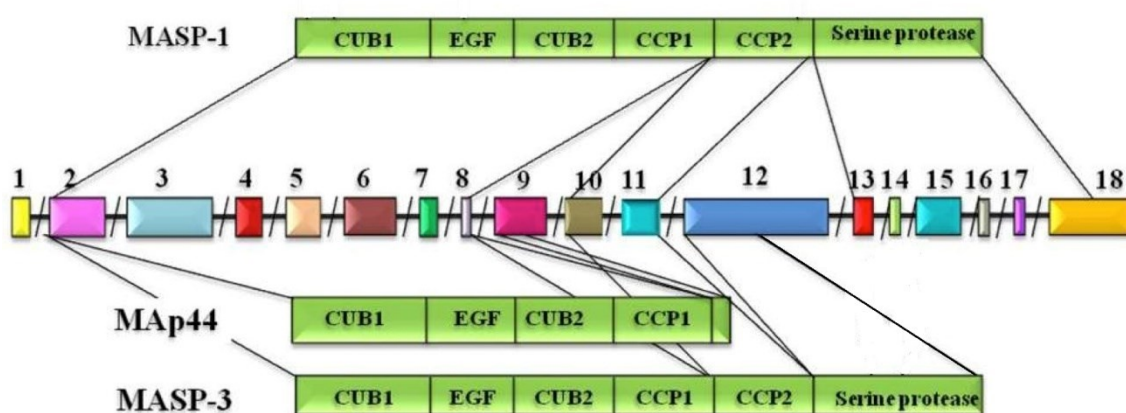


Figura 13. Esquema ilustrativo do gene *MASP1* e das proteínas codificadas.

Legenda: Exons representados pelas caixas coloridas, e correspondente domínio proteico codificado. FONTE: BOLDT et al., 2011.

O domínio serina-protease de MASP-1 é codificado por seis exons separados (exons 13-18), enquanto que o de MASP-3 é codificado por um único exon (exon 12). Desta forma, MASP-1 e MASP-3 compartilham os primeiros cinco domínios, mas têm domínios de serina-protease distintos, e

também diferem nos últimos 15 resíduos de aminoácidos. O terceiro produto de *MASP1*, MAp44, é codificado por nove exons: os oito primeiros exons são compartilhados por MASP-1 e MASP-3, que codificam os primeiros quatro domínios CUB-EGF-CUB-CCP, enquanto que o exon 9 é exclusivo de MAp44. O segundo domínio CCP e todo o domínio serina-protease não estão presentes portanto, em MAp44 (DEGN et al., 2010).

3.2.3 MASP-3

A proteína MASP-3 está presente no soro em 1800 a 10600 ng/ml aproximadamente (FRAUENKNECHT et al., 2013). A função específica, bem como os substratos e a função catalítica de MASP-3 ainda estão sendo elucidados e até o momento não há uma definição clara de seu papel. Através da competição pelo local de ligação das MASPs nas moléculas de reconhecimento como MBL e Ficolinas, a MASP-3 pode desempenhar um papel de regulação negativa na ativação do complemento e MASP-3 está frequentemente associada à ficolina-H (SKJOEDT et al., 2010) (DEGN et al., 2010).

Um papel de MASP-3 no desenvolvimento embrionário foi descrito em recentes estudos de mutações no exon 12 do gene *MASP1*, região exclusiva de MASP-3, na etiologia da Síndrome 3MC (abreviação para as quatro síndromes autossômicas recessivas identificadas por Mingarei, Malpuech, Michels e Carnevale), caracterizada por diversas malformações no indivíduo afetado (ROORYCK et al., 2011). Todas as mutações implicadas na etiologia desta síndrome parecem danificar o domínio serina-protease, que suprime a atividade enzimática de MASP-3. Da mesma forma intrigante, MASP-3 possui a capacidade de clivar a proteína 5 ligante do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-5) e clivar o fator D e B indiretamente em camundongos, sugerindo um papel também na via alternativa do complemento (IWAKI et al., 2011) (TAKAHASHI et al., 2012).

3.2.4 MAp44

Contendo os domínios CUB1-EGF-CUB2-CCp1 em comum com MASP-1 e MASP-3 e mais 17 aminoácidos diferentes, a MAp44, ou MAP-1, é um outro produto de splicing alternativo do gene *MASP1* (KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013). Esta proteína de 44 KDa (portanto o nome MAp44 – proteína de 44 kda associada a MBL) possui todos os domínios necessários para a formação de complexos com as PRMs, porém não possui o domínio serina protease. Dessa forma a MAp44 também é capaz de inibir a ativação do complemento pela via das lectinas, através da competição de ligação de outras MASPs as PRMs (DEGN et al., 2010).

A MAp44 é altamente expressa no tecido cardíaco, mas também é encontrada em outros tecidos e órgãos como o fígado ou rim. Possui uma concentração relativamente baixa no plasma e soro (0,14 – 3,00 ug/mL) se comparada aos outros dois produtos do gene.

Assim como MBL, que já tem sido usada em terapias de reposição, a utilização de terapêutica MAp44 foi proposta em pacientes com isquemia/lesão de reperfusão do miocárdio e trombogênese (FRAUENKNECHT et al., 2013). A MAp44 foi capaz de atenuar os sintomas e preservar a função cardíaca, reduzindo o tamanho do enfarte e impedindo a trombogênese por inibição de MBL e deposição de C3 em dois modelos de ratos, apresentando um efeito inibidor na ativação da via das lectinas *in vivo*.

3.3 Polimorfismos do gene *MASP1*

As sequências genômicas dos seres humanos são 99,9% semelhantes entre si e quase toda a diferença dos 0,1% restantes, reside em variações de somente um nucleotídeo, ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Substituições de um só nucleotídeo ocorrem quando uma única base nitrogenada – Adenina, Timina, Citosina ou Guanina – no genoma difere entre membros de uma mesma espécie. Parte destas diferenças encontradas são polimórficas, ou seja, o alelo menos comum na população tem frequência >

1%. A combinação de certos SNPs pode ser usada muitas vezes para deduzir uma espécie de arranjo, baseado na noção de haplótipos, que são herdados em blocos, e com o passar do tempo e das gerações o crossing-over deverá rompê-los (GRIFFITHS , 2009). Esta herdabilidade em blocos é explicada pelo desequilíbrio de ligação descrevendo uma situação em que, diferentemente daquilo que era esperado pela formação aleatória de haplótipos, algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem com mais ou menos frequência em uma população (STRAM, 2004).

Devido ao desequilíbrio de ligação entre os alelos de um haplótipo, a identificação de alguns alelos (de SNPs marcadores ou tagSNPs) permite conhecer os alelos ligados a eles. Essa informação, inicialmente fornecida pelo Projeto Internacional HapMap, é muito valiosa para investigar o componente genético da suscetibilidade a doenças comuns. É importante ressaltar que um polimorfismo associado a uma doença pode estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos que, de fato, são causadores da doença, o que é conhecido como “efeito carona” ou “hitch-hiking effect” (ABEL & CASANOVA, 2002). Com o propósito de caçar genes, seja entre genes candidatos ou no genoma completo, estão se tornando cada vez mais comuns estudos baseados em desequilíbrio de ligação com o propósito de identificar regiões e genes envolvidos em susceptibilidades a doenças (STRAM, 2004).

Mutações raras no exon 12 do gene *MASP1*, que codifica exclusivamente para a proteína MASP-3, e do gene *COLEC11*, foram associadas com a Síndrome 3MC em 11 famílias afetadas como mencionado anteriormente (Fig.14). MASP-3, juntamente com *COLEC11*, intervém na migração celular durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados. A ausência dessas duas proteínas culmina no desenvolvimento de múltiplas anormalidades em seres humanos, incluindo defeitos craniofaciais, esqueléticos, renais e aberrações neuronais, que caracterizam a síndrome 3MC (ROORYCK et al, 2011; SIRMACI et al, 2010).



Figura 14. Paciente portador da Síndrome 3MC
FONTE: (ROORYCK et al., 2011)

Embora existam 1869 SNPs catalogados para o gene *MASP1* no banco de dados *SNP data base*, há poucos estudos de associação com doenças e concentrações ou polimorfismos do gene *MASP1*. Um dos estudos relacionando concentrações séricas e polimorfismos gênicos é de AMMITZBOOL *et al.* (2013), que demonstrou forte associação entre a concentração de uma ou mais das proteínas originárias do gene *MASP1* e diversos SNPs de *MASP1*. Dentre estes, quatro diferentes SNPs (rs3774275, rs698090, rs72549154 e rs67143992), todos localizados na região de recomposição alternativa do gene, estão associados ao aumento de MASP-1 e MAp44 e diminuição de MASP-3, ou vice-versa, em indivíduos saudáveis (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013). Este efeito inverso, aumento na concentração sérica de MASP-1 e diminuição de MASP-3 e MAp44, faz sentido ao se ter em mente que MASP-1 tem um papel de ativação do sistema complemento, enquanto MASP-3 e MAp44 estão relacionadas a regulação negativa (Tabela 1).

Também observou-se uma associação de polimorfismos *MASP1* com fibrose cística, em pacientes portando o alelo menos comum do SNP rs850312 (p.L617=), com mediana de idade <15 anos e infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (HAERYNCK et al., 2012). Além disso, observou-se uma correlação com a atividade do complexo MBL/MASP-1 com a gravidade da fibrose em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (BROWN et al., 2007) e com os depósitos glomerulares de fibrinogênio e hematúria prolongada na glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica.

Tabela 1: SNPs de *MASP1* já descritos na literatura.

dbSNP	Região do gene	Domínio proteico	Concentração de proteínas * #	Associação a doenças	Maf #/ 1000 Genomes Project
rs190590338	promotora	-----	G/A: MASP-1 elevado (35%)	n.a.	1.64 / <1
rs75284004	promotora	-----	A/G: MASP-3 reduzido (16%)	n.a.	3.21 / 2/0
rs35089177	promotora	-----	T/A: MASP-1 reduzido (10%) A/A: MASP-1 reduzido (15%) A/A: MAp44 reduzido (14%)	n.a.	31.2 / 31.0
rs7625133	promotora	-----	A/C: MAp44 reduzido (10%) C/C: MAp44 reduzido (34%)	n.a.	7.6 / 3.0
rs72549254	intron 01	5' UTR	A/A: MAp44 reduzido (29%)	n.a.	15.0 / 16.0
rs710469	intron 02	CUB1	n.a.	<MASP-3 em crianças doentes quando admitidas ao hospital	46.5 / 47.0
rs3774275	intron 08	CCP1	A/G: MASP-1 elevado (10%), MAp44 elevado (16%) G/G: MASP-3 reduzido (26%), MAp44 elevado (29%)	n.a.	32.1 / 25.0
rs113938200	exon 09	CCP1	C/T: MAp44 reduzido (39%)	n.a.	0.3 / 0.1
rs698090	exon 09	3'UTR de MAp44	C/T: MAp44 elevado (13%) C/C: MASP-3 reduzido (23%) e MAp44 elevado(23%)	n.a.	37.4 / 41.0
rs72549154	exon 12	serina-protease de MASP-3	G/T: MASP-1 reduzido (14%) e MASP-3 elevado(13%)	Síndrome 3MC	3.5 / 3.0
rs850312	exon 12	serina-protease de MASP-3	n.a.	<MASP-3 em crianças doentes quando admitidas ao hospital	34.0 / 24.0
rs67143992	exon 12	3'UTR de MASP-3	C/T: MASP-1 elevado (12%), MASP-3 elevado(16%) e MAp44 elevado (9%)	n.a.	19.2 / 9.0

Em negrito: SNPs pertencentes a haplótipos da região regulatória upstream; n.a.: não aplicável. * % Indica a alteração relativa comparada com homozigotos para o alelo mais frequente. # (Ammitzbøll et al., 2013)(Ingels et al., 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (parecer 279.970, projeto “Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase”) (ANEXO 1). Todos os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa e preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esta pesquisa trata-se de um estudo transversal, do tipo caso-controle.

4.1 Casuística

4.1.1 Pacientes

Fazem parte deste estudo materiais biológicos retrospectivos pertencentes ao biorrepositório do laboratório de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR. Foram selecionadas 190 amostras de DNA, das quais 133 com amostras sorológicas correspondentes. Também foram incluídas 6 amostras de soro, cujo DNA não estava mais disponível, totalizando 196 amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de hanseníase, apresentando diferentes formas clínicas da doença (Tabela 2). Todos os pacientes passaram por acompanhamento nos ambulatórios de hanseníase do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) ou do Centro Regional de Especialidades-Barão (CRE-Barão) da Secretaria do Estado do Paraná, além dos que estavam internados no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná (HDS-PR). A classificação da forma clínica da doença de cada paciente foi obtida da ficha do SINAN (Ficha do Sistema de Informações de Agravos de Notificação) e do prontuário médico. Para a avaliação das formas clínicas da doença, foi utilizada a classificação de Ridley e Jopling (1966).

Tabela 2. Características dos pacientes de Hanseníase

Parâmetros	Formas clínicas da Hanseníase					Total
	Lepromatosa	Dimorfa	Tuberculóide	Indeterminada	Não especificada	
N (%)	116 (59,2%)	28 (14,3%)	20 (10,2%)	10 (5,1%)	22 (11,2%)	196
Idade (Média)	53,45 [20-94]	48,5 [22-75]	47,84 [19-70]	47,75 [24-67]	48,85 [18-82]	51,31
Sexo (%)						
Masculino	78 (39,8%)	18 (9,1%)	7 (3,5%)	1 (0,5%)	15 (7,6%)	119 (60,7%)
Feminino	38 (19,3%)	10 (5,1%)	13 (6,6%)	9 (4,6%)	7 (3,5%)	77 (39,3%)
Etnia (%)						
Euro-brasileiro	93(47,4%)	22(11,2%)	15(7,6%)	8(4,1%)	20(10,2%)	158 (80,6%)
Afrodescendente	22(11,2%)	6(3%)	4(2,1%)	2(1%)	2(1%)	36 (18,3%)
Oriental	0	0	0	0	0	0
Indígena	1(0,55%)	0	1(0,55%)	0	0	2 (1,1%)

4.1.2 Grupo Controle

O grupo controle constituiu-se de adultos voluntários sadios que foram selecionados entre os doadores do HemePar e do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas. Foram selecionadas 187 amostras de DNA com 101 amostras sorológicas correspondentes (incluindo 6 amostras de controle cujo DNA não forneceu resultados satisfatório – totalizando 193 amostras de controles analisadas). Este grupo foi utilizado para estimar as frequências dos SNPs na população saudável de Curitiba e Região Metropolitana, e pareado com os pacientes de acordo com a distribuição sexual e étnica (Tabela 3).

Tabela 3. Características dos controles e comparação com pacientes

Parâmetros	Controles	Pacientes
N	193	196
Média de idade [Min-Max]	40,19 [18-61]	51,31 [18-94]
Sexo (%)		
Masculino	117 (60,6%)	119 (60,7)
Feminino	76 (39,4%)	77 (39,3)
Etnia (%)		
Euro-brasileiro	160 (82,9%)	158 (80,6%)
Afrodescendente	29 (15,0%)	36 (18,6%)
Indígena	4 (2,1%)	2 (1,1%)

4.1.3 Grupo de Dinamarqueses

Para verificar uma possível associação entre variantes de *MASP1* e concentrações séricas de MASP-3 e MAp44, foi utilizado também um terceiro grupo (segundo grupo de controles) chamado neste trabalho de grupo de dinamarqueses, constituído por 210 amostras de DNA de doadores de sangue dinamarqueses com concentração de MASP-3 e MAp44 previamente quantificados no soro. Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo grupo de

pesquisa liderado pelo Prof. Jens C. Jensenius da Universidade de Aarhus, Dinamarca, através de uma colaboração. Comitês de Ética locais também aprovaram este estudo. Os 210 indivíduos apresentam uma idade média de 45,9 anos [18-64] e são compostos por 138 (65,7%) homens e 72 mulheres (34,3%).

4.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica – UAD – HC/UFPR, o DNA genômico foi extraído do sangue total/EDTA (4 mL com EDTA e 4 mL sem anticoagulante), utilizando-se um kit comercial (Qiagen, Hilden, Alemanha). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante, compreendendo lise de células, precipitação de proteínas, precipitação e ressuspensão do DNA.

4.3 Seleção de SNPs de interesse do gene *MASP1* e desenho de iniciadores.

Utilizando o banco de dados SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), foram selecionados polimorfismos de interesse em algumas regiões do gene *MASP1*, compreendendo tanto introns quanto exons. Os SNPs escolhidos foram aqueles onde o alelo menos frequente apresentava frequência alélica mínima (Maf) igual ou superior a 10% na população europeia e pelo menos mais de 1% nas outras populações consideradas pelo banco de dados (Africana e Oriental) (tabela 4). Além disso, utilizando o programa Haploview v. 4.2, foram selecionados SNPs que servem como marcadores para dois dos nove blocos de desequilíbrio de ligação do gene *MASP1* na população europeia (Figura 15).

Tabela 4. Frequência alélica dos SNPs do gene *MASP1* selecionados

Gene <i>MASP1</i> SNPs	NG029440.1	N	Europeia (%)	N	População Africana (%)	N	Oriental (%)
rs7609662	g.8113G>A	176 ⁴	G–147(83,5) A–29 (16,5)	224 ²	G–169(75,4) A–55 (24,6)	172 ³	G–146(84,9) A – 26 (15,1)
rs13064994	g.8795C>T	120 ¹	C–88(73,3) T–32(26,7)	120 ²	C–120(100)	90 ³	C – 81(90,0) T – 9 (10,0)
rs72549262	g.61897C>G	58 ⁵	C–56 (96,6) G – 2 (3,4)	48 ⁶	C–46(95,8) G– 2 (4,2)	120 ⁷	C – 64(53,3) G – 56 (46,7)
rs1109452	g.62223C>T	176 ⁴	C–124(70,5) T–52(29,5)	226 ²	C–210(92,9) T–16(7,1)	172 ³	C – 46(26,7) T – 126(73,3)
rs850314	g.62224G>A	174 ⁴	G–117(67,2) A–57 (32,8)	224 ²	G–222(99,1) A– 2(0,1)	172 ³	G – 148(86,0) A – 24 (14,0)

LEGENDA: N, número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem; ¹HapMap_CEU (Norte-Americanos); ²HapMap_YRI (Nigerianos); ³HapMap_JPT (Japoneses); ⁴HapMap_TSI(Europeus-Italianos); ⁵SNP500CANCER (Caucasianos); ⁶SNP500CANCER (Afro-Americanos); ⁷PILOTCHB(?) (Chineses). Dados do dbSNP (NCBI)
Em negrito: SNP marcador.

COMENTÁRIOS: Os SNPs rs7609662 e rs13064994 pertencem ao intron 01, e os SNPs rs72549262, rs1109452 e rs850314 pertencem ao exon 12 do gene *MASP1*.

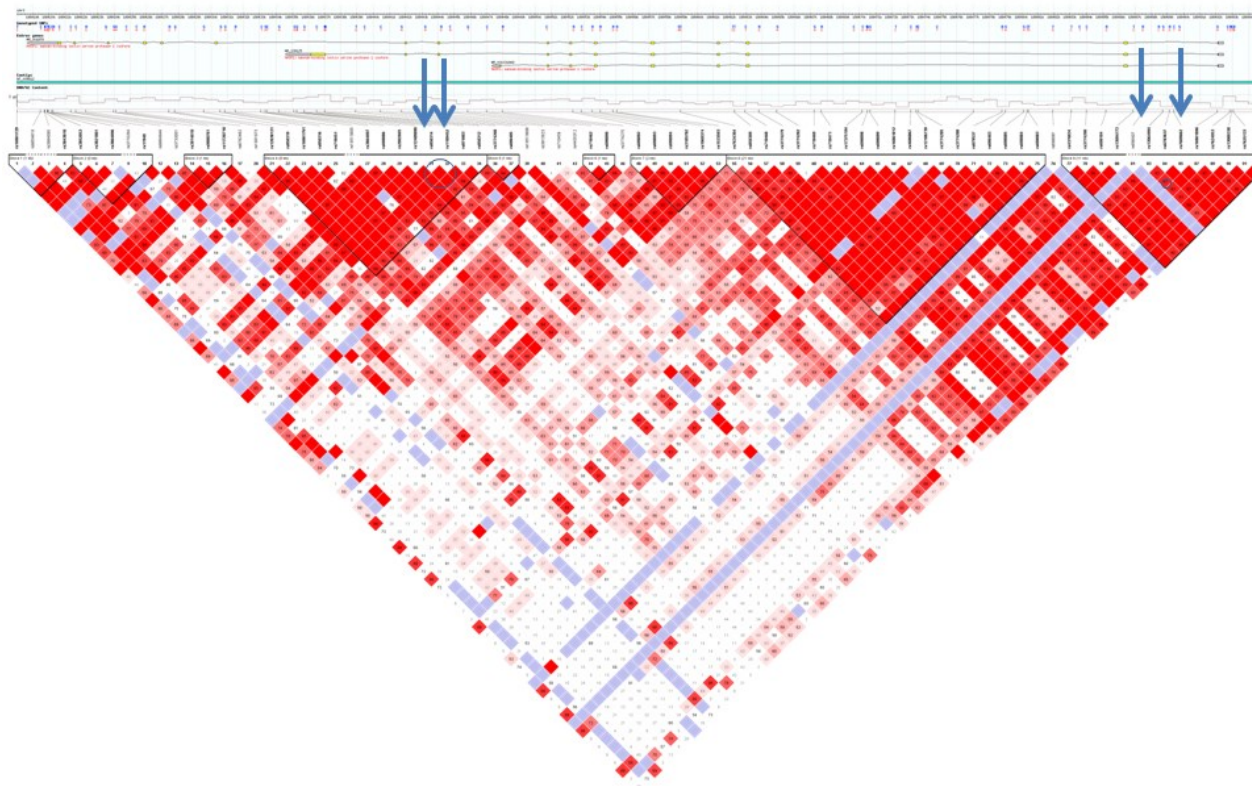


Figura 15. Plot de desequilíbrio de ligação em MASP1

Legenda: As flechas azuis indicam a região dos blocos haplotípicos que incluem 4 das 5 variantes estudadas neste projeto.

A região do exon 12 codifica exclusivamente o domínio serina-protease de MASP-3 e foi priorizada para a seleção de variantes por se tratar de uma região associada a diferenças nos níveis de concentração de MASPs (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013) e a mutações que causam as síndromes 3MC (ROORYCK et al., 2011). As variantes localizadas no exon 12 selecionadas para este trabalho, encontram-se todas na região não-traduzida (3'UTR) deste exon, as variantes desta região podem estar interferindo no processamento alternativo do pré-mRNA ou na estabilidade do mRNA maduro no citoplasma.

Para os SNPs selecionados, foram projetados iniciadores sequência-específicos contendo em média 18 a 23 nucleotídeos complementares a uma região específica do gene, de maneira que o último nucleotídeo do iniciador coincida com a variação a ser investigada (Figuras 15 e 16). Os iniciadores diretos e reversos foram desenhados de acordo com a sequência NT_019501 do cromossomo 3 (Tabela 5) utilizando a ferramenta do NCBI/Primer-Blast.

...Intron 01

```

3901 atctcagctctatatattacttttgacatttctgcaatgtagctaaactttttgattagc
3961 cggaggatagatagcagggtgtgggaactatacagccggtgcctcgtatacaagaagcca
4021 aaaacattcagagagtgtgacgaggaatgaaagctgccacttataattctcaatttacag
4081 cccctaaccgaagcaggcaagcatatgctcaagcccattacatgaaggag[atatttggtt
4141 tcatatgtttgaacc [g/A] ttttgagatgcaaaagtagaagggaaagcttctctgggcct rs7609662
4201 tcctcccacgctgaccagttgcctaccacacatggcaccgggcttctgggctacacaggg
4261 ctgtctgctgccagtccttgacagaaccggcctcaggaggctcagtgctcctcogatgtg
4321 gtctggaaaaagcagtcacatggaggaagttgaccttctcgccctgcataatttgggtgctg
4381 ctattataggaagtcgggttaggagccaaagctcattcctgactcttgcttttggga
4441 actggcaggatggaataattataactaatgtttggctagggtggacagttaacaaaata 730 pb
4501 cttccccatcctcctttacgctgatagcagtgctgtggaagtcgttattactactt
4561 aatggatgaggaaacaagacctcccatgacctcctaaaatggaaaggataaataaagtca
4621 aagctggagctgaatctagctcttttgaccagggccagtgccctcccctcctcagcagg
4681 gctgaacctgaactcccagccctgtaacactggttcatttccctcacttgaaaatgggat
4741 gcctgggccctgccacctggtttttgactcagcttccaactaattcacagggttaact
4801 ggacatatgccttcccttctctgacctgagggcct [c/t cttccacagattggttgaaga rs 13064994
4861 a]aatattgacattggctatgggattaagacattttgcttcttaatagaatctcacatat
4921 tgctattgtaggaccttgaaaaaattaaataaatgtattttcttttattgaaaaaat
4981 agtacatggtccttcttgacaaatgtaaacattttatatgcacaaaaatggaaactta
5041 tattcccatttcagagataactactgtcaataccttggtgatatacctttcagacat

```

Figura 16. Localização dos SNPs e iniciadores no intron 01
 FONTE: Sequência NT_019501 do gene *MASP1*.

...Exon 12

Iniciadores

57301 CAAAGGTCCTCCAATTACGTGGACTGGGTGTGGGAGCAGATGGGCTTACCACAAAGTGTG
57361 TGGAGCCCCAGGTGGAACGGTGA /GCTGACTTACTTCTCGGGGCTGCCTCCCCTGAGCG /Início da região UTR
57421 AAGCTACACCGCACTTCCGACAGCACACTCCACATTACTTATCAGACCATATGGAATGGA
57481 ACACACTGACCTAGCGGTGGCTTCTCCTACCGAGACAGCCCCAGGACCTGAGAGGCAG
57541 AGTGTGGTATAGGAAAAGGCTCCAGGCAGGAGACCTGTGTTCTGAGCTTGTCCAAGTC
57601 TCTTTCCC [TGTCTGGGCTCACTCTACCAGTAATACAATGCAGGAGCTCAACCAAGGCC
57661 TCTGTGCCAATCCCAGCACTCCTTTCCAGGCCATGCTTCTTACCCAGTGGCCTTTATTC
57721 ACTCCTGACCATTATCAAACCCATCGGTCTACTGTTGGTATAACTGAGCTTGGACCTG
57781 ACTATTAGAAAATGGTTTCTAACATTGAAGTGAATGCCGCATCTGTATATTTTCTGCTC
57841 TGCCTTCTGGGACTAGCCTTGGCCTAATCCTTCTCTAGGAGAAGAGCATTACAGGTTTTG
57901 GGAGATGGTCATAGCCAAGC [CCCTCTCTCTTAGTGTGAT [C/g] CCTTGGAGCACCTTCATGC rs72549262
57961 C]TGGGGTTTCTCTCCAAAAGCTTCTTGCAGTCTAAGCCTTATCCCTTATGTTCCCCATT
58021 AAAGGAATTTCAAAGACATGGAGAAAAGTTGGGAAGGTTTGTGCTGACTGCTGGGAGCAG
58081 AATAGCCGTGGGAGGCCACCAAGCCCTTAAATTTCCATTGTCAACTCAGAACACATTTG
58141 GGCCCATATGCCACCTTGGAACACCAGCTGACACCATGGGCGTCCACACCTGCTGCTCCA
58201 GACAAGCACAAAGCAATCTTTCAGCCTTGAATGTATTATCTGAAAGGCTACCTGAAGCC
58261 CAGGCC [C/T - G/A AATATGGGACTTAGTGG] ATTACCTGAAAAAGAAAAGACCCACACTGTGTC rs1109452
58381 CCAAAATCCTGCCAGGCTGCCTGGCATCCCTGGGGCATGAGCTGGGCGGAGAATCCACCCC e rs850314
58441 GCAGGATGTTTCAGAGGGACCCACTCCTTCAATTTTTCAGAGTCAAAGGAATCAGAGGCTCA
58501 CCCATGGCAGGCAGTGAAGAGCCAGGAGTCCCTGGGTTCTAGTCCCTGCTCTGCCCCCA
58561 ACTGGCTGTATAACCTTTGAAAATCATTTTCTTTGTCTGAGTCTCTGGTTCTCCGTCAG

Figura 17. Localização dos SNPs e iniciadores do exon 12.
FONTE: Sequência NT_019501 do gene *MASP1*.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos produzidos.

Iniciador direto		Iniciador reverso		Fragmento
Intron 01				
<i>MASP1</i> rs7609662_Af	5' ATATTTGTTTCATATGTTTCAAACCA 3'	<i>MASP1</i> rs13064994_Cr	5' TTCTTAAACCAATCTGTGGAAG 3'	730 pb
<i>MASP1</i> rs7609662_Gf	5' ATATTTGTTTCATATGTTTCAAACCG 3'	<i>MASP1</i> rs13064994_Tr	5' TTCTTAAACCAATCTGTGGAAA 3'	730 pb
Exon 12				
<i>MASP1</i> rs72549262_Cf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGATC 3'	<i>MASP1</i> rs1109452_Tr	5' CGACTAAGTCCCCATATTCA 3'	365 pb
<i>MASP1</i> rs72549262_Gf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGATG 3'	<i>MASP1</i> rs1109452_Cr	5' CGACTAAGTCCCCATATTG 3'	365 pb
		<i>MASP1</i> rs1109452_Cr2	5' CGACTAAGTCCCCATATTTG 3'	365 pb

LEGENDA: Em negrito, nucleotídeos variantes; pb, pares de base. O iniciador reverso "*MASP1* rs1109452_Cr2" corresponde a outra variante (A) do SNP rs85031

4.4 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)

Para as PCR-SSP biespecíficas, utilizaram-se um iniciador SSP direto, e outro reverso, cada um capaz de detectar SNPs não espaçados por mais de 1200 pb (pares de base). Para a PCR-SSP multiplex, um grupo de alelos de SNPs diferentes foi identificado para cada indivíduo, permitindo a haplotipagem física dos polimorfismos pelo uso conjugado de iniciadores SSP. Estas vem sendo desenvolvidas e utilizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia HC/UFPR e apresentam baixo custo e um menor tempo de trabalho de bancada (BOLDT et al., 2011).

O resultado das amplificações foi observado em transiluminado sob luz azul após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0 %, contendo 5µl de corante fluorescente Sybersafe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) para 100 mL de agarose. Esta técnica permite obter dados de genotipagem com rapidez, baseando-se na análise do padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.

4.4.1 PCR-SSP do Exon 12 de *MASP1*

A primeira reação de amplificação PCR-SSP foi padronizada para este trabalho, utilizando-se iniciadores PCR-SSP para os polimorfismos de nucleotídeo único *g.61897C>G* (rs72549262) e *g.62223C>T* (rs1109452), que é exclusivo de MASP-3.

Para cada reação de PCR, utilizou-se de 20 a 100 ng de DNA genômico, 0,3 µM de cada iniciador, na presença de 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 1x de Tampão Coral (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1,5% de Glicerol e 0,15 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos ou Promega, Madison, WI, Estados Unidos). As amostras foram submetidas à

reação de PCR em termociclador sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C (período de desnaturação) por 20 segundos e terminando 30 segundos com 72°C (período de extensão) por 1 minuto e 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi de 61°C nos 10 primeiros ciclos, 59° 10 seguintes e 57°C nos 15 últimos ciclos, garantindo boa especificidade e quantidade de produto. Cada reação foi acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e amostras de DNA de genótipos conhecidos, utilizados como controles positivo/negativo (Fig. 16).

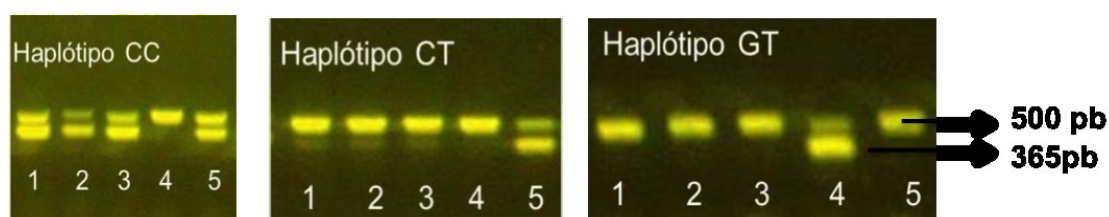


Figura 18. Padrão eletroforético da PCR-SSP. Amplificação dos fragmentos esperados dos SNPs do Exon 12. Fragmentos esperados: Exon 12 – 365pb. Iniciadores para fragmento específico do Exon 08 da Ficolina 1 (500 pb) são usados como controle endógeno e amplificam em todos os indivíduos. Interpretação - 1: CC/CC; 2: CC/CC; 3: CC/CC; 4: GT/GT; 5: CC/CT

4.4.2 PCR-SSP Multiplex – Intron 01 e Exon 12

A reação de amplificação do tipo PCR-SSP multiplex foi padronizada, utilizando-se iniciadores sequência-específicos para as variantes *g.61897C>G* (rs72549262) e *g.62223C>T* (rs1109452) do exon 12, o qual é exclusivo de MASP-3, *g.81113G>A* (rs7609662) e *g.8795C>T* (rs13064994) do intron 01 do gene *MASP1*.

Para cada reação de PCR utilizou-se de 20 a 100 ng de DNA genômico, 0,3 µM dos iniciadores SSP do exon 12 e 0,32 µM dos iniciadores do intron 01, na presença de 0,2 mM de deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 1x de Tampão Coral (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1,5% de Glicerol e 0,15 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies,

Carlsbad, CA, Estados Unidos ou Promega, Madison, WI, Estados Unidos). As amostras foram submetidas à reação de PCR em termociclador sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C (período de desnaturação) por 20 segundos e terminando com 72°C (período de extensão) por 1 minuto e 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi de 63°C nos 10 primeiros ciclos, 60°C 10 seguintes e 58°C nos 15 últimos ciclos. Cada reação foi acompanhada por controles negativos, e amostras de DNA de genótipos conhecidos (Fig. 18). Interpretação dada na Tabela 2.

Uma segunda PCR-SSP Multiplex foi padronizada para a confirmação do resultados, já que a variante *g.62224G>A* (rs850314) foi identificada exatamente adjacente a rs1109452. Desta forma, todos os indivíduos que apresentaram bandas fracas na eletroforese para o fragmento do exon 12, assim como todos os homozigotos para a variante *g.62223C>T*, foram analisados novamente com esta Multiplex, confirmando assim o genótipo deste SNP e também provendo o conhecimento do genótipo de *g.62224G>*.

As condições de reação e amplificação foram as mesmas que as utilizadas na Multiplex já descrita, apenas com a inserção de um novo par de iniciador específico para ambos os *MASP1* rs1109452_Cr2 conforme descritos na tabela 13.

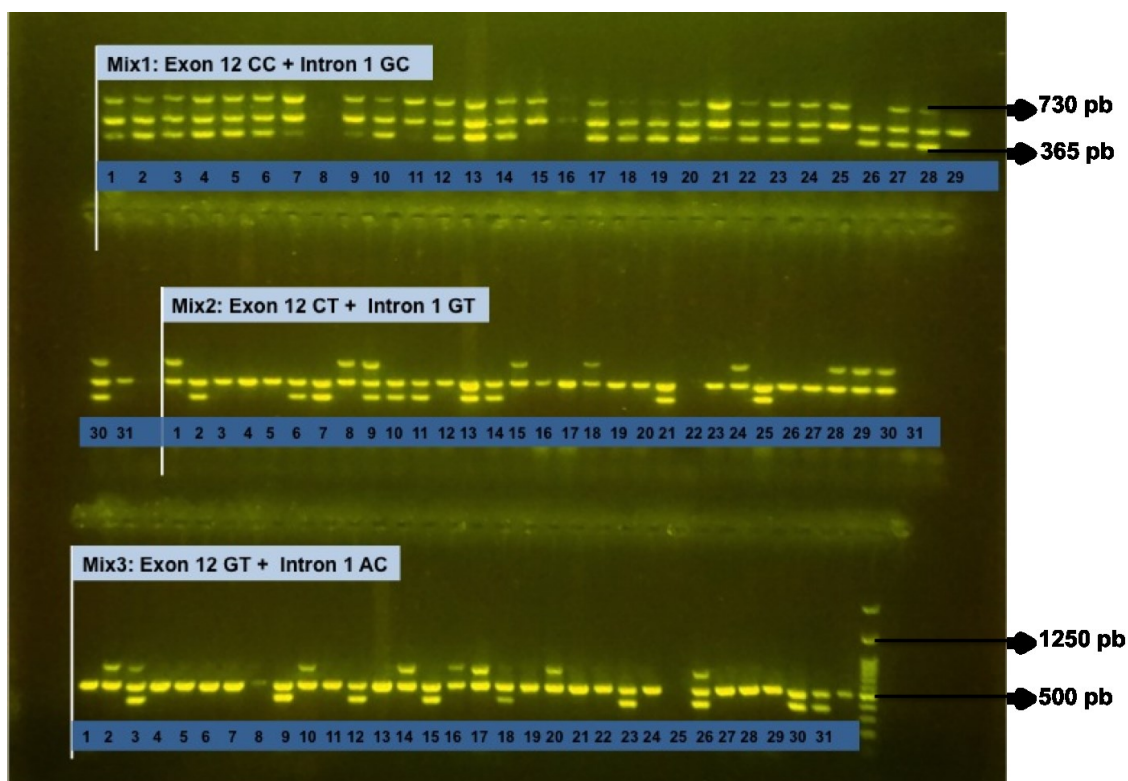


Figura 19. Padrão eletroforético da PCR-SSP Multiplex

Nota: Amplificação dos fragmentos esperados nas quatro combinações conforme seus SNPs. Fragmentos esperados: Intron 01 – 730pb e Exon 12 – 365pb. Iniciadores para fragmento específico do Exon 08 da Ficolina 1 (500 pb) são usados como controle endógeno e amplificam em todos os indivíduos. A interpretação do resultado e atribuição de genótipos das seis primeiras amostras se encontram na tabela 6.

Tabela 6. Exemplo de interpretação de resultado e atribuição de genótipo

AMOSTRA	Intron 01 (rs7609662 e rs13064994)	Exon 12(rs72549262 e rs1109452)
1	GC/GT	CC/CC
2	GC/AC	CC/CT
3	GC/AC	CC/GT
4	GC/GC	CC/CC
5	GC/GC	CC/CC
6	GC/GC	CC/CT

4.5 Ensaios de quantificação sorológica para Masp-3 e MAp44.

O TRIFMA (do inglês *Time-resolved Immunofluorimetric Assay*) constitui um método *in house* de um ensaio imunofluorimétrico tipo sanduíche que se utiliza da radioatividade de longa duração dos íons európio, que pode ser medida com grande sensibilidade por contagem de fótons. Isto proporciona à quantificação proteica por TRIFMA uma maior sensibilidade, reprodutibilidade, grande alcance e maiores relações sinal-ruído, em comparação com os testes enzimáticos Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), por exemplo. Estas análises foram realizadas em visita colaborativa de 3 meses, ao Departamento de Biomedicina da Universidade de Aarhus chefiado pelo Prof. Jens C. Jensenius, na cidade de Aarhus, Dinamarca, onde o método foi desenvolvido e patenteado. Através desta técnica, foram determinadas as concentrações séricas de MASP-3 e MAp44 em controles sadios e pacientes com hanseníase.

Para esta quantificação, a proteína MASP-3 é capturada através de um anticorpo monoclonal (5F5) específico para o domínio CCP1 (comum às três proteínas: MASP-1, MAp44 e MASP-3). Em seguida, um anticorpo monoclonal (38.12.3), específico para região C-terminal do domínio serina protease de MASP-3 é adicionado à reação. A proteína MAp44, por sua vez, é capturada com um anticorpo monoclonal (2D5) que reage com o domínio C-terminal de MAp44, seguido por uma marcação com anticorpo monoclonal anti-CCP1 (4H2) (DEGN et al., 2009, 2010).

Primeiramente, anticorpos monoclonais (5F5 para detecção de MASP-3 ou 2D5 para detecção de Map44), diluídos em tampão fosfato-salino (PBS) são adsorvidos em microplacas de 96 poços (Thermo Scientific™ Nunc FluoroNunc), durante 24 horas a temperatura ambiente. No dia seguinte, após descarte do líquido, as placas são bloqueadas com 200 µl de tampão salino Tris (TBS) contendo uma mg/mL de albumina sérica humana (HSA) e incubadas por 60min, lavadas por 3 vezes com TBS/Tween e a placa está pronta para uso.

Quatro amostras de concentrações já conhecidas de MASP-3 e MAp44 são utilizadas como controles internos da reação. As amostras a serem

quantificadas são diluídas, juntamente com os controles internos e os soros para a curva padrão, em uma solução com alto teor salino (20 mM Tris, 1 M NaCl, 0.05% Triton X-100, 10 mM CaCl₂, 0.1% HSA em pH 7.4). A diluição das amostras e dos controles internos é 1:100 para o ensaio de MASP-3 e 1:40 para o ensaio de MAp44. Para a curva padrão no ensaio de MASP-3, a diluição de um soro padrão, é feita a partir de 1:10 (1:10, 1:30 até 1:7290). Já para MAp44, a diluição inicia em 1:10, (1:10, 1:20, 1:40 até 1:280). Ambas resultam em uma curva de oito pontos representando diferentes diluições. Todas as amostras sorológicas, controles e amostras para a curva, são avaliadas em duplicatas para melhor confiabilidade dos resultados (APÊNDICE 1).

Após incubação por 24 horas a 4°C, a placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween enriquecido com cálcio e em seguida incubada com anticorpo anti-MASP-3 marcado com biotina/diluído em TBS/Tween/Ca⁺⁺, por duas horas. Depois de lavadas mais três vezes, as amostras são colocadas em contato com streptavidina marcada com európio (PerkinElmer 1244-360, 0,25mg/2,5mL), diluído em TBS/Tween/EDTA, por 60 min. A placa é lavada e a reação é finalizada com tampão de aprimoramento “*Enhancement*” (Perkin Elmer) por 5 minutos, em agitação. A contagem final de íons é lida por fluorimetria em tempo resolvido (DELFI A-reader – Perkin Elmer), e através de um fator multiplicador, é realizado o cálculo dos valores de concentração sérica das proteínas.

A quantificação dos níveis séricos das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44, foi realizada em 101 controles e 139 pacientes, assim como em todos os indivíduos do grupo de dinamarqueses utilizados neste projeto. As amostras do grupo de dinamarqueses, já foram previamente quantificadas para MASP-3 e Map44 utilizando-se a mesma técnica e cedidas para o nosso grupo, através de colaboração científica. O ensaio possui também a capacidade de determinar as concentrações das proteínas mesmo após ativação, pois o anticorpo utilizado liga-se a domínios não clivados da proteína.

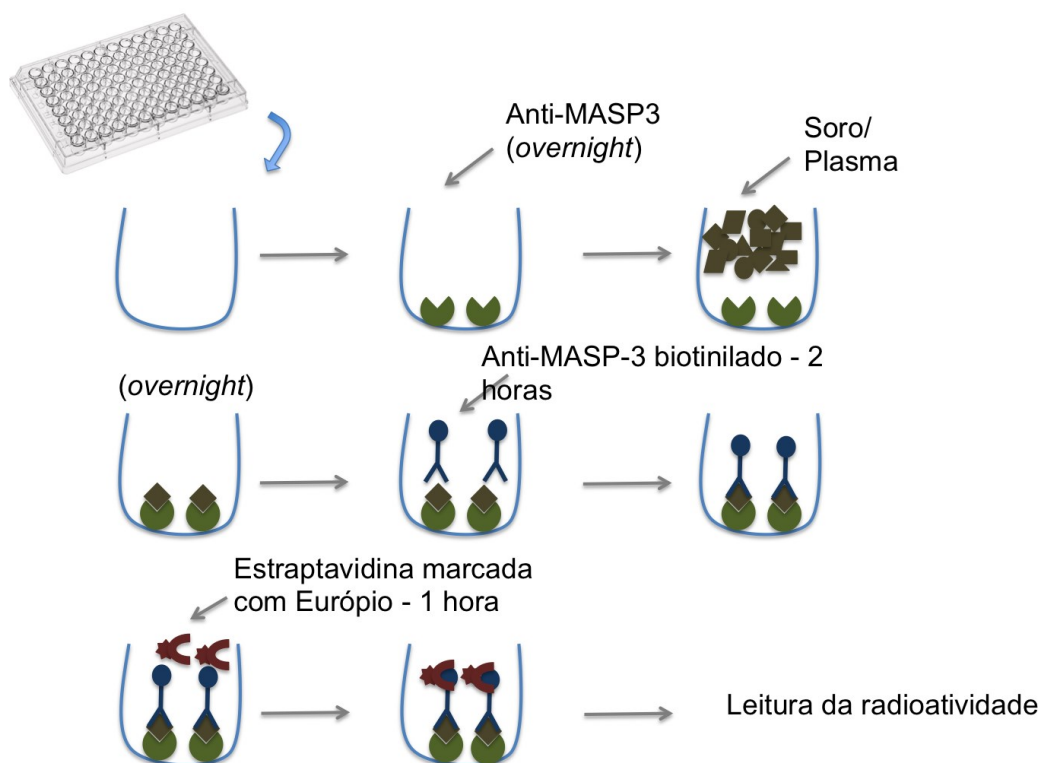


Figura 20. Esquema ilustrativo das etapas do ensaio TRIFMA

FONTE: Mendes H.C.W, 2015

4.6 Análise estatística

A estatística descritiva dos dados demográficos foi obtida através do programa STATA 9.0 (StataCorp, Texas, EUA) e Graphpad Prism 6 (Graphpad software, Prism 6 for MAC OS X). A suposição de normalidade dos dados foi rejeitada através do teste de Shapiro-Wilk e a possibilidade de associação entre genótipo e fenótipo, testada através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, utilizando-se destes mesmos softwares.

As frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. A estimativa de fase gamética e haplotípica do haplótipo contendo as cinco variantes, foi feita por reconstrução baseada em algoritmo pseudo Baesyano com o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5

(EXCOFFIER, 2010). As hipóteses de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de diferenciação populacional foram avaliadas utilizando-se o teste de Guo e Thompson (2002) e o de Raymond e Rousset (ROUSSET; RAYMOND, 1995) e Goudet *et al.* (1996), respectivamente, no pacote de programas ARLEQUIN v.3.5. Para as análises de associação foram realizados os testes de independência entre as variáveis utilizando-se teste de Fisher bicaudal e regressão logística binária no programa STATA 9.0. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Polimorfismo do gene *MASP1*

A hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada para os haplótipos identificados através da PCR-SSP Multiplex de *MASP1* nos grupos controle, grupo de dinamarqueses e pacientes de hanseníase (Tabelas 7-9). No grupo controle, pode-se assumir que o desvio das premissas do modelo são desprezíveis, ou seja: de que os cruzamentos são aleatórios, as gerações são discretas, o tamanho populacional é infinito e de que não ocorrem migração, mutação e seleção natural. Contudo, houve menos heterozigotos que o esperado para o haplótipo do exon 12 em pacientes e o haplótipo do intron 1, nos dinamarqueses, gerando uma diferença significativa, porém não menor que 0,01.

Tabela 7. Equilíbrio Hardy-Weinberg dos haplótipos em pacientes

Locus (GRCh38)	n	Het. obs.	Het. esp.	P.	DP.
intron 1	190	0,594	0,569	0,422	0,00049
exon 12	190	0,568	0,684	0,011	0,00011

LEGENDA: n = número de indivíduos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

NOTA: teste de Guo e Thomson (1992).

Tabela 8. Equilíbrio Hardy-Weinberg dos haplótipos no grupo controle

Locus (GRCh38)	n	Het. obs.	Het. esp.	P.	DP.
intron 1	190	0,621	0,575	0,461	0,00048
exon 12	190	0,657	0,683	0,218	0,00041

LEGENDA: n = número de indivíduos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão. NOTA: teste de Guo e Thomson (1992)

Tabela 9. Equilíbrio Hardy-Weinberg nos haplótipos no grupo comparação

Locus (GRCh38)	n	Het. obs.	Het. esp.	P.	DP.
intron 1	215	0,465	0,508	0,028	0,00016
exon 12	215	0,581	0,656	0,076	0,00028

LEGENDA: n = número de indivíduos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

NOTA: teste de Guo e Thomson (1992).

As frequências alélicas para os SNPs *g.8113G>A* (rs7609662) e *g.8795C>T* (rs13064994) localizados no intron 01, e *g.61897C>G* (rs72549262) e *g.62223C>T* (rs1109452) e *g.62224G>A* (rs850314), localizados na região não traduzida do exon 12 (3'UTR) do gene *MASP1* apresentaram similaridade àquelas encontradas em europeus para todos os loci estudados, de acordo com o banco de dados de SNPs, dbSNP (2014) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Frequências dos alelos das variantes do Intron 01 nos três grupos.

Populace	N	+8113 rs7609662	+8795 rs13064994
Europeus	120 ¹	G – 104 (86,7%) A – 16 (13,3%)	C – 89 (74,2%) T – 31 (25,8%)
Controles	380	G – 325 (85,5%) A – 55 (14,5%)	C – 275 (72,4%) T – 105 (27,6%)
Hanseníase	380	G – 327(86,1%) A – 53 (13,9%)	C – 272 (71,6%) T – 108 (28,4%)
Dinamarqueses	430	G – 374 (86,9%) A – 56 (13,1%)	C – 338 (78,6%) T – 92 (21,4%)

LEGENDA: N, número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem; ¹HapCEU (Norte-Americanos);

NOTA: Dados do dbSNP (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

Tabela 11. Frequência dos alelos das variantes do Exon 12 nos três grupos

População	N	+61897 rs72549262	+62223 rs1109452	+62224 rs850314
Europeus	120	C – 108 (90%)	C – 81 (67,5%)	G – 90(75%)
		G – 12 (10%)	T – 39 (32,5%)	A – 30 (25%)
Controles	380	C – 330 (86,9%)	C – 255 (67,1%)	G – 307 (81,8%)
		G – 50 (13,1%)	G – 125 (32,9%)	A – 73 (19,2%)
Hanseníase	380	C – 350 (92,1%)	C – 252 (66,3%)	G – 320 (84,2%)
		G – 30 (7,9%)	G – 128 (33,7%)	A – 60 (15,8%)
Dinamarqueses	430	C – 391(90,9%)	C – 277(64,4%)	G – 362(84,2%)
		G – 39(9,1%)	T – 153 (35,6%)	A – 68 (15,8%)

LEGENDA: N, número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem; ¹HapCEU (Norte-Americanos);

NOTA: Dados do dbSNP (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

Utilizando o algoritmo pseudo-Bayesiano, foram encontrados doze diferentes haplótipos de *MASP1* nos pacientes (Tabela 12), treze nos controles e doze, no grupo de dinamarqueses. A frequência de cada haplótipo foi semelhante nos três grupos estudados. Os haplótipos mais frequentemente encontrados foram *GC CCG*, *GC CTG*, *GC CCA* e *GT CCG*, os menos frequentes foram *GT GTG*, *AC GTG*, *AC CCA* e *GT GCA* nas populações analisadas e um único indivíduo do grupo controle apresentou o haplótipos *GT GCA*. Comparando-se as frequências haplotípicas entre pacientes e controles através do teste pseudo Baesyano (Tabela 12), observou-se uma frequência mais elevada do haplótipo *GC CCG* nos pacientes quando comparados aos controles ($p=0,028$, $OR=1,43$, $[IC95\%= 1,04-1,94]$).

Tabela 12. Diferença na distribuição dos haplótipos do gene *MASP1* entre pacientes com hanseníase e controles.

Haplótipo	Pacientes	Controles	P	OR (IC95%)
GC CCG	35%	27,4%	0,028	1,43 [1,04-1,94]
GC CTG	13,9%	13,2%	n.s	n.a.
GC GTG	5,5%	10,3%	n.s	n.a.
GC CCA	3,2%	6,1%	n.s	n.a.
GT CCG	8,2%	8,7%	n.s	n.a.
GT CTG	8,7%	7,1%	n.s	n.a.
GT GTG	0,8%	0,5%	n.s	n.a.
GT CCA	10,8%	11,8%	n.s	n.a.
AC CCG	7,4%	10,8%	n.s	n.a.
AC GTG	1,6%	1,3%	n.s	n.a.
AC CCA	3,2%	1,1%	n.s	n.a.
AC CTG	1,7%	1,6%	n.s	n.a.
GT GCA	0	0,3%	n.s	n.a.

LEGENDA: P: probabilidade; O. R.: *odds ratio*

NOTA: Teste pseudo Baesyano.

5.2 Concentrações séricas de MASP-1, MASP-3 e MAp44

Valores considerados deficientes para as proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44 ainda não foram estabelecidos, enquanto os valores considerados normais de concentrações séricas, tanto no soro quanto no plasma, já foram relatados. A quantificação dos níveis séricos das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44 foi realizada em 101 controles e 139 pacientes, assim como em todos os indivíduos do grupo de dinamarqueses. Vinte indivíduos sendo 12 pacientes e 8 controles, apresentaram valores séricos <3800 ng/mL para MASP-1. O valor considerado normal de MASP-1 no soro/plasma é de 11000 ng/mL (intervalo de 4000-30000 ng/mL) (THIEL et al., 2012). Com base neste critério, consideramos esses 20 indivíduos como baixo produtores de MASP-1.

Para MASP-3, o valor normal no soro é de 5000 ng/mL (intervalo de 1800 – 10600 ng/mL) (DEGN et al., 2010). Um paciente apresentou concentração sérica <1800 ng/mL para MASP-3 e todos os demais encontraram-se dentro dos valores encontrados em trabalhos anteriores.

Todos os valores para a proteína MAp44 encontraram-se entre 340 e 3000 ng/mL nos três diferentes grupos, sendo os mesmos dentro dos padrões de normalidade descritos na literatura. Para MAp44, foi encontrada no plasma/EDTA uma concentração média de 800 ng/mL (intervalo 140 – 2040 ng/mL), e no soro 380 ng/mL (intervalo 340 – 3000 ng/mL) (DEGN et al., 2009). Os resultados obtidos não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram analisados com testes não-paramétricos de Mann-Whitney.

5.2.1 MASP-1

Não houve associação entre a concentração sérica da proteína MASP-1 e hanseníase (medianas: 6179 ng/ml em controles vs. 7086 ng/ml em pacientes, $P=0,146$) (Gráfico 1), embora observou-se uma tendência de concentrações mais altas de MASP-1 nos pacientes com hanseníase.

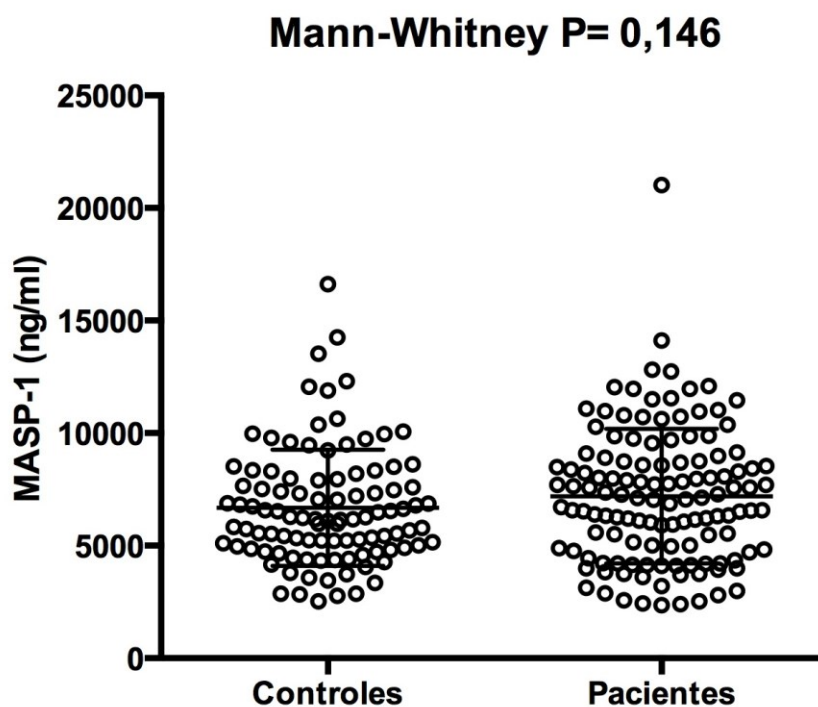


Gráfico 1. Concentração sérica de MASP-1 em controles e pacientes
 Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney

A concentração sérica de MASP-1 foi similar entre os pacientes apresentando a forma lepromatosa e aqueles apresentando as outras formas da hanseníase (medianas: 7057 ng/mL em lepromatosos vs. 7036 ng/mL em outras formas clínicas, $P=0,644$) (Gráfico 2).

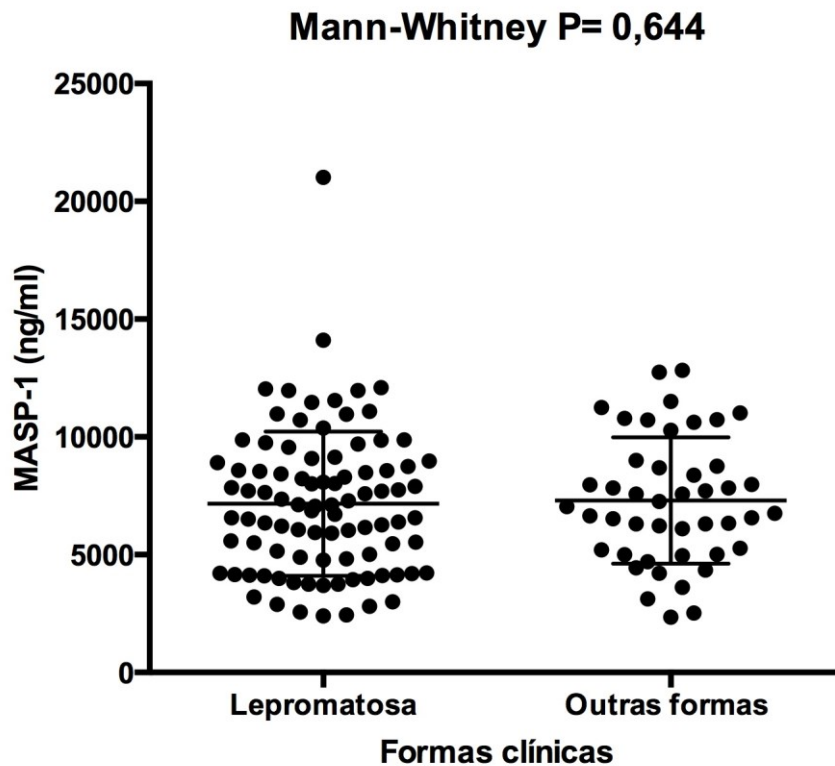


Gráfico 2. Concentrações séricas de MASP-1 e formas clínicas de hanseníase
 Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney

Níveis circulantes elevados de MASP-1 aparentemente tem um efeito clínico em certas doenças. Sabe-se que entre pacientes com diferentes doenças cardíaco e cerebrovasculares, concentrações de MASP-1 foram mais altas em pacientes com infarto do miocárdio subagudo (mediana de 12000 ng/mL), (FRAUENKNECHT et al., 2013). Além disso, a expressão de MASP-1 foi aumentada em leiomiossarcoma primário uterino (Davidson et al., 2014) e em linhas celulares de hepatócitos infectados por HCV (SAEED et al., 2013).

Devido à importância de MASP-1 na via das lectinas através da ativação de MASP-2 (DEGN et al., 2012) (HÉJA et al., 2012), é plausível considerar que elevados níveis de concentração de MASP-1 possam ser clinicamente importantes, uma vez que isso possa levar a uma ativação elevada do sistema complemento e, portanto, aumento da inflamação (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013) e da atividade fibrinogênica (SAEED et al., 2013). Além disso, a atividade enzimática de complexos MBL/MASP-1 é superior em pacientes com fibrose hepática grave induzida por HCV (BROWN et al., 2007) (EL SAADANY et al., 2011).

5.2.2 MASP-3

A concentração sérica de MASP-3 foi significativamente menor em pacientes, quando comparados aos controles (medianas: 5606 ng/mL em controles vs. 4603 ng/mL em pacientes, $P=0,0016$) (Gráfico 3). Concentrações >5500 ng/mL de MASP-3 foram significativamente mais frequentes nos controles, que nos pacientes (Wilcoxon signed-rank test $P=0,0004$), e negativamente associadas com a doença ($P=0,007$, $OR=0,45$ [IC95%=0,25-0,80]), independente da idade, que foi o único fator demográfico que permaneceu associado no modelo reduzido de regressão logística.

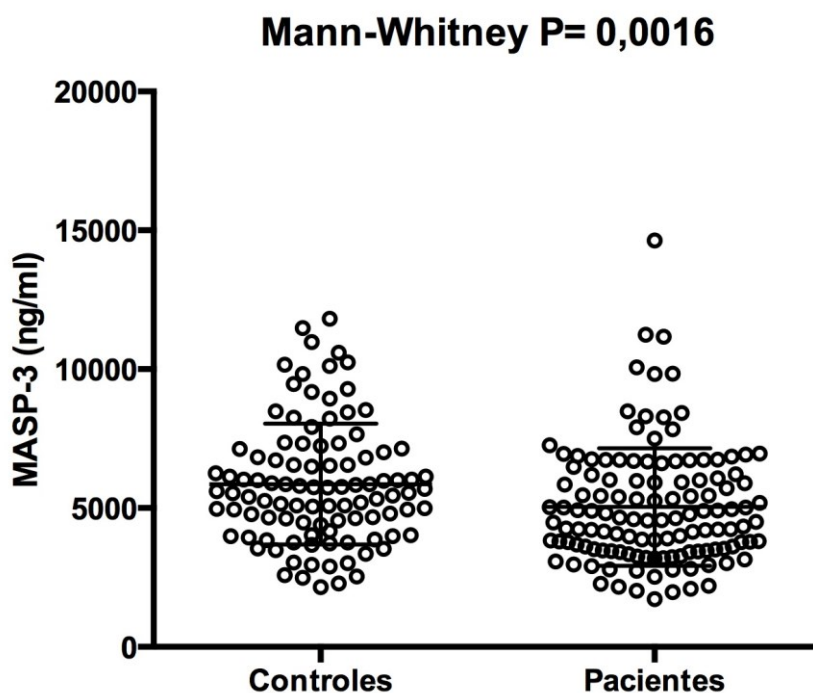


Gráfico 3. Concentração sérica de MASP-3 em controles e pacientes
Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney

Além disso, pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase apresentaram níveis séricos de MASP-3 menores que pacientes com as outras formas clínicas da doença (medianas: 4234 ng/mL em pacientes lepromatosos vs. 5187 ng/mL em pacientes com as outras formas clínicas, $P<0,05$) (Gráfico

4). Considerando que pacientes com a forma lepromatosa de hanseníase apresentam geralmente estado mais grave da doença, com lesões e reação inflamatória mais exacerbada que aqueles com outras formas clínicas, esses achados corroboram com a hipótese de pré-existência deste fenótipo e da influência desta condição pré-existente na progressão clínica da doença.

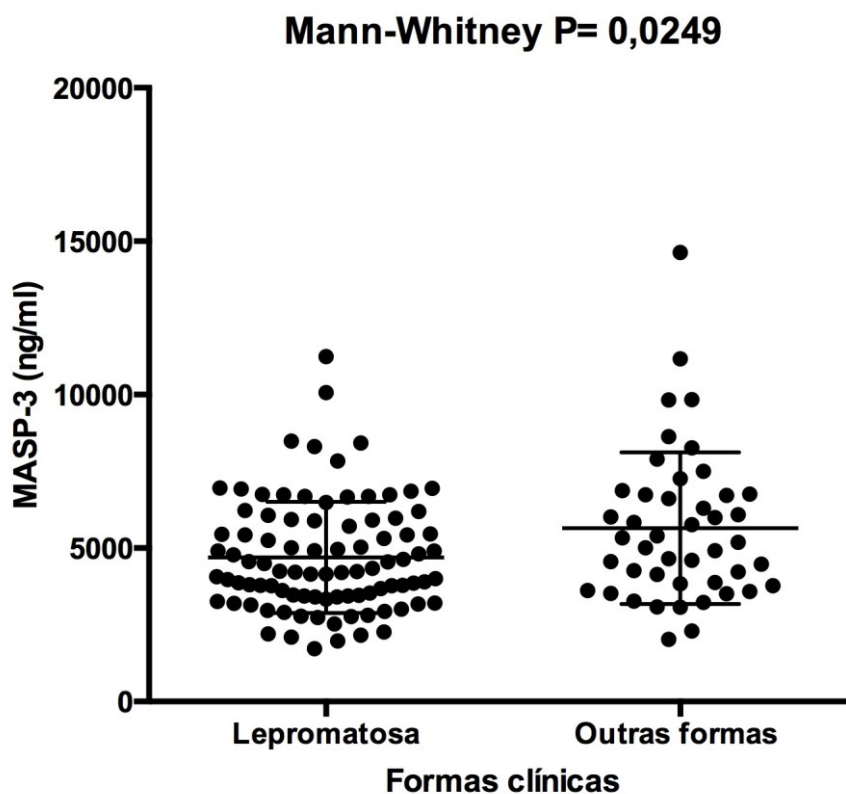


Gráfico 4. Concentração sérica de MASP-3 em pacientes com hanseníase lepromatosa

Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney

Para ilustrar mais a relação da concentração sérica de MASP-3 com as diferentes formas clínicas da doença, esta variação de concentração permanece quando comparada entre cada uma das diferentes formas clínicas (medianas: 4234 ng/ml em lepromatosos, 6011 ng/ml dimorfa, 3921 ng/ml indeterminada e 5402 ng/ml tuberculoide, $P=0,013$) (Gráfico 5). Baixos níveis

de MASP-3 nos pacientes indeterminados podem estar relacionados ao número amostral pequeno dessa forma clínica (n=4).

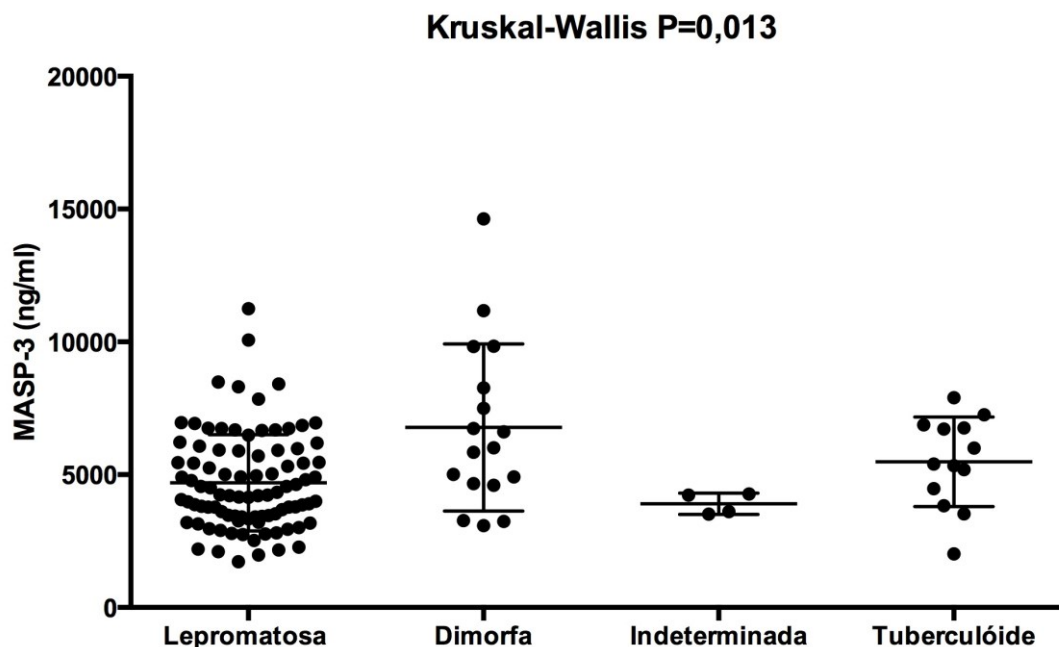


Gráfico 5. Concentração sérica de MASP-3 e formas clínicas de hanseníase
Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas.

Níveis mais baixos de MASP-3 já foram associados com risco aumentado de novas infecções em crianças na admissão a hospital, assim como com a necessidade prolongada de cuidados intensivos independentemente da infecção (INGELS et al., 2014). Esse trabalho juntamente com os resultados aqui apresentados, reforçam o fato de que MASP-3 parece ter um papel importante na resposta a infecções em geral.

5.2.3 MAp44

A concentração sérica de MAp44 foi também significativamente menor em pacientes com hanseníase do que em controles (medianas: 2350 ng/mL em controles vs. 1732 ng/mL em pacientes, $P < 0,0001$) (Gráfico 6). Ainda,

concentrações >2300 ng/mL foram significativamente mais frequentes nos controles do que nos pacientes (Wilcoxon signed-rank test $P < 0,0001$), e negativamente associados com a doença ($P < 0,0001$, OR=0,31 [IC95%=0,17-0,56]), independentemente da idade, o qual foi o único fator demográfico que permaneceu associado no modelo reduzido de regressão logística.

Assim como para MASP-3, pacientes com a forma lepromatosa da doença também apresentam níveis séricos de MAp44 diminuídos quando comparados às outras formas clínicas (medianas: 1685 ng/mL em pacientes lepromatosos vs. 1979 ng/mL em pacientes com as outras formas clínicas, $P = 0,001$) (Gráfico 7).

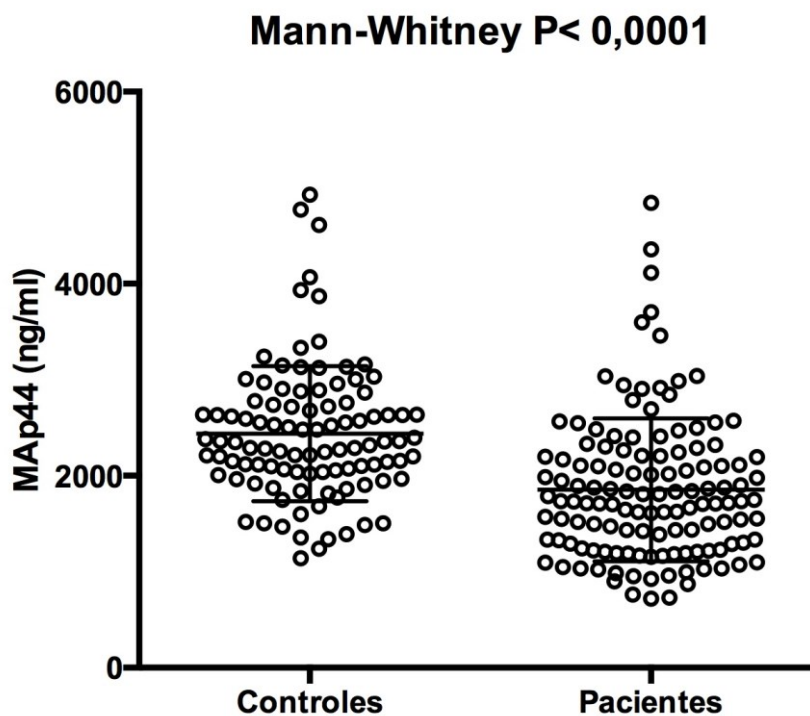


Gráfico 6. Concentração sérica de MAp44 em controles e pacientes
Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney

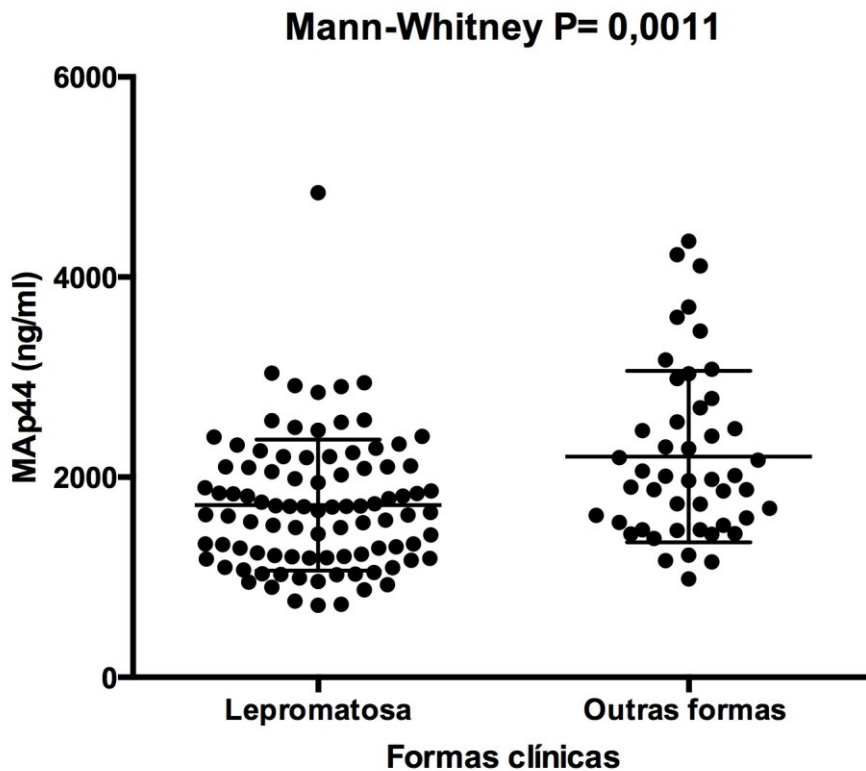


Gráfico 7. Concentração de MAp44 em pacientes com hanseníase lepromatosa.

Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney

Esta variação na concentração de MAp44 permanece quando comparada entre cada uma das diferentes formas clínicas (medianas: 1685 ng/mL em pacientes lepromatosos, 2063 ng/mL em dimorfos, 1527 ng/mL em indeterminados e 1876 ng/mL em tuberculoide, $P < 0,05$) (Gráfico 8). A baixa concentração de Map44 nos pacientes indeterminados pode estar relacionada ao pequeno número amostral desses casos.

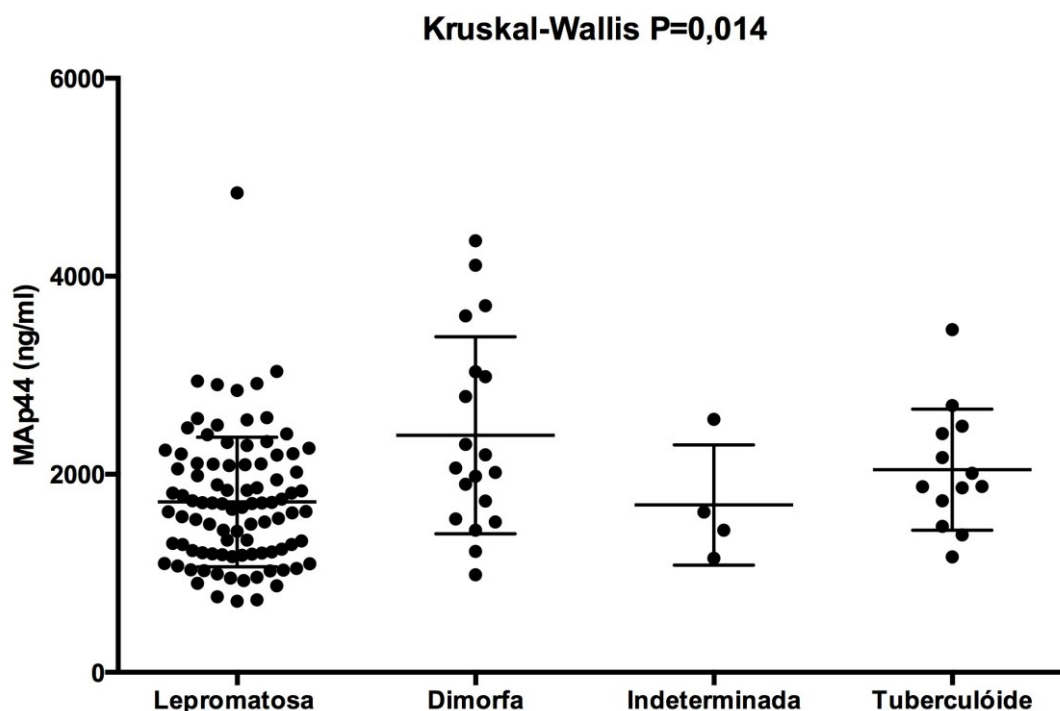


Gráfico 8. Concentração de MAp44 e diferentes formas clínicas da hanseníase.

Nota: Mediana e variação interquartil estão indicadas.

Mesmo após ativação do sistema complemento pela via das lectinas através do complexo formado entre MBL/FCN/COL-11 e MASPs, o domínio serina-protease destas proteínas permanece disponível e pode ser reconhecido pelos anticorpos utilizados no ensaio sanduíche do tipo TRIFMA. Desta forma, as concentrações reduzidas de MASP-3 e MAp44 não refletem necessariamente maior consumo destas proteínas nos pacientes (devido regulação negativa da via das lectinas), pois mesmo depois de ativadas e da clivagem do domínio SP, estas teoricamente ainda podem ser quantificadas pelo método TRIFMA utilizado.

A formação do complexo de ataque a membrana (MAC) pela ativação da via das lectinas é um importante processo na eliminação do patógeno pelo sistema complemento (DOBÓ et al., 2014). No entanto, a fagocitose é desencadeada principalmente pela deposição de C3b na membrana do patógeno (IWAKI et al., 2011) (Fig.19). As células fagocíticas reconhecem este fragmento de C3 através dos receptores CR1 e dessa forma promovem a eliminação do patógeno. Os macrófagos são as principais células envolvidas

neste mecanismo além de serem as células que definem os granulomas, os quais estão presentes abundantemente na hanseníase.

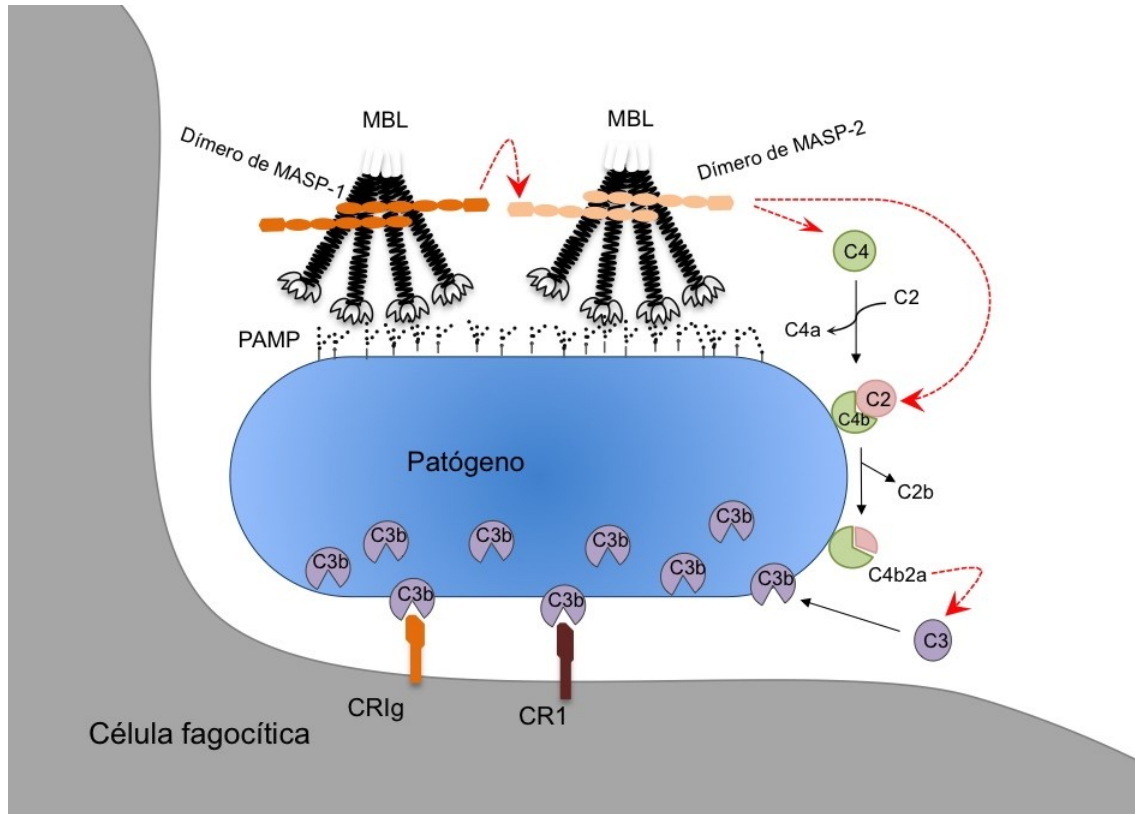


Figura 21. Ativação do complemento e atividade fagocítica

FONTE: Mendes H.C.W., 2015

Fraser et al, 2014, descrevem que a MBL aumenta a ingestão de LDL modificado (OxLDL) por macrófagos, e também modula o acúmulo de colesterol em monócitos durante a ingestão de OxLDL. Pode-se concluir portanto, que existe uma alta atividade de MBL onde há acúmulo de colesterol (FRASER; TENNER, 2012). Dados recentes revelam que a sobrevivência de *M. leprae* em macrófagos também depende no acúmulo de colesterol (MATTOS et al., 2014), sugerindo até mesmo um potencial alvo para novos tratamentos, de fato as concentrações de CD36 (o principal receptor de OxLDL em macrófagos) estão aumentadas em células infectadas *in vitro* com *M. leprae*.

Diante desses fatos, é possível supor a existência de diferentes causas para a redução dos níveis de MAp44 e MASP-3 em indivíduos com hanseníase. Destaca-se sobretudo o papel de outros polimorfismos do gene *MASP1* que podem estar modulando a concentração dos produtos deste gene dentro do contexto da doença, assim como outras cascatas e metabolismos, como o do colesterol, que poderiam estar relacionados com a ativação do complemento.

5.2.4 Correlação entre a concentração das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44.

Os níveis de MASP-3 e MAp44 se mostraram correlacionados positivamente nos três grupos investigados: controles (Spearman $R=0,39$; $P<0,0001$) (Gráfico 9), pacientes (Spearman $R=0,55$; $P<0,0001$) (Gráfico 10) e no grupo de dinamarqueses, onde a correlação foi realizada em 350 indivíduos que já haviam sido quantificados previamente (Spearman $R=0,35$; $P=0,0024$) (Gráfico 11).

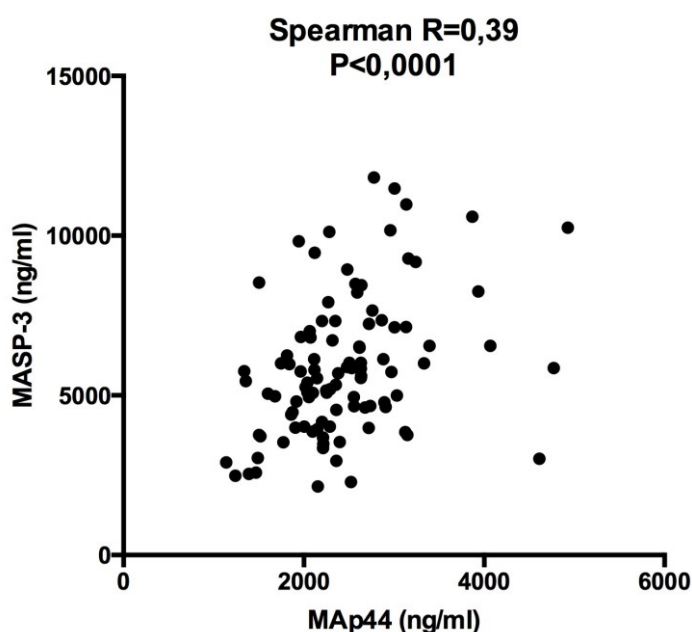


Gráfico 9. Correlação de MASP-3 e MAp44 em controles

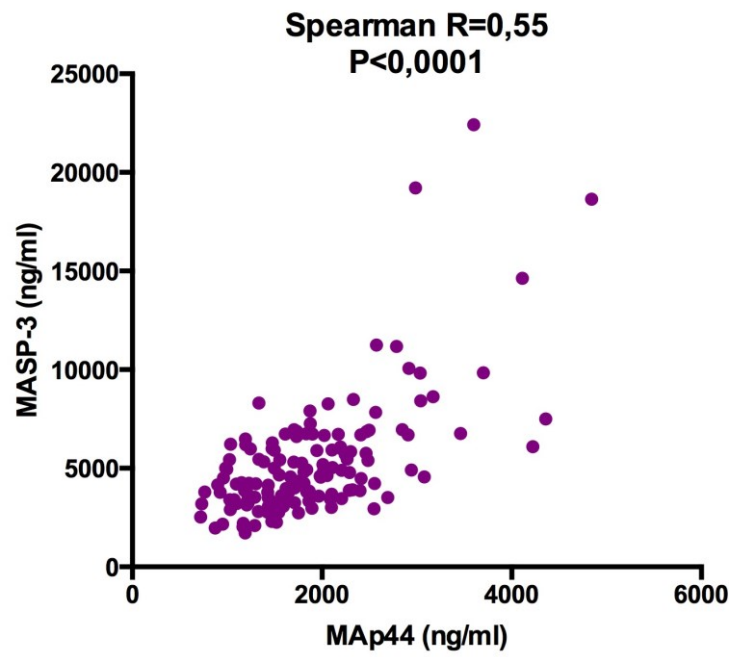


Gráfico 10. Correlação de MASP-3 e MAp44 em pacientes

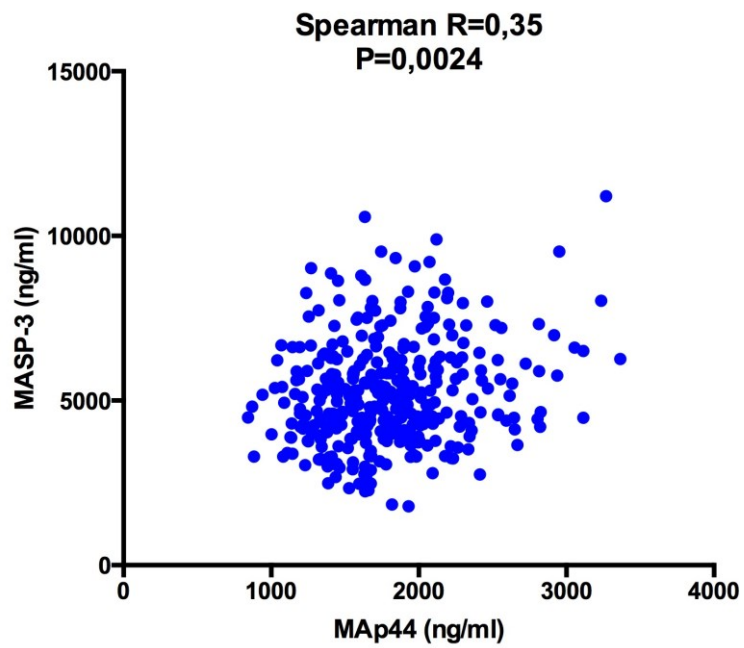


Gráfico 11. Correlação de MASP-3 e MAp44 em dinamarqueses

Embora fraca, a correlação observada, se mostrou constante nos três diferentes grupos, e pode ser causada pela regulação do processamento alternativo do pré-mRNA do gene *MASP1*, como sugere Ammitzbøll et al. 2013. Isto explicaria também a correlação de MASP-1 e MAp44 nos pacientes (Spearman $R=0,35$; $P<0,0001$) (Gráfico 12) e no grupo de dinamarqueses (Spearman $R=0,24$; $P<0,0001$) (Gráfico 13), embora não nos controles.

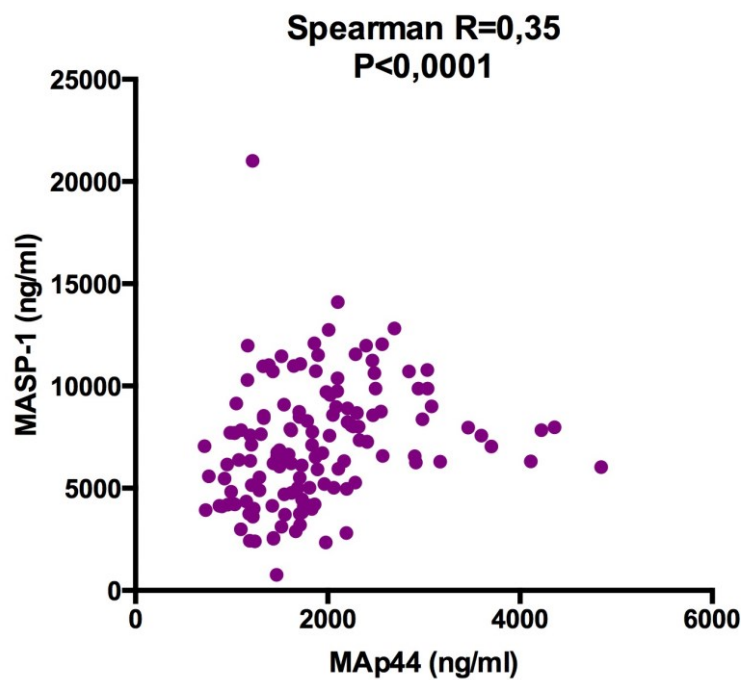


Gráfico 12. Correlação de MASP-1 e MAp44 em pacientes

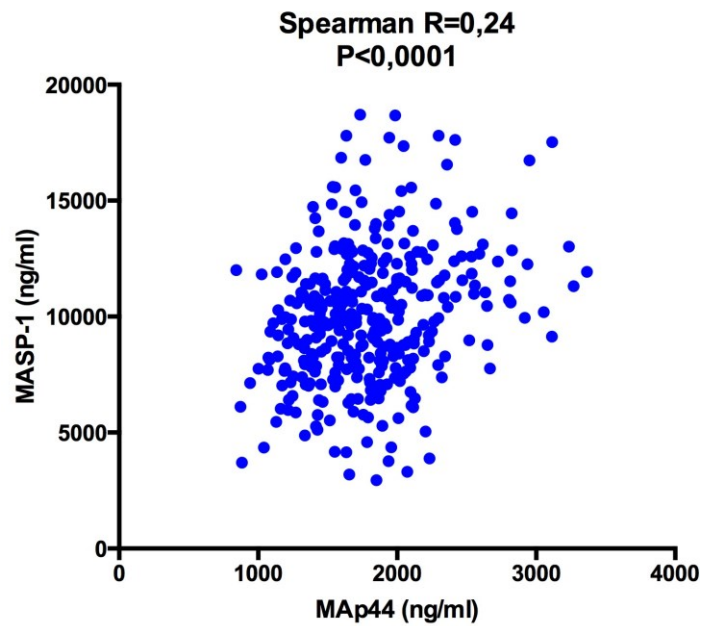


Gráfico 13. Correlação de MASP-1 e MAp44 em dinamarqueses

Ainda, uma fraca correlação negativa entre a concentração sérica de MASP-1 e MASP-3 foi observada no grupo de dinamarqueses (Spearman $R=0,-14$; $P=0,0081$) (Gráfico 14). É possível que esta correlação foi observada somente em dinamarqueses devido ao tamanho amostral deste grupo que para esta análise foi maior que os controles e pacientes. Este resultado é interessante, pois corrobora com a ideia que MASP-1 e MASP-3 possuem papéis distintos na ativação do complemento, ativação e regulação negativa, respectivamente.

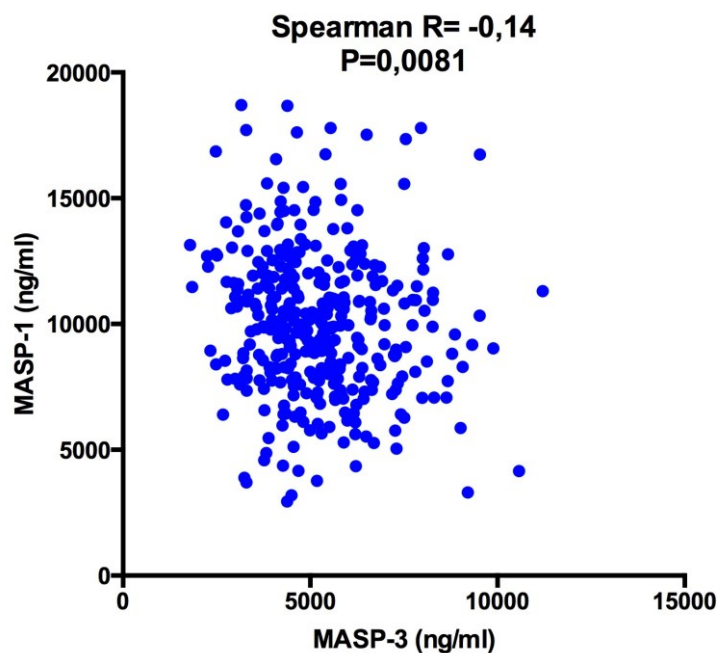


Gráfico 14. Correlação de MASP-1 e MASP-3 em dinamarqueses

5.3 Associação das concentrações séricas de MASPs com as variantes do intron 01 rs7609662 e rs13064994 do gene *MASP1*.

Nos controles, houve uma associação do alelo *MASP1**8795T, o alelo menos frequente para rs13064994, com concentrações elevadas de MASP-3 (medianas: 5039 ng/mL em indivíduos sem o alelo T vs. 6131 ng/mL em indivíduos com o alelo T em heterozigose ou homozigose, $P=0,0048$) (Gráfico 15). Esta associação, porém, não foi observada em pacientes ou no grupo de dinamarqueses, e deve ser interpretada com cautela. A mesma pode resultar, por exemplo, de um “efeito carona” de outra variante presente no mesmo bloco de ligação haplotípico (Figura 15).

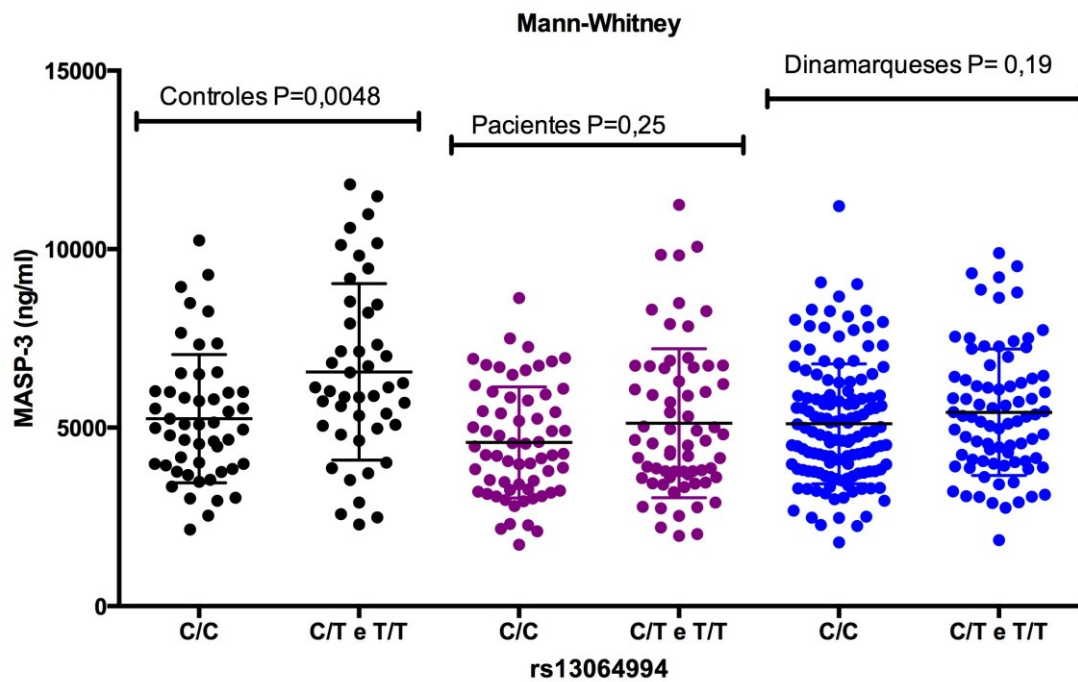


Gráfico 15. Genótipos da variante *g.8795C>T* e concentrações de MASP-3 nos três grupos

Nenhuma associação com concentrações séricas das três proteínas foi observada com a variante *g.8113G>A* (rs7609662) neste estudo, e a distribuição do genótipo para este polimorfismo encontra-se também homogênea, entre os grupos. O polimorfismo rs72549254, que também se encontra no intron 01 do gene *MASP1*, já foi associado com níveis reduzidos de MAp44 por Ammitzbøll C. G. et al (2013) (Ver tabela 14). Este SNP, contudo, não está em desequilíbrio de ligação com rs13064994. Outros polimorfismos na região promotora de *MASP1*, não investigados no presente trabalho, também foram associados a diferenças nas concentrações de MASP-1, MASP-3 e MAp44 por Ammitzbøll C. G. et al (2013).

5.4 Associação das concentrações de MASPs com as variantes do exon 12: rs7254262, rs1109452 e rs850314

Observou-se uma maior frequência de indivíduos com a variante *MASP1*61897G* (rs72549262) entre os pacientes, quando comparados aos

controles ($P=0,055$, $OR=1,72$ [IC95%= 0,99-2,99]) (Tabela 13). Esta, e as outras duas outras variantes do exon 12 analisadas neste estudo encontram-se em uma região altamente polimórfica do gene *MASP1*, onde outros polimorfismos já foram associados com diferentes fenótipos e quadros clínicos (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013) (ROORYCK et al., 2011) (SIRMACI et al., 2010).

Tabela 13. Diferença na distribuição dos genótipos de rs72549262 em Pacientes e Controles

Genótipo	Pacientes	Controles	P	OR (IC95%)
<i>MASP1*61897G</i>				
C/C	165	149	n.s	n.a.
C/G e G/G	25	39	P = 0,055	OR=1,72 [0,99-2,99]

LEGENDA: P: probabilidade; O. R.: *odds ratio*

Apenas no grupo de dinamarqueses houve uma associação entre o alelo *MASP1*61897G* com concentrações elevadas de MAp44 (medianas: 1675 ng/mL em indivíduos sem o alelo G vs. 1881 ng/mL com o alelo G em heterozigose ou homozigose, $P=0,0075$) (Gráfico 16). Esta associação não foi observada nos pacientes ou nos controles.

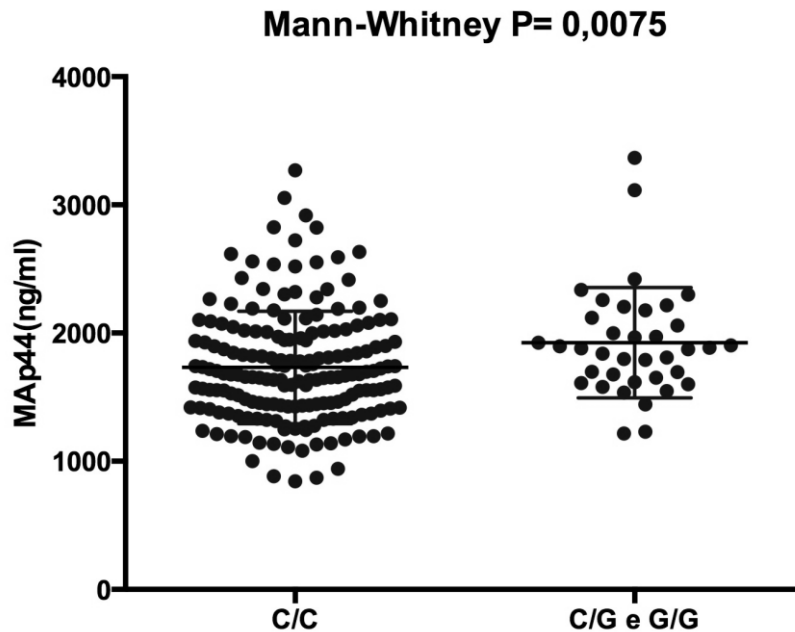


Gráfico 16. Concentrações de MAp44 e genótipos da variante *g.61897C>G* em dinamarqueses

A distribuição dos genótipos dos outros dois polimorfismos estudados no exon 12 não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Entre todas as variantes analisadas, *g.62223C>T* (rs1109452) foi a única que apresentou mais associação com as concentrações séricas das proteínas codificadas pelo gene *MASP1*. Esta variante se associou com concentrações mais baixas de MASP-1 nos controles (medianas: 5475 ng/mL em indivíduos sem o alelo *T* vs. 6561 ng/mL em indivíduos com o alelo *T* em heterozigose ou homozigose, $P=0,0081$), pacientes (medianas: 6603 ng/mL em indivíduos sem o alelo *T* vs. 7319 ng/mL em indivíduos com o alelo *T* em heterozigose ou homozigose, $P=0,038$) e também no grupo de dinamarqueses (medianas: 9711 ng/mL em indivíduos sem o alelo *T* vs. 10821 ng/mL em indivíduos com o alelo *T* em heterozigose ou homozigose, $P=0,015$) (Gráfico 17).

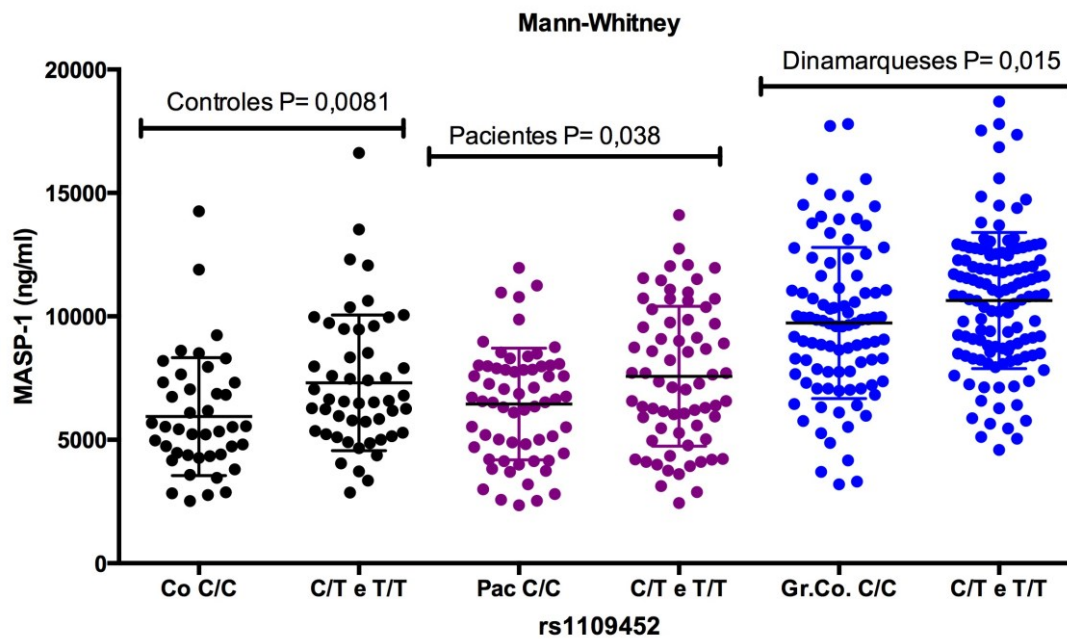


Gráfico 17. Genótipos da variante g.62223C>T e concentração de MASP-1 nos três grupos

O SNP rs1109452 também apresentou associação com níveis reduzidos da proteína MASP-3 em controles (medianas: 6373 ng/mL em indivíduos sem o alelo *T* vs. 5071 ng/mL em indivíduos com o alelo *T* em heterozigose ou homozigose, $P=0,0011$) e no grupo de dinamarqueses (medianas: 5513 ng/mL em indivíduos sem o alelo *T* vs. 4511 ng/mL em indivíduos com o alelo *T* em heterozigose ou homozigose, $P=0,0013$) (Gráfico 18). Entretanto, essa associação não ocorreu nos pacientes ($p=0.357$).

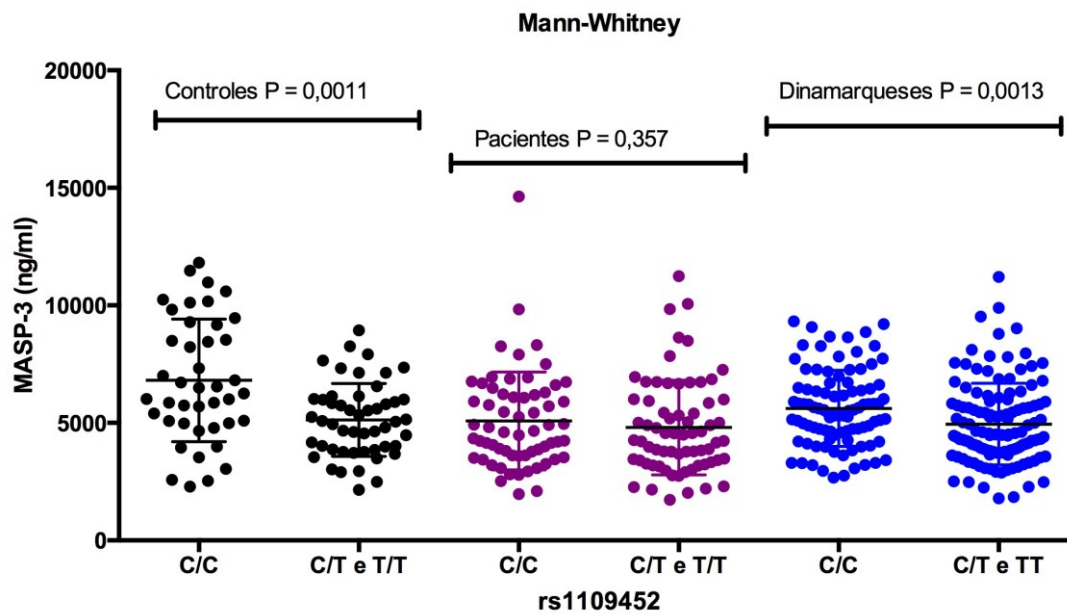


Gráfico 18. Genótipos da variante *g.62223C>T* e concentrações de MASP-3

A variante *g.62224G>A* (rs850314), localizada exatamente ao lado da variante rs1109452 (com a qual ocorre em desequilíbrio de ligação absoluto), não apresentou diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre os grupos. Porém, também apresentou associação com concentrações séricas da proteína MASP-3 nos controles (medianas: 5450 ng/mL em indivíduos sem o alelo A vs. 6373 ng/mL em indivíduos com o alelo A em heterozigose ou homozigose, $P=0,033$) e no grupo de dinamarqueses (medianas: 4741 ng/mL em indivíduos sem o alelo A vs. 5649 ng/mL em indivíduos com o alelo A em heterozigose ou homozigose, $P=0,0014$) (Gráfico 19). Entretanto, essa associação não foi observada nos pacientes ($p=0.41$).

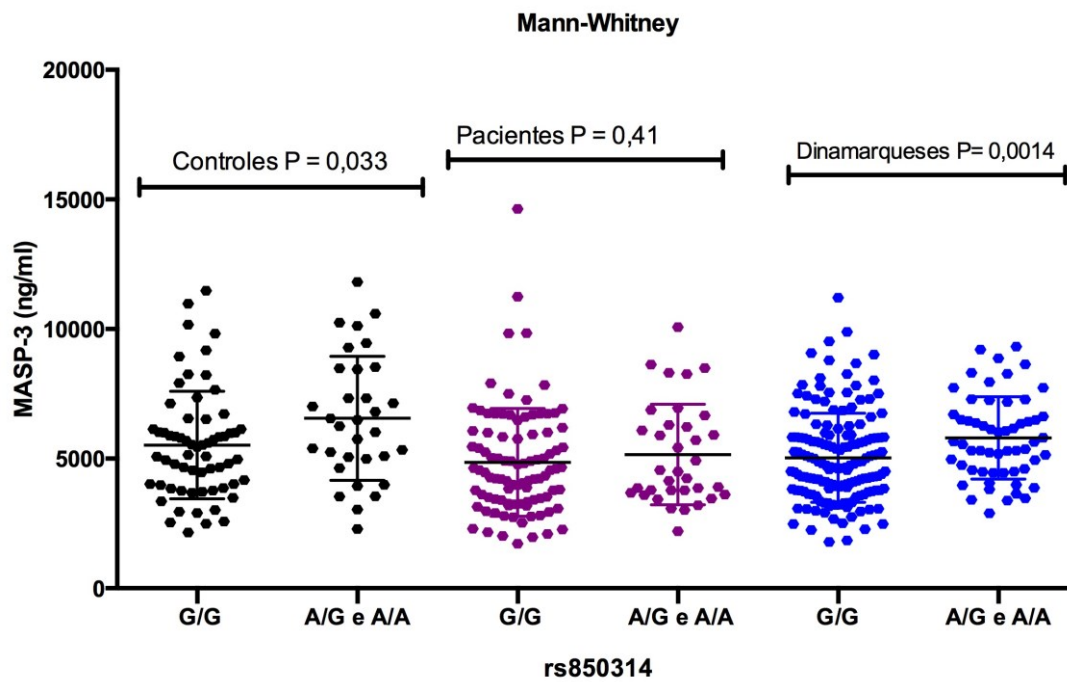


Gráfico 19. Genótipos da variante g.62224G>A e concentração de MASP-3

Segundo Ammitzbøll *et al* 2013, quatro SNPs localizados na região do exon 12, podem apresentar um efeito gene-dose sobre as concentrações das três proteínas (Tabela 14). Estes efeitos incluem concentrações de MASP-1 aumentadas quando as concentrações de MASP-3 e MAp44 estão diminuídas e vice-versa. Nesse trabalho (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013), os indivíduos analisados compreendem um grupo de 350 doadores de sangue dinamarqueses, dos quais os 190 controles dinamarqueses foram utilizados neste projeto.

Tabela 14. SNPs de *MASP1* estudados até o momento.

dnSNP	Região do gene	Associação com concentração sérica das proteínas	Referência
rs35089177	promotora	Maf– Níveis reduzidos de MASP-1 e elevados de MASP-3	#
rs76525133	promotora	Maf– Níveis reduzidos de MAp44	#
rs72549254	intron 01	Maf– Níveis reduzidos de MAp44	#
rs7609662	intron 01	n.a.	Presente trabalho
rs13064994	intron 01	Maf– Níveis reduzidos de MASP-3 em controles brasileiros	Presente trabalho
rs698090	exon 09	Maf– Níveis reduzidos de MASP-3 e elevados de MAp44	#
rs72549154	exon 12	Maf– Níveis reduzidos de MASP-1	#
rs67143992	exon 12	Maf– Níveis reduzidos de MASP-3 e elevados de MAp44	#
rs72549262	exon 12	n.a.	Presente trabalho
rs1109452	exon 12	Maf– Níveis elevados de MASP-1 e reduzidos de MASP-3	Presente trabalho
rs850314	exon 12	Maf– Níveis elevados de MASP-3	Presente trabalho

Legenda: # SNPs estudados por Ammitzbøll *et al.*, (2013) com um grupo contendo todas as mesmas amostras de controles dinamarqueses utilizadas neste trabalho; n.a.: Nenhuma associação observada.

Vários fatores indicam que os quatro SNPs analisados pelos autores são marcadores do mesmo fenômeno genético (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013). Este efeito gene-dose parece estar presente em indivíduos saudáveis, como os controles e no grupo comparação deste estudo, porém não ocorreu em infectados por *M. leprae*.

As três variantes do exon 12 analisada neste estudo encontram-se na região UTR do exon 12 no gene *MASP1* e portanto, poderia se esperar que não houvesse nenhuma associação gene-fenótipo. As diferenças observadas na concentração sérica de MASP-1, MASP-3 e MAp44 podem estar

relacionadas a outros fatores que extrapolam a teoria de falhas ou problemas na tradução gênica. Estas diferenças podem estar associadas a uma maior afinidade de microRNAs pelos polimorfismos rs1109452 e rs850314 na região não traduzida, levando à destruição do mRNA ou ao bloqueio da sua tradução, que pode ocorrer quando não há complementaridade perfeita entre a sequência do microRNA e o mRNA.

É interessante observar que este mecanismo de regulação pós-transcricional estaria de alguma forma sendo mais efetivo nos indivíduos controles e no grupo comparação. Outros estudos são necessários para investigar quais mecanismos de regulação estão funcionando de forma diferencial em pacientes com hanseníase.

5.5 Associação entre haplótipos do gene *MASP1* e concentrações séricas das proteínas.

Indivíduos controles com os alelos mais comuns para as cinco variantes, GC CCG-haplótipo que apresentou associação positiva com a susceptibilidade à hanseníase (Tabela 12), apresentaram associação com os níveis séricos de MAp44 ($P < 0,005$). Os níveis de MAp44 apresentam-se elevados na presença de GC CCG em heterozigose. No entanto, a mesma associação não foi observada em pacientes ou no grupo de dinamarqueses (Gráfico 20) (dados do grupo de dinamarqueses não mostrados). A associação com a presença destes alelos é independente da idade, único fator demográfico associado à doença (OR=1,72 [IC95%=1,21-2,45]; $P=0,003$).

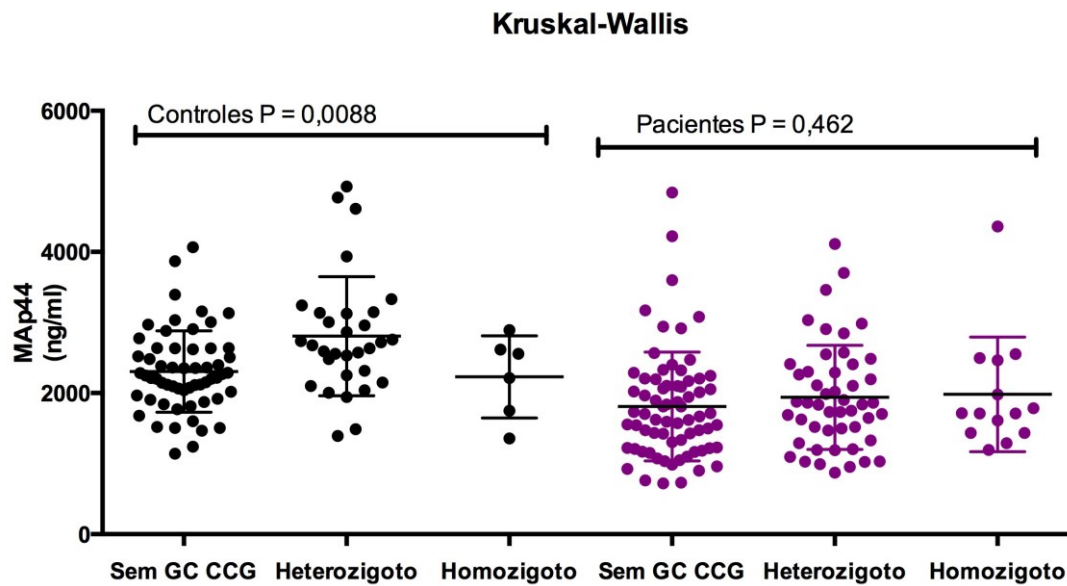


Gráfico 20. Presença e GC CCG em controles e pacientes

Não foi observada nenhuma associação com níveis séricos de MASP-3 ou MASP-1 e presença do haplótipo GC CCG. Conforme relatado no item 5.2, este bloco tem frequência significativamente maior nos pacientes, porém sem associação com concentrações séricas das três proteínas. Segundo Ammitzbøll, 2013, os quatro SNPs localizados na região do exon 12 analisados em seu trabalho, podem apresentar um efeito de dosagem gênica sobre as concentrações das três proteínas, tal como as concentrações de MASP-1 aumentadas, quando as concentrações de MASP-3 e MASP-44 estão diminuídas e vice-versa (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013). Este efeito de dosagem gênica parece estar presente com mais intensidade em controles e no grupo de dinamarqueses conforme observamos neste trabalho.

A distribuição do haplótipo das três variantes do exon 12 (*g.61897C>G*, *g.62223C>T* e *g.62224G>A*), apresentou associação com os níveis séricos de MASP-3 nos controles ($P < 0,05$) e no grupo de dinamarqueses ($P < 0,05$) (gráfico 21)

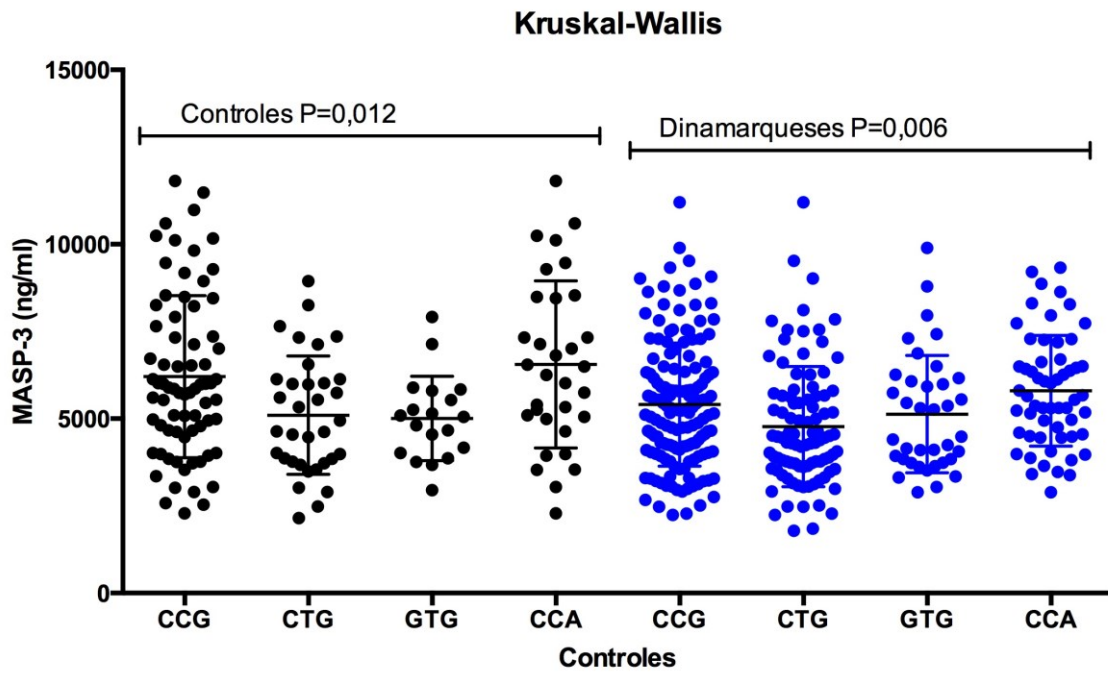


Gráfico 21. Haplótipos do exon 12 e concentração sérica de MASP-3

Os níveis de MASP-3 foram significativamente diferentes entre os diferentes genótipos das variantes do intron 01 nos indivíduos dinamarqueses apresentaram níveis elevados de MASP-3 (medianas: 6032 ng/mL em indivíduos *GT/AC* vs. 5201 ng/mL em outros) (Gráfico 22).

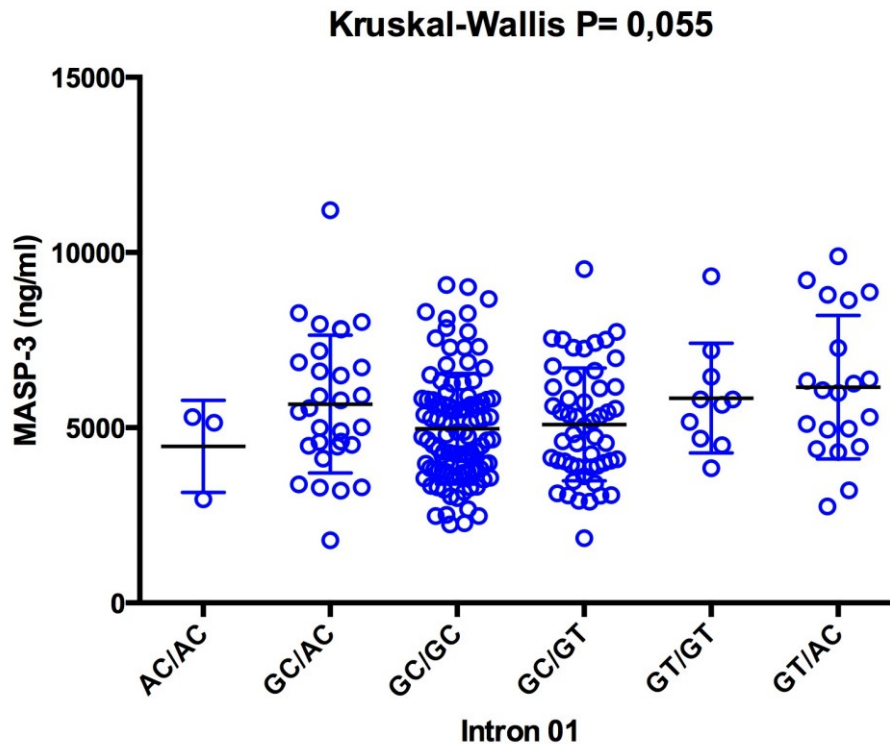


Gráfico 22. Genótipos das variantes do intron 01 e concentração de MASP-3

Da mesma forma uma tendência a associação foi observada nos genótipos de intron 01 e concentrações séricas de MASP-3 nos controles (P=0,095).

A distribuição dos genótipos das variantes do exon 12 também apresentou associação com as concentrações séricas de MASP-3 nos controles (P=0,024) (Gráfico 23). Esta diferença está sendo provavelmente determinada pela presença do alelo T em g.62223C>T (rs1109452), polimorfismo que apresentou mais associações com MASP-3 quando analisado isoladamente.

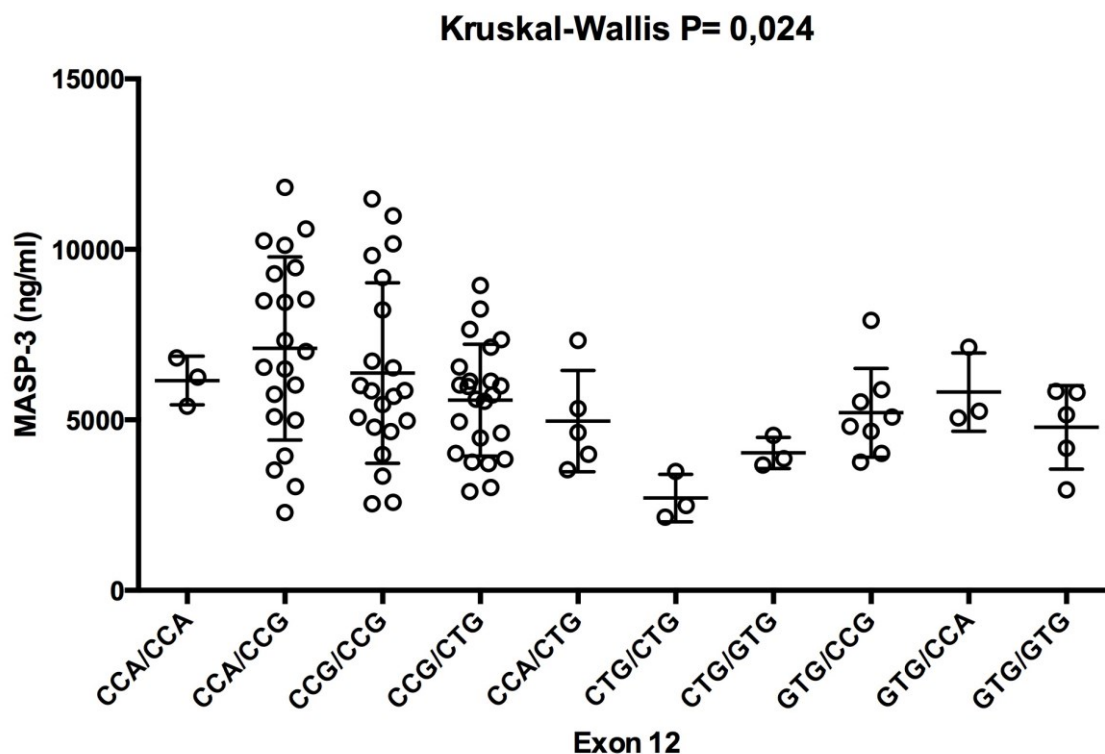


Gráfico 23. Genótipos de variantes do Exon 12 em controles

Não houve nenhuma diferença nas concentrações séricas de MASP-1 e MASP-3 relacionadas as variantes do exon 12 nos controles. Também não foi observada nenhuma associação com nenhuma das três proteínas nos outros grupos.

Os resultados obtidos aliados a outros trabalhos, corroboram com a hipótese que a infecção pelo *M. leprae* envolve uma combinação de fatores tanto imunológicos como genéticos, e que vários genes, incluindo genes da via das lectinas como *MBL2*, *FCN2* (DE MESSIAS-REASON et al., 2007), *MASP2* (BOLDT et al., 2013) e *MASP1* participam no processo da infecção pelo *M. leprae* e na progressão clínica da hanseníase.

6 – CONCLUSÕES

- A PCR-SSP multiplex otimizada neste trabalho permitiu a haplotipagem física de cinco variantes do gene *MASP1* em apenas quatro reações.
- Níveis de MASP-1 >7000 ng/mL estão negativamente associados com a hanseníase *per se*, independentemente da idade
- Níveis reduzidos de MASP-3 e Map44 estão associados com a susceptibilidade à hanseníase *per se* e com a forma lepromatosa da doença.
- As concentrações de MAp44 e MASP-3 se correlacionaram positivamente.
- *MASP1*8795C* (rs13064994) se associou com concentrações elevadas de MASP-3 nos controles.
- Foi observada uma associação positiva entre o haplótipo de *MASP1 GC CCG* e a susceptibilidade à hanseníase *per se*, e a presença deste bloco está associada com níveis séricos reduzidos de MAp44 nos controles
- A variante *MASP1*61897G* se relacionou com concentrações mais elevadas de MAp44 em Dinamarqueses.
- A variante *g.62223T* (rs1109452) apresentou associação com concentrações reduzidas de MASP-3 e aumentadas de MASP-1 (exceto em pacientes).
- A variante *g.62224A* (rs850314) se associou a níveis aumentados de MASP-3 (exceto em pacientes)
- O haplótipo formado pelas variantes do exon 12 se relacionou com as concentrações séricas de MASP-3 em controles e dinamarqueses, assim como a distribuição genotípica destas variantes em controles (P=0,024).

Estes resultados levam-nos a sugerir que polimorfismos do gene *MASP1* podem modular a concentração das proteínas MASP-1, MASP-3 e MAp44 no soro e influenciar a susceptibilidade à hanseníase *per se*, assim como a progressão para as diferentes formas clínicas, e que as proteínas MAp44 e MASP-3 desempenham um papel importante nesse processo.

10. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Immunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABEL, L.; DEMENAIIS, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. **American journal of human genetics**, v. 42, n. 2, p. 256–66, fev. 1988.

ALCAÏS, A. et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 1, p. 44–8, fev. 2005.

ALTER, A. et al. Leprosy as a genetic disease. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 22, n. 1-2, p. 19–31, fev. 2011.

AMBRUS, G. et al. Natural Substrates and Inhibitors of Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-1 and -2: A Study on Recombinant Catalytic Fragments. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1374–1382, 1 fev. 2003.

AMMITZBØLL, C.; STEFFENSEN, R.; NIELSEN, H. Polymorphisms in the MASP1 gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MASP44. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73317, jan. 2013.

ARAÚJO, M. G.; RESUMO, A. Hanseníase no Brasil Leprosy in Brazil. v. 36, n. 3, p. 373–382, 2005.

BELTRAME, M. H. et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in pediatrics**, v. 2, n. January, p. 148, jan. 2014.

BOLDT, A B. W. et al. Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. **Genes and immunity**, v. 7, n. 5, p. 393–400, jul. 2006.

BOLDT, A. B. W. et al. Leprosy association with low MASP-2 levels generated by MASP2 haplotypes and polymorphisms flanking MASP19 exon 5. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69054, jan. 2013.

BOLDT, A. B. W.; LUZ, P. R.; MESSIAS-REASON, I. J. T. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 140, n. 1, p. 63–70, jul. 2011.

BROWN, K. S. et al. Severe fibrosis in hepatitis C virus-infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex. **Clinical and experimental immunology**, v. 147, n. 1, p. 90–8, jan. 2007.

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. **The journal of infectious diseases**, v. 204, n. 8, p. 1256–63, 15 out. 2011.

CASANOVA, J.-L.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 581–620, jan. 2002.

CATARINO, S. J. D. S. et al. Association of MASP2 polymorphisms and protein levels with rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Human immunology**, v. 75, n. 12, p. 1197–202, dez. 2014.

CHARLES C. SHEPARD; The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice, United States. n. 1, 1960.

CUNHA, R. S. et al. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. **Leprosy Review** n. 29, p. 357–366, 2004.

DAVIDSON, B., Abeler, V.M., Førsund, M., Holth, A., Yang, Y., Kobayashi, Y., Chen, L., Kristensen, G.B., Shih, I.-M., Wang, T.-L., 2014. Gene expression signatures of primary and metastatic uterine leiomyosarcoma. **Human pathology**. 45, 691–700. doi:10.1016/j.humpath.2013.11.003

DE MESSIAS-REASON, I. J. et al. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. **The journal of infectious diseases**, v. 196, n. 9, p. 1379–85, 1 nov. 2007.

DE MESSIAS- REASON, I.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. Functional Haplotypes That Produce Normal Ficolin- 2 Levels Protect against Clinical Leprosy. **The journal of infectious diseases**, v. 199, n. 6, p. 801–804, 15 mar. 2009.

DEGN, S. E. et al. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 11, p. 7371–8, 1 dez. 2009.

DEGN, S. E. et al. Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. **Journal of immunological methods**, v. 361, n. 1-2, p. 37–50, 30 set. 2010.

DEGN, S. E. et al. MASP-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, while neither MASP-1 nor MASP-3 are required for alternative pathway function. **Immunobiology**, v. 217, n. 11, p. 1218–1219, 15 out. 2012.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. **American journal of human genetics**, v. 88, n. 6, p. 689–705, 10 jun. 2011.

DOBÓ, J. et al. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. **Molecular immunology**, p. 1–10, 13 jun. 2014.

DOCKRELL, H. M. et al. Induction of Th1 Cytokine Responses by Mycobacterial Antigens in Leprosy. **Infection and Immunity** v. 64, n. 10, p. 4385–4389, 1996.

DORNELLES, L. N.; PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clinical and experimental immunology**, v. 145, n. 3, p. 463–8, set. 2006.

EL SAADANY, S. A. et al. Fibrosis severity and mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex in HCV-infected patients. **Arab journal of gastroenterology : the official publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology**, v. 12, n. 2, p. 68–73, jun. 2011.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FRASER, D. A.; TENNER, A. J. NIH Public Access. v. 185, n. 7, p. 3932–3939, 2012.

FRAUENKNECHT, V. et al. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. **Clinical and experimental immunology**, v. 173, n. 1, p. 112–20, jul. 2013.

GABORIAUD, C. et al. The serine protease domain of MASP-3: enzymatic properties and crystal structure in complex with ecotin. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67962, jan. 2013.

GOELDNER, I. et al. Mannose Binding Lectin and Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Brazilian Patients and Their Relatives. **Plos One** v. 9, n. 4, 2014.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HAERYNCK, F. et al. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. **Human immunology**, v. 73, n. 11, p. 1175–1183, nov. 2012.

HAN, X. Y. et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **American journal of clinical pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–64, dez. 2008.

HÉJA, D. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 10498–503, 26 jun. 2012.

HOTEZ, P. J. Neglected diseases and poverty in “The Other America”: the greatest health disparity in the United States? **PLoS neglected tropical diseases**, v. 1, n. 3, p. e149, jan. 2007.

INGELS, C. et al. Lectin pathway of complement activation and relation with clinical complications in critically ill children. **Pediatric research**, v. 75, n. 1-1, p. 99–108, jan. 2014.

IWAKI, D. et al. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 7, p. 3751–8, 1 out. 2011.

JANEWAY C.A.; TRAVERS, P. *Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença.* Porto Alegre: Artes Médicas. 2002

KJAER, T. R.; THIEL, S.; ANDERSEN, G. R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. **Molecular immunology**, v. 56, n. 4, p. 413–22, dez. 2013.

LÁZARO, F. P. et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. **The journal of infectious diseases**, v. 201, n. 10, p. 1598–605, 15 maio 2010.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, out. 2009.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, S. Public Health Reviews Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. v. 013730, n. 04, 2005.

MARMOR, M. F.; MARMOR, M. F. HISTORY OF OPHTHALMOLOGY **The Ophthalmic Trials of G . H . A . Hansen**. v. 47, n. 3, 2002.

MATSUO, E. Leprosy as a Challenge to Science on the Ability to Decode Its Enigma . A Hypothesis on How to Respond. p. 59–64, 2005.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Cutting Edge: Complement-Activating Complex of Ficolin and Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. **The journal of immunology**, v. 164, n. 5, p. 2281–2284, 1 mar. 2000.

MATTOS, K. A et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 6, p. 797–815, jun. 2014.

MCDUGALL, A. C.; REES, R. J. W. Airborne infection with Mycobacterium Leprae in mice. **Medical Microbiology** v. 63, n. July 1976, p. 63–68, 1977.

MEGYERI, M. et al. Complement Protease MASP-1 Activates Human Endothelial Cells: PAR4 Activation Is a Link between Complement and Endothelial Function. **The journal of immunology**, v. 183, n. 5, p. 3409–3416, 10 ago. 2009.

MEIMA, A. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. **Bulletin of the World ...**, v. 003632, n. 03, 2004.

MEYERS, M.; WALSH, P. Naturally Acquired Banded Armadillo: I 975-i Leprosy in the Nine- A Decade of Experience. v. 656, p. 645–656, 1986.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Hanseníase**. Brasília-DF, 2010.

MIRA, M. T. et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 412–5, mar. 2003.

MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Letters to Nature** v. 427, n. February, p. 636–640, 2004.

MISCH, E. A et al. Leprosy and the human genome. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 4, p. 589–620, dez. 2010.

MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282–9, dez. 2009.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: A five group system. **International Journal of Leprosy** , v. 34, p. 255-273, 1966.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 11, n. 6, p. 464–70, jun. 2011.

ROORYCK, C. et al. Europe PMC Funders Group Mutations in the lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. **Nature Genetics** v. 43, n. 3, p. 197–203, 2011.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing Heterozygote Excess. **Genetic Society of America** v. 1419, p. 1413–1419, 1995.

SAEED, A et al. Mannan binding lectin-associated serine protease 1 is induced by hepatitis C virus infection and activates human hepatic stellate cells. **Clinical and experimental immunology**, v. 174, n. 2, p. 265–73, nov. 2013.

SALLENBACH, S. et al. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). **Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology**, v. 22, n. 4, p. 424–30, jun. 2011.

SASAKI, S.; TAKESHITA, F.; OKUDA, K. *Mycobacterium leprae* and Leprosy : A Compendium. **Microbiology and Immunology** v. 45, n. 11, p. 729–736, 2001.

SAUER, M. E. D. et al. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. **Clinics in dermatology**, v. 33, n. 1, p. 99–107, 2015.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **The journal of experimental medicine**, v. 174, n. 5, p. 1031–8, 1 nov. 1991.

SETIA, M. S. et al. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. v. 6, n. March, 2006.

SIRMACI, A. et al. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of carnevale, malpuech, OSA, and michels syndromes. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, n. 5, p. 679–686, 12 nov. 2010.

SKJOEDT, M.-O. et al. MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 921–31, nov. 2010.

STRAM, D. O. Tag SNP selection for association studies. **Genetic epidemiology**, v. 27, n. 4, p. 365–74, dez. 2004.

TAKAHASHI, M. et al. Mannose-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease (MASP)-1 Contributes to Activation of the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6132–6138, 18 abr. 2008.

TAKAHASHI, M. et al. The Study of MASPs Knockout Mice. 2012.

TENNER, A. J. et al. Mannose Binding Protein (MBP) Enhances Mononuclear Phagocyte Function via a Receptor that Contains the 126,000 Mr, Component of the C1q Receptor. **Immunity** v. 3, p. 485–493, 1995.

THIEL, S. et al. Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. **Clinical and experimental immunology**, v. 169, n. 1, p. 38–48, jul. 2012.

TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188–94, 22 jun. 2002.

TRUMAN, R. W. et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626–33, 28 abr. 2011.

WALLACE, C.; CLAYTON, D.; FINE, P. Estimating the relative recurrence risk ratio for leprosy in Karonga District , **Leprosy Review Malawi**. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO – Leprosy today**. Genebra, Suíça: WHO Press; 2010. Disponível em < <http://www.who.int/lep/en/> >. Acesso em 10/07/2012.

ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ...105

ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



Curitiba, 30 de agosto de 2002.

Ilmo (a) Sr. (a)
Anna Carolina de Moraes Braga
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o **Adendo I** ao do Projeto de Pesquisa
**"AVALIAÇÃO DE MECANISMO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS FORMAS
TUBERCULÓIDE E LEPROMATOSA DA HANSENÍASE"**, foi analisado e aprovado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27
de agosto de 2002, e está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela
Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.
Protocolo CEP-HC 497.079/2002-06

Atenciosamente,



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Serres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS EM PLACA DE 96 POÇOS PARA QUANTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA TRIFMA	107
---	-----

APÊNDICE 1 – Esquema ilustrativo da distribuição das amostras em uma placa de 96 poços para a realização da quantificação sorológica de proteínas através do TRIFMA.

STD = Standard (Amostras para curva de concentrações).

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1	STD 1	STD 2	STD 2	STD 3	STD 3	STD 4	STD 4	STD 5	STD 5	STD 6	STD 6
B	STD 7	STD 7	STD 8	STD 8	Tampão	Tampão	Controle 01	Controle 01	Controle 02	Controle 02	Controle 03	Controle 03
C	Controle 04	Controle 04	Amostra 01	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 03	Amostra 04	Amostra 04	Amostra 05	Amostra 05
D	Amostra 06	Amostra 06	Amostra 07	Amostra 07	Amostra 08	Amostra 08	Amostra 09	Amostra 09	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 11
E	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 17
F	Amostra 18	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 19	Amostra 20	Amostra 20	Amostra 21	Amostra 21	Amostra 22	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 23
G	Amostra 24	Amostra 24	Amostra 25	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 28	Amostra 29	Amostra 29
H	Amostra 30	Amostra 30	Amostra 31	Amostra 31	Amostra 32	Amostra 32	Amostra 33	Amostra 33	Amostra 34	Amostra 34	Amostra 35	Amostra 35