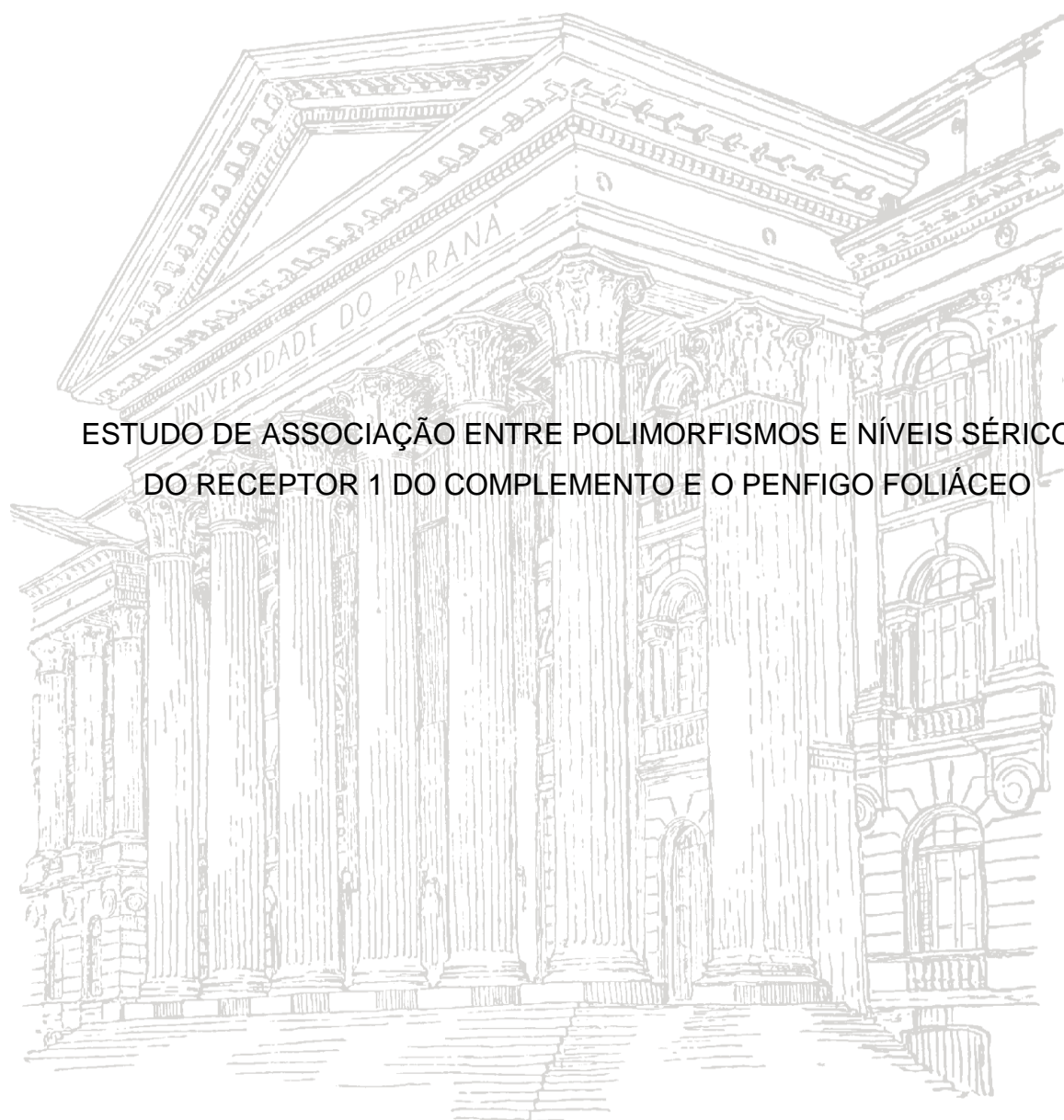


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA CAROLINE OLIVEIRA

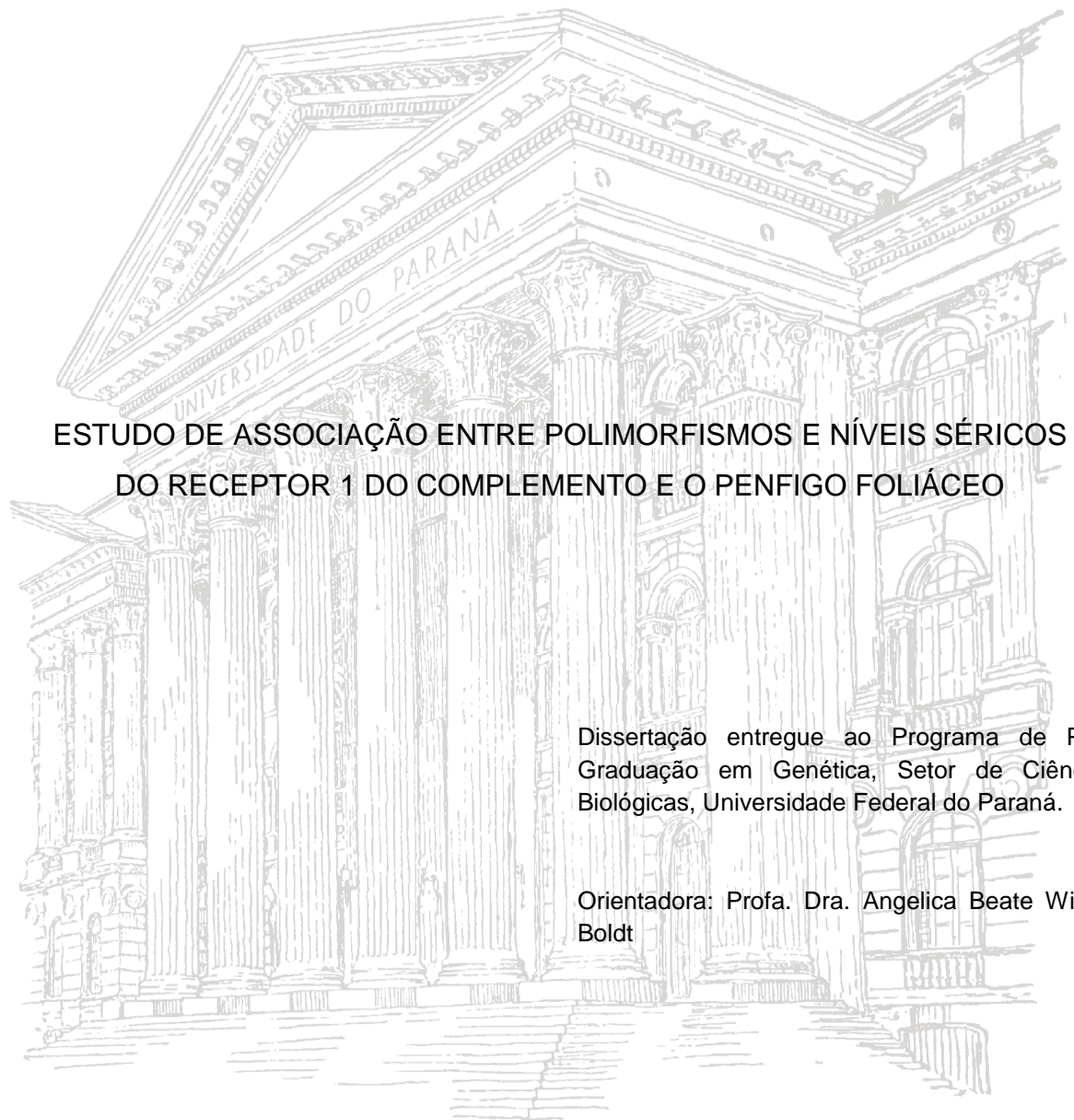


ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E NÍVEIS SÉRICOS  
DO RECEPTOR 1 DO COMPLEMENTO E O PENFIGO FOLIÁCEO

CURITIBA

2015

LUANA CAROLINE OLIVEIRA



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E NÍVEIS SÉRICOS  
DO RECEPTOR 1 DO COMPLEMENTO E O PENFIGO FOLIÁCEO

Dissertação entregue ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

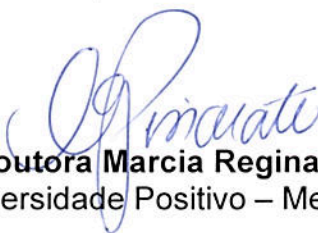
CURITIBA

2015

## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **LUANA CAROLINE OLIVEIRA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata. Secretária da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

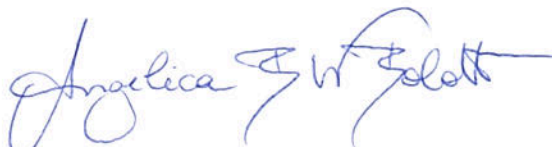
Curitiba, 30 de setembro de 2015



**Doutora Marcia Regina Pincerati**  
Universidade Positivo – Membro Titular



**Doutor Danilo Gardenal Augusto**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



**Doutora Angelica Beate Winter Boldt**  
Universidade Federal do Paraná – Presidente da Banca

Visto



**Profª Drª Lupe Furtado Alle**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Aos meus pais e a minha irmã Camila.

Ao meu melhor amigo e companheiro Johnny.

Aos pacientes.

Obrigada

## AGRADECIMENTOS

A Deus o meu guia espiritual, a quem eu recorri nos momentos de dúvidas, angústias e medo, mas também nas alegrias e vitórias.

A minha orientadora Angélica, serei eternamente grata pela oportunidade de ser sua orientada. Obrigada pelos ensinamentos, elogios, críticas, motivação, entusiasmo e por sempre depositar confiança em mim.

As professoras Luiza, Karin e Dani, por todos os ensinamentos de imunogenética e discussões nas reuniões do laboratório. É um privilégio fazer parte do LGMH.

Aos meus queridos amigos e colegas do lab: Aninha, Amanda, Andressa 1 e 2, Áurea, Carol 1 – 5, Débora 1 e 2, Danillo, Eduardo, Eleonora, Gabi (ela), Gabi (ele), Li, Luciana, Mari, Maria, Max, Renata, Rodrigo, Sara, Sheyla, Tici, Vanessa e Vero, é muito divertido e prazeroso trabalhar com vocês, obrigada por todas as dicas e ajuda.

Agradeço em especial a Gabi pela amizade, pelas risadas, por toda ajuda, pela intensa parceria com o *CR1* e pelas incansáveis tentativas de otimizações das nossas multiplex tripolares. Andressa minha IC estrelinha, obrigada por todas as vezes que me acalmou, escutou e aconselhou, pelas risada e por toda ajuda. Carol muito obrigada pela sua amizade, por todas as dicas e ajuda com as minhas análises, pela paciência e por sempre me atender quando as dúvidas apareciam (e não foram poucas), torço muito por você e admiro a sua determinação.

As cientetes: Sandra, Márcia, Tamy, Kárita e Hellen, pelo carinho e amizade.

Ao professor Renato Nishihara, obrigada pela paciência e por toda a ajuda com o ELISA.

A todos os pacientes e controles de pênfigo foliáceo, que aceitaram participar dos estudos do LGMH.

Aos meus amigos, Leonel, Ana, Lilian obrigada por entenderem a minha ausência e por todo o apoio.

Ao grupinho do Senhora, é sempre muito divertido e especial estar com vocês. Vocês são a minha segunda família!

Aos meus pais e a minha irmã, os grandes responsáveis por tudo o que conquistei até hoje. Obrigada pelo apoio e amor incondicional, vocês são o meu

porto seguro. Em especial a minha mãe, obrigada por sempre estar ao meu lado e por ter me convencido a fazer aquela prova, se estou aqui é porque você sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos.

Ao Johnny, meu amigo e companheiro, meu amorzinho, que sempre me motiva e acredita em mim. Obrigada por cada conselho, cada palavra de incentivo, por todo o cuidado e carinho que você tem por mim, além da paciência sem fim pra escutar as minhas reclamações. E como não poderia faltar por cada programa instalado e por cada vírus eliminado do meu computador.

*“Permaneçei firmes e adiante.*

*Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários”*

Madre Paulina

## RESUMO

Pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune endêmica no Brasil, caracterizada pela presença de anticorpos contra a desmogleína 1, causando acantólise e bolhas epidérmicas. O Receptor 1 do complemento (*CR1*) inibe a ativação do complemento, podendo bloquear o rompimento das junções desmossômicas. A fim de avaliar o impacto funcional de *CR1* na susceptibilidade ao PF, utilizamos Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores Sequência Específicos (PCR-SSP), simples e multiplex, com a estratégia de haplotipar fisicamente nove polimorfismos de *CR1*: rs6656401 no intron 4, rs3849266 no intron 21, rs2274567 no exon 22 – p.H1208R, rs3737002 no exon 26 – p.T1408M, rs11118131 no intron 26, rs11118167 no intron 28, rs17047660 no exon 29 – p.K1590E, rs4844610 e rs12034383 no intron 37. Nós identificamos os alelos de *CR1*, distribuídos em treze haplótipos, em até 282 pacientes PF e 214 controles e quantificamos os níveis de *CR1* solúvel (sCR1) em um subgrupo de 53 pacientes e 27 controles. Encontramos associação dos alelos menores de dois polimorfismos, rs3737002 codifica p.1408Met, responsável pelo grupo sanguíneo KCam (OR=0,55, p=0,006) e rs3849266 no intron 21 (OR=0.66, p=0.046) com a proteção ao PF. Nós também encontramos o rs17047660 (codifica p.1590Glu, responsável pelo grupo sanguíneo McCoy), associado com a susceptibilidade (OR = 2,99, p = 0,033) ao PF, respectivamente. Nós também observamos que pacientes em remissão ou com lesões localizadas em tratamento tem níveis mais elevados de sCR1 comparados aos controles (p=0,01 e p=0,006, respectivamente). Entre os pacientes com lesão, os pacientes sob tratamento têm níveis mais elevados de sCR1 (p= 0,002). Entre aqueles em tratamento, os pacientes com lesões localizadas têm níveis mais elevados de sCR1 do que pacientes com lesões generalizadas (p = 0,0004). Em conclusão, os polimorfismos de *CR1* estão associados com susceptibilidade à doença. O tratamento com corticóide parece aumentar os níveis séricos de sCR1, e níveis mais altos podem desempenhar um papel anti-inflamatório e protetor em indivíduos com pênfigo foliáceo endêmico PFE.

**Palavras chaves:** pênfigo foliáceo endêmico, autoimunidade, polimorfismos de *CR1*, sCR1.



## ABSTRACT

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease endemic in Brazil, characterized by the presence of autoantibodies against desmoglein-1, causing acantholysis and epidermal blisters. Complement receptor 1 (*CR1*) inhibits complement activation, which may block disruption of desmosomal junctions. In order to evaluate the functional impact of *CR1* on the susceptibility to PF, we used sequence-specific PCR, simple and multiplex, in a strategy to physically haplotype nine *CR1* polymorphisms: rs6656401 in intron 4, rs3849266 in intron 21, rs2274567 in exon 22 – p.H1208R, rs3737002 in exon 26 – p.T1408M, rs11118131 in intron 26, rs11118167 in intron 28, rs17047660 in exon 29 – p.K1590E, rs4844610 and rs12034383 in intron 37. We identified *CR1* alleles, distributed in thirteen haplotypes, in up to 282 PF patients and 214 controls and measured levels of soluble CR1 (sCR1) in a subset of 53 patients and 27 controls. We found an association of the minor alleles of two polymorphisms, rs3737002 encoding p.1408M, responsible for the KCam blood group (OR=0.55, p=0.006) and rs3849266 in intron 21 (OR=0.66, p=0.046) with protection against PF. We also found the rs17047660 (encoding p.1590E, responsible for the McCoy blood group), associated with susceptibility to PF (OR=2.99, p=0.033). Carriage of least one of two haplotypes encoding the KCam (but not the McCoy blood group antigen) was associated with protection against the disease (OR=0.56, p=0.009). We also observed that patients in remission or with localized lesions but under treatment had higher levels of sCR1, compared with controls (p=0.01 and p=0.006, respectively). Among patients with lesions, those under treatment had higher sCR1 levels (p=0.02). Among those under treatment, patients with localized lesions had higher sCR1 levels than patients with generalized lesions (p=0.0004). In conclusion, *CR1* polymorphisms were associated with protection and disease susceptibility. Corticoid treatment seemed to increase sCR1 serum level, and higher levels may play a anti-inflammatory protective role in individuals with EPF.

**Keywords:** pemphigus foliaceus, autoimmunity, *CR1* polymorphism, sCR1.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças da acantólise de pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV)...	16
Figura 2: Estrutura do desmossomo .....	17
Figura 3: Estrutura molecular do ectodomínio da DSG1 e DSG3 .....	18
Figura 4: Três vias de ativação do sistema complemento.....	25
Figura 5: Receptores de complemento, respectivos fragmentos C3 ligantes e expressão em células.....	27
Figura 6: Transcritos do gene <i>CR1</i> . .....	32
Figura 7: Estrutura do Receptor de Complemento tipo 1 (CR1).....	37
Figura 8: Estrutura dos 30 CCPs (SCRs) que compõem a porção extracelular do CR1.....	37
Figura 9: Regulação da cascata do complemento e de complexos imunes por CR1 .....	39
Figura 10: Desequilíbrio de ligação entre polimorfismos comuns do gene <i>CR1</i> em populações do projeto HapMap.....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Transcritos do gene <i>CR1</i> .....	31
Tabela 2: Frequência das variantes alotípicas de <i>CR1</i> em diferentes populações. ...	33
Tabela 3: Antígenos do grupo sanguíneo Knops .....	34
Tabela 4: Variantes de <i>CR1</i> associadas a doenças.....	43
Tabela 5: Frequência alélica dos SNPs de <i>CR1</i> selecionados.....	95
Tabela 6: Caracterização da amostra de controles e pacientes para a análise dos níveis séricos da proteína CR1. ....	95
Tabela 7: Análises de associação e frequências alélicas, genotípicas e de portadores para os SNPs de <i>CR1</i> .....	98
Tabela 8: Análises estratificadas para os SNPs epistáticos de <i>CR1</i> em EU.....	101
Tabela 9- Análises de associações e frequências dos haplótipos formados pelos 2 SNPs epistáticos de <i>CR1</i> (rs11118167- rs12034383).....	102
Tabela 10: Análises de associações e frequências dos haplótipos formados pelos 9 SNPs de <i>CR1</i> (rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs3737002, rs11118131, rs11118167, rs17047660, rs4844610 e rs12034383).....	103

## LISTA DE ABREVIações

<b>C</b>	<i>Complement (Complemento)</i>
<b>CCP</b>	<i>Complement Control Protein (Repetições de Proteínas Controladoras do Complemento)</i>
<b>CM</b>	<i>Cytoplasmic Membrane (Membrana Citoplasmática)</i>
<b>CR1</b>	<i>Complement Receptor 1 (Receptor 1 do Complemento)</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)</i>
<b>dNTP</b>	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxinucleotídeo Trifosfatado)</i>
<b>DP</b>	<i>Desmoplakin (Desmoplaquina)</i>
<b>DSC</b>	<i>Desmocollin (Desmocolina)</i>
<b>DSG</b>	<i>Desmoglein (Desmogleína)</i>
<b>ECR1</b>	<i>Erythrocyte Complement Receptor 1 (Receptor 1 do Complemento associado a Eritrócitos)</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)</i>
<b>FCN</b>	<i>Ficolin (Ficolina)</i>
<b>fH</b>	<i>Factor H (Fator H)</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte antigen (Antígenos Leucocitários Humanos)</i>
<b>HW</b>	<i>Hardy Weinberg</i>
<b>IC</b>	<i>Immune Complex (Complexos Imunes)</i>
<b>IDP</b>	<i>Inner Dense Plaque (Placa Interior Densa)</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gama</i>
<b>Ig</b>	<i>Immunoglobuline (Imunoglobulinas)</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin (Interleucinas)</i>
<b>KIF</b>	<i>Keratin Intermediate Filaments (Filamentos Intermediários de Queratina)</i>
<b>LHR</b>	<i>Long Homologous Repeats (Longas Repetições Homólogas)</i>
<b>MAF</b>	<i>Minor Allele Frequency (Frequência do alelo menos comum)</i>
<b>MASP</b>	<i>Mannose Biding Lectin Associated Serina Protease (Serina Protease Associada à MBL)</i>
<b>MBL</b>	<i>Mannose Biding Lectin (Lectina Ligante de Manose)</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal De Histocompatibilidade)</i>
<b>ODP</b>	<i>Outer Dense Plaque (Placa Externa Densa)</i>
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio (Razão de Chance)</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction (Reação de Cadeia Polimerase)</i>
<b>PCR-SSP</b>	<i>Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores Sequência Específicos)</i>
<b>PF</b>	<i>Pemphigus Foliaceus (Pênfigo Foliáceo)</i>
<b>PFE</b>	<i>Endemic Pemphigus Foliaceus (Pênfigo Foliáceo Endêmico)</i>
<b>PG</b>	<i>Plakoglobin (Placoglobina)</i>
<b>PKP</b>	<i>Plakophilins (Placofilina)</i>
<b>PV</b>	<i>Pemphigus Vulgaris (Pênfigo Vulgar)</i>
<b>RCA</b>	<i>Regulators of Complement Activation (Reguladores de Ativação do Complemento)</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)</i>
<b>SCR</b>	<i>Short Consensus Repeats (Curtas Repetições Consenso)</i>
<b>sCR1</b>	<i>Soluble Complement Receptor 1 (Receptor 1 do Complemento solúvel)</i>

**SNP** *Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)*  
**TCR** *T-Cell Receptor (Receptores de Célula T)*  
**Th2** *T helper Cell 2 (Células T auxiliares tipo 2)*  
**uCR1** *urine Complement Receptor1 (Receptor 1 do Complemento na urina)*  
**VSIG4** *V-Set and Immunoglobulin Domains-Containing Protein 4 (Proteína 4 contendo o conjunto V e domínios de imunoglobulina)*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1	PÊNFIGO FOLIÁCEO .....	15
	2.1.1 <i>Subtipos e aspectos clínicos</i> .....	15
	2.1.2 <i>Histopatologia e imunopatologia</i> .....	17
	2.1.3 <i>Epidemiologia</i> .....	19
	2.1.4 <i>Etiologia e fatores ambientais</i> .....	20
	2.1.5 <i>Fatores Genéticos</i> .....	21
	2.1.6 <i>Tratamento</i> .....	22
2.2	SISTEMA COMPLEMENTO .....	22
	2.2.1 <i>Complemento e pênfigo</i> .....	25
2.3	RECEPTORES DE COMPLEMENTO .....	26
2.4	PROTEÍNAS REGULADORAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO .....	28
2.5	GENE CR1 29	
	2.5.1 <i>Estrutura e regulação</i> .....	29
	2.5.2 <i>Polimorfismo do gene CR1</i> .....	33
2.6	MOLÉCULA CR1 .....	35
	2.6.1 <i>Estrutura</i> .....	35
	2.6.2 <i>Função</i> .....	37
	2.6.3 <i>Expressão de CR1</i> .....	39
	2.6.4 <i>Associação entre CR1 e doenças</i> .....	41
3	HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA.....	45
4	OBJETIVOS.....	46
4.1	OBJETIVO GERAL .....	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
5	ARTIGO.....	47
6	DISCUSSÃO FINAL .....	73
7	CONCLUSÕES .....	77
	APÊNDICE 94	
	ANEXO 1 - FICHA DE AVERIGUAÇÃO - PÊNFIGO .....	104
	ANEXO 2- FICHA DE AVERIGUAÇÃO - CONTROLES .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

O pênfigo é um grupo de doenças autoimunes órgão-específicas caracterizadas pela formação de bolhas na camada superficial da epiderme, decorrentes da perda de adesão entre os queratinócitos (acantólise) e pela produção de autoanticorpos contra as caderinas desmossômicas desmogleína 1 (DSG1), molécula constituinte dos desmossomos e importante no processo de adesão celular (CULTON *et al.*, 2008), no pênfigo foliáceo (PF). O reconhecimento dos anticorpos contra o autoantígeno ou de padrões moleculares associados a células alteradas ativa o sistema complemento, causando a sua deposição em espaços intercelulares, colaborando com o processo que causa a acantólise (KAWANA *et al.*, 1985, 1988, MESSIAS *et al.*, 1988, 1989). No Brasil, o PF é endêmico e atinge sua maior incidência, acometendo principalmente adultos jovens, vivendo em áreas rurais (CULTON *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2009).

Por ser uma doença multifatorial, o PF inclui fatores ambientais e genéticos em sua etiopatologia. A suscetibilidade ao PF não está relacionada a um único *loco* de um gene específico, mas sim à presença de diversos alelos de diferentes genes. Associações com variantes de diversos genes do sistema imune, as quais influenciam na susceptibilidade ao PF vem sendo descritas, em sua maioria, pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR. O gene *CR1* codifica uma glicoproteína polimórfica multifuncional, de cadeia simples, ligada à membrana ou solúvel, pertencente à família de proteínas reguladoras de ativação do complemento (RCA). É expressa principalmente em eritrócitos, células B e células dendríticas. CR1 atua como receptor para C3b e C4b, regulando a cascata de ativação do sistema complemento e removendo complexos imunes opsonizados, da circulação sanguínea. Na sua forma solúvel, apresenta atividade anti-inflamatória (BENNET *et al.*, 2000, ARUMUGAN *et al.*, 2006, LI *et al.*, 2010), Polimorfismos que alteram a expressão do gene ou a atividade da proteína são comuns em diferentes populações e têm sido associados a diferentes doenças infecciosas, como hanseníase e malária; autoimunes, como lupus eritematoso e artrite reumatoide, e neurodegenerativas, como Alzheimer (ARORA *et al.*, 2011; PICCOLI *et al.*, 2011; KREMLITZKA. *et al.*, 2012; LORD e MORGAN, 2013). Até o momento, não há estudos relacionando a expressão dessa proteína, assim como seus polimorfismos, com o PF. Devido à relevância de CR1 na regulação do sistema complemento e

remoção de complexos imunes, eventos de grande importância na patogênese desta doença, e dadas associações prévias com outras doenças autoimunes, faz-se necessário investigar o seu papel também na fisiopatologia do PF. Para tanto, neste estudo pioneiro, pretende-se avaliar possíveis associações entre os polimorfismos de *CR1* e a expressão da proteína CR1 solúvel (sCR1) com a susceptibilidade ao PF, assim como com diferentes manifestações sintomáticas, em pacientes com e sem tratamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO

#### 2.1.1 Subtipos e aspectos clínicos

O pênfigo consiste em um grupo de doenças autoimunes órgão-específicas de pele e mucosas, que envolve a formação de autoanticorpos dirigidos principalmente contra a desmogleína (DSG), proteína pertencente à família de moléculas de adesão celular, apresentando perda de adesão entre os queratinócitos (acantólise) e formação de bolhas e vesículas intra-epiteliais. As principais formas clínicas conhecidas de pênfigo são: pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) (CULTON *et al.*, 2008).

O PV caracteriza-se pela presença de autoanticorpos anti-desmogleína 3 na forma mucosa e de anti-desmogleína 1 e 3, na forma mucocutânea. Ele apresenta distribuição mundial, ocorre com incidência semelhante em ambos os sexos e tem pico de incidência entre a quarta e a sexta década de vida, podendo acometer qualquer faixa etária. Diferente do PV, o PF apresenta autoanticorpos anti-desmogleína 1 (anti-DSG1) (NISHIHARA *et al.* 2003). Anticorpos contra outros membros da família das caderinas, como E-caderina, desmogleína 2, 3 e 4, e desmocolina 1, 2 e 3, também foram relacionados ao PF (FLORES *et al.*, 2012). No PF, a acantólise ocorre nas camadas superficiais da epiderme e no PV, a acantólise ocorre nas camadas mais profundas (Figura 1). O PF tem duas formas clínicas: uma esporádica, também conhecida como o pênfigo de Cazenave, com distribuição mundial, e outra endêmica, em determinadas áreas geográficas, denominada pênfigo foliáceo endêmico (PFE), ou fogo selvagem. As formas endêmica e esporádica são histologicamente e imunologicamente similares, diferenciando-se



apenas por seus aspectos epidemiológicos (CHACÓN *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2011; SILVESTRE e NETTO, 2005).

O PF pode ser classificado em duas formas: a localizada e a generalizada. Na forma localizada, as lesões são vesículas e pequenas bolhas, geralmente limitadas na face, cabeça, pescoço e partes altas do tronco, que se rompem facilmente, deixando pequenas áreas erosivas. Alguns pacientes com esta forma podem evoluir para a forma generalizada, por apresentarem disseminação das lesões para tronco, abdômen e membros superiores e inferiores. A forma generalizada é caracterizada pela disseminação das lesões no tronco e nos membros, além da face e do couro cabeludo. A fase eritodérmica é caracterizada pela expressão máxima da forma generalizada, em que eritema e lesões esfoliativas ocupam todo o tegumento. Na fase mais aguda da doença, ocorre a invasão bolhosa e disseminação cutânea da doença, causando febre, artralgias e sensação de queimação e ardor cutâneos (CAMPBELL *et al.*, 2001; CUNHA e BARRAVIEIRA, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2005). Em termos de evolução de quadro clínico, o PF pode ser classificado como agudo, crônico, recorrente e curado. Os casos agudos são aqueles com duração de menos de 6 semanas; casos crônicos são aqueles que duram mais de 6 semanas, e casos recorrentes são aqueles que entram em remissão após o tratamento, mas reiniciam após algum tempo. Os casos curados não apresentam lesões ou sorologia positiva, por pelo menos 12 meses (RIBEIRO *et al.*, 2005).

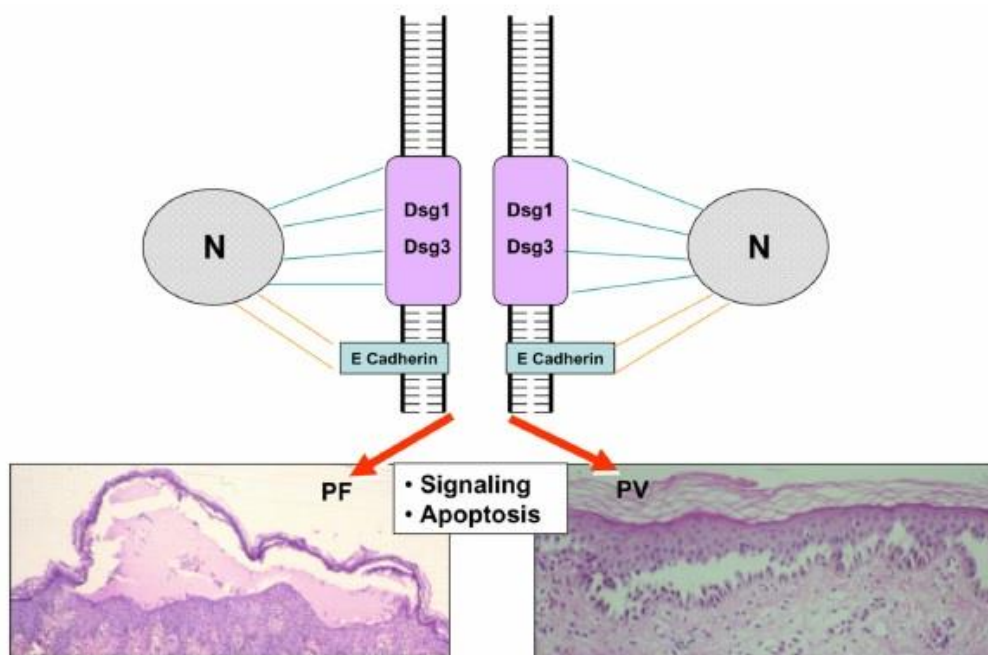


Figura 1: Diferenças da acantólise de pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV). LEGENDA: DSG - desmogleína, N - núcleo. FONTE: CÚLTON *et al.* (2008).

### 2.1.2 Histopatologia e imunopatologia

O pênfigo é caracterizado pelo rompimento do desmossomo, que é a principal estrutura envolvida na adesão intercelular. O desmossomo possui duas regiões: a região da placa e a região do núcleo. Os principais componentes do núcleo são os domínios extracelulares das caderinas, especificamente das desmogleínas (DSG1, DSG2 e DSG3) e das desmocolininas (DSC1, DSC2 e DSC3) (Figura 2) (CAMPBELL *et al.*, 2001; ANHALT *et al.*, 1999; DI ZENZO *et al.*, 2012). As porções extracelulares destas moléculas de adesão dependentes de cálcio, especialmente das desmogleínas 1 e 3, são alvos de autoanticorpos IgG patogênicos (CAMPBELL *et al.*, 2001; CULTON *et al.*, 2008), colaborando para causar a perda de coesão epidérmica célula-célula e acantólise (LOMBARDI *et al.*, 1999; CULTON *et al.*, 2008) (Figura 3).

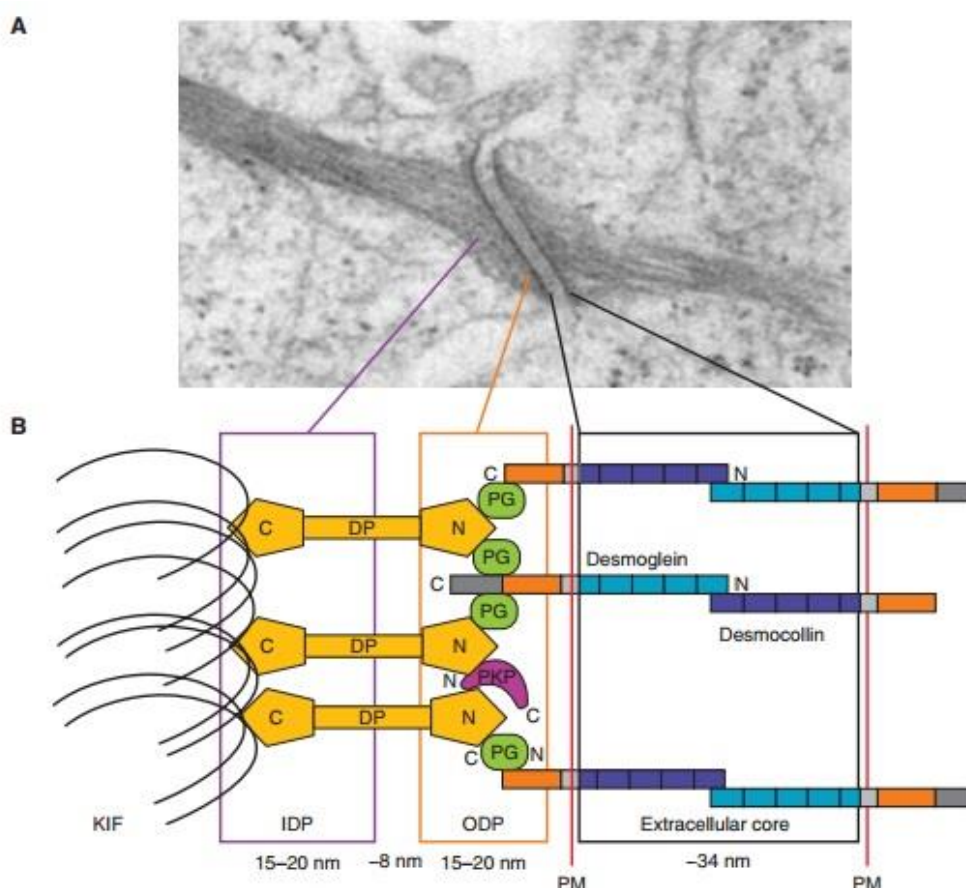


Figura 2: Estrutura do desmossomo: a) Eletromicrografia de desmossomo; b) Esquema de proteínas desmossomais e distância relativa da membrana do plasma. NOTA: As caderinas desmossomais, as desmogleínas e as desmocolininas, se estendem através do núcleo extracelular e da placa externa densa (ODP) para estabelecer contato e adesão às células vizinhas de forma  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente. As caudas das caderinas citoplasmáticas estão associadas a proteínas vinculadoras: placoglobina (PG), placofilinas (PKP) e desmoplaquina (DP). DP liga-se a filamentos intermediários de queratina (KIF) no interior da placa interior densa (IDP), que serve para amarrar os filamentos intermediários da membrana plasmática. FONTE: adaptado por DELVA *et al.* (2009).

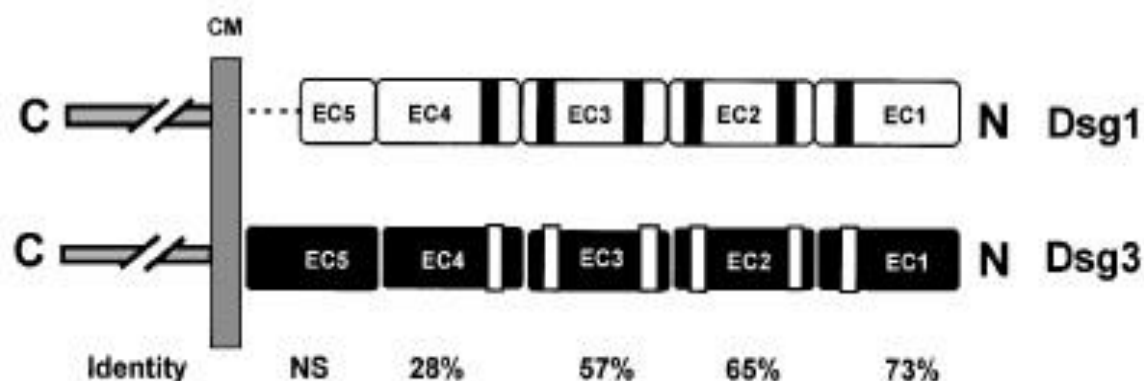


Figura 3: Estrutura molecular do ectodomínio da DSG1 e DSG3. NOTA: As caderinas contêm cinco domínios de caderinas extracelulares (EC) em série (EC1 – EC5) na membrana citoplasmática (CM). Os domínios extracelulares de Dsg1 e Dsg3 contêm quatro caderinas (EC1 a EC4) e um domínio proximal de membrana (EC5). O grau de identidade de sequência entre estes domínios é também mostrado nesta figura. FONTE: AOKI *et al.* (2004).

As lesões epidérmicas de pacientes de PF apresentam deposições de anticorpos (BYSTRYN *et al.*, 1978). Os anticorpos encontrados no soro de pacientes pertencem predominantemente à subclasse de imunoglobulinas (Ig) IgG4, mas também são encontrados IgG1, IgG2, IgG3, IgE e IgM (CAMPBELL *et al.*, 2001; QIAN *et al.*, 2011; QIAN *et al.*, 2012; CULTON *et al.*, 2008; CHACÓN *et al.*, 2012; DING *et al.*, 1997). Por meio de diferentes estudos, demonstrou-se que os pacientes de PFE exibem uma resposta de IgG1 precoce, seguida por uma resposta sustentada IgG4. De fato, os autoanticorpos IgG1 foram indetectáveis em soros de pacientes que entraram na fase crônica da doença (doença com mais de seis semanas de evolução) ou que foram efetivamente tratados. Autoanticorpos IgG4, no entanto, foram a subclasse predominante nos soros desses pacientes (RIVITTI *et al.*, 1994 *apud* DING *et al.*, 1997; ROCK *et al.*, 1989; ALLEN *et al.*, 1993; AOKI *et al.*, 2004). Além dos autoanticorpos anti-DSG1, autoanticorpos contra outros membros da família das caderinas, como E-caderina, desmogleína 2, 3 e 4, e desmocolina 1, 2 e 3, também foram relacionados ao pênfigo (FLORES *et al.*, 2012).

A resposta celular também é essencial na patogenia do PF, já que a produção de anticorpos pelas células B requer a interação com células T. Essas células reconhecem epítomos localizados no ectodomínio da DSG1, e a sua proliferação é antígeno-específica (LIN *et al.*, 2000; AOKI *et al.*, 2004). Em indivíduos com PF, a resposta de células T é bloqueada por anticorpos HLA-DR, mas não por anticorpos HLA-DQ ou HLA-DP, indicando que a resposta específica contra DSG1 é restrita a HLA-DR. As células T expressam CD3, CD4, CD45RO e TCR, e não expressam

CD8, CD19, CD45RA, o que sugere que são células T CD4+ de memória. Além disso, estas células produzem interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-6, mas não interferon gama (IFN- $\gamma$ ), indicando que são do tipo Th2 (T auxiliares do tipo 2). As citocinas do tipo 2, tais como IL-4, podem ser importantes na modulação da produção de subclasses de IgG nestes pacientes, aumentando a produção de IgG4 (AOKI *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Epidemiologia

O pênfigo foliáceo endêmico ocorre em regiões de clima tropical com altitude entre 500 e 800 metros, sendo extremamente raro, em regiões abaixo de 400 metros ou acima de 1000 metros. No Brasil, o pênfigo foliáceo é endêmico nos estados localizados entre 45° a 60° de longitude a oeste e 5° a 25° de latitude ao sul, sendo eles: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (CULTON *et al.*, 2008; DIAZ *et al.*, 1989; LOMBARDI *et al.*, 1992). O pênfigo foliáceo endêmico na América do Sul, não apresenta associação com sexo ou grupo étnico e manifesta-se em adultos, jovens e crianças. Os indivíduos com a doença geralmente trabalham no campo, vivem em casas rústicas localizadas perto de rios ou riachos e criam animais, normalmente são de baixa renda e com higiene pessoal precária (CULTON *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2009).

Observado desde o início do século no Brasil, o PF continua a representar um problema de saúde pública, com uma incidência de 25-35 casos/milhão/ano. Pessoas de diferentes raças e origens étnicas, incluindo os brasileiros de ascendência portuguesa, espanhola, alemã, africana e japonesa que vivem nas áreas endêmicas, são acometidas pela doença (AOKI *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 1995). Na década de 80, foram registrados mais de 15.000 casos de indivíduos com a doença (FRIEDMAN *et al.*, 1992; FRIEDMAN *et al.*, 1995; DIAZ *et al.*, 1989). A maior prevalência (3,4%) foi encontrada em duas populações ameríndias no Centro-Oeste do Brasil, pertencentes à reserva Xavante (FRIEDMAN *et al.*, 1995) e à reserva Terena de Limão Verde (HANS-FILHO *et al.*, 1996). Ambos apresentam uma incidência de 1 a 4 casos novos, por 1200-1350 indivíduos, por ano (AOKI *et al.*, 2004; CULTON *et al.*, 2008).

A doença tem sido descrita em outros países: do México ao norte da Argentina, principalmente Paraguai, Bolívia, Peru, Colômbia e Venezuela, e em algumas zonas tropicais no continente africano, principalmente a Tunísia. No Peru, o

pênfigo existe desde tempos pré-colombianos, uma vez que representações da doença podem ser encontradas em figuras de cerâmica inca (*huacos*) das culturas Moche e Chimú (CHACÓN *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2005; SILVESTRE *et al.*, 2005). Na Colômbia, foi descrita uma variante de PFE com o nome de “El Bagre”, na qual os pacientes também apresentam elevada autoreatividade a moléculas das plaquinhas e a diferentes epítomos cardíacos, razão pela qual têm susceptibilidade aumentada à morte súbita por falência cardíaca (ABREU-VELEZ *et al.* 2011). Formas endêmicas de PF foram observadas também na Tunísia, onde a doença tem incidência de 6,7 novos casos por milhão de habitantes, por ano, e atinge, principalmente, mulheres de 25 a 34 anos de idade. A proporção sexual do PF neste país, se considerados todos os tipos de pênfigo, é de 4 mulheres para 1 homem. Já na França, onde o PF não é endêmico, a incidência é de 1 a 7 novos casos por milhão de habitantes, por ano (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1996).

#### 2.1.4 Etiologia e fatores ambientais.

As casas em que os pacientes com PF vivem, geralmente estão localizadas dentro de 10 a 15 quilômetros de um rio ou riacho, e uma variedade de insetos é encontrada nas proximidades. São eles: flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*, conhecido como mosquito palha), reduvídeos (barbeiros) e simulídeos (mosca preta ou “borrachudo”). Por meio de estudos epidemiológicos, demonstrou-se que o número de novos casos de PFE é maior no final da estação chuvosa (setembro a março) e menor durante o verão seco (abril a agosto), sugerindo que a multiplicação de insetos e o aumento do número de indivíduos com PFE estão correlacionados (CULTON *et al.*, 2008; LOMBARDI *et al.*, 1992; QIAN *et al.*, 2012). Observou-se também que indivíduos expostos a picadas de simulídeos são 4,7 vezes mais propensos a desenvolverem a doença, do que aqueles que não foram expostos (LOMBARDI *et al.*, 1992; FRIEDMAN *et al.*, 1995).

Foi sugerido que a DSG1 apresenta reação cruzada com antígenos salivares de insetos hematófagos. Indivíduos geneticamente predispostos e/ou no estágio pré-clínico de PFE, possuem níveis elevados de autoanticorpos anti-DSG1 contra o domínio extracelular da caderina 5 (EC5) da DSG1. A transição do estágio pré-clínico para o estágio clínico do PFE é acompanhada pelo surgimento de autoanticorpos específicos para os domínios EC1 e EC2. Além disso, os anticorpos nos soros de pacientes com doença ativa reconhecem os domínios EC1 e EC2 da

molécula, enquanto que nos doentes em remissão, a resposta autoimune é restrita apenas ao domínio EC5. A transição da resposta autoimune do estágio pré-clínico, para o estágio clínico, pode ter um tempo de incubação de vários anos (CHACÓN *et al.*, 2012; AOKI *et al.*, 2004; DI ZENZO *et al.*, 2012).

O consumo de alguns alimentos tem sido relacionado com a manifestação do PF, como o alho, alho-poró, cebola e alimentos que possuem tanino. Uma série de outros fatores ambientais tem sido relacionado ao desencadeamento da doença: alguns tipos de medicamentos (especialmente os que contêm tiol em sua composição, por exemplo, penicilina), infecções virais, exposição a raios ultravioletas e raios ionizantes, contato com pesticidas, e estresse físico e emocional (BASCONES *et al.*, 2010; LOMBARDI *et al.*, 1999; RUOCO *et al.*, 2003). No caso do PFE na Tunísia, o uso de cosméticos tradicionais como hena e outros foram implicados na incidência aumentada em mulheres (BASTUJI-GARIN *et al.* 2002).

#### 2.1.5 Fatores Genéticos

Uma das principais características do PFE no Brasil é a grande ocorrência de casos familiares, geneticamente relacionados. Pesquisadores têm documentado a sua natureza familiar: entre os índios Terena houve compartilhamento genético em 60% dos afetados, e entre os Xavantes, em 80% dos afetados (AUAD, 1972 *apud* AOKI *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2001).

Os genes *HLA* clássicos de classe I e de classe II localizados no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) são frequentemente investigados em estudos de associação com doenças autoimunes, por terem função relevante na resposta imune e apresentarem elevado grau de polimorfismo. Vários genes *HLA* estão entre os mais investigados nos estudos de associação com o pênfigo (MARTEL *et al.*, 2002). O primeiro estudo de associação entre genes *HLA* e PFE foi realizado por Petzl-Erlor e Santamaria em 1989, que encontraram associação positiva dos grupos alélicos *HLA-DR1* e *HLA-DR4* com a doença, e associação negativa com grupo *HLA-DQ2*. Observou-se que os alelos *HLA-DRB1\*0102*, *0404*, *1402*, *1406*, associados ao pênfigo, compartilham uma sequência consenso (LLEQRRAA) na posição 67-74, no terceiro domínio hipervariável do gene *HLA-DRB1* (AOKI *et al.*, 2004; CULTON *et al.* 2008). Esses dados levaram os autores a sugerir que a susceptibilidade ao PFE não está relacionada a um único antígeno de

histocompatibilidade, mas a um epítipo presente em todos os alelos *HLA* associados com PFE, sem relação com o grupo étnico (CAMPBELL *et al.*, 2001).

Outros genes também foram associados ao pênfigo: variantes genéticas do gene da morte celular programada 1 (*PDCD1*) (BRAUN-PRADO e PETZL-ERLER, 2007), *CD40*, *CD40L* e *BLYS* (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009), genes *KIR* (AUGUSTO *et al.*, 2012), interleucina 6 (*IL6*) e interleucina 4 (*IL4*) (PEREIRA *et al.*, 2004). Associações não foram encontradas com fator de necrose tumoral (*TNF*), linfotóxina alfa (*LTA*) (ROXO *et al.*, 2003), antígeno 4 de linfócito T citotóxico (*CTLA4*) (PAVONI *et al.*, 2006), *BAX* e *TP53* (KOHLENER e PETZL-ERLER, 2006) e a própria desmogleína 1 (*DSG1*) (PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005).

#### 2.1.6 Tratamento

Desde a introdução dos corticoides sistêmicos na década de 1950 e de imunossupressores na década de 1960, o prognóstico da doença tem melhorado gradualmente. O uso combinado de corticoides sistêmicos e imunossupressores como a prednisona (1 a 2 mg/kg/dia), azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato, micofenolato mofetil e ciclosporina tornaram-se o padrão de terapia de PV e PF, por apresentarem bons resultados. No entanto, a morbidade associada com o uso a longo prazo destas drogas continua a ser problemática para os pacientes, especialmente aqueles com diabetes, hipertensão ou outras condições médicas (CULTON *et al.*, 2008; CAMPBELL *et al.*, 2001). Interessantemente, existem casos refratários à terapia comum que foram tratados com rituximab (anticorpo contra CD20) e/ou administração de imunoglobulina intravenosa (TEIXEIRA *et al.* 2011).

## 2.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo constituído por vários mecanismos humorais e celulares que reconhecem potenciais agentes patogênicos dentro de minutos ou horas após a entrada. A ativação da imunidade inata é impulsionada pelo reconhecimento de padrões específicos presentes na superfície de micróbios e auto-componentes alterados. Este reconhecimento é baseado em elementos pré-moldados, um recurso que permite a ativação de elementos humoral e celular poucos minutos após a infecção. Após essa rápida ativação, há um processo de inflamação o qual limita eficientemente a infecção, dando origem a uma resposta imune adaptativa (HOFFMANN *et al.* 1999).

Os efetores da imunidade inata incluem as barreiras epiteliais, fagócitos e células natural killer, citocinas assim como um conjunto de proteínas, chamado sistema complemento.

O sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata e sinalizadores da imunidade adaptativa. Representa um mecanismo secundário na primeira linha de defesa do sistema imunológico, sendo importante para a manutenção da homeostase com um papel muito para além da simples eliminação microbiana. Ele compreende um conjunto de mais de 40 proteínas séricas e de membrana que interagem entre si, de maneira altamente regulada (UTIYAMA *et al.*, 2004), que podem ser encontradas em circulação no sangue, ligados a membranas celulares, ou recolocadas em tecidos. O fígado é a principal fonte da maior parte das proteínas do complemento, além de muitos outros locais de sua produção. O sistema complemento tem como função: defender o organismo contra infecções microbianas, desencadeando a geração de um complexo membranolítico na superfície da bactéria e fragmentos de C3 que interagem com receptores da superfície das células (CRIg, CR1, CR3 e CR4) para promover fagocitose; estimular a inflamação pela liberação de anafilatoxinas e eliminar complexos imunes e produtos da lesão inflamatória (restos de células e corpos apoptóticos tóxicos) para garantir a homeostasia do hospedeiro (ABBAS *et al.*, 2007; LIU e NIU 2009).

Existem três vias de ativação do complemento: via clássica, via alternativa e via das lectinas (Figura 4). A via clássica envolve C1q, C1r, C1s, C4, C2 e C3 e é ativada pela interação de C1q com complexos imunes (antígeno-anticorpo), ou após a interação de C1q com moléculas não imunes (DNA, RNA, alguns polissacarídeos pequenos, alguns componentes da membrana de bacteriana, fungos e vírus, entre outros). A via alternativa envolve C3, fator B (Bf), fator D (DF) e properdina (P) e é ativada na superfície das células microbianas, na ausência de anticorpos. A via das lectinas é iniciada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL) ou ficolinas (FCN1, 2 ou 3), a padrões de açúcares ou resíduos acetilados, respectivamente. Estas proteínas interagem com duas serino-proteases, conhecidas como MASP-1 e MASP-2. Ao serem ativadas, MASPs levam à clivagem sequencial de C4 e C2 e à formação da enzima C3 convertase (ABBAS *et al.*, 2007; FARRIES *et al.*, 1988; FUGITA *et al.*, 2004).



Essas três vias de ativação convergem no passo de clivagem de C3. A cascata proteolítica resultante permite uma grande amplificação e rapidez da resposta inflamatória, pois cada ativação de um elemento pré-formado pode gerar, rapidamente, múltiplas enzimas e complexos enzimáticos ativados (ABBAS *et al.* 2007). As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são potentes moléculas pro-inflamatórias geradas a partir da clivagem sequencial de C3, C4 e C5, os seus efeitos pró-inflamatórios são mediados pela ligação com receptores específicos em vários tipos celulares. As três anafilatoxinas, por exemplo, se ligam aos mastócitos e induzem sua desgranulação, com a liberação de histamina e outros mediadores vasoativos. Em neutrófilos, C5a estimula a motilidade, a firme adesão às células endoteliais e a produção de espécies reativas de oxigênio. Já fragmentos gerados a partir da clivagem de C3, como C3b e iC3b, atuam como opsoninas, ligantes covalentemente unidos ao substrato de ativação e específicos dos receptores de neutrófilos e macrófagos, tais como o receptor de complemento tipo 1 (CR1/CD35) (BOACKLE 2003 *apud* LIU e NIU, 2009). C3b e C4b ligam-se ao CR1, prevenindo a agregação de complexos imunes e promovendo a sua eliminação por células fagocíticas. Por sua vez, o complexo lítico terminal C5b-9 exibe efeito lesivo sobre membranas celulares e, uma vez associado a essas, promove a lise celular (ABBAS *et al.* 2007; DUNKELBERGER e SONG, 2010; BOLDT *et al.*, 2011)



MBL) e ficolinas, associadas a serina proteases. De fato, houve uma tendência para níveis inferiores da serina protease 2 associada à MBL (MASP-2) no PF, indicando um provável consumo da proteína após a ativação (MESSIAS-REASON *et al.* 2007), e deposição de ficolina 2 e do complexo lítico de ataque à membrana, em lesões de PV (MESSIAS-REASON *et al.* 2011). Além das duas vias de ativação anteriores, a deposição de C3 no pêfingo também pode ser causada pela ativação da via alternativa, o que foi constatado pela detecção do fragmento de clivagem do fator B (B), causada pela hidrólise espontânea de C3 (MESSIAS *et al.* 1989). A ativação da cascata do complemento é bloqueada por diferentes proteínas, como CR1, investigada no presente trabalho, CD59 e CD55. Esta última também foi encontrada com expressão aumentada em linfócitos T CD4+ de pacientes de pêfingo vulgar (1,6x superior a controles) e pêfingo foliáceo (1,5x superior a controles, avaliando apenas pacientes com a forma generalizada) (MALHEIROS *et al.* 2014).

Após a ativação, produtos de degradação de C3, C4 e C5 promovem contração da musculatura lisa e degranulação de basófilos e mastócitos, com a liberação de histamina e outras substâncias vasoativas; ativação de macrófagos e liberação de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio; agregação e fagocitose de complexos imunes. Por sua vez, o complexo lítico terminal C5b-9 (TLC) exibe efeito lesivo sobre membranas celulares e, uma vez associado a essas, promove a sua destruição. A deposição deste complexo tem sido frequentemente observada no pêfingo foliáceo, assim como no pêfingo vulgar (XIA *et al.* 1988; KAWANA *et al.* 1989, 1990; LAPIERE *et al.* 1998; MESSIAS-REASON *et al.* 2011).

### 2.3 RECEPTORES DE COMPLEMENTO

São descritos quatro receptores de complemento: CR1 (também conhecido como grupo de diferenciação 35 ou CD35, ou ainda, receptor de C3b/C4b), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18). CR1 e CR2 são expressos principalmente em linfócitos B e células dendríticas do tipo folicular, enquanto CR3 e CR4 são integrinas expressas nos macrófagos e células dendríticas (PETTY, 2002 apud LIU e NIU 2009; HELMY *et al.*, 2006). Um quinto receptor de complemento (CR1g) foi descrito em 2006 (HELMY *et al.*, 2006) (Figura 5).

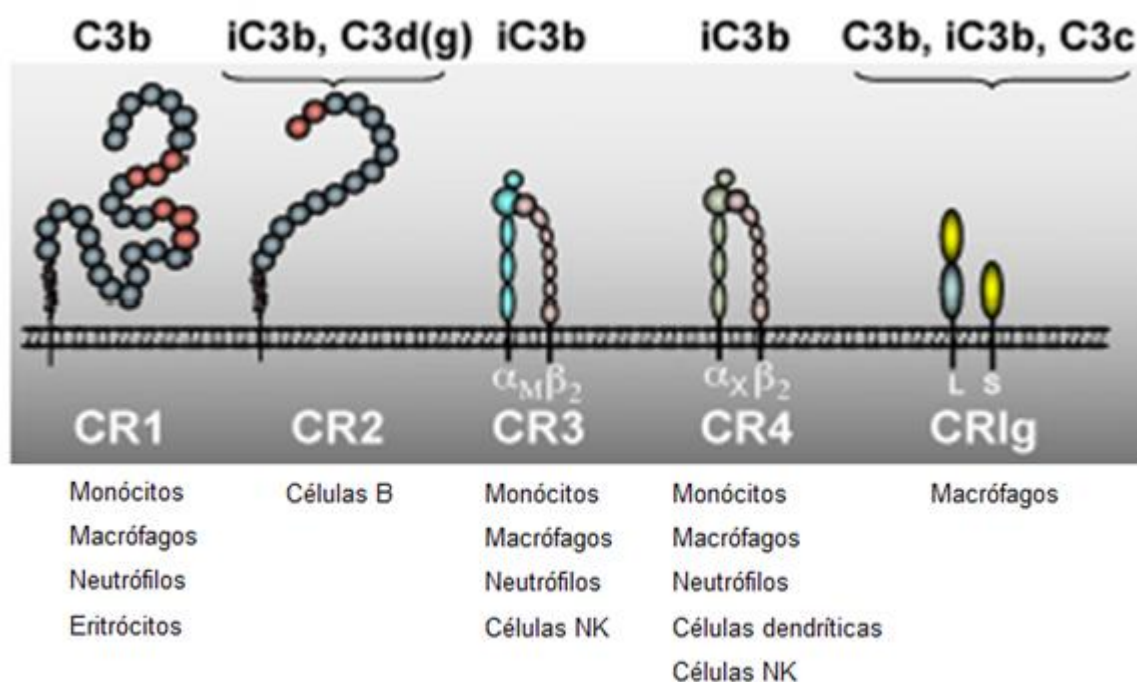


Figura 5: Receptores de complemento, respectivos fragmentos C3 ligantes e expressão em células. Nota: CR1 e CR2 humanos contêm 30 e 15 pequenas repetições consenso (SCR), respectivamente, cada um representado pelas esferas. Indicado em vermelho são os SCR mediadores de ligação dos fragmentos C3. CR2 humano liga-se a iC3b, C3dg ou C3d. CR3 e CR4 contêm subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  que são glicoproteínas transmembranas do tipo 1 com domínios extracelulares longos e citoplasmáticos curtos. CR1g humano contém duas isoformas que consistem em dois (denominada forma longa ou L) ou um (denominada forma curta ou S) domínio extracelular de Ig. Ambas as formas longa e curta de CR1g, contêm um domínio de ligação ligado a N-terminal que pertence a um domínio de imunoglobulina do tipo IgV (indicado em amarelo), a forma longa de CR1g também tem um domínio proximal de membrana que é um domínio de imunoglobulina de tipo IgC (azul). Fonte: He *et al.* 2008.

CR1 é uma glicoproteína de cadeia simples ligada à membrana de eritrócitos, monócitos, neutrófilos, algumas células T e podócitos glomerulares, além das células B e células dendríticas foliculares anteriormente mencionadas, atuando como principal regulador da ativação do sistema complemento (DYKMAN *et al.*, 1983; DYKMAN *et al.*, 1984; WONG *et al.*, 1983). A estrutura de CR1 consiste de uma série linear de módulos de curtas repetições de consenso (SCR) estruturalmente relacionadas, seguida por um curto domínio transmembranar e intracitoplasmático, o que a coloca na família de proteínas reguladoras de ativação do complemento (RCA), assim como CR2. Este último também é expresso em linfócitos B maduros, um pequeno subconjunto de células T periféricas, timócitos precoces, basófilos, mastócitos, queratinócitos e outros tipos de células epiteliais (HOLERS 2003 *apud* LIU e NIU 2009).

CR3 e CR4 são membros da família das integrinas e compartilham cadeias  $\beta$  comuns da forma  $\beta_2$ . Eles são expressos em células fagocíticas profissionais, tais

como neutrófilos, monócitos e macrófagos, um subconjunto de linfócitos e eosinófilos. CR3 é uma molécula multifuncional e também possui funções independentes do complemento na adesão celular, ao interagir com uma variedade de ligantes, incluindo ICAM-1, fator X e fibrinogênio. CR3 e CR4 podem mediar a fagocitose de antígenos iC3b-opsonizados para células apresentadoras de antígenos, podendo aumentar a apresentação do antígeno (LIU e NIU 2009).

CR1g (*VSIG4*) é expresso exclusivamente em macrófagos residentes em tecido e macrófagos sinusoidais, sua estrutura e função são conservados em humanos e ratos. Diferente dos outros receptores de complemento, CR1g é encontrado em associação com a reciclagem constitutiva de vesículas de membrana e participa na internalização de partículas C3-opsonizadas por células de Kupffer. CR1g é considerado um componente crítico do sistema imune inato (HELMY *et al.*, 2006).

#### 2.4 PROTEÍNAS REGULADORAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

A família de proteínas reguladoras de ativação do complemento (RCA) inclui CR1 (CD35), CR2 (CD21) e o fator H (FH). Essas proteínas são codificadas por um agrupamento de genes localizado no braço longo do cromossomo 1, região 3, banda 2 (1q32). Embora as proteínas da família RCA possuam tamanhos variados, elas compartilham semelhanças significativas na estrutura primária de aminoácidos. A porção extracelular das proteínas RCA é composta predominantemente de domínios conhecidos como “repetições de proteínas controladoras do complemento” (CCPs), “pequenas repetições consenso” (SCRs), “repetições complementares” (CRs) ou “domínios sushi” (KRUSHKAL *et al.*, 2000; KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001; LIU e NIU 2009). Os módulos CCP são responsáveis por interações específicas entre proteínas e proteína-carboidrato, desempenhando um papel chave na função biológica dos receptores RCA. Paradoxalmente, CCPs também servem como sítios ligantes para numerosos patógenos (O’LEARY *et al.* 2004).

CR1 é o maior membro da família RCA. A sua região extracelular é composta por 30 domínios CCP, enquanto CR2 tem 15 domínios CCP e FH, 20 domínios CCP. Caracteristicamente, cada domínio CCP é composto de uma estrutura de 61 resíduos com duas pontes dissulfeto conservadas e um resíduo conservado de triptofano (FURTADO *et al.*, 2008). CR1 e CR2 se ligam aos produtos de degradação de C3 que se tornam ligados covalentemente a um antígeno ou a

complexos imunes, no processo de ativação do sistema complemento (BOACKLE *et al.*, 2004). Mais especificamente, CR1 age como um receptor para C3b e C4b, desestabilizando e aumentando o decaimento das convertases C3 (C4b2a) e C5 (C4b2a3b) da via clássica e das lectinas, e C3 (C3bCBb) e C5 (C3bBb3b) da via alternativa. Outra função de destaque é a sua atividade como co-fator para a inativação de C3b e C4b, mediada pelo Fator I, como mais um passo na regulação da via alternativa. Além disso, CR1 atua como um receptor de MBL e pode estar envolvido na regulação da via de ativação das lectinas (ROSS *et al.*, 1983; MEDOF *et al.*, 1984; GHIRAN *et al.*, 2000; LIU e NIU 2009).

Fator H (FH) é uma glicoproteína de 150 kDa composta por 20 domínios CCP, cada um com 60 resíduos de comprimento. É expresso constitutivamente no fígado e também pode ser expresso localmente em outros tipos celulares, incluindo células endoteliais, células epiteliais, plaquetas e células tronco mesenquimais, entre outros (GORDON 1995 *apud* MERI *et al.*, 2013). O FH regula a ativação da via alternativa do sistema complemento, sendo um co-fator do fator I, mediando clivagem e inativação de C3b e acelerando o decaimento da convertase C3bBb. Na ausência de FH, a ativação espontânea da via alternativa do complemento ocorre no plasma, o que leva ao consumo de componentes do complemento C3 e o fator B. A via alternativa pode ser ativada e eficientemente amplificada em qualquer superfície não protegida por proteínas reguladoras do complemento ligadas, solúveis ou de membrana. O FH é essencial neste processo, pois detecta e se liga a depósitos iniciais de C3b, em associação a marcadores específicos em células hospedeiras (FERREIRA *et al.*, 2010; MERI *et al.*, 2013).

## 2.5 GENE *CR1*

### 2.5.1 Estrutura e regulação

A organização do gene *CR1* (OMIM: 120620) foi primeiramente descrita em 1993 (VIK *et al.*, 1993). *CR1* está localizado no agrupamento de genes reguladores de ativação do complemento, no braço longo do cromossomo 1 (1q32) e o número de exons depende do transcrito codificado (*CR1-001*, por exemplo, possui 39 exons). A maior parte da atividade promotora parece estar concentrada nos primeiros 140 pb (FUNKHOUSER e VIK, 2000), porém há um elemento regulador negativo entre 700 e 500 pb a montante do sítio de início da transcrição (KIM *et al.*, 1999). O fator de transcrição 1 relacionado a Runt (RUNX1, também conhecido

como AML1, pelo seu envolvimento na leucemia linfoblástica aguda de células B na infância) reconhece a sequência 5'-TGTGGT-3' no promotor, ativando a transcrição do gene (KIM *et al.* 1999). A proteína de fusão TEL/AML1 resultante da translocação t (12;21)(p12;q22), interfere neste mecanismo, inibindo a ativação (SONG *et al.* 1999, RHO *et al.* 2002).

Com base em dados do navegador genômico Ensembl, sabe-se que o gene *CR1* possui 12 mRNAs, porém apenas dois destes transcritos são listados no NCBI RefSeq (CR1-001: NM\_000573.3 e CR1-012: NM\_000651.4). Dentre os mesmos, sete potencialmente codificam proteínas, um é apenas processado (não apresenta quadro aberto de leitura), e os demais apresentam retenção de introns. Os transcritos CR1-001, 002, 003 e 007 codificam para uma proteína de mesmo tamanho, com sequências idênticas de 2039 aminoácidos (Tabela 1, Figura 6) (Disponível em: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669492-207813992;t=ENST00000530487](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669492-207813992;t=ENST00000530487)) Acesso em: 29/08/2015.) Os transcritos 002, 003, 007, 008 e 011 são os mais amplamente expressos, segundo dados do portal GTEX (Disponível em: <http://www.gtexportal.org/home/gene/CR1>) Acesso em: 29/08/2015).

Tabela 1 Transcritos do gene *CR1*.

Nome	Transcrito	Exons	Comprimento (pb)	Proteína	Comprimento (aa)	Tipo
<i>CR1-012</i>	<u>ENST00000367049</u>	47	7470	<u>ENSP00000356016</u>	2489	Codificador de proteína
CR1-001	<u>ENST00000400960</u>	39	6959	<u>ENSP00000383744</u>	2039	Codificador de proteína
<b>CR1-002</b>	<u>ENST00000367051</u>	39	7469	<u>ENSP00000356018.1</u>	2039	Codificador de proteína
<b>CR1-003</b>	<u>ENST00000367053</u>	39	7469	<u>ENSP00000356020.1</u>	2039	Codificador de proteína
<b>CR1-007</b>	<u>ENST00000367052</u>	39	7469	<u>ENSP00000356019.1</u>	2039	Codificador de proteína
<i>CR1-010</i>	<u>ENST00000534202</u>	21	3460	<u>ENSP00000436139</u>	1151	Sujeito a decaimento mediado por codon nonsense
<b>CR1-011</b>	<u>ENST00000529814</u>	14	1981	<u>ENSP00000434718</u>	661	Codificador de proteína
<i>CR1-009</i>	<u>ENST00000367050</u>	13	2393	Sem produto proteico	-	Transcrito processado
CR1-004	<u>ENST00000434033</u>	11	2377	Sem produto proteico	-	Com intron retido
CR1-005	<u>ENST00000450439</u>	11	2377	Sem produto proteico	-	Com intron retido
CR1-006	<u>ENST00000436595</u>	11	2377	Sem produto proteico	-	Com intron retido
<b>CR1-008</b>	<u>ENST00000530487</u>	3	1228	Sem produto proteico	-	Com intron retido

LEGENDA: CR1 – receptor 1 do complemento; pb – pares de base; aa – aminoácido. Segundo dados para a expressão dos diferentes transcritos, baseada em resultados de RNASeq, disponíveis no site GTEX, representou-se: em negrito, os transcritos abundantes no baço e sangue total (expressão menor no intestino delgado – íleo terminal, pulmão, trompas de Falópio); e em itálico, os transcritos raros (sendo que os demais apresentam expressão mais clara, apenas em linfócitos transformados com vírus Epstein-Barr).

FONTE: Baseado em dados do Ensembl e do GTEX. Disponível em: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669492-207813992;t=ENST00000367053](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669492-207813992;t=ENST00000367053) e <http://www.gtexportal.org/home/gene/CR1#ptvBlock> Acesso em 10/09/15..



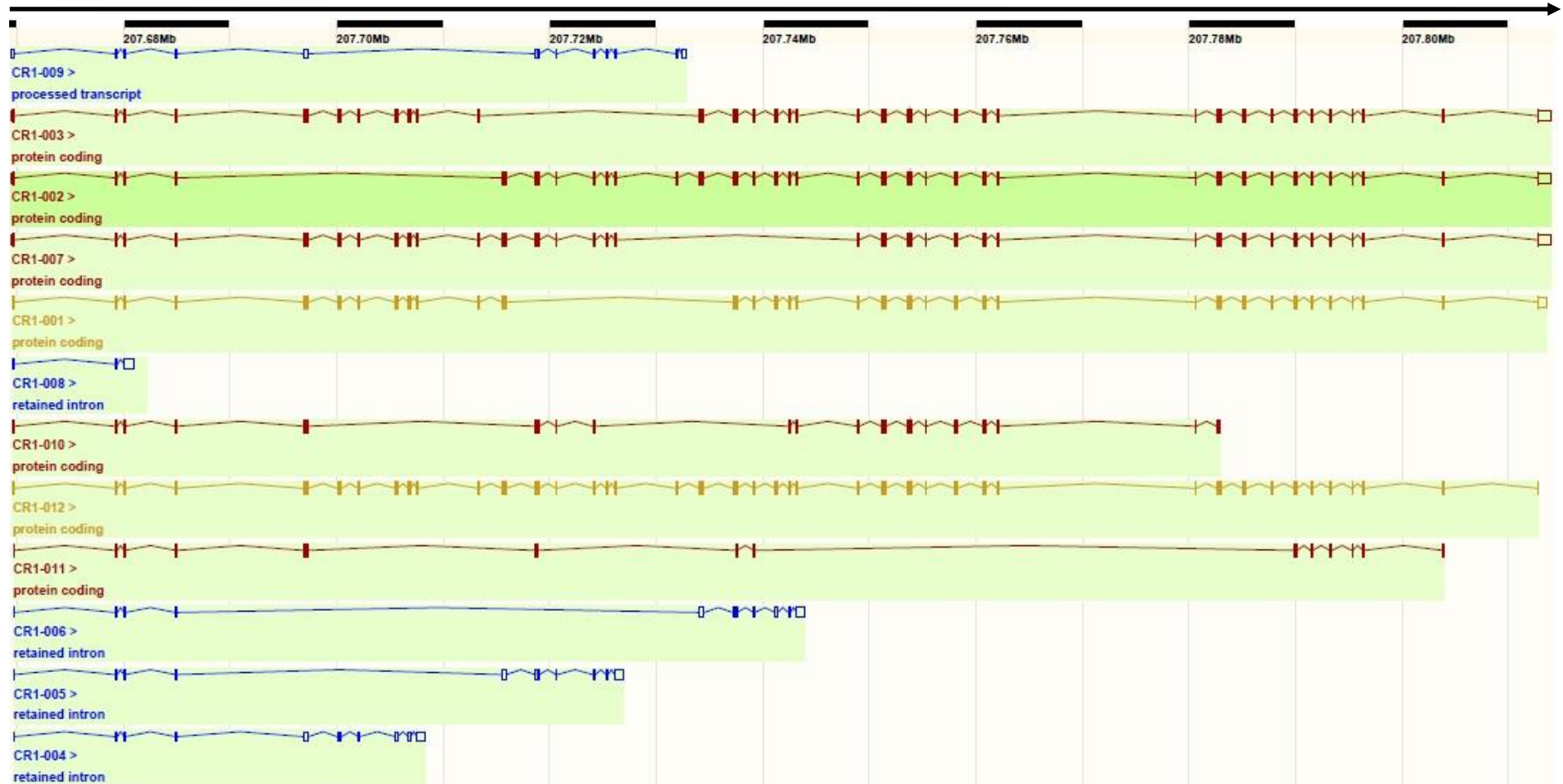


Figura 6: Transcritos do gene *CR1*. NOTA: Com base em dados do navegador genômico Ensembl, o gene *CR1* possui 12 mRNAs. Os blocos fechados representam os exons, os blocos abertos representam regiões não traduzidas, as linhas entre os blocos representam os introns. Os transcritos em vermelho são codificadores de proteínas; os transcritos em laranja foram analisados pelos navegadores genômicos Ensembl e Havana; e os transcritos em azul são transcritos processados. A flecha indica o sentido da transcrição. Os transcritos CR1-001 e CR1-012 são codificadores de proteínas, assim como, os representados com a cor vermelha. FONTE: Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669686-207803972;t=ENST00000367051](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669686-207803972;t=ENST00000367051)> Acesso em 29/01/14

### 2.5.2 Polimorfismo do gene *CR1*

As variações do gene *CR1* podem ocorrer por meio de deleções ou inserções ou por polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que alteram a proteína e/ou afetam a densidade das moléculas de *CR1* na superfície da célula (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001; KRYCH-GOLDBERG 2003 *apud* LIU e NIU 2009).

Inserções e deleções resultantes de recombinação não homóloga são consideradas responsáveis pela ocorrência de quatro variantes alotípicas, variando em tamanho de 190 a 250 kDa, alélicas entre si: *CR1-A* (190 kDa), *CR1-B* (220 kDa), *CR1-C* (160 kDa) e *CR1-D* (250 kDa) (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001; BIRMINGHAM e HEBERT, 2001; DYKMAN *et al.*, 1983; DYKMAN *et al.*, 1984). Longas repetições homólogas (LHR) fornecem um sítio adicional de ligação a C3b para as variantes maiores (*CR1-B* e *CR1-D*), enquanto o pequeno *CR1-C* tem apenas um sítio (WONG *et al.*, 1986; HOLERS *et al.*, 1987). Os alelos mais frequentes são o *CR1-A* (alótipo F) e o *CR1-B* (alótipo S) seguido do *CR1-C* e *CR1-D* que são raros (Tabela 2) (BIRMINGHAM e HEBERT, 2001; MOULDS *et al.*, 1996).

Tabela 2: Frequência das variantes alotípicas de *CR1* em diferentes populações.

Alelos	Frequência alélica (%)				
	Europeu	Afro-americano	Mexicano	Indiano	Asiático
<b>CR1 - A</b>	87	82	89	91,6	91,6
<b>CR1 - B</b>	11	11	11	8,4	8,4
<b>CR1 - C</b>	<5	<5	<5	<5	<5
<b>CR1 - D</b>	<5	<5	<5	<5	<5

FONTE: BIRMINGHAM e HEBERT, 2001; MOULDS *et al.*, 1996.

Um segundo grupo de variações do *CR1* ocorrem devido a alguns polimorfismos que alteram a proteína *CR1* os quais são responsáveis pelas variantes do grupo sanguíneo Knops (MOULDS 2010, VELDHUISEN 2011) (Tabela 3).

Tabela 3: Antígenos do grupo sanguíneo Knops

Antígeno	Nucleotídeo	Aminoácido	SNP
Kn <sup>a</sup>	4681G	1561V	rs41274768
Kn <sup>b</sup>	4681A	1561M	
McC <sup>a</sup>	4768 <sup>a</sup>	1590K	rs17047660
McC <sup>b</sup>	4768G	1590E	
S11/S1a	4801A	1601R	rs1747661
S12/Vil	4801G	1601G	
S13+	4801A	1601R	rs1747661
S13+	4828T	1610S	rs4844609
S13-	4801A	1601R	rs1747661
S13-	4828A	1610T	rs4844609
KCAM+	4843A	1615I	rs3737002
KCAM-	4843G	1615V	
YK <sup>a+</sup>	4223C	1408T	rs6691117
YK <sup>a-</sup>	4223T	1408M	

FONTE: MOULDS 2010, VELDHUISEN 2011

Subsequentemente, foi identificado que os antígenos correspondentes estavam presentes na molécula de CR1 (MOULDS *et al.*, 1991), codificados na região LHR-D do gene *CR1* (MOULDS *et al.*, 2001; TAMASAUSKAS 2001 *apud* LIU e NIU 2009). Muitos destes grupos sanguíneos são gerados por SNPs no exon 29 (codificante para SCR-25) (MOULDS *et al.*, 2004). Estes SNPs estão entre os 43594 relacionados no banco de dados Ensembl (disponível em: <[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Variation\\_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207496147-207640647](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207496147-207640647)> Acesso em: 31/08/2015).

Um terceiro grupo de variação é o polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) *Hind III* que está correlacionado com o número de cópias de CR1 em eritrócitos (E-CR1). Os eritrócitos são o único tipo de células do sangue que tem uma variabilidade autossômica em sua expressão quantitativa. O número de moléculas CR1 por eritrócito varia entre cerca de 100 e 1000. Alelos homozigotos L (baixa expressão) expressam 100 cópias de CR1/célula, alelos homozigotos H (alta expressão) expressam 1000 cópias de CR1/célula, e os heterozigotos (H/L)

apresentam expressão intermediária (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON e 2001). Vários polimorfismos têm sido estudados quanto à sua capacidade de alterar a densidade de E-CR1 nas membranas celulares. O RFLP de *Hind III* (rs11118133, *g.207589899A>T* ou *g.207589899A>C*) corresponde a um SNP no intron 27 do gene *CR1*. O fragmento genômico de 7,4 kb de *Hind III* está associado com o alelo H, e o fragmento de 6,9 kb está associado com o alelo L (LIU e NIU, 2009). Xiang *et al.* (1999) sugerem que a presença de vários SNPs em desequilíbrio de ligação com o RFLP de *Hind III* (rs11118133) podem influenciar na estabilidade da proteína de CR1: rs200082366 (*g.207552816G>T* no exon 19 ou p.Gln1022His), rs2274567 (*g.207580276G>A* ou p.Arg1208His), rs3811381 (*g.207616743C>G* ou p.Pro1827Arg). As variantes do alelo H codificam p.1022Gln, p.1208His, e p.1827Pro, e as variantes do alelo L codificam p.1022His, p.1208Arg e p.1827Arg.

O polimorfismo rs140717816 (*1:g.207542395T>C* no exon 13, p.I684T), mais especificamente p.684Thr, juntamente com p.1022His do alelo L, anteriormente mencionado, também está associado com maior afinidade de ligação por C4b (BIRMINGHAM *et al.*, 2003). Tem-se sugerido que a variante p.1022His proteja contra o fenótipo de roseta e a malária cerebral, por apresentar frequência aumentada em regiões endêmicas para malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (THOMAS *et al.*, 2005).

## 2.6 MOLÉCULA CR1

### 2.6.1 Estrutura

CR1 é uma glicoproteína polimórfica multifuncional, de cadeia única, transmembrana, pertencente à família RCA. A porção extracelular do CR1 pode ser dividida em 30 domínios CCP (ou SCR), sendo cada um composto por 59 a 75 aminoácidos (BIRMINGHAM *et al.*, 2007; JIN *et al.*, 2012). Vinte e oito dos 30 domínios estão dispostos em quatro longas repetições homólogas (LHR-A, LHR-B, LHR-C e LHR-D), cada uma com sete domínios CCP, seguidas pelos dois domínios CCP C-terminais. As sequências de aminoácidos dos LHRs apresentam identidade extensa de 60-99%, o que leva a sugerir que tenham surgido por duplicação (WONG *et al.*, 1989; FURTADO *et al.*, 2008; LIU e NIU 2009). Os CCPs 1-3 em LHR-A formam o sítio 1, que é o sítio ativo para a atividade de aceleração de decaimento da convertase C3 na via clássica/das lectinas e alternativa, ligante de C4b e da proteína PfRh4 da forma merozoíta do parasita da malária, *P. falciparum* (LIU e NIU 2009).

Este mesmo sítio desempenha considerável função neuroprotetora na isquemia cerebral aguda e na injúria por reperfusão no camundongo (YANG *et al.*, 2013). O sítio 2 abrange os CCPs 8-10 em LHR-B e os CCPs 15-17 de LHR-C. Ambas regiões são candidatas para interação com outra proteína de *P. falciparum*, o PfEMP1. Também ligam C3b e C4b e são os principais locais para a atividade co-fatora de CR1 na clivagem de C3b e C4b, mediada pelo fator I, além de promover a fagocitose de elementos opsonizados por C3b. O sítio 3 abrange o CCP 25 em LHR-D. Comporta todos os antígenos conhecidos do grupo sanguíneo Knops, decorrentes de SNPs. Os Knops mais comuns (Kna/b), McCoy (McCa/b) e Swain-Langley (SI1/2) também estão localizados no CCP 24, e os CCPs 24-25 também promovem a fagocitose de elementos opsonizados (C1q, MBL e a ficolina) quando estão livres de serinas proteases (LIU e NIU 2009; JACQUET *et al.*, 2013) (Figura 7 e Figura 8).

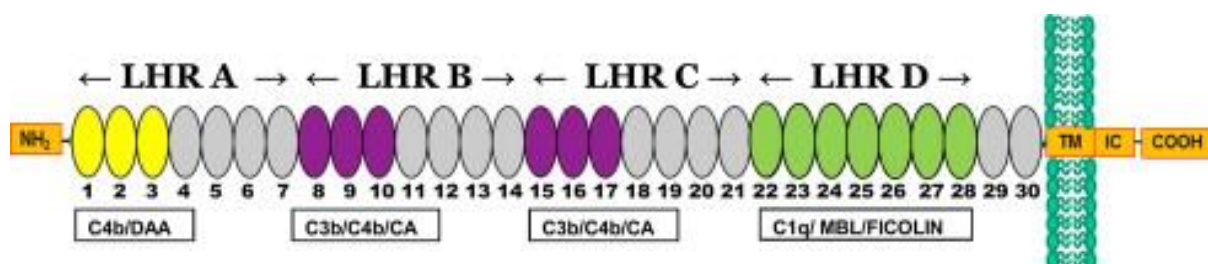


Figura 7: Estrutura do Receptor de Complemento tipo 1 (CR1).

NOTA: Cada bloco representa uma CCP. Existem três sítios de ligação C4b (CCP 1-3; 8-10 e 15-17) e dois sítios de ligação de C3b (CCP 8-10 e 15-17). CCPs 22-28 ligam C1q, ficolinas e MBL. Os blocos 24 e 25 carregam antígenos de grupo sanguíneo frequentes em africanos, mas raros em eurodescendentes. LEGENDA: TM, domínio transmembranar; IC, domínio intracitoplasmático; DAA, atividade de aceleração de decaimento, CA, atividade cofatora; as quatro longas repetições homólogas (LHR) desta proteína são demarcadas: 1-7, 8-14, 15-21, 22-28. Os sítios funcionais em 8-10 e 15-17 são quase idênticas. Repetições em amarelo são necessárias para a ligação C4b e atividade de aceleração de decaimento enquanto aqueles em roxo são necessários para ligação de C3b e C4b e atividade cofatora. FONTE: JAVA (2015).

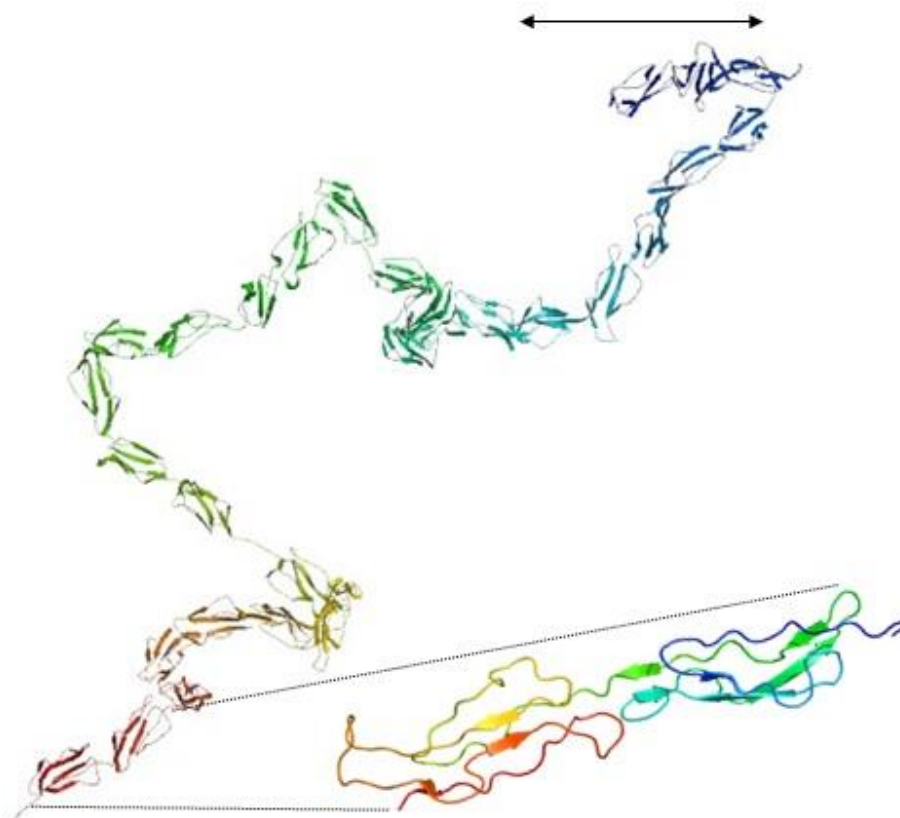


Figura 8: Estrutura dos 30 CCPs (SCRs) que compõem a porção extracelular do CR1. Fonte: FURTADO *et al.* 2008. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2Q7Z&bionumber=1>> Acessado em 29/01/14.

## 2.6.2 Função

A função biológica de CR1 varia com o tipo de célula na qual é expresso. CR1 em monócitos, macrófagos, neutrófilos promove a fagocitose de alvos opsonizados com C3, especialmente se essas células são ativadas por citocinas ou por outros

mediadores de inflamação. Nas células dendríticas foliculares (FDC), acredita-se que CR1 desempenhe um papel no aprisionamento de complexos imunes dentro dos centros germinativos dos órgãos linfoides. Nas células B, regula a sua ativação, além de facilitar a ligação do antígeno e a apresentação às células T (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001; WONG *et al.*, 1989) (Figura 9).

No sistema complemento CR1 atua como um inibidor, por ligar-se reversivelmente a C3b e C4b, inativar as convertases C3 e C5 (complexos multiproteicos que incluem C3b e C4b), e promover a dissociação das subunidades catalíticas C2a ou Bb (atividade de aceleração do decaimento). CR1 também serve como co-fator na clivagem proteolítica do C3b e C4b pelo fator I (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001; LIU e NIU *et al.*, 2009). A interação dos leucócitos por meio de CR1 com C3b e C4b depositados em antígenos, bactérias, vírus ou outras superfícies estranhas leva à proteólise do C3b e C4b através do Fator I a iC3b e iC4b, e subsequentemente a C3d e C4d, os quais são ligantes para outros receptores de complemento, incluindo CR2, CR3 e CR4. O efeito global destas atividades é a regulação negativa da via clássica, alternativa e das lectinas do complemento e o direcionamento da resposta imune a células com outros receptores para o complemento (FURTADO *et al.*, 2008).

CR1 também é encontrado em baixos níveis na maior parte dos eritrócitos (COCKBURN *et al.*, 2006; BIRMINGHAM e HEBERT, 2001). Contudo, é o principal sítio de ligação celular para grandes complexos imunes circulantes, ligados covalentemente a C3b e C4b, facilitando a sua remoção da circulação (FURTADO *et al.*, 2008). Vários complexos imunes de partículas revestidas com C3b podem ser reconhecidos pelas moléculas de CR1 nestas células e nos monócitos polimorfonucleares (PMN) (FEARON *et al.*, 1981). Os receptores Fc-gama e o CR1 trabalham em sinergia para promover a absorção de partículas opsonizadas por imunoglobulinas e proteínas do complemento, de modo que sejam internalizadas e destruídas nos lisossomos (SENGELOV 1994 *apud* LIU e NIU 2009). Por outro lado, CR1 é o principal receptor do *P. falciparum* para invasão de eritrócitos, pela via independente de ácido siálico (AWANDARE *et al.* 2011).

A forma solúvel sCR1 é resultante de clivagem proteolítica na região C-terminal de CR1 em vesículas secretoras terminais ou na membrana (DANIELSSON *et al.* 1994, HAMER *et al.* 1998). sCR1 tem atividades anti-inflamatórias e de regulação do complemento altamente eficazes, o que é notável em situações de

injúria por reperfusão sanguínea, onde a anafilatoxina C5a aumenta a quimiotaxia de leucócitos, capazes de amplificar o dano inicial. O seu potencial terapêutico tem sido comprovado em diferentes modelos animais (BENNET *et al.* 2000, ARUMUGAM *et al.* 2006, LI *et al.* 2010), razão pela qual sua aplicação está sendo investigada, com sucesso, em ensaios clínicos (KESHAVJEE *et al.* 2005).

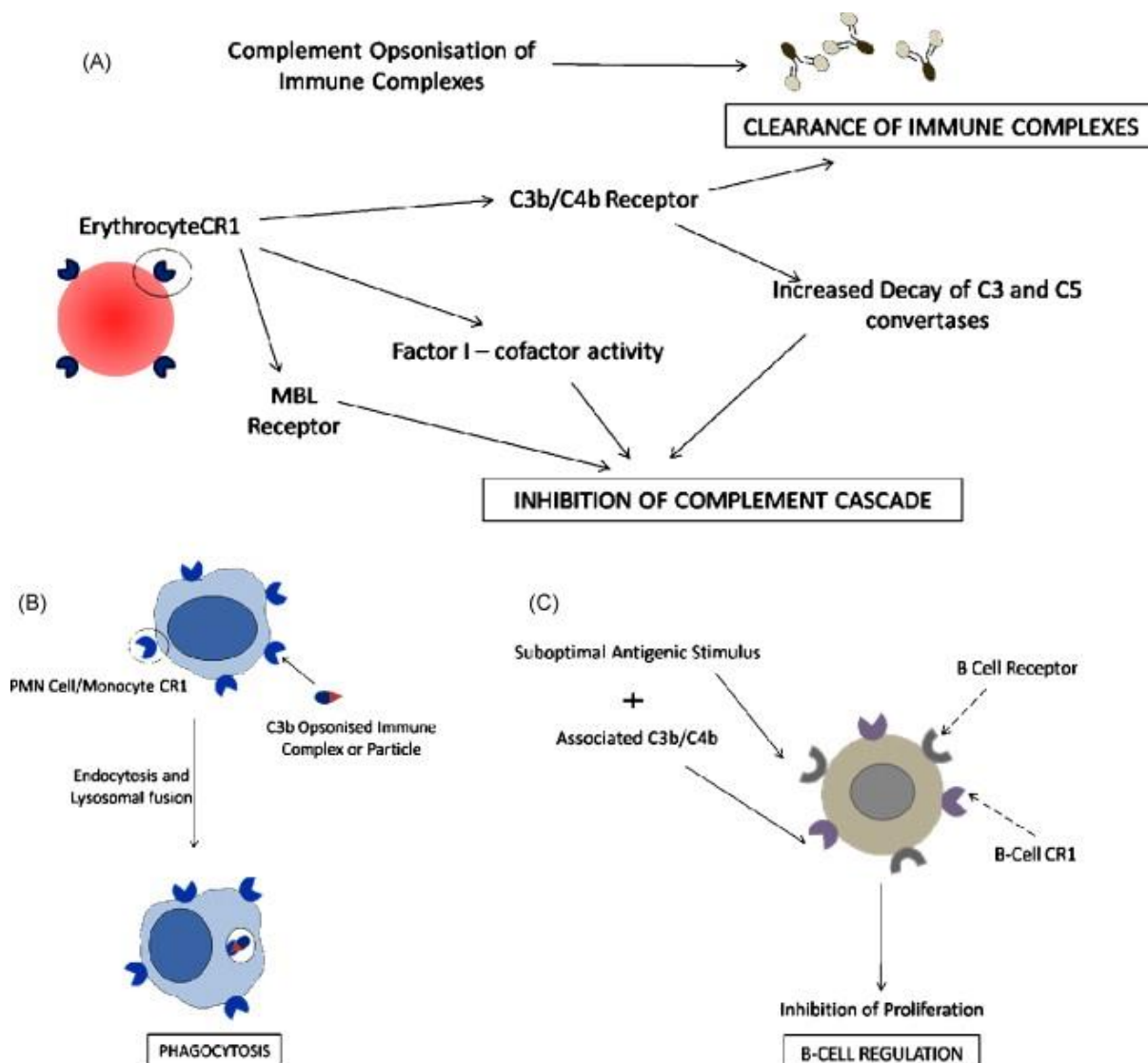


Figura 9: Regulação da cascata do complemento e de complexos imunes por CR1: (A) CR1 em eritrócitos, envolvido na regulação do complemento e eliminação de complexos imunes; (B) CR1 em células polimorfonucleares e monócitos, mediando a fagocitose de partículas opsonizadas/complexos imunes; (C) CR1 em linfócitos B, envolvido na regulação da produção de anticorpos e da memória de longo prazo (KHERA e DAS, 2009).

### 2.6.3 Expressão de CR1

CR1 está presente na membrana de diferentes células, citados anteriormente, e na forma solúvel, no plasma e na urina (LIU e NIU 2009). Noventa por cento do CR1 circulante é encontrado associado a eritrócitos. Neutrófilos expressam cerca de 5.000 cópias de CR1 por célula, e, quando estimulados, aumentam rapidamente



esse número (mais de 10x), devido à liberação de CR1 pré-formado em vesículas secretoras intracelulares. Células B e monócitos expressam 20.000 a 40.000 cópias de CR1, por célula. CR1 também é encontrado em células dendríticas foliculares no centro germinal de linfonodos, que capta e retém antígenos para estimulação de células B (FEARON *et al.*, 1983).

Nos seres humanos, o nível de E-CR1 varia entre as populações e pode ser aumentado por meio de tratamento com eritropoietina (HEBERT *et al.*, 1994). Em europeus, a quantidade de E-CR1 varia entre 50 e 1200 moléculas, por célula. Já na Papua Nova Guiné, baixos níveis de E-CR1 (<100 moléculas por célula) são extremamente comuns (COCKBURN *et al.*, 2004). A regulação da expressão de E-CR1 nestas populações está associada com pelo menos três SNPs, localizados no exon 22 (rs2274567, p.H1208R), intron 27 (rs11118133, sítio de RFLP para *HindIII*) e exon 33 (sítio de restrição para *MnlI*). Ao contrário, SNPs na região promotora e a 3' do gene não parecem estar associados (COCKBURN *et al.*, 2006). Os três SNPs mencionados estão compreendidos em haplótipos co-dominantes, associados a alta e baixa expressão de CR1 em eritrócitos, mas não em outros tipos de células, tais como linfócitos B e macrófagos (COCKBURN *et al.*, 2004; COCKBURN *et al.*, 2006; XIANG *et al.*, 1999).

Embora os níveis fisiológicos de sCR1 no plasma sejam baixos (aproximadamente 30 ng/ml), aumentam significativamente em certas doenças, incluindo insuficiência hepática e renal, linfomas e leucemias (PASCUAL *et al.*, 1993). Concentrações aumentadas de sCR1 também foram encontradas na lavagem broncoalveolar dos pacientes com doenças pulmonares inflamatórias agudas (síndrome do stress respiratório e pneumonia bacteriana) e crônicas (fibrose pulmonar intersticial e sarcoidose) (HAMACHER *et al.*, 1998). Existe uma forma solúvel e funcional encontrada na urina (uCR1), com peso molecular cerca de 15 kDA superior ao de sCR1, possivelmente oriunda dos podócitos glomerulares (PASCUAL *et al.*, 1994).

#### 2.6.4 Associação entre CR1 e doenças

Polimorfismos no gene *CR1* têm sido associados a diferentes doenças, entre elas a doença de Alzheimer, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e malária. Alguns desses polimorfismos foram escolhidos para o presente estudo de associação (Tabela 4).

CR1 parece ser um fator chave para a patogênese da doença de Alzheimer (DA), devido ao seu papel na regulação da atividade do complemento. A fagocitose mediada por CR1 pode estar envolvida na depuração de placas  $\beta$  amiloides do cérebro (componente importante na DA), pois peptídeos  $A\beta$  fibrilares ativam a cascata do complemento, tornando-se covalentemente ligados a C3b (OLGIATI *et al.*, 2011; JIN *et al.* 2012; BROUWERS *et al.*, 2012). Variantes dentro do *locus CR1* estão fortemente associadas com a diminuição da memória episódica e podem desempenhar um papel importante na depuração de placas  $\beta$  amiloides (KEENAN *et al.*, 2012). Por meio de estudos genômicos de associação (GWAS), observou-se que o alelo A do SNP rs6656401 (*g.207518704A>G*), representa um fator de risco na susceptibilidade da DA na população de origem europeia (OR=1,21 [95% IC = 1,14–1,29]  $p = 3,7 \times 10^{-9}$ ) e na população chinesa Han (OR = 1,76 [95% IC = 1,19–2,60]  $p = 0,005$ ) (LAMBERT 2009 *apud* JIN *et al.*, 2012). Outro SNP associado a DA em europeus foi o rs3818361 (*g.207611623A>G*) (OR 1.14) (OLGIATI *et al.*, 2011, ANTUNEZ, 2011).

Baixos níveis de CR1 em eritrócitos, leucócitos e podócitos glomerulares foram associados ao LES (IIDA *et al.*, 1982; HAMER *et al.*, 1998; ARORA *et al.*, 2004). Barbosa *et al.* (1992) sugeriram que a perda de E-CR1 no LES pode ser devida à proteólise no fígado. Arora *et al.* (2004) demonstraram que a expressão de CR1 em nível transcricional e de proteína é menor em indivíduos com LES, do que em indivíduos saudáveis. Além disso, valores médios para CR1 urinário (uCR1) ( $0,66 \pm 0,39$  ng/mL) foram significativamente menores em pacientes com LES, em comparação com os controles normais ( $1,44 \pm 0,98$  ng/mL) ( $P < 0,05$ ) (SIVASANKAR *et al.*, 2004).

CR1 parece desempenhar um papel importante na patogênese da malária grave, em virtude de sua capacidade de "formação de roseta", um fenômeno resultante da sua adesão à proteína 1 de membrana de eritrócito do *P. falciparum* (PfEMP-1), formando complexos imunes (ICs) e facilitando a entrada do parasita nas

hemácias (TEERANAIPONG *et al.*, 2008; HANSSON *et al.*, 2013). Indivíduos com maior expressão de CR1 poderiam apresentar maior susceptibilidade a desenvolver malária cerebral, devido ao bloqueio do fluxo de sangue nos capilares do cérebro causado pelo acúmulo de rosetas, embora nenhuma associação tenha sido encontrada até o momento. Ao contrário, níveis mais baixos de CR1 em eritrócitos foram associados com anemia grave (STOUTE *et al.*, 2003). Já o SNP rs9429942 (*g.207495285C>T*) da região promotora do *CR1* foi fortemente associado a um nível maior de expressão de E-CR1 em indivíduos saudáveis e proteção contra a malária cerebral (TEERANAIPONG *et al.*, 2008). A taxa de depuração de ICs da circulação também apresenta correlação positiva com o número de E-CR1 (SCHIFFERLI *et al.*, 1989; MADI *et al.*, 1991). Logo, a menor expressão de E-CR1, associada ao polimorfismo do promotor de CR1, leva a uma maior deposição de ICs, o que provoca danos nos tecidos ou a agregação de células, possivelmente conduzindo a características clínicas graves, incluindo a malária cerebral. Por outro lado, a maior expressão de E-CR1 pode ajudar a prevenir o desenvolvimento de tais sintomas graves por meio de remoção eficiente de ICs. Em um estudo realizado na Índia, a associação dos níveis de CR1 com a malária foi analisada para uma região endêmica e outra não endêmica, usando os níveis de CR1 e dados de genótipos de controles e pacientes com acometimento mais ou menos grave. A associação entre os níveis baixos de CR1 e a gravidade da doença foi observada, apenas, na região não endêmica (SINHA *et al.*, 2009). No Quênia, Thathy *et al.* (2005) observaram que as crianças com o genótipo SI2/2  $McC^{a/b}$  foram menos propensas a ter a malária cerebral do que as crianças com SI1/1  $McC^{a/a}$  (OR= 0,18, P= 0,02). A falta de replicação dos resultados de alguns estudos pode ser devido a outros fatores, como o nível de parasitemia e a linhagem de parasitas, pois ambos influenciam o grau de formação de roseta (ROWE *et al.*, 2002; HO *et al.*, 1991).

Em relação ao PF, não há quaisquer estudos relacionando os polimorfismos e níveis plasmáticos de proteínas reguladoras do complemento, como CR1, com a doença assim como com outras formas de pênfigo.

Tabela 4: Variantes de *CR1* associadas a doenças

SNP	Localização	Variação	Troca de aminoácido	Associação com doenças
<b>rs12567990</b>	Intron 3	1:g.207508340C>T		Afeta níveis de sedimentação em eritrócitos (Naitza, <i>et al.</i> , 2012)
<b>rs6656401</b>	Intron 4	1:g.207518704A>G		Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer (Lambert, 2009)
<b>rs2274567</b>	Exon 22	Mutação não sinônima 1:g.207580276A>G	Histidina / Arginina (p.H1208R)	Afeta níveis de expressão de CR1 em eritrócitos (Naitza, <i>et al.</i> , 2012) Proteção contra a malária grave (Cockburn <i>et al.</i> 2004)
<b>rs12034598</b>	Intron 24	1:g.207584170A>G		Afeta níveis de expressão de CR1 em eritrócitos (Naitza, <i>et al.</i> , 2012)
<b>rs1746659</b>	Intron 24	1:g.207585199T>A		Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer (Brouwers, <i>et al.</i> , 2012)
<b>rs6691117</b>	Exon 29	Mutação não sinônima 1:g.207609586A>G	Isoleucina/ Valina (p.I1615V)	Afeta níveis de sedimentação em eritrócitos (Kullo <i>et al.</i> , 2011) Nascimento prematuro espontâneo (McElroy <i>et al.</i> , 2013)
<b>rs17047660</b>	Exon 29	Mutação não sinônima 1:g.207609511A>G	Lisina/ Ácido Glutâmico (p.K1590E)	Associado a convulsões associadas à malária (Kariuki, <i>et al.</i> , 2013) Homozigotos McC <sup>b</sup> aparentam estar protegidos contra a hanseníase (Fitness <i>et al.</i> , 2004)
<b>rs4844610</b>	Intron 37	1:g.207629207A>C		Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer (Hazrati, <i>et al.</i> , 2012).

---

**rs12034383**

Intron 37

1:g.207630250G&gt;A

Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer  
(Brouwers *et al.*, 2012)Afeta níveis de sedimentação em eritrócitos (Kullo *et al.*, 2011)

---

### 3 HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA

A hipótese levantada neste estudo é de que polimorfismos podem alterar a expressão do gene *CR1* e/ou a atividade da proteína CR1, desregulando o sistema complemento e alterando a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Estudos de associação do gene *CR1* com doenças autoimunes e inflamatórias têm sido realizados devido à importância desse gene na ativação e regulação do sistema complemento. No pênfigo foliáceo, falhas na regulação da ativação do sistema complemento têm sido propostas como causa da acantólise (BRENNER *et al.* 2006). Contudo, não há quaisquer estudos relacionando os polimorfismos e níveis plasmáticos de proteínas reguladoras do complemento, como CR1, com o pênfigo foliáceo. Este fato torna importante a realização de estudos que esclareçam o papel da regulação do complemento na fisiopatologia dessa doença. Tal conhecimento permitiria a implementação de medidas de correção, como a utilização de sCR1 (QUIGG 2002), aprimorando o manejo clínico desta doença e possivelmente de outras doenças bolhosas semelhantes, como o pênfigo vulgar.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se existe associação entre os polimorfismos de *CR1* e a expressão da proteína CR1 solúvel (sCR1) com a susceptibilidade ao PF, assim como com diferentes manifestações sintomáticas, em pacientes com e sem tratamento.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar PCR-SSP multiplex para rápida haplotipagem de polimorfismos de relevância clínica no gene *CR1*;
- Verificar possíveis associações entre os alelos e genótipos de SNPs e a susceptibilidade ao PF *per se*;
- Verificar possíveis associações entre os alelos e genótipos de SNPs e a susceptibilidade às formas localizada e generalizada do PF;
- Descrever os haplótipos deste gene em pacientes com PF e controles;
- Propor uma nomenclatura para os haplótipos, baseada em suas relações filogenéticas;
- Verificar possíveis associações entre os haplótipos e a susceptibilidade ao PF *per se*;
- Verificar possíveis associações entre os haplótipos e a susceptibilidade às formas localizada e generalizada do PF;
- Descrever os níveis séricos de sCR1 em pacientes com PF e controles;
- Verificar possíveis associações entre os genótipos de SNPs e haplótipos e os níveis séricos de sCR1;
- Verificar possíveis associações entre os níveis séricos de sCR1 e a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo *per se*;
- Verificar possíveis associações entre os níveis séricos de sCR1 e a susceptibilidade às formas localizada e generalizada do PF;
- Verificar possíveis efeitos do tratamento sobre os níveis séricos de sCR1 em pacientes com PF.

## 5 ARTIGO

### **CR1 polymorphisms and soluble CR1: an anti-inflammatory role in pemphigus foliaceus**

Luana Caroline Oliveira<sup>1</sup>, Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>, Iara José de Messias-Reason<sup>2</sup>, Angelica Beate Winter Boldt<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

#### **Corresponding author**

Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

Departamento de Genética

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071

81531-980 Curitiba, Brasil

Tel: (+5541) 3361-1553, 3361-1724

e-mail: [angelicaboldt@gmail.com](mailto:angelicaboldt@gmail.com)



**ABSTRACT**

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease endemic in Brazil, characterized by the presence of autoantibodies against desmoglein-1, causing epidermal blisters. Complement receptor 1 (*CR1*) inhibits complement activation, which may block disruption of desmosomal junctions. In order to evaluate the functional impact of *CR1* on the susceptibility to PF, we used sequence-specific PCR, in a strategy to physically haplotype nine *CR1* polymorphisms, which includes: rs2274567 in exon 22 – p.H1208R, rs3737002 in exon 26 – p.T1408M and rs17047660 in exon 29 – p.K1590E. We identified *CR1* alleles, distributed in thirteen haplotypes, in up to 282 PF patients and 214 controls living in the same affected areas and measured levels of soluble CR1 (sCR1) in a subset of 53 patients and 27 controls. We found an association of the minor alleles of two polymorphisms, rs3737002 encoding p.1408M, responsible for the KCam blood group (OR=0.55, p=0.006) and rs3849266 in intron 21 (OR=0.66, p=0.046) with protection against PF. We also found the rs17047660 (encoding p.1590E, responsible for the McCoy blood group), associated with susceptibility to PF (OR=2.99, p=0.033). Carriage of least one of two haplotypes encoding the KCam (but not the McCoy blood group antigen) was associated with protection against the disease (OR=0.56, p=0.009). We also observed that patients in remission or with localized lesions but under treatment had higher levels of sCR1, compared with healthy controls (p=0.01 and p=0.006, respectively). Among patients with lesions, those under treatment had higher sCR1 levels (p=0.02). Among those under treatment, patients with localized lesions had higher sCR1 levels than patients with generalized lesions (p=0.0004). In conclusion, *CR1* polymorphisms are associated with protection and disease susceptibility. Corticoid treatment seems to increase sCR1 serum level, and higher levels may play a anti-inflammatory protective role in individuals with EPF.

**Keywords:** pemphigus foliaceus, autoimmunity, *CR1* polymorphism, sCR1.

## INTRODUCTION

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease characterized by epidermal blisters, which result from the loss of adhesion between keratinocytes (acantholysis). In Brazil, PF is endemic, being also known as *fogo selvagem* (wild fire, in English), due to the similarity of symptoms with burning injuries. It affects mainly young adults that live in rural areas near to rivers, within the flying range of hematophagous insects [1-3]. The disease is associated with the production of IgG1 and IgG4 autoantibodies against desmoglein 1 (Dsg1) and occasionally against desmoglein 3 (Dsg3), important components of desmosomes [1]. The recognition of bound IgG1 antibodies and altered cell-associated molecular patterns activate the complement system, responsible for the recurrent observation of complement components as C1q, C3b, C4b and the membrane attack complex on cell surfaces of PF epidermal blisters, initiating and feedbacking the acantholytic process [4-7].

The complement receptor 1 (CR1) recognizes and binds C3b and C4b, as well as C1q, mannose-binding lectin and ficolins, and removes opsonized immune complexes from the bloodstream. It also interrupts the complement cascade, being a co-factor for the Factor I-mediated cleavage of soluble/bound C3b and C4b. Its soluble form results from proteolytic cleavage in terminal secretory vesicles or in the membrane [8-9]. The CR1 gene is located in the RCA (Regulators of Complement Activation) gene cluster on the long arm of chromosome 1 (1q32) and contains 39 exons, of which 34 express 30 short consensus repeats (SCR) distributed in four long homologous repeats (LHR) responsible for complement decay-accelerating and cofactor activities (Figure 1). It is primarily expressed in erythrocytes, B-cells, a subset of T cells, neutrophils, monocytes and dendritic cells. Polymorphisms that alter gene expression or protein activity are common in different populations and have been associated with different infectious diseases such as leprosy and malaria; autoimmune diseases, such as lupus erythematosus and rheumatoid arthritis; and neurodegenerative, such as Alzheimer [10-13].

There are no studies about protein expression and polymorphisms of complement regulators in general, and of CR1 in particular, with PF. Thus we aim to fill in this gap by evaluating possible associations between CR1 polymorphisms and the expression of soluble CR1 protein (sCR1) with susceptibility to PF, as well as with different symptomatic manifestations of the disease, in patients with and without

treatment. This is particularly important given the relevance of CR1 in inhibiting the complement system and removing immune complexes, major deregulated events in autoimmunity.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Subjects and samples*

The National Committee for Ethics in Research (CONEP) approved this study (project approval 505.988). We personally informed every participant about the purpose and other relevant aspects of the study and recruited 282 patients with PF and 214 controls (among accompanying persons, health workers and other volunteers). Most patients (93%) and controls (88%) lived in Central Western Brazil and were cared for or worked in the Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, MS). All the others lived in Southwestern and South Brazil, of which 6% of the patients attended the Lar da Caridade (Uberaba, MG), 1% the Hospital das Clínicas of the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP), and 1% of patients and the remainder 12% of controls, the Hospital de Clínicas of the UFPR (Curitiba, PR). Inclusion criteria were: written informed consent, being resident in the endemic region, and for the patients, PF diagnosis based on clinical and immunohistochemical analysis. Exclusion criteria were: consanguinity and a familial history of autoimmune diseases, like PF and others. All subjects were classified according to ethnic origin, based on physical characteristics and self-reported ancestry, as previously described [14]. Among the patients, 53% were female, 58.36% were Euro-Brazilians, 41.64% Afro-Brazilians, with an average age of 37.5 years (6-86). Forty one patients were untreated at sampling, and the treatment of choice for most of the others included prednisone. Thirty seven patients (13%) were in disease remission. Among the 135 symptomatic patients with information regarding the distribution of blistering lesions, 29% had localized epidermal blisters (aLUT), and 71% had generalized lesions (aGUT). Among the controls, 49% were female, 64% were Euro-Brazilians, 33% Afro-Brazilians and 3% Amerindians, with an average age of 42 years (17-88). DNA was extracted from peripheral blood leukocytes as previously described, using phenol-chloroform-isoamyl alcohol [15].

### *CR1 genotyping*

We selected the SNPs based on (1) minor allele frequency (MAF > 0.05 in Northern Europeans from Utah - USA, Mexican, Colombian and Yoruba populations of the 1000 Genomes Project – available in <http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers> [16]<sup>1</sup>; (2) linkage disequilibrium (tag SNPs with  $r^2 \geq 0.8$  in at least one of the above mentioned populations)<sup>2</sup>; (3) previous association with disease (as reported in the literature). We did not evaluate copy number variants (CNVs) of [17], but chose to genotype nine SNPs which occur in exons and introns shared by the pre-mRNAs encoding the most frequent CNV isoforms CR1-S and CR1-F (Figure 1) (shown in Suppl. Figure 2): rs6656401 (1:g.207518704A>G in intron 4), rs3849266 (1:g.207579645C>T in intron 21), rs2274567 (1:g.207580276A>G in exon 22 or p.His1208Arg), rs3737002 (1:g.207587428C>T in exon 26 or p.Thr1408Met, responsible for the KCam blood group antigen), rs11118131 (1:g.207587851C>T in intron 26), rs11118167 (1:g.207608809T>C in intron 28), rs17047660 (1:g.207609511A>G in exon 29 or p.Lys1590Glu, responsible for the McCoy blood group antigen), rs4844610 (1:g.207629207A>C in intron 37), rs12034383 (1:g.207630250G>A in intron 37).

We aimed to physically haplotype eight of these SNPs, by evaluating coamplification of DNA fragments differing in length by at least 100 bp, using different combinations of forward and reverse sequence-specific primers (SSP). With this end, we optimized two multiplex PCR-SSP, in which we included up to six sequence-specific primers in one PCR reaction, thus saving DNA, time, materials and reagents. The sequence of SSPs and control primers are shown in Table 1. All reactions (including one simple PCR-SSP) were carried out in a final volume of 15µl, containing 20 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1x Coral Buffer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Thermal cycling began with 95°C for 5 min; followed by 30 cycles, where each cycle began with 94°C for 20 s and ended with 72°C (extension step) for 40 s.

We discriminated the rs6656401 alleles using a simple PCR-SSP, with 0.3 µM of each SSP and 0.1 µM of each control primer, in the presence of 1.65 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.02 units Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). The annealing temperatures of the primers were 56°C for the initial 10 cycles, 53°C for

---

<sup>1</sup> As frequências alélicas dos SNPs de *CR1* estão listadas na tabela 4 do apêndice.

<sup>2</sup> A figura 10 do apêndice apresenta o plot do desequilíbrio de ligação entre polimorfismos comuns do gene *CR1*, em populações do projeto HapMap.

the following 10 cycles and 50°C for the last 10 cycles. In the multiplex PCR-SSP 1, we used 0.2 µM of SSPs for discriminating the alleles of rs3849266 and rs2274567, 0.4 µM of SSPs for rs4844610 and rs12034383, 0.1µM of each control primer, in the presence of 1.50 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.15 units Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). The annealing temperatures of the primers were 62°C for the initial 5 cycles, 60°C for the following 15 cycles and 58°C for the last 10 cycles. In the multiplex PCR-SSP 2, we used 0.5 µM of SSPs for discriminating the alleles of rs3737002 and rs11118131, 0.6 µM of SSPs for rs11118167 and rs17047660, 0.1 µM of each control primer, in the presence of 1.50 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.15 units Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). The annealing temperatures of the primers were 59°C for the initial 10 cycles, 57°C for the following 5 cycles, 55°C for another 5 cycles and 53°C for the last 10 cycles. We evaluated the pattern of amplified fragments after electrophoretic run on 1.5% agarose gel, stained with Sybrsafe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) (Suppl. Figure 1).

#### *sCR1 Quantification*

We measured sCR1 levels in the serum of 53 PF patients and 27 healthy controls, collected between 2011 and 2015, matched for sex and age <sup>3</sup>, using SEB123Hu ELISA kit (USCN Life Science Inc., Wuhan, China), according to the manufacturer's instructions. Eighteen of the patients were in disease remission, nine without treatment (rWT) and nine under immunosuppressive treatment (rUT); 35 patients presented active pemphigus, six still untreated (aWT) and 29 already being treated (aUT). Among the patients with known information regarding distribution of lesions, five had localized epidermal blisters (aL), and 21 had generalized lesions (aG). We previously measured anti-Dsg1 levels in 49 of the patients and 28 of the controls and anti-Dsg3 levels in 17 of the controls and 30 of the patients, using commercial ELISA kits, (RG-M7593-D and RG-7680-EC-D from MBL®, respectively) (Oliveira *et al.*, submitted). Among the investigated patients, 27 (55%) were positive for anti-Dsg1 and one (3.3%) for anti-Dsg3, whereas controls were negative for both

---

<sup>3</sup> A caracterização das amostra de controles e pacientes analisadas pelo ELISA está descrita na tabela 5 do apêndice.

autoantibodies, with exception of one individual, who was both anti-Dsg1 and anti-Dsg2 positive and was excluded from other analyses.

### *Statistical and bioinformatical analysis*

We obtained allele, genotype and two-SNP haplotype frequencies by direct counting, and evaluated the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium with the exact test of Guo & Thompson, implemented in the Arlequin v.5.1 population genetics software package [18]. We reconstructed extended haplotypes based on linkage disequilibrium and phase information about the two-SNP haplotypes, given by the PCR-SSP amplification. We compared the results with the haplotypes estimated using the EM algorithm (Expectation-Maximization) implemented in the PLINK software [19] and found 2.9% of discrepant results, which is in accordance with the literature [20]. We also used PLINK for analysis SNP-to-SNP interactions, but evaluated linkage disequilibrium with Haploview 4.2 [21]. We further compared the distribution of polymorphisms and haplotypes in patients and controls adjusted for the proportion of ethnic groups using Fisher exact test, with the online software VassarStats (VassarStats: Website for Statistical Computation; available at: <http://vassarstats.net>) [22]. We adjusted all associations for possible effects of confounding factors (such as age, sex, ethnic group), by logistic regression in nonadjusted patient and control groups, using the software STATA v.9.2 (Statacorp, Lakeway Drive, TX). Comparisons between medians were made using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests using the program GraphPad Prism v.5.01. To predict functional effects of associated SNPs, we explored data from the ENCODE project, contained in the RegulomeDB [23] and Haploreg [24] databases. To evaluate the effect of non synonymous SNPs, we used Polyphen-2 [25].

## **RESULTS**

### *CR1 SNPs and susceptibility to Pemphigus Foliaceus*

Within each ethnic group, we found homogeneity in the genotype distribution of patients and controls recruited in Central West and South/Southeast Brazil ( $p > 0.22$ ). Thus, besides analysing “total” and “total adjusted (for ethnic proportion)” groups, we evaluated patients and controls according to their classification as Euro-Brazilians and Afro-Brazilians. We found the genotype distributions of SNPs to be in

accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. There was also strong pairwise linkage disequilibrium between the SNPs in intron 21 (rs3849266), exon 22 (rs2274567), exon 26 (rs3737002) and intron 37 (rs12034383), both in Euro- and Afro-Brazilians (Suppl. Figure 2).

In the total adjusted group, minor alleles of two polymorphisms - rs3737002 and rs17047660 – were associated with protection and susceptibility to PF, respectively (Figure 2).<sup>4</sup>

Regarding rs3737002, the *1:g.207587428T* minor allele in exon 26 encodes p.1408Met, responsible for positive KCam blood group antigen. Carriers of this allele occurred at higher frequency in control group (81/148 or 54.7%), than patients (84/214 or 39.3%), a proportion most evident among Euro-Brazilians (54/89 or 60.7% vs. 52/125 or 41.6%). This allele presented a dominant protective effect against the disease, after correction for age (sexual and ethnic group proportions were not associated) in the total sample - OR=0.55 [95%CI=0.36-0.84] (p=0.006) – as well as in Euro-Brazilians - OR=0.58 [95%CI=0.35-0.95] (p=0.03).

On the other hand, the minor allele of rs17047660 in exon 29 (*1:g.207609511G*) encodes p.1590Glu, responsible for positive McCoy blood group antigen. Carriers of this allele (all heterozygotes) were more frequent among the patients (20/197 or 10.2%), than among the controls (5/134 or 3.7%), independent of age, sex and ethnic group: OR=2.99 [95%CI=1.09-8.17] (p=0.033).

In the total group, we additionally found that the carriage of the *1:g.207579645T* minor allele of rs3849266 (in intron 21) increased protection against PF in Euro-descendants and in the total sample (115/192 or 59.9% in control and 110/221 or 49.8% in patients), independently of age, sex and ethnic group (OR=0.59 [95%CI=0.35-0.98], p=0.043 and OR=0.66 [95%CI=0.45-0.99], p=0.046, respectively).

In Euro-descendants, we found a protective interaction between two intronic SNPs, which are not in linkage disequilibrium ( $r^2=0.26$ ) and did not have any effect when they are separated: rs11118167 (*1:g.207608809T>C* in intron 28) and rs12034383 (*1:g.207630250G>A* in intron 37) (p = 0.026)<sup>56</sup>. In the stratified analysis,

<sup>4</sup> As frequências alélicas, genotípicas e de portadores para os SNPs de *CR1* estão listadas na tabela 6 do apêndice.

<sup>5</sup> As análises estratificada dos SNPs epistáticos de *CR1* estão listadas na tabela 7 do apêndice.

<sup>6</sup> As frequências dos haplótipos de dois SNPs formados pelos SNPs epistáticos de *CR1* estão listadas na tabela 8 do apêndice.

there was a dominant protective effect for the combination of the rs12034383 A minor allele and the rs11118167 minor C allele, regardless of genotype (heterozygous or homozygous) (OR = 0.44 [95%CI= 0.22-0.88], p = 0.022), or in combination with the rs11118167 T/C heterozygous genotype (OR=0.10 [95%CI= 0.01-0.82], p = 0.020).

There was also a trend for an association with the rs12034383 1:g.207630250A allele in intron 37 with susceptibility to generalized PF lesions (52/70 or 74.3%), compared with localized PF lesions (19/32 or 59.4%), after adjustment for the proportion of ethnic groups: OR=2.35 [95%CI=0.99-5.57] (p=0.053). No other SNP was associated with the severity of the disease.

### *CR1 haplotypes and susceptibility to Pemphigus Foliaceus*

Based on linkage disequilibrium and phase information obtained with SSP amplification, we haplotyped all SNPs in a subset of 173 patients and 125 controls and found thirteen haplotypes, named according to the phylogenetic nomenclature suggested by others [26] and adapted for recombinant haplotypes [20] (Figure 3).<sup>7</sup> Four haplotypes were probably recombinant and shared the 1:g.207630250A allele in intron 37 (rs12034383). In the phylogenetic analysis (including only nonrecombinant haplotypes), we rooted the tree on the GCACCTACG (\*1) haplotype, which is identical to the sequence found in *Pan troglodytes* (NM\_001193675). Haplotypes \*4 and \*2 occurred on isolated branches. Haplotype \*2 and a recombinant haplotype (\*2.3B2B) are unique in that they harbor the 1:g.207609511G allele in exon 29, encoding p.1590Glu, responsible for the McCoy blood group antigen (rs17047660). On the other hand, clade \*3A represented all haplotypes encoding p.1208Arg, that carries the 1:g.207580276G allele in exon 22 (rs2274567). Yet clade \*3B harbored all haplotypes with the 1:g.207630250A allele in intron 37 (rs12034383), probably involved in the generation of all four recombinant haplotypes. The KCam blood group antigen (corresponding to the 1:g.2075874328T allele in exon 26 or p.1408Met), is solely encoded by one haplotype of this clade (\*3B2B) and two recombinant haplotypes (\*1.3B2B and \*3B2B..3A2B).

Genotype distributions of haplotypes were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. Two haplotypes occurred at higher frequency among controls (Table 2), both encoding the KCam blood group antigen, differing only in the rs3849266 SNP

---

<sup>7</sup> As frequências dos haplótipos e análise de OR estão listadas na tabela 9 do apêndice.



(1:g.207579645C>T in intron 21). The \*1.3B2B haplotype (GCATCTACA) was associated with protection against PF in Euro-Brazilians and in the total sample (OR = 0.23 [95%CI=0.06 - 0.87], p = 0.033 and OR = 0.28 [95%CI=0.09 - 0.90], p=0.029 respectively), and \*3B2B (GTATCTACA) only in the total sample (OR=0.63 [95%CI=0.43-0.94], p=0.025). The carrier status of any of these haplotypes, after correction for demographic factors, was even stronger associated with protection against the disease (OR=0.56 [95%CI= 0.36-0.86], p=0.009).

#### *sCR1 levels and susceptibility to Pemphigus Foliaceus*

sCR1 levels differed according to treatment and disease manifestations, but not according to genotypes of the investigated SNPs and haplotypes. Patients in remission under treatment (rUT) had higher levels of sCR1 compared to controls (medians 1.816 ng/mL vs. 1.232 ng/mL, respectively, p=0.01), but patients under remission, without treatment (rWT), presented variable values (Figure 4). On the other hand, there was no clear difference between sCR1 levels in controls and patients with active pemphigus under treatment (aUT) (medians 1.232 ng/mL vs. 1.392 ng/mL, respectively, p=0.223). However, within patients with PF lesions, those under treatment (aUT) had higher sCR1 levels, than those with PF at admission, before getting treated (aWT) (medians 1.392 ng/mL vs. 0.610 ng/mL, respectively, p=0.026). Among the aUT patients, those with localized lesions (aLUT), presented the highest sCR1 levels, especially compared to those severely affected, with generalized lesions (aGUT) (medians 2.388 ng/mL vs. 1.224 ng/mL, respectively, p=0.0004). sCR1 levels of aLUT patients were also much higher compared to controls (p=0.007), and to patients before treatment (aWT) (p = 0.016). It is important to highlight there was no difference in serum levels of patients under treatment with different doses of corticosteroids.

## DISCUSSION

CR1 has a major role in inhibiting the complement system and removing immune complexes, main events that are desregulated in autoimmune diseases, such as lupus and rheumatoid arthritis [10-12]. Complement inhibition is also severely hampered in PF, as judged by heavy deposition of complement components on desmosomal junctions [4-7]. Despite the importance of the complement system, this is the first study to investigate gene polymorphisms and protein expression of a complement regulator on a cutaneous autoimmune disorder, such as PF.

The most evident association was with a CR1 aminoacid substitution that modifies the first SCR in the LHR-D module (SCR 22), which is responsible for the recognition of the initiation molecules of the classical (C1q) and lectin (mannose binding lectin or MBL/ficolin or FCN) pathways. Specifically, p.1408M that encodes the KCam epitope (rs3737002) presented a dominant protective effect against the disease. It is also reported as a susceptibility allele to late-onset *alzheimer* disease in Han Chinese [27]. The p.T1408M amino acid substitution is considered at least probably damaging (score 0.9 or higher), as estimated using the algorithms implemented in Polyphen-2 (but not in SIFT, which resulted in tolerated, with score 0.09). We suggest that this substitution contributes to reduce the binding to IgG1-bound C1q, as well as to MBL/FCNs bound to exposed glycosylated/acetylated residues on desmosomes and epithelial cells, decreasing internalization of neoantigens by antigen-presenting cells. This would reduce the positive feedback loop on autoantibody production and further desmosomal destruction. Yet the protective association found with the intronic *1:g.207579645T* allele (rs3849266) seems to be a feature of strong linkage disequilibrium with the *1:g.207587428T* allele of rs3737002. Another possible explanation would be that subjects that carry this allele, or with SNPs bonded to it, modulate the expression of CR1 on membrane. Low expression could result in a higher activation of complement system and deposition of membrane attack complex, frequently observed in PF, as well as in PV [4-5, 28-30].

The very opposite is expected to occur with the amino acid substitution that creates the McCoy "b" antigen in SCR25, namely p.K1590E (rs17047660). This SNP is also deemed to damage (although with a lower Polyphen score: 0.597) or deleterious, according to SIFT (score of 0.02). It actually increases the amount of

glutamic acid residues in a sequence of only 10 residues, strengthening the negative charge already provided by Glu at the 1595 and 1597 positions, and thus most probably increasing the affinity of this LHR-D domain for C1q/MBL/FCNs [31]. This explains the association found with susceptibility to PF, since it would provide for higher immune complex internalization and exposure of self neoepitopes to *HLA* molecules. The association found with the McCoy antigen however did not resist correction for demographic factors, which may rely on its higher frequency in African-derived populations and low sample size of this study. Interestingly, homozygosity for p.1590Glu was also associated with higher susceptibility to repetitive malaria-associated seizures in patients with cerebral malaria [32].

Interaction between the alleles *rs11118167C* and *rs12034383A* was further associated with a dominant protective effect against PF (homozygous or heterozygous genotypes). It is important to note that this association relies on allele interaction, since the allele *rs12034383A* was also associated with generalized distribution of PF lesions, the most severe disease manifestation. Both alleles were also found associated with reduced erythrocyte sedimentation rate, a marker of the acute phase response [33].

Multiplex PCR-SSP allowed us to identify *CR1* haplotypes with minimal ambiguity and a high cost/benefit, since we were able to haplotype four *CR1* SNPs at once, employing four reactions, instead of eight, as previously published for other genes [20]. Two haplotypes presented a dominant protective effect against the disease. They belong to phylogenetic clade \*3B, that arose from the mutation that caused the minor 1:g.207630250A allele of *rs12034383*. Given the fact that all identified recombinant haplotypes shared this allele, this clade is probably one of the oldest in the *CR1* phylogenetic haplotype tree. As expected, associated haplotypes also carried the minor allele of *rs3737002* encoding p.1408Met (KCam positive) and the major allele of *rs17047660* encoding p.1590Lys (McCoy "a" allele).

As previously discussed, the KCam and McCoy SNPs probably alter activity of the LHR-D domain, responsible for recognizing and internalizing immune complexes opsonized by C1q, MBL and FCNs. The LHR-D domain actually competes with complement serine proteases for the same binding site on the collagenous stalks of C1q, MBL and FCNs, thus inhibiting complement activation, while mediating C3b-independent phagocytosis [28]. It also presents several other nonsynonymous SNPs belonging to the Knops blood group antigen (as KCam and McCoy), not investigated

in this study, but possibly associated to the disease (rs6691117, rs41274768, rs4844609, rs669117, rs3811381). In contrast to LHR-D, LHRs A-C present a paucity on coding polymorphisms, and the only investigated nonsynonymous SNP in this region was not associated with the disease (rs2274567, encoding p.H1208R).

All LHR domains are shared between sCR1, exosomal-bound CR1 and cell membrane-bound CR1, as well as all actions mediated by LHRs A-C, including the ability to cleave C4b, accelerating the decay of C3 and C5 convertases, and to cleave C3b, reducing opsonization and phagocytosis [34-35]. Nevertheless, sCR1 and exosomal-bound CR1 are unable to mediate the LHR-D-mediated internalization of immune complexes by phagocytes, thus acting as a “sink” for initiation molecules of the complement cascade and inhibiting both complement activation and complement-driven phagocytosis [36]. Thus, sCR1 and exosomal-bound CR1 mostly execute anti-inflammatory actions, in contrast to cell membrane-bound CR1.

Taking into account that human sCR1 has in fact been demonstrated to reduce acute inflammation and autoimmunity, even preventing disease progression in a rat arthritis model [37-38], as well as its potential application in therapeutic settings [39], its role in the susceptibility to pemphigus and clinical evolution might be highly relevant. In fact, although we found an effect of corticoid therapy on increased sCR1 production, serum levels were especially higher in patients with localized lesions, compared with patients with generalized lesions, independently of treatment. This leads us to suggest that sCR1 plays a protective role in the evolution of the disease. A longitudinal follow-up study would be necessary to find out if patients with localized lesions, which progressed to the generalized form, also presented a decline in sCR1 serum levels. In this study, *CR1* genotypes were not associated with sCR1 serum levels, which might rely on the fact that the soluble CR1 form does not result from alternative splicing of the gene, but from proteolytical cleavage [9] However, due to the great heterogeneity among subgroups of patients and the limited number of individuals within each subgroup, results should be accepted with caution, until replicated in a larger setting.

The present study is the first with the identification of *CR1* polymorphisms and sCR1 protein levels in serum of PF patients and controls. The results lead us to suggest that *CR1* polymorphisms of the Knops blood group modulate susceptibility to the disease, probably by changing the affinity for the initiation molecules of the complement cascade. Furthermore, corticoid treatment seems to increase sCR1

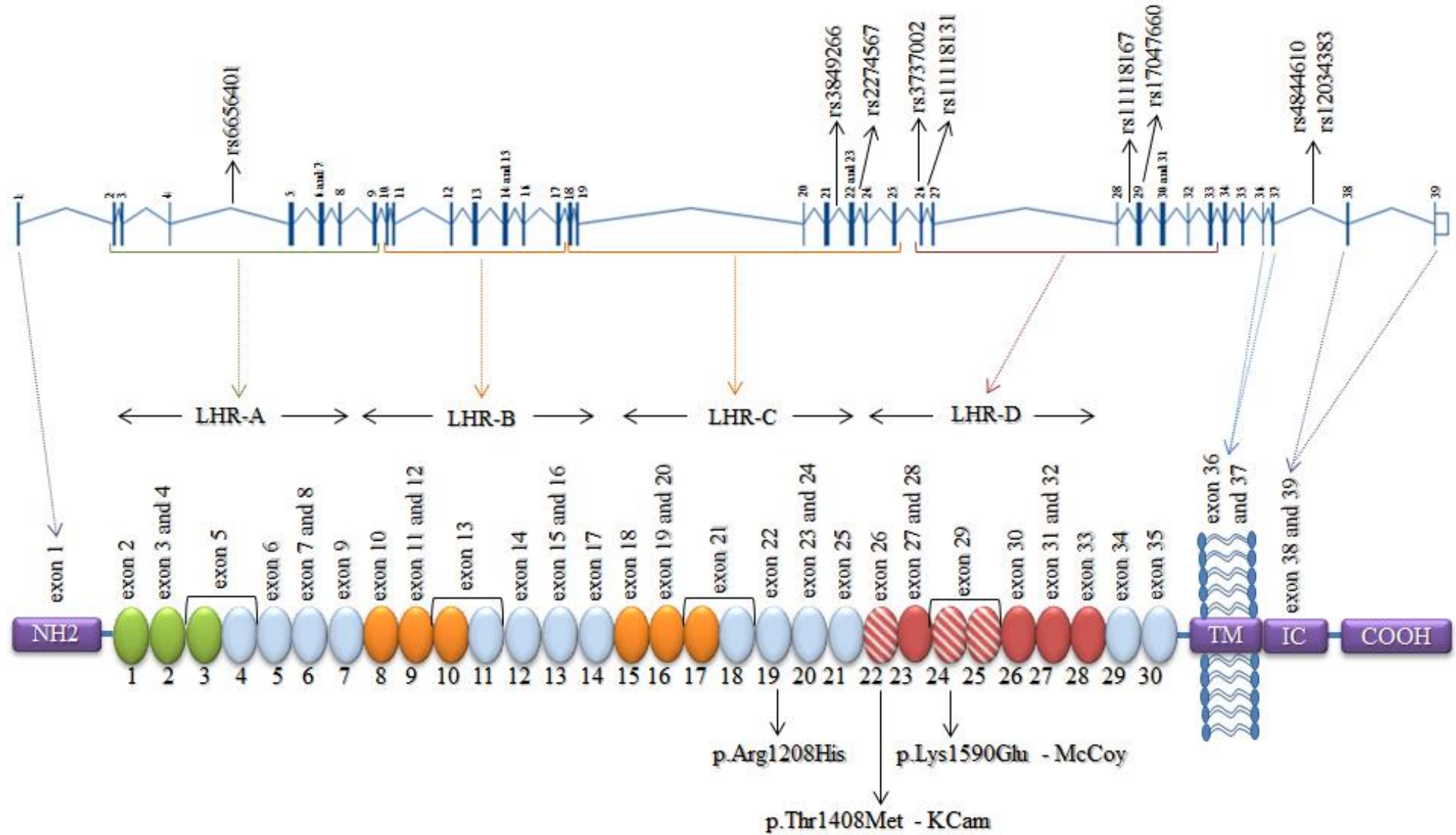
serum levels and higher levels may limit the distribution of PF lesions, placing sCR1 as a possible biomarker for treatment response and disease severity, as well as a candidate for new therapeutically interventions in the disease.

## References

- [1] Culton, D. A. *et al.* Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, v. 31, p. 311-324, 2008.
- [2] Lombardi, C. *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Journal Investigative Dermatology*; 98:847-850, 1992.
- [3] Qian, Y. *et al.* Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. *Journal Of Immunology*, v. 189, n. 4, p. 1535–9, 2012.
- [4] Kawana S., Geoghegan W.D., Jordon R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. II. Complement enhanced detachment of epidermal cells. *Clin Exp Immunol* v.61, p.517–525, 1985.
- [5] Kawana S., Diaz L.A., Rivitti E.A., Geoghegan W.D., Jordon R.E. Complement fixation by Brazilian Pemphigus foliaceus autoantibodies. *Clin Exp Immunol* v. 71, n.3, p. 464–469, 1988.
- [6] Messias I.T., Von Kuster L.C., Santa Maria J., Kajdacsy-balla A. Complement and antibody deposition in Brazilian pemphigus foliaceus and correlation of disease activity with circulating antibodies. *Arch Dermatol* v. 124, p.1664–1668, 1988
- [7] Messias I.T., Santamaria J., Ragiotta R., Doi E.M., Kajdacsy-Balla A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. *Clin Exp Dermatol* v.14, p.51–55, 1989.
- [8] DANIELSSON, C. *et al.* Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. *J. Immunol.* V. 24, p. 2725 – 2731, 1994.
- [9] Hamer, I. *et al.* Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. *Biochemical Journal*, v. 329, p. 183-290, 1998.
- [10] Arora, V. *et al.* Relationship of leukocyte CR1 transcript and protein with the athophysiology and prognosis of systemic lupus erythematosus: A follow-up study. *Lupus*, v. 20, p. 1010-1018, 2011.
- [11] Piccoli, A. K.*et al.* Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 na artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*; v. 51, n. 5, p. 497-510, 2011.
- [12] Kremlitzka, M., *et al.* Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients. *International Immunology*, v. 25, n. 1, p. 25-33, 2012.

- [13] Lord, J. E Morgan, M. Complement Component (3b/4b) Receptor 1 (CR1). Genetic Variants in Alzheimer's Disease, p. 77-101, 2013
- [14] PETZL-ERLER ML. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*; 51:199-211, 1999.
- [15] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning – a laboratory manual. 2 ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] 1000 Genomes Project – available in <http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers>
- [17] WONG, W. W. *et al.* Analysis of multiple restriction fragment length polymorphisms of the gene for the human complement receptor type 1: Duplication of genomic sequences occurs in association with high molecular mass receptor allotype. *Journal of experimental medicine*, v. 164, p. 1531-1546, 1986.
- [18] Excoffier, L. and H.E. L. Lischer . Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. v. 10, p. 564-567, 2010.
- [19] Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.
- [20] Boldt, A. B. W. *et al.* Multiplex sequence-specific PCR reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and M<sub>Ap</sub>19 serum levels. *Human Immunology*. v. 72, p. 753-760, 2011.
- [21] BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005. Acesso em: 7/9/2015.
- [22] VassarStats: Website for Statistical Computation; available at: <http://vassarstats.net>
- [23] BOYLE, A. P.; HONG, E. L.; HARIHARAN, M.; *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 2012. Acesso em: 31/8/2015.
- [24] WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. Database issue, p. D930–D934, 2012. Acesso em: 31/8/2015.
- [25] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* v. 7, n. 4, p.248-249, 2010.
- [26] Nebert, D.W. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. *Hum Mutat*.V. 20, p.463–72, 2002.

- [27] Ma, X.Y., Yu, J.T., Tan, M.S., Sun, F.R., Miao, D, Tan, L. Missense variants in CR1 are associated with increased risk of Alzheimer' disease in Han Chinese. *Neurobiology of Aging*, v. 35, n. 443, p. 17-21, 2014.
- [28] XIA, P. *et al.* Complement fixation by pemphigus antibody. V. Assembly of the membrane attack complex on cultured human keratinocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 82, n. 6, p. 1939-1947, 1988.
- [29] LAPIERE, J.C. *et al.* Preferential activation of the complement system in the lower epidermis of patients with pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol.*, v. 139, n. 5, p. 851-854, 1998.
- [30] MESSIAS-REASON IJ, NISHIHARA RM, MOCELIN V. Mannan-binding lectin and ficolin deposition in skin lesions of pemphigus. *Arch Dermatol Res.* v.303, n.7, p.521-525, 2011.
- [31] Rossi, V. Deciphering Complement Receptor Type 1 Interactions with Recognition Proteins of the Lectin Complement Pathway. *The Journal of Immunology.* V. 4, 2013.
- [32] Kariuki, S.M. *et al.* The genetic risk of acute seizures in African children with falciparum malaria. *Epilepsia*, v. 6, n. 56, p. 990-1001, 2013.
- [33] Kullo, I.J. *et al.* Complement Receptor 1 gene variants are associated with erythrocyte sedimentation rate. *The American Journal of Human Genetics*, v. 89, p. 131-138, 2011.
- [34] KRYCH-GOLDBERG, M.; ATKINSON, J.P. Structure- function relationship of complement receptor type 1. *Immunological Reviews*, v.180, p. 112- 122, 2001.
- [35] WONG, W.W. *et al.* Structure of the human CR1 gene: molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *Journal of experimental medicine*, v. 169, p. 847-863, 1989.
- [36] HESS, C. Ectosomes Released by Human Neutrophils are Specialized Functional Units. *The Journal of Immunology.* v.163, n. 8, p. 4564-4573, 1999.
- [37] DREJA, H., ANNENKOV, A., CHERNAJOVSKY, Y. Soluble complement receptor 1 (cd35) delivered by retrovirally infected syngeneic cells or by naked dna injection prevents the progression of collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* v. 43, n. 8, p 1698–1709, 2000.
- [38] GOODFELLOW, R.M, WILLIAMS, A.S, LEVIN J.L., MORGAN, B.P.. Local therapy with soluble complement receptor 1 (sCR1) suppresses inflammation in rat mono-articular arthritis. *Clin Exp Immunol* 1997;110:45–52.
- [39] KESHAVJEE, S. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* v. 129, n. 2, p. 423 – 428, 2005.

Figure 1. *CR1* gene and protein structure and localization of the investigated SNPs.

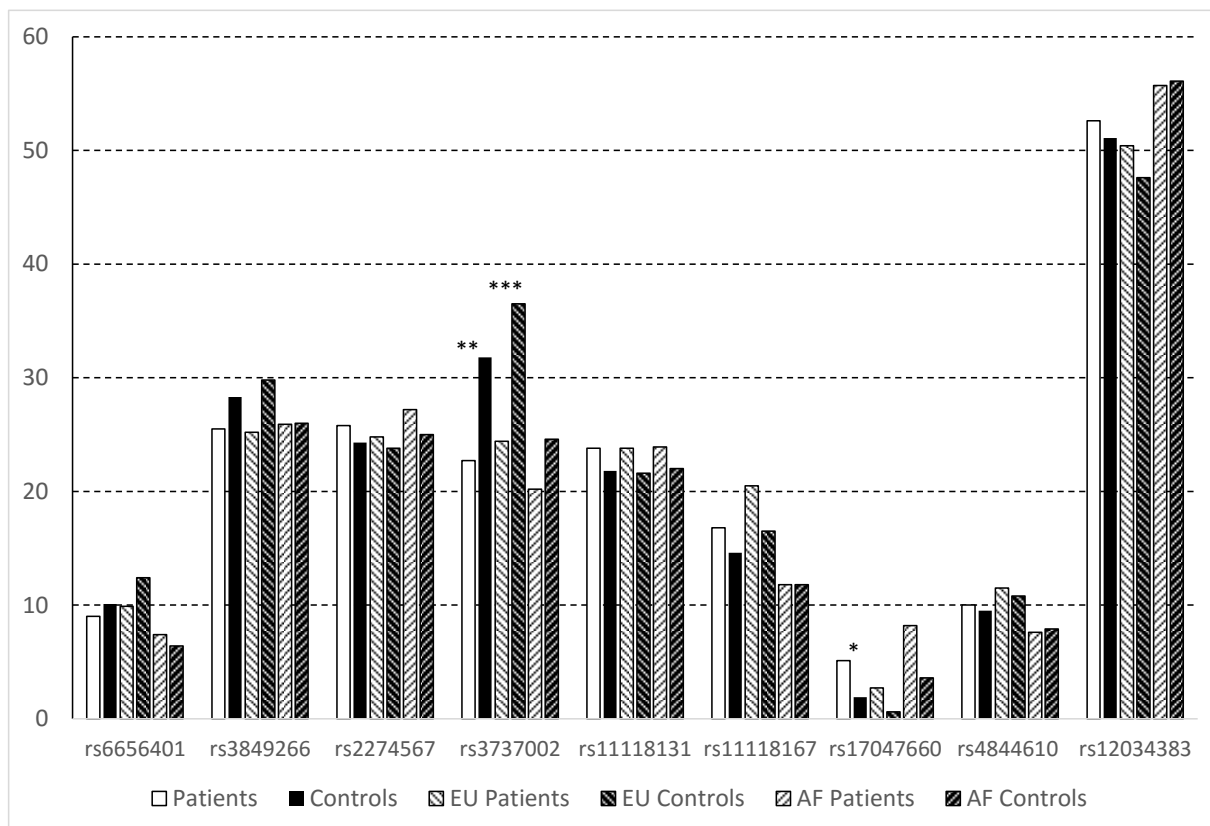


Each block represents a SCR (short consensus repeat), encoded by the exons listed just above. There are three C4b binding sites (SCR 1-3, 8-10 and 15-17) and two C3b binding sites (SCR 8-10 and 15-17). SCRs 22-28 bind C1q, MBL and ficolins, and SCRs 22, 24 and 25 carry blood group antigens frequent in Africans, but rare in Euro-descendants. The SNPs analysed in this study are indicated in the gene and the amino acid substitutions resulting from polymorphisms located in exons are indicated on the protein. TM, transmembrane domain; IC, intracytoplasmic domain; the four long homologous repeats (LHR) of this protein are demarcated: 1-7, 8-14, 15-21, 22-28. The functional sites in 8-10 and 15-17 are nearly identical. Repeats in green are required for C4b binding and decay accelerating activity, while those in orange are required for C3b and C4b binding and cofactor activity. The dashed lines indicate coding exons of main parts: leader peptide encoded by exon 1, transmembrane domain encoded by exons 36 and 37, and the intracytoplasmic domain encoded by exons 38 and 39 [35].

Table 1. Sequence-specific primers\* for selected *CR1* polymorphisms.

Forward Primers			Reverse primers			
SNP	Localization	5'→3' Sequence	SNP	Localization	5'→3' Sequence	Fragment
<b>rs6656401</b>	Intron 4	5' CTCTGTCTCCATCTTCTCA 3' 5' CTCTGTCTCCATCTTCTCG 3'	<b>Generic Primer</b>	Intron 4	5' CATAGTTGTAGTTGGGGATTG 3'	257bp
<b>rs3849266</b>	Intron 21	5' CTGATGGCTTGGGGTAT 3' 5' CTGATGGCTTGGGGTAC 3'	<b>rs2274567</b>	Exon 22	5' CTC AATCTGCATTGATCCAC 3' 5' CTC AATCTGCATTGATCCAT 3'	667bp
<b>rs3737002</b>	Exon 26	5' CCATTTGCCAGTCCTAC 3' 5' CCATTTGCCAGTCCTAT 3'	<b>rs11118131</b>	Intron 26	5' CAAGAAGAAGGGGTGATG 3' 5' CAAGAAGAAGGGGTGATA 3'	457bp
<b>rs11118167</b>	Intron 28	5' GCCAATATGTGAATATTATTATCTTAT 3' 5' GCCAATATGTGAATATTATTATCTTAC 3'	<b>rs17047660</b>	Exon 29	5' TTCTGGAGCTGTGCATT 3' 5' TTCTGGAGCTGTGCATT 3'	746bp
<b>rs4844610</b>	Intron 37	5' CTACACAAAACAGCCTTGTA 3' 5' CTACACAAAACAGCCTTGTC 3'	<b>rs12034383</b>	Intron 37	5' AGATGTCCATGCCTTAAC 3' 5' AGATGTCCATGCCTTAAT 3'	1080bp
Control Primers						
	HGHf	5' TGCCTTCCCAACCATTCCTTA 3'		HGHr	5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'	431bp
	<i>HLA-E</i> f	5' CGGGACTGACTAAGGGGCGG 3'		<i>HLA-E</i> r	5' GTAGCCCTGTGGACCCTCTTAC 3'	324bp

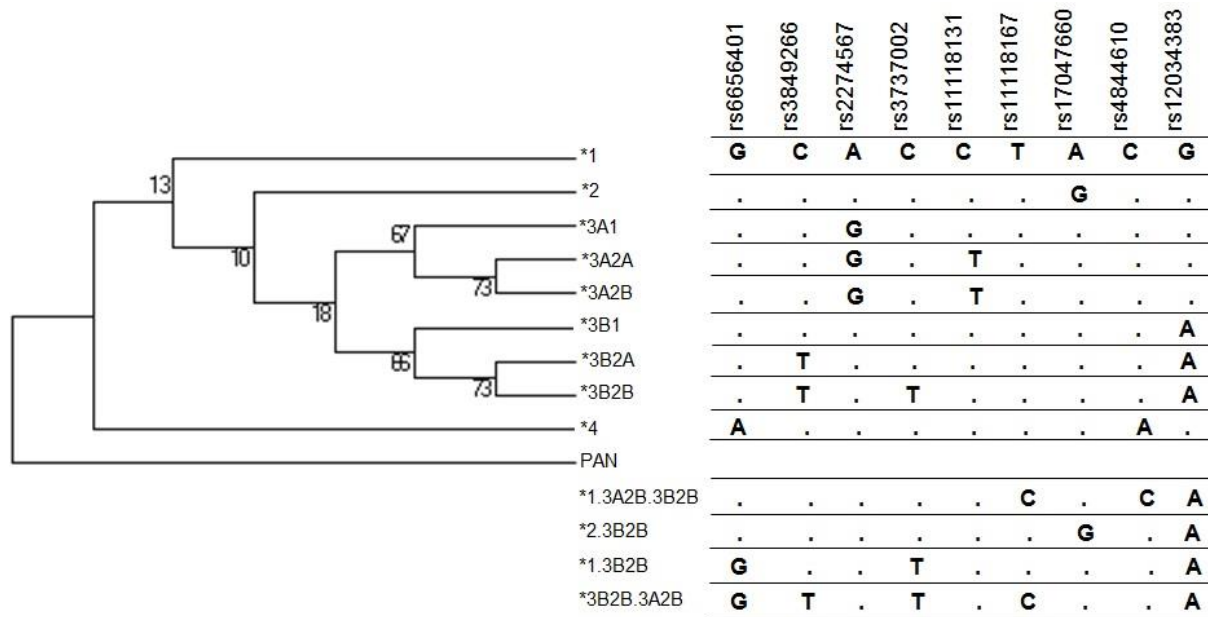
In bold: variant nucleotide. \* excepting the generic and control primers. SNP: single nucleotide polymorphism; bp: base pairs; HGH: human growth hormone; *HLA-E*: Human leukocyte E antigen; f: forward; r: reverse.

Figure 2. Minor allele frequencies of the investigated *CR1* SNPs.

For patients and controls, allele frequencies were given after adjustment for the proportion of Euro and Afro-Brazilians.

\*  $P=0.04$ ; \*\*  $P=0.01$ ; \*\*\*  $P=0.007$ , EU Euro-Brazilians, AF Afro-Brazilians

Figure 3. Maximum parsimony tree of *CR1* haplotypes with nucleotide changes and phylogenetic nomenclature.



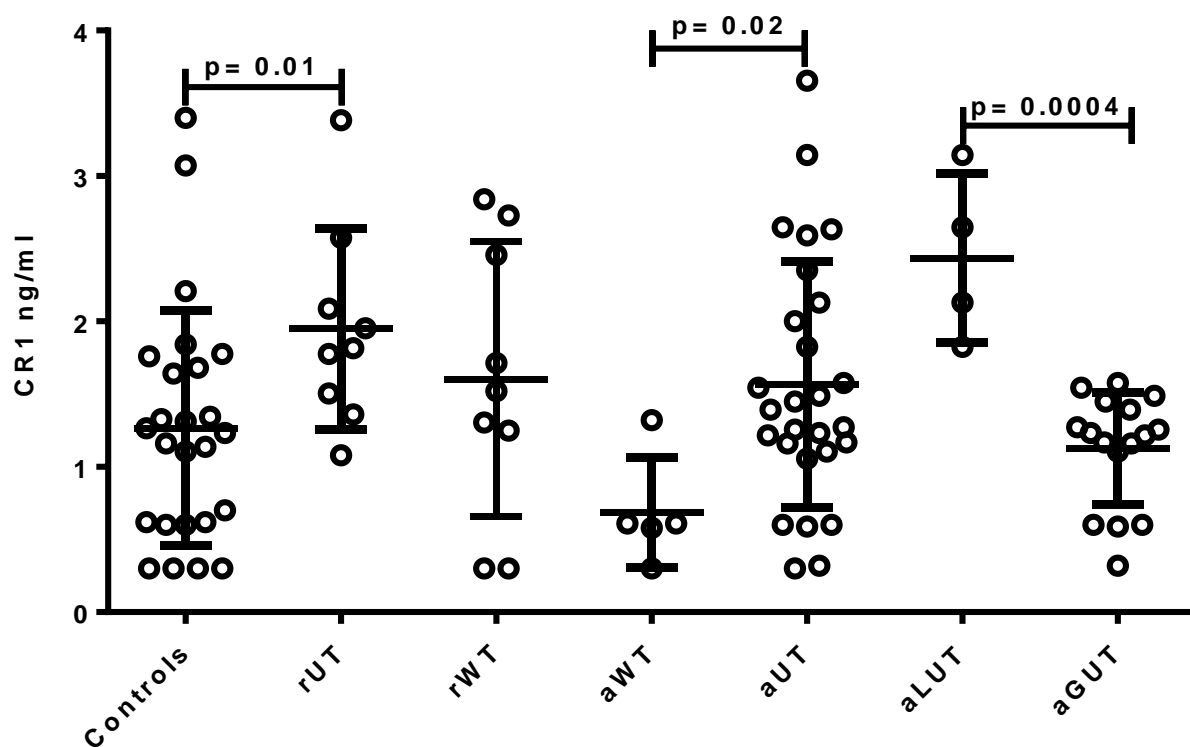
The tree was rooted on the haplotype shared with *Pan troglodytes* (NM\_001193675). In the phylogenetic nomenclature system, the first clades to diverge are numbered with Arabic numerals. Sublineages of each clade are subsequently designated with capital letters and individual present-day haplotypes are given Arabic numerals, following the schema numerals/letters/numerals, if they diverge further [26]. Recombinants are named according to the most common inferred parental haplotypes, separated by a dot [20], and citing the most similar parental haplotype, first. Bootstrap values are given on the respective branches.

Table 2. Frequencies of *CR1* haplotypes.

Haplotypes	TOTAL								EU						AF					
	Patients		Controls		OR	95%CI	P	Patients		Controls		OR	95%CI	P	Patients		Controls		P	
	n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%		
*1	GCACCTACG	45	13.01	34	13.60			n.s.	22	11.11	14	9.72			n.s.	23	15.54	20	18.87	n.s.
*2	GCACCTGCG	13	3.76	6	2.40			n.s.	4	2.02	2	1.39			n.s.	9	6.08	4	3.77	n.s.
*3A1	GCGCCTACG	7	2.02	2	0.80			n.s.	2	1.01	0	0.00			n.s.	5	3.38	2	1.89	n.s.
*3A2A	GCGCTCACG	43	12.43	31	12.40			n.s.	30	15.15	18	12.50			n.s.	13	8.78	13	12.26	n.s.
*3A2B	GCGCTTACG	34	9.83	21	8.40			n.s.	14	7.07	10	6.94			n.s.	20	13.51	11	10.38	n.s.
*3B1	GCACCTACA	74	21.39	42	16.80			n.s.	46	23.23	25	17.36			n.s.	28	18.92	17	16.04	n.s.
*3B2A	GTACCTACA	15	4.34	8	3.20			n.s.	9	4.55	5	3.47			n.s.	6	4.05	3	2.83	n.s.
*3B2B	GTATCTACA	<b>62</b>	<b>17.92</b>	<b>64</b>	<b>25.60</b>	<b>0.63</b>	<b>0.43 – 0.94</b>	<b>0.025</b>	38	19.19	38	26.39			n.s.	24	16.22	26	24.53	n.s.
*4	ACACCTAAG	37	10.69	23	9.20			n.s.	24	12.12	15	10.42			n.s.	13	8.78	8	7.55	n.s.
*1.3A2B.3B2B	GCACCCACA	1	0.29	0	0.00			n.s.	1	0.51	0	0.00			n.s.	0	0.00	0	0.00	n.s.
*2.3B2B	GCACCTGCA	2	0.58	0	0.00			n.s.	1	0.51	0	0.00			n.s.	1	0.68	0	0.00	n.s.
*1.3B2B	GCATCTACA	<b>4</b>	<b>1.16</b>	<b>10</b>	<b>4.00</b>	<b>0.28</b>	<b>0.09 – 0.90</b>	<b>0.029</b>	<b>3</b>	<b>1.52</b>	<b>9</b>	<b>6.25</b>	<b>0.23</b>	<b>0.06 – 0.87</b>	<b>0.033</b>	1	0.68	1	0.94	n.s.
*3B2B.3A2B	GTATCCACA	9	2.60	9	3.60			n.s.	4	2.02	8	5.56			n.s.	5	3.38	1	0.94	n.s.
	<b>Total</b>	346	100	250	100			n.s.	198	1000	144	100			n.s.	148	100	106	100	n.s.

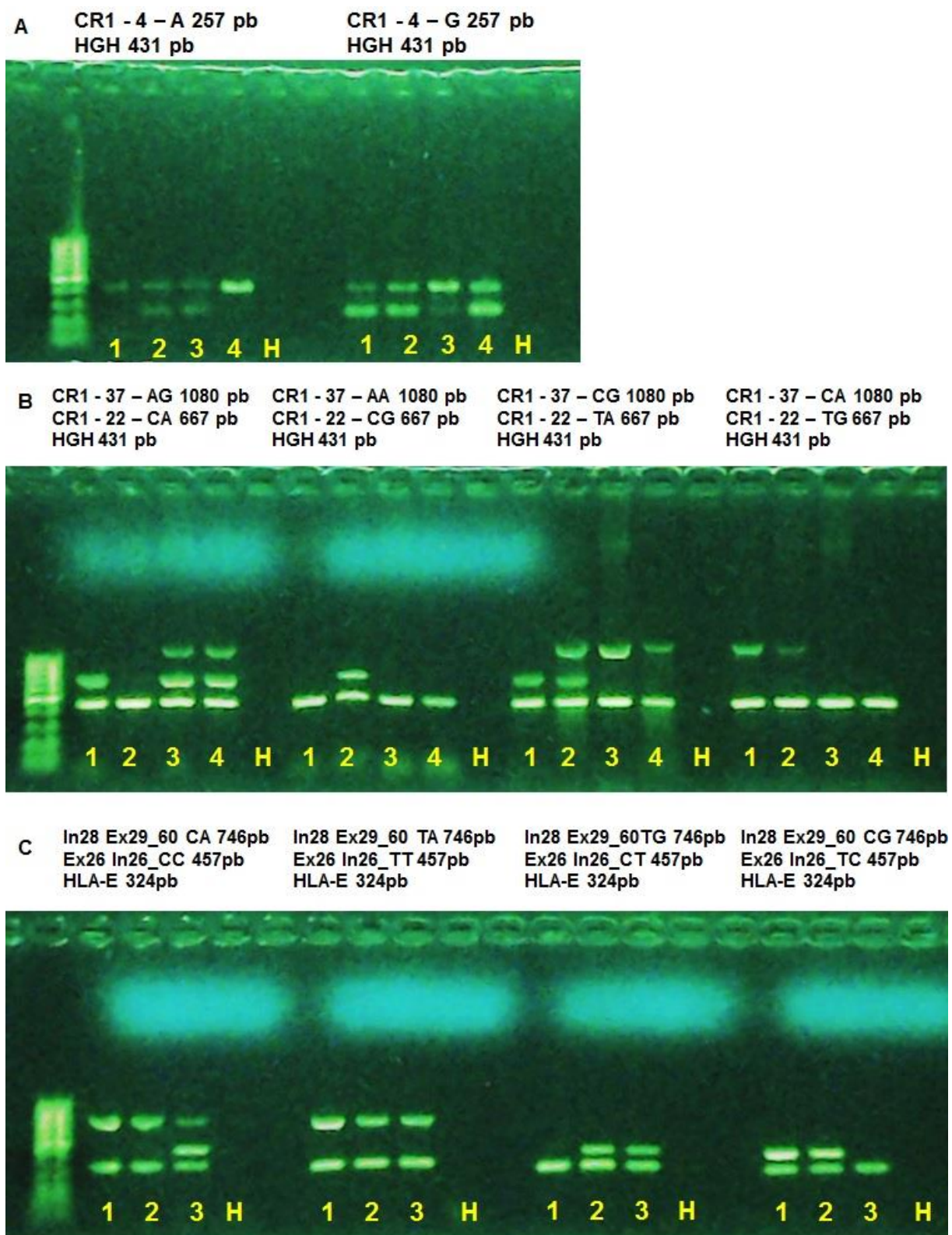
Haplotypes represented all nine investigated *CR1* SNPs (rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs3737002, rs11118131, rs11118167, rs17047660, rs4844610 and rs12034383). AF: African-Brazilian; EU: Euro-Brazilian; n = number of alleles, n.s.= not significant. In bold: haplotypes associated with protection against the disease (see text).

Figure 4. sCR1 serum levels in controls and PF patients.



rUT: patients in disease remission under immunosuppressive treatment; rWT: Patients in disease remission without treatment; aWT: patients with active pemphigus, before initiating therapy (still untreated); aUT: patients with active pemphigus under immunosuppressive treatment; aLUT: patients with localized lesions under immunosuppressive treatment; aGUT: patients with generalized lesions under immunosuppressive treatment; p: P values obtained with the Mann-Whitney test. Interquartil median and range are indicated.

## Supplementary material

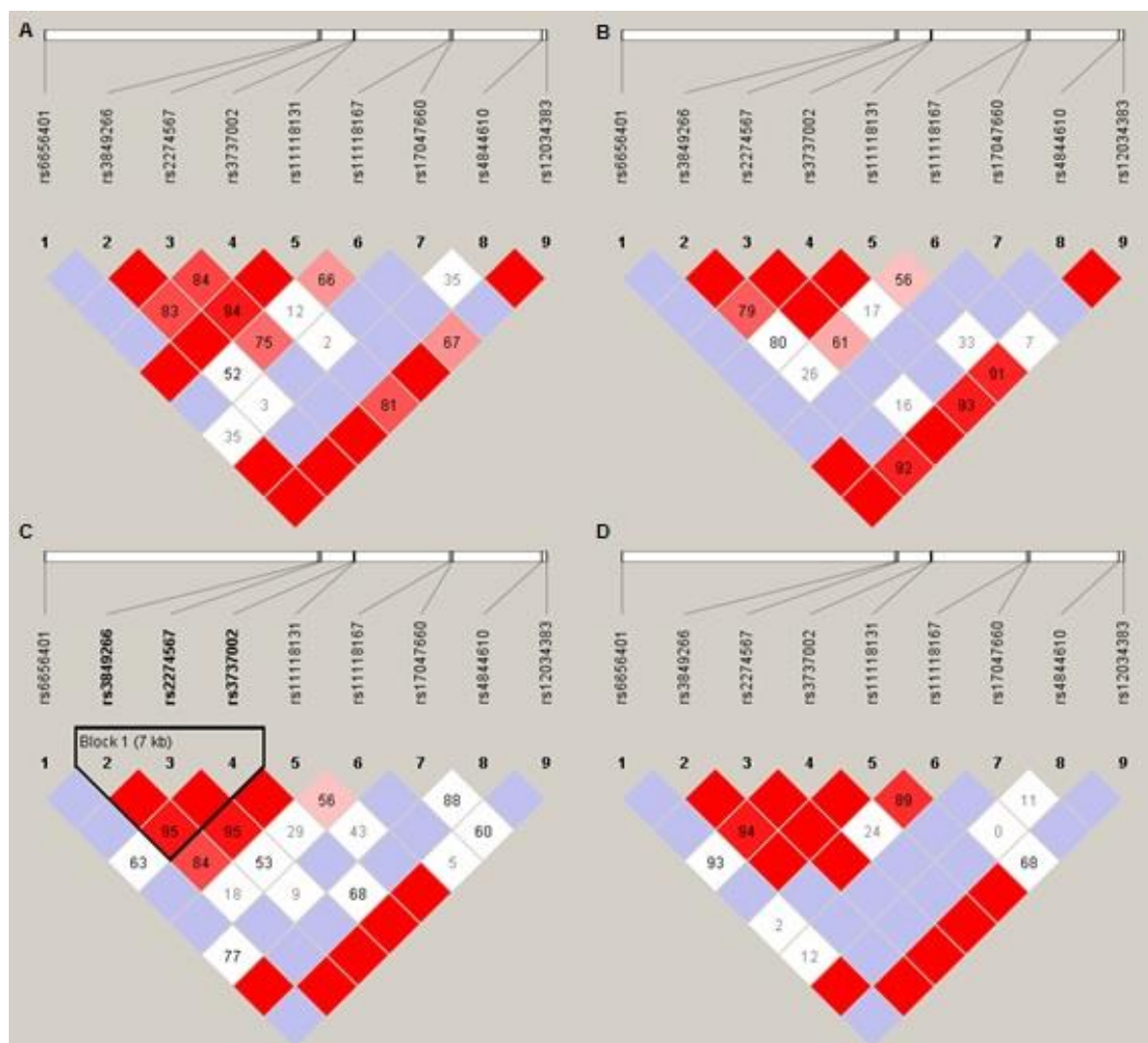
Supplementary figure 1. Multiplex PCR-SSP results of *CR1* SNPs.

A. PCR-SSP for rs6656401 (1:g.207518704A>G) (specific fragment of 257 bp): 1) G/G, 2) A/G, 3) A/G, 4) G/G. B. PCR-SSP for rs3849266 (1:g.207579645C>T), rs2274567 (1:g.207580276A>G) (specific fragment of 667 bp) and rs4844610 (1:g.207629207A>C), rs12034383 (1:g.207630250G>A). (specific fragment of 1080 bp): 1) CACA/TACA; 2) CGCG/TACA; 3) CAAG/CACG; and 4) CAAG/CACG. C. PCR-SSP for rs3737002 (1:g.207587428C>T), rs11118131 (1:g.207587851C>), (specific fragment of 457 bp); rs11118167 (1:g.207608809T>C), rs17047660 (1:g.207609511A>G): 1) (specific fragment of 746 bp): 1) TCCA/TCTA; 2) CTCA/TCTA; and 3) CCCA/CTTA.

H: negative controls (complete reactions without DNA); bp: base pairs; HGH: Human Growth Hormone (as internal PCR control fragment of 431 bp for A and B); *HLA-E*: Human Leukocyte Antigen - E (as internal PCR control fragment of 324 bp).



Supplementary figure 2. Pairwise linkage disequilibrium plot based on investigated *CR1* SNPs.



Colors are indicative of  $D'$ /logarithm of odds (LOD), and values correspond to  $r^2$ . Bright red color represents LOD score for  $LD \geq 2$  and  $D = 1$ , shades of pink/red represents  $LOD \geq 2$  and  $D < 1$ , blue color represents  $D = 1$  but  $LOD < 2$ , and white squares represent  $LOD < 2$  and  $D < 1$ . A) Euro-Brazilian patients; B) Euro-Brazilian controls; C) Afro-Brazilian patients; D) Afro-Brazilian controls.

## 6 DISCUSSÃO FINAL

Sabe-se que a ativação do sistema complemento contribui para a fisiopatologia do PF (BYSTRYN *et al.*, 1978, KAWANA *et al.* 1988, MESSIAS *et al.*, 2011) e que fatores genéticos têm relação tanto com o desenvolvimento, como com a evolução da doença (PETZL-ERLER E SANTAMARIA, 1989, BRAUN-PRADO e PETZL-ERLER, 2007, MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009, AUGUSTO *et al.*, 2012). Associações entre polimorfismos gênicos de componentes do sistema imunológico e o PF já foram estudadas. Este é o primeiro estudo relacionando os polimorfismos e níveis plasmáticos de proteínas reguladoras do complemento, como CR1, com o pênfigo foliáceo.

CR1 é uma glicoproteína de cadeia simples ligada à membrana ou solúvel, expressa em grande variedade de células de defesa e eritrócitos (LIU e NIU 2009). Por meio do seus domínios LHR-A, B e C, atua como principal regulador da ativação do sistema complemento, principalmente causando a aceleração do decaimento das convertases C3 e C5 (DYKMAN *et al.*, 1983; DYKMAN *et al.*, 1984; WONG *et al.*, 1983). Já através do seu domínio LHR-D, reconhece moléculas iniciadoras do complemento livres de serinas proteases, promovendo a fagocitose dos elementos aos quais estão ligadas (ROSS *et al.*, 1983; MEDOF *et al.*, 1984; GHIRAN *et al.*, 2000; LIU e NIU 2009). Polimorfismos que potencialmente alteram a expressão do gene ou a atividade da proteína (principalmente no LHR-D) são comuns em diferentes populações e foram associados a diferentes doenças infecciosas, como hanseníase e malária; autoimunes, como lupus eritematoso e artrite reumatoide; e neurodegenerativas, como Alzheimer (FITNESS *et al.*, 2004, COCKBURN *et al.* 2004, KARIUKI, *et al.*, 2013, ARORA *et al.*, 2011; PICCOLI *et al.*, 2011; KREMLITZKA. *et al.*, 2012; LORD e MORGAN, 2013).

Neste trabalho, investigou-se nove SNPs pela técnica de PCR-SSP, identificando simultaneamente oito destes, pela reunião dos iniciadores em dois conjuntos de reações multiplex. Desta forma, alcançou-se a sua rápida haplotipagem com elevada relação custo-benefício (reduzindo o número de reações pela metade), como relatado previamente para o gene *MASP2* (BOLDT *et al.*, 2011).

Dentre as associações encontradas, duas são devidas a mutações missense nos exons 26 e 29, codificantes do LHR-D e consideradas potencialmente danosas, quando estimada pelo algoritmo Polyphen-2. Houve um efeito dominante de

proteção com a substituição de uma treonina por uma metionina na posição 1408 da proteína (p.Thr1408Met) responsável pelo epítipo KCam (rs3737002), o qual também é relatado como um alelo de susceptibilidade da doença de Alzheimer de início tardio em chineses Han (MA *et al.*, 2014) Sugere-se que p.1408Met reduza a afinidade do LHR-D por C1q ligado a IgG1, assim como por MBL ou FCNs ligadas a resíduos glicosilados/acetilados expostos nos desmossomos, diminuindo a internalização de neoepítios por células apresentadoras de antígenos, desta forma reduzindo a retroalimentação positiva da produção de auto-anticorpos. Por outro lado, a substituição de uma lisina por ácido glutâmico na posição 1590 da proteína (p.Lys1590Glu, responsável pelo antígeno McCoy codificado por rs17047660) aumenta muito a carga negativa em uma sequência de apenas 10 aminoácidos, diretamente implicada no aumento da afinidade pelas moléculas iniciadoras da cascata do complemento (ROSSI *et al.* 2013), o que explica a sua associação com um efeito dominante de susceptibilidade à doença. Outros autores apontam para um efeito de susceptibilidade deste alelo, na manifestação de convulsões repetitivas na malária cerebral (KARIUKI *et al.*, 2013).

Outra possível explicação seria que indivíduos com estes SNPs ou SNPs ligados a estes, modulem a expressão de CR1 na membrana. Baixa expressão poderia resultar numa maior maior ativação do sistema complemento e deposição do complexo lítico de ataque à membrana, frequentemente observada no pênfigo foliáceo, assim como no pênfigo vulgar (XIA *et al.* 1988; KAWANA *et al.* 1985, 1988; LAPIERE *et al.* 1998; MESSIAS-REASON *et al.* 2011). Outra associação protetora observada foi com o SNP intrônico rs3849266 (1:g.207579645T). No entanto, é importante ressaltar que esse SNP está em desequilíbrio de ligação com o rs3737002, o qual foi fortemente associado ao PF. Sendo assim, essa associação pode ser decorrente do efeito carona resultante do desequilíbrio de ligação entre esses dois polimorfismos. Além disso, houve uma associação protetora resultante da interação entre os alelos dos SNPs rs11118167 e rs12034383, ambos previamente associados com uma taxa menor de sedimentação eritrocitária (KULLO *et al.* 2011). As lesões do pacientes com PF podem ser classificadas de acordo com sua distribuição, em localizadas ou generalizadas, sendo que apenas o rs12034383 (1:g.207630250A localizado no intron 37) apresentou uma tendência à associação com a susceptibilidade a lesões generalizadas. Com exceção do rs3737002, as demais associações não permaneceram significantes após correção por fatores

demográficos, necessitando reavaliação com o aumento do tamanho amostral de pacientes e controles pertencentes aos principais grupos étnicos brasileiros.

Baseado no desequilíbrio de ligação e na informação de fase obtida pelo uso de PCR-SSP biespecífica, treze haplótipos foram identificados, distribuídos em quatro ramos filogenéticos. O clado \*3 é o mais diversificado e apresenta dois ramos, sendo que o ramo \*3B deve ser o mais antigo, a julgar pelo número de haplótipos recombinantes que lhe são derivados. Haplótipos deste ramo apresentam 1:g.207630250A em comum no intron 37, sendo que dois foram associados com a proteção ao PF: \*3B2B (GTATCTACA) e o recombinante \*1.3B2B (GCATCTACA). Interessantemente, ambos compartilham os polimorfismos *rs3737002T* (p.1408M que codifica o antígeno KCam, associado com proteção contra a doença) e o *rs17047660A* (p.1590K, que é negativo para o antígeno McCoy, sendo que p.1590E foi associado com susceptibilidade ao PF).

Os fluidos da bolhas de doenças cutâneas autoimunes são repletos de componentes do complemento (LESSEY *et al.* 2008). Bolhas induzidas tanto quimicamente, quanto por ferimentos por queimaduras, apresentam uma maior expressão de sCR1, devido à exocitose de leucócitos polimorfonucleares e clivagem de CR1 da membrana (DEITCH *et al.* 1990, HESS *et al.* 1999). Como um desativador de C3 e C5 convertases, sCR1 é um potente inibidor do complemento, assim como CR1 ancorado à membrana. Contudo, ao contrário deste último, sCR1 não leva à internalização de elementos ligados a C1q, MBL ou FCNs por fagócitos, uma vez que não está associado à membrana celular (logo, não alimenta a via de apresentação de antígenos e produção de anticorpos) (ROSSI *et al.* 2013). Possivelmente por esta razão, sCR1 reduz a inflamação aguda e a autoimunidade, bem como previne a progressão da doença em modelos de ratos com artrite, tal com artrite monoarticular (DREJA *et al.*, 2000, GOODFELLOW *et al.*, 1997). Seu potencial terapêutico tem sido comprovado em diferentes modelos animais (BENNET *et al.* 2000, ARUMUGAM *et al.* 2006, LI *et al.* 2010), razão pela qual sua aplicação está sendo investigada, com sucesso, em ensaios clínicos (KESHAVJEE *et al.* 2005). Níveis de sCR1 também estão elevados em doenças autoimunes, assim como em pacientes com cirrose e doenças hematológicas (PASCUAL *et al.* 1993, ARORA *et al.* 2004). No PF, observou-se que pacientes em remissão (sob tratamento) apresentam níveis mais elevados de sCR1, comparados a controles saudáveis. Pacientes com lesão sob tratamento imunossupressor apresentaram, além disso, concentrações

aumentadas de sCR1 em relação aos pacientes com lesão, sem tratamento. Logo, isto leva-nos a sugerir que o tratamento com corticoide é responsável por aumentar a expressão de sCR1 no soro. Adicionalmente, dentre os pacientes sob tratamento, portadores de lesões localizadas apresentaram concentrações ainda mais aumentadas de sCR1, em relação aos portadores de lesões generalizadas e a todos os demais subgrupos de pacientes e controles. Isto destaca o possível papel anti-inflamatório exercido por sCR1 na distribuição das lesões e gravidade da doença. Contudo, possivelmente devido ao fato de sCR1 não ser gerado por processamento alternativo do gene, grande heterogeneidade entre os subgrupos de pacientes e número limitado de indivíduos em cada subgrupo, não foi possível verificar uma associação entre a expressão de sCR1 e os SNPs investigados.

Por fim, os resultados levam-nos a sugerir que os polimorfismos de *CR1* que modificam a afinidade do LHR-D pelas moléculas iniciadoras da cascata do complemento, estão modulando a susceptibilidade ao PF. Além disso, tratamentos com corticoides parecem aumentar os níveis séricos de sCR1, e níveis mais altos possivelmente reduzem o número de lesões e levam à remissão da doença. Futuramente, sCR1 pode ser usado como um biomarcador em pacientes com PF, ou como elemento a ser adicionado na terapia. Mais estudos ainda são necessários para examinar se há alguma associação entre os polimorfismos estudados e os níveis séricos de sCR1, assim como com a expressão do mRNA e da proteína na membrana, na saúde e na doença. Adicionalmente, estudos funcionais também serão necessários para esclarecer o papel desse gene na patogênese do pênfigo.

## 7 CONCLUSÕES

- As PCR-SSP multiplex otimizadas neste trabalho permitiram a haplotipagem física de oito variantes do gene *CR1* em apenas oito reações, ao invés de 32 com PCRs-SSP biespecíficas (ou 64 monoespecíficas).
- Os polimorfismos codificantes do domínio LHR-D, rs3737002 (p.1408M que codifica o antígeno KCam) e rs17047660 (p.1590E que codifica o antígeno McCoy), estão associados com a proteção e susceptibilidade ao PF, respectivamente.
- Dois SNPs intrônicos de *CR1*, rs11118167 (1:g.207608809T>C) e rs12034383 (1:g.207630250G>A) estão associados com proteção ao PF em heterozigose ou homozigose conjunta dos seus alelos menos comuns.
- O SNP rs12034383 (1:g.207630250A) também apresentou uma tendência de associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento generalizado de lesões.
- Os haplótipos \*1.3B2B (GCATCTACA) e \*3B2B (GTATCTACA), contendo os alelos que codificam p.1408M e p.1590K, estão associados com a proteção ao PF.
- Não houve associação entre os haplótipos, com a distribuição das lesões.
- Tratamento com corticoide está associado com o aumento das concentrações séricas de sCR1.
- A distribuição localizada das lesões está associada com as maiores concentrações de sCR1, possivelmente devido ao seu papel anti-inflamatório.
- Polimorfismos de *CR1* e a concentração de sCR1 no soro alteram a susceptibilidade ao PF e, possivelmente, a expressão clínica da doença.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Elsevier, 2007.

ABREU-VELEZ, A.M. *et al.* Cardiac autoantibodies from patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus in Colombia, South America. **Journal of Clinical Immunology**. n. 6, p. 985-997, 2011.

ALLEN, E. M., GIUDICE, G. J., DIAZ, L. A. Subclass reactivity of pemphigus foliaceus autoantibodies with recombinant human desmoglein. **The journal of investigative dermatology**, v. 100, n. 5, p. 685-691, 1993.

ANHALT, G. J. Making sense of antigens and antibodies in pemphigus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.40, n. 5, parte 1, p , 1999.

ANTÚNEZ, C. *et al.* Genetic association of complement receptor 1 polymorphism rs3818361 in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and dementia**, v. 7, p. 124-129, 2011.

ARLEQUIN v.3.1. Disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>.

AOKI, V. *et al.* Environmental Risk Factors in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 34–40, 2004.

ARORA, V. *et al.* Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus. **Molecular immunology**, v. 41, p. 449-456, 2004.

ARORA, V. *et al.* Relationship of leukocyte CR1 transcript and protein with the pathophysiology and prognosis of systemic lupus erythematosus: A follow-up study. **Lupus**, v. 20, p. 1010-1018, 2011.

ARUMUGAN, T. V. . Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. **Clinica Chimica Acta**, v. 374, p. 33–45, 2006.

AUGUSTO, D. G. *et al.* Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39991, 2012.

AWANDARE, G.A. *et al.* Plasmodium falciparum field isolates use complement receptor 1 (CR1) as a receptor for invasion of erythrocytes. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 177, n. 1, p. 57-60, 2011.

BARBOSA, J. E. *et al.* An anti-peptide antibody that recognizes a neo-antigen in the CR1 stump remaining on erythrocytes after proteolysis. **Clinical experimental immunology**, v. 87, p. 144-149, 1992.

BASCONES-MARTINEZ A, MUNOZ-CORCUERA M, BASCONES-ILUNDAIN C, ESPARZA-GÓMEZ G. Oral Manifestations of Pemphigus Vulgaris: Clinical Presentation, Differential Diagnosis and Management. **J Clin Exp Dermatol**, v. 1, p. 1-4, 2010.

BASTUJI-GARIN, S. *et al.* Comparative Epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France: Unusual Incidence of Pemphigus Foliaceus in Young Tunisian Women. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 302–305, 1996

BASTUJI-GARIN S. *et al.* Possible relation of Tunisian pemphigus with traditional cosmetics: a multicenter case-control study. **Am J Epidemiol.** n. 3, p. 249-256, 2002

BELTRAME, M.H. *et al.* The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in Pediatrics.** v. 2, n. 149, 1-14, 2015.

BENNET, W, *et al.* Damage to porcine islets of Langerhans after exposure to human blood in vitro, or after intraportal transplantation to cynomolgus monkeys: protective effects of sCR1 and heparina. **Transplantation.** v. 69, n. 5, p. 709 – 711, 2000.

BLAST. Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BRENNER, *et al.* Acute Generalized Exanthematous Pustulosis: A Retrospective Analysis Showing a Clear Predilection for Women. **SKINmed: Dermatology for the Clinician** v. 5, n. 4, p. 186 – 188, 2006.

BIRMINGHAM, D.J., *et al.* A CR1 polymorphism associated with constitutive erythrocyte CR1 levels affects binding to C4b but not C3b. **Immunology.** v. 108, p. 531–538, 2003.

BIRMINGHAM, D. J. *et al.* A polymorphism in the type one complement receptor (CR1) involves an additional cysteine within the C3b/C4b binding domain that inhibits ligand binding. **Molecular immunology**, v.44, p. 3510-3516, 2007.



BIRMINGHAM, D. J., HERBERT, L. A. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. **Immunological reviews**, v. 180, p. 100-111, 2001.

BOACKLE, S. A. *et al.* CR1, CR2 deficiency alters IgG3 autoantibody production and IgA glomerular deposition in the MRL/lpr model of SLE. **Autoimmunity**, v. 127, p. 111-123, 2004.

BOLDT, A. B. W. *et al.* **Multiplex sequence-specific PCR reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MASP19 serum levels.** *Human Immunology*. v. 72, p. 753-760, 2011.

BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 314-321, 2007.

BROUWERS, N. *et al.* Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. **Molecular psychiatry**, v. 17, p. 223-233, 2012.

BYSTRIN, J. C.; RODRIGUEZ, J., Absence of intercellular antigens in the deep layers of the epidermis in pemphigus foliaceus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 61, p. 339-348, 1978.

CAMPBELL, I. *et al.* Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.76, p. 13-33, 2001.

CHACÓN, G. R.; ORTEGA-LOAYZA, A. G.; CYR, R. M. Historical notes on endemic pemphigus in South America. **International Journal of Dermatology**, v. 51, p. 477-481, 2012.

COCKBURN, I. A. *et al.* A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. **Proceedings of the national academy of science**, v. 101, n. 1, p. 272-277, 2004.

COCKBURN, I. A., ROWE, J. A. Erythrocyte complement receptor 1 (CR1) expression level is not associated with polymorphisms in the promoter or 3' untranslated regions of the CR1 gene. **International Journal immunogenet**, v. 33, p. 17-20, 2006.

CULTON, D. A. *et al.* Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 31, p. 311-324, 2008.

CUNHA, P. R., BARRAVIERA, S. R. C. S. Dermatoses bolhosas auto imunes. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n.2, p. 111-124, 2009.

DANIELSSON, C. *et al.* Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. **J. Immunol.** V. 24, p. 2725 – 2731, 1994.

DEITCH EA, LU Q, XU DZ, SPECIAN RD. Effect of local and systemic burn microenvironment on neutrophil activation as assessed by complement receptor expression and morphology. **J. Trauma.** V.30, n.3, p.259-268, 1990.

DELVA, E., TUCKER, D. K., KOWALCZYK, A. P. The desmosome. **Cold spring harb perspect biol**, p. 1-17, 2009.

DI ZENZO, G.; ZAMBRUNO, G.; BORRADORI, L. Endemic pemphigus foliaceus: towards understanding autoimmune mechanisms of disease development. **The Journal Of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2499–2502, 2012

DIAZ, L. A. *et al.* Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 1, p. 4-12, 1989

DING, X. *et al.* Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. **The Journal of Investigate Dermatology**, v. 109, n. 4, 1997

DREJA, H., ANNENKOV, A., CHERNAJOVSKY, Y. Soluble complement receptor 1 (cd35) delivered by retrovirally infected syngeneic cells or by naked dna injection prevents the progression of collagen-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatism** v. 43, n. 8, p 1698–1709, 2000.

DYKMAN, T. R, HATCH, J. A., ATKINSON, J. P. Polymorphism of the human C3b/C4b receptor, identification of a third allele and analysis of receptor phenotypes in families and patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of experimental medicine**, v. 159, p. 691-703, 1984.

DYKMAN, T. R. *et al.* Polymorphism of human erythrocyte C3b/C4b receptor. **Proceeding of the national academy of sciences**, v. 80, p. 1698-1702, 1983.

DUNKELBERGER, J.R., SONG, W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20 p. 34-50, 2009.

ENSEMBL. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>

ENSEMBL. Disponível em:

<[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669686-207803972;t=ENST00000367051](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669686-207803972;t=ENST00000367051)> Acesso em 29/08/2015.)

ENSEMBL. Disponível em:

<[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669492-207813992;t=ENST00000530487](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000203710;r=1:207669492-207813992;t=ENST00000530487)> Acesso em: 29/01/2014.

FARRIES, T. C., LACHMANN, P. J., HARRISON, R. A. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. **Biochemical Journal**, v. 252, p. 47-54, 1988.

FEARON, D. T., KANEKO, I., THOMSON, G. G. Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. **Journal experimental medecine**, v. 153, p. 1615-1628, 1981.

FEARON D.T., COLLINS L.A. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. **J Immunol**, v. 1, n. 130, p. 370–375, 1983.

FERREIRA, V. P., PANGBURN, M. K., CORTÉS, C. Complement control protein factor H: the good, the bad and the inadequate. **Molecular immunology**, v. 47, p. 2187-2197, 2010.

FITNESS, J. *et al.* Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am. J. Trop Med Hyg.** v. 3, n. 71, p. 330-340, 2004.

FLORES, G. *et al.* IgG autoantibody response against keratinocyte cadherins in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). **Journal investigation dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2573-2580, 2012.

FLORES, G.; QIAN, Y.; DIAZ, L.A. The Enigmatic Autoimmune Response in Endemic Pemphigus Foliaceus. **Actas Dermosifiliogr**, v. 100, p. 40- 48, 2009.

FRIEDMAN, H. *et al.* Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 949–956, 1995.

FRIEDMAN, H. *et al.* Pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem) no grupo indígena Xavante, Mato Grosso, Brasil. **Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro**, v. 8, n. 3, p. 331-334, 1992.

FUGITA, T., MATSUSHITA, M., ENDO, Y. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. **Immunological reviews**, v. 198, p. 185-202, 2004.

FUNKHOUSER, T., VIK, D. P. Promoter activity of the 5' flanking region of the complement receptor type 1 (CR1) gene: basal and induced transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**.p. 1490-1499, 2000.

FURTADO, P. B. *et al.* The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits access to its C3b and C4b ligands. **Journal molecular biology**, v. 375, p. 102-118, 2008.

GHIRAN, I. *et al.* Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 12, p. 1797-1807, 2000.

GONÇALVES, G. A. *et al.* Incidence of pemphigus vulgaris exceeds that of pemphigus foliaceus in a region where pemphigus foliaceus is endemic: analysis of a 21-year historical series. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 1109-1112, 2011.

GOODFELLOW, R.M, WILLIAMS, A.S, LEVIN J.L., MORGAN, B.P.. Local therapy with soluble complement receptor 1 (sCR1) suppresses inflammation in rat mono-articular arthritis. **Clin Exp Immunol** 1997;110:45–52.

GTEX: (Disponível em: <<http://www.gtexportal.org/home/gene/CR1>> Acesso em: 29/08/2015).

HAMACHER, J. *et al.* Soluble complement receptor type 1 (CD35) in bronchoalveolar lavage of inflammatory lung diseases. **European respiratory Journal**, v. 11, p. 112-119, 1998.

HAMER, I. *et al.* Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. **Biochemical Journal**, v. 329, p. 183-290, 1998.

HANS-FILHO, G. *et al.* An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **The Journal Of Investigative Dermatology**, v. 107, n. 1, p. 68–75, 1996.

HANSSON, H. H. *et al.* Human genetic polymorphisms in the knops blood group are not associated with a protective advantage against *Plasmodium falciparum* malaria in Southern Ghana. **Malaria Journal**, p. 1-9, 2013.

Haploreg. Disponível em:

[http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg\\_v3.php](http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php)

HAPLOVIEW v.4.2. Disponível em: <http://broadinstitute.org/haploview/haploview>

HapMap. Disponível em: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

HAZRATI, L.N. *et al.* Genetica association of *CR1* with Alzheimer's disease: A tentative disease mechanism. **Neurobiology of Aging**, v.33, p. 2949,e5-2949.e12, 2012.

HE, J.Q., WIESMANN, C., CAMPAGNE, M.V.L. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. **Molecular Immunology**. v.45, p. 4041-4047, 2008.

HEBERT, L. A. *et al.* Erythropoietin therapy in human increases erythrocyte expression of complement receptor type 1 (CD35). **Journal of the American society of nephrology**, v. 4, n. 10, p. 1786-1791, 1994.

HELMY, K. Y. *et al.* CR1g:A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. **Cell**, v. 124, p. 915-927, 2006.

HESS, C. Ectosomes Released by Human Neutrophils are Specialized Functional Units. **The Journal of Immunology**. v.163, n. 8, p. 4564-4573, 1999.

HO, M. *et al.* Rosette formation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from patients with acute malaria. **Infection and immunity**, v. 59, n. 6, p. 2135-2139, 1991.

HOFFMANN, J.A. *et al.* Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313–1318, 1999.

HOLERS, V. M. *et al.* Human complement C3b/ C4b receptor (CR1) mRNA polymorphism that correlates with the CR1 allelic molecular weight polymorphism. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 84, p. 2459-2463, 1987.

IIDA, K., MORNAGHI, R., NUSSENZWEIG, V. Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal experimental medicine**, v. 155, p. 1427-1438, 1982.

JACQUET, M. *et al.* Deciphering complement receptor type 1 interactions with recognition proteins with the lectin complement pathway. **The journal of immunology**, p. 1-11, 2013.

JAVA, A. *et al.* Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: A model for understanding complement-mediated damage in the kidney. **Molecular Immunology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.016>

JIN, C. *et al.* Association of the CR1 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Chinese Han populations: A meta-analysis. **Neuroscience Letters**, v.527, p. 46- 49, 2012

KARIUKI, S.M. *et al.* The genetic risk of acute seizures in African children with falciparum malaria. **Epilepsia**, v. 6, n. 56, p. 990-1001, 2013.

KAWANA S., DIAZ L.A., RIVITTI E.A., GEOGHEGAN W.D., JORDON R.E. Complement fixation by Brazilian Pemphigus foliaceus autoantibodies. **Clin Exp Immunol** v. 71, n.3, p. 464–469, 1988.

KAWANA S., GEOGHEGAN W.D., JORDON R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. II. Complement enhanced detachment of epidermal cells. **Clin Exp Immunol** v.61, p.517–525, 1985.

KEENAN, B. T. *et al.* A coding variant in CR1 interacts with APOE- $\epsilon$ 4 to influence cognitive decline. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 10, p. 2377-2388, 2012.

KESHAVJEE, S. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**. v. 129, n. 2, p. 423 – 428, 2005.

KHERA, R., DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Molecular Immunology**. v. 46, p. 761–772, 2009.

KIM, J. H. *et al.* AML1, the target of chromosomal rearrangements in human leukemia, regulates the expression of human complement receptor type 1 (CR1) gene. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. p. 931-933, 1999.

KOHLER, K. F.; PETZL-ERLER, M. L. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo Selvagem). **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, n. 2, p. 141-144, 2006.

KREMLITZKA, M., *et al.* Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients. **International Immunology**, v. 25, n. 1, p. 25-33, 2012.

KRUSHKAL, J., BAT, O., GIGLI, I. Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. **Molecular biology evolution**, v. 17, p. 1718-1730, 2000.

KRYCH-GOLDBERG, M.; ATKINSON, J.P. Structure- function relationship of complement receptor type 1. **Immunological Reviews**, v.180, p. 112- 122, 2001.

KULLO, I.J. *et al.* Complement Receptor 1 gene variants are associated with erythrocyte sedimentations rate. **The American Journal of Human Genetics**, v. 89, p. 131-138, 2011.

LAMBERT, J.C. *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, 1094-1100, 2009.

LAPIERE, J.C. *et al.* Preferential activation of the complement system in the lower epidermis of patients with pemphigus vulgaris. **Br J Dermatol.**, v. 139, n. 5, p. 851-854, 1998.

LESSEY, E. *et al.* Complement and cutaneous autoimmune blistering diseases. **Immunologic Research.** v.41, n. 3, p. 223-232, 2008.

LI, D. *et al.* MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. **Journal of Hypertens.** v. 28, n. 8, p. 1646-1654, 2010.

LIN, M. S. *et al.* Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 207-213, 2000.

LIU, D., NIU, Z. X. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/ CD35). **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 31, p. 524-535, 2009.

LOMBARDI, C. *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal Investigative Dermatology**; 98:847-850, 1992.

LOMBARDI, M. L. *et al.* Common Human Leukocyte Antigen Alleles in Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Italian Patients. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 1, p. 107-110, 1999.

LORD, J. e MORGAN, M. Complement Component (3b/4b) Receptor 1 (CR1). **Genetic Variants in Alzheimer's Disease**, p. 77-101, 2013.

Ma, X.Y., Yu, J.T., Tan, M.S., Sun, F.R., Miao, D, Tan, L. Missense variants in CR1 are associated with increased risk of Alzheimer' disease in Han Chinese. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 443, p. 17-21, 2014.

MADI, N. *et al.* Immune adherence and clearance of hepatitis B surface Ag/Ab complexes is abnormal in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical experimental immunology**, v. 85, p. 373-378, 1991.

MALHEIROS, D.; PANEPUCCI, R. A.; ROSELINO, A. M.; *et al.* Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. **Immunology**, v. 143, n. 3, p. 381–395, 2014



MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and Immunity**, v. 10, p. 547-558, 2009.

MARTEL, P. *et al.* Epistasis between DSG1 and *HLA* class II genes in pemphigus foliaceus. **Genes and immunity**, v. 3, p. 205-210, 2002.

MCELROY, J.J. *et al.* Maternal coding variants in complement receptor 1 and spontaneous idiopathic preterm birth. **Human Genetics**. v.8, n.132, p. 1-13, 2013.

MEDOF, M. E., NUSSENZWEIG, V. control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor CR1. **Journal of experimental medicine**, v. 159, p. 1669-1685, 1984.

MEGA v.4. Disponível em: (<http://www.megasoftware.net/>).

MERI, T. *et al.* Microbes bind complement inhibitor factor H via a common site. **PLOS pathogens**, v. 9, p. 1-12, 2013.

MESSIAS I.T., SANTAMARIA J., RAGIOTTO R., DOI E.M., KAJDACSY-BALLA A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clin Exp Dermatol** v.14, p.51–55, 1989.

MESSIAS I.T., VON KUSTER L.C., SANTA MARIA J., KAJDACSY-BALLA A. Complement and antibody deposition in Brazilian pemphigus foliaceus and correlation of disease activity with circulating antibodies. **Arch Dermatol** v. 124, p.1664–1668, 1988.

MESSIAS-REASON I.J. *et al.* The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. **Journal of Infectious Diseases**. v.196, p.1379 - 1385, 2007.

MESSIAS-REASON IJ, NISIHARA RM, MOCELIN V. Mannan-binding lectin and ficolin deposition in skin lesions of pemphigus. **Arch Dermatol Res**. v.303, n.7, p.521-525, 2011.

MOULDS, J. M. *et al.* Identification of the Kn<sup>a</sup>/Kn<sup>b</sup> polymorphism and a method for Knops genotyping. **Transfusion**, v. 44, p. 164-169, 2004.

MOULDS, J. M. *et al.* Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. **Blood of the American society of hematology**, v. 97, n. 9, p. 2879-2885, 2001.

MOULDS, J. M. The Knops blood-group system: a review. **Immunohematology** v. 26, n. 1, p. 2–7, 2010

MOULDS, J. M. *et al.* The C3b/C4b receptor is recognized by the knops, McCoy, Swain-Langley and Work blood group Antisera. **Journal of experimental medicine**, v. 173, p. 1159-1163, 1991.

MOULDS, J. M. REVEILLE, J. D., ARNETT, F. C. Structural polymorphisms of complement receptor 1 (CR1) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and normal controls of three ethnic groups. **Clinical and experimental immunology**, v. 105, p. 302-305, 1996.

NAITZA, S. *et al.* A Genome-Wide Association Scan on the Levels of Markers of Inflammation in Sardinians Reveals Associations That Underpin Its Complex Regulation. **Ploze Genetics**, v. 8, n. 1, 1-12, 2012.

NISIHARA, R.M, *et al.* Prevalence of autoantibodies in patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Arch Dermatol Res**. v. 295, p. 133-137, 2003.

OLGIATI, P. *et al.* Review article: genetic of late-onset *alzheimer's* disease: update from the alzgene database and analysis of shared pathways. **International Journal of Alzheimer's disease**, p. 1-14, 2011.

O'LEARY, J. M. *et al.* Backbone dynamics of complement control protein (CCP) modules reveals mobility in binding surfaces. **Protein Science**. v. 13, p. 1238–1250, 2004.

PASCUAL *et al.* Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. **Brain**. v. 117, p. 847-858, 1994

PASCUAL *et al.* Safety of rapid-rate transcranial magnetic stimulation in normal volunteers. **Electroencealography and Clinical Neurophysiology**. V. 89, p. 120–130, 1993.

PAVONI, D. P. *et al.* Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 39, p. 1227-1232, 2006.

PEREIRA, N. F. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, p. 233-241, 2004.

PETZL-ERLER, M L; SANTAMARIA, J. Are *HLA* class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue antigens**, v. 33, n. 3, p. 408-14, mar 1989.

PETZL-ERLER, M. L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: Is there any relationship? **Journal of Autoimmunity**, v. 25, p. 121-125, 2005.

PICCOLI, A. K. *et al.* **Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 na artrite reumatoide.** Revista Brasileira de Reumatologia; v. 51, n. 5, p. 497-510, 2011.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.

QIAN, Y. *et al.* Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. **Journal Of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1535–9, 2012.

QIAN, Y. *et al.* IgE, IgM, and IgG4 anti-desmoglein 1 autoantibody in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v.131, p. 985-987, 2011.

QUIGG, R. J. Use of complemente inhibitors in tissue injury. **Trends in Molecular Medicine**. v.8, n. 9, 430 – 435, 2002.

RCSB. Disponível em:

<<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2Q7Z&bionumber=1>>

Acessado em 29/01/14.

RegulomeDB. Disponível em: (<http://www.regulomedb.org>).

RIBEIRO, A. M. Q. *et al.* The profile of fogo selvagem (endemic pemphigus foliaceus) at the University hospital of Brasilia – Brazil. Epidemiological and clinical considerations. **International journal of dermatology**, v. 44, p. 293-298, 2005.

RHO, J. K. *et al.* Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 297, p. 91–95, 2002.

ROCK, B. *et al.* The Pathogenic Effect of IgG4 Autoantibodies in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **New England Journal Of Medicine**, v. 320, n. 22, p. 1463–1469, 1989.

ROSS, G. D. *et al.* Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. **Journal of experimental medecine**, v. 158, p. 334-352, 1983.

ROSSI, V. Deciphering Complement Receptor Type 1 Interactions with Recognition Proteins of the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**. V. 4, 2013.

ROWE, J. A. *et al.* Short report: positive correlation between rosetting and parasitemia in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. **American Journal of Tropical medicine and hygiene**, v. 66, p. 458-460, 2002.

ROXO, V. M. *et al.* Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus. Are there any associations? **Tissue Antigens**, v. 62, p. 394-400, 2003.

RUOCCO, V.; RUOCCO, E. Pemphigus and environmental factors. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 138, n. 4, p. 299-309, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2 ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHIFFERLI, J. A. *et al.* The role of hypocomplementaemia and low erythrocyte complement receptor type 1 numbers in determining abnormal immune complex clearance in humans. **Clinical experimental immunology**, v. 75, p. 329-335, 1989.

SILVESTRE, M. C.; NETTO, J. C. A. Endemic pemphigus foliaceus: social and demographical characteristics and incidence in the microregions of Goiás, based on

patients seen at the Tropical Diseases Hospital, Goiânia – Goiás. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 80, p. 261-266, 2005.

SINHA, S. *et al.* CR1 levels and gene polymorphisms exhibit differential association with falciparum malaria in regions of varying diseases endemicity. **Human immunology**, v. 70, p. 244-250, 2009.

SIVASANKAR, B. *et al.* Modulation of urinary CR1 in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 13, p. 228-233, 2004.

SONG, W-J. *et al.* Haploinsufficiency of *CBFA2 (AML 1)* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leucemia (FPD/AML). **Nature Genet.** v. 23, p. 166–175, 1999.

STOUTE, J. A. *et al.* Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increases levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. **The journal of infectious diseases**, v. 187, p. 522-525, 2003.

TAO, M.H., CANFIELD, S.T., MORRISON, S.L. The Differential Ability of Human IgG1 and IgG4 to Activate Complement Is Determined by the COON-terminal Sequence of the CH2 Domain. **The Journal of experimental medicine**. n. 4, p. 1025-1028, 1991.

TEERANAIPONG, P. *et al.* A functional single nucleotide polymorphism in the CR1 promoter region contributes to protection against cerebral Malaria. **The Journal of infectious disease**, v. 198, p. 1880-1891, 2008.

TEIXEIRA, T.A. *et al.* Refractory endemic pemphigus foliaceus in adolescence successfully treated with intravenous immunoglobulin. **An Bras Dermatol.** n. 4, p. 133-136, 2011.

THATHY, V. *et al.* Complement receptors I polymorphisms associated with resistance to severe malaria in Kenya. **Malaria Journal**, v. 4, p. 1-7, 2005.

THOMAS, B.N., *et al.* A complement receptor-1 polymorphism with high frequency in malaria endemic regions of Asia but not Africa. **Genes Immun.** v. 6, p. 31–36, 2005.

UTIYAMA, S. R. R.; MESSIAS REASON, I.; KOTZE, L. M. Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas. **Rev Bras Anal Clin**, v. 36, p. 183-188, 2004.

VassarStats. Disponível em: <http://vassarstats.net>.

VELDHUISEN, B *et al.* Molecular analysis of the York antigen of the Knops blood group system. **Transfusion**, v. 51, n. 7, p 1389–1396, 2011.

VIK, D. P., WONG, W.W. Structure of the gene for the F allele of complement receptor type 1 and sequence of the coding region unique to the S allele. **J Immunol**, v. 11, p. 6214–6224, 1993.

XIA, P. *et al.* Complement fixation by pemphigus antibody. V. Assembly of the membrane attack complex on cultured human keratinocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 6, p. 1939-1947, 1988.

WONG, W. W. *et al.* Analysis of multiple restriction fragment length polymorphisms of the gene for the human complement receptor type 1: Duplication of genomic sequences occurs in association with high molecular mass receptor allotype. **Journal of experimental medicine**, v. 164, p. 1531-1546, 1986.

WONG, W. W., WILSON, J. G., FEARON, D. T. Genetic regulation of a structural polymorphism of human C3b receptor. **Journal of clinical investigation**, v. 72, p. 685-693, 1983.

WONG, W.W. *et al.* Structure of the human CR1 gene: molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. **Journal of experimental medicine**, v. 169, p. 847-863, 1989.

XIANG, L. *et al.* Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. **American association of immunologists**, p. 4939-4945, 1999.

YANG, A. C., TSAI, S-J. Is mental illness complex? From behavior to brain. **Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 45, p. 252–256, 2013.

## APÊNDICE

Figura 10: Desequilíbrio de ligação entre polimorfismos comuns do gene *CR1* em populações do projeto HapMap.



(A) população europeia, (B) africana. LEGENDA: Em vermelho brilhante, desequilíbrio de ligação absoluto ( $D'=1$ ) e significativo, em azul,  $D'=1$ , porém não significativo; tonalidades de vermelho-claro/rosa indicam  $D'<1$ , significativo; branco:  $D'<1$ , não significativo. Os polimorfismos estudados estão destacados na figura FONTE: dados extraídos do projeto HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), e avaliados pelo programa Haploview 4.2.

Tabela 5: Frequência alélica dos SNPs de *CR1* selecionados

SNP	NG_007481.1	Localização	Frequência do alelo menor (%)			
			AFR	AMR	ASN	EUR
<b>rs6656401</b>	g.27577A>G	Intron 4	A: 0	A: 8	A: 3	A: 4
<b>rs3849266</b>	g.88518C>T	Intron 21	T: 5	T: 33	T: 39	T: 36
<b>rs2274567</b>	g.89149A>G	Exon 22	G: 26	G: 30	G: 23	G: 14
<b>rs3737002</b>	g.96301C>T	Exon 26	T: 5	T: 33	T: 39	T: 36
<b>rs11118131</b>	g.96724C>T	Intron 26	T: 22	T: 29	T: 24	T: 14
<b>rs11118167</b>	g.117682T>C	Intron 28	C: 1	C: 26	C: 20	C: 14
<b>rs17047660</b>	g.118384A>G	Exon 29	G: 23	G: 2	G: 0	G: 0
<b>rs4844610</b>	g.138080A>C	Intron 37	A: 0	A: 7	A: 3	A: 7
<b>rs12034383</b>	g.139123G>A	Intron 37	A: 13	G: 43	A: 43	G: 25

NOTA: Para a frequência populacional, utilizaram-se dados do projeto HapMap para as seguintes populações: Africanos (população Yoruba) (AFR), Americano miscigenado (AMR), Leste da Ásia (ASN), Europeu (população ibérica) (EUR). FONTE: Frequências de alelos na população retirado do navegador genômico Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), demais dados fornecidos pelo autor. NCBI Reference Sequence: NG\_007481.1.

Tabela 6: Caracterização da amostra de controles e pacientes para a análise dos níveis séricos da proteína CR1.

Código do Indivíduo	Sexo	Idade	Quadro Clínico	Lesão	Tratamento
<b>024JCM</b>	M	62	Controle	-	-
<b>043MLP</b>	F	60	Controle	-	-
<b>068NBP</b>	F	58	Controle	-	-
<b>074KAB</b>	F	44	Controle	-	-
<b>099ABB</b>	F	41	Controle	-	-
<b>331LAO</b>	F	32	Controle	-	-
<b>369GAC</b>	M	27	Controle	-	-
<b>393ARS</b>	F	55	Controle	-	-
<b>410ERA</b>	M	43	Controle	-	-
<b>423AEV</b>	F	20	Controle	-	-
<b>434ACB</b>	F	36	Controle	-	-
<b>439FSC</b>	M	21	Controle	-	-
<b>464TDF</b>	F	28	Controle	-	-
<b>465JSJ</b>	F	21	Controle	-	-
<b>469MCM</b>	F	20	Controle	-	-
<b>477OVU</b>	M	55	Controle	-	-
<b>480LCO</b>	F	24	Controle	-	-
<b>616SFY</b>	F	27	Controle	-	-



<b>C630ILB</b>	F	74	Controle	-	-
<b>C635AAT</b>	M	68	Controle	-	-
<b>C665HCF</b>	M	33	Controle	-	-
<b>C688SBA</b>	M	43	Controle	-	-
<b>C689EGB</b>	M	26	Controle	-	-
<b>C690AXA</b>	F	51	Controle	-	-
<b>C691AXU</b>	F	37	Controle	-	-
<b>C692LHF</b>	M	66	Controle	-	-
<b>CP465NGP</b>	M	46	Controle	-	-
<b>P243ERS</b>	M	70	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P242NRS</b>	F	42	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P307LRS</b>	F	30	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P360JIS</b>	M	34	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P362BCP</b>	F	53	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P376GOC</b>	F	52	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P377IYY</b>	M	48	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P378YHP</b>	M	51	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P380MQJ</b>	F	17	PF inativo	s.l.	s.t
<b>P392KEB</b>	M	38	PF inativo	s.l.	10 mg
<b>P229MFF</b>	F	52	PF inativo	s.l.	10 mg
<b>P266RMS</b>	F	29	PF inativo	s.l.	10 mg
<b>P352UDS</b>	M	14	PF inativo	s.l.	20 mg
<b>P357MAF</b>	M	55	PF inativo	s.l.	20 mg
<b>P363KHP</b>	F	13	PF inativo	s.l.	10 mg
<b>P367ABP</b>	M	22	PF inativo	s.l.	40 mg
<b>P369JCC</b>	F	30	PF inativo	s.l.	40 mg
<b>P384APK</b>	F	52	PF inativo	s.l.	60 mg
<b>P391XQG</b>	F	15	PF ativo	Generalizada	s.t.
<b>P325CEA</b>	M	48	PF ativo	s.i.	s.t.
<b>P362BCP</b>	F	54	PF ativo	Generalizada	s.t.
<b>P414AIK</b>	F	28	PF ativo	Generalizada	s.t.
<b>P415KGM</b>	F	36	PF ativo	s.i.	s.t.
<b>PK253EVM</b>	F	62	PF ativo	s.i.	s.t.
<b>P394XSE</b>	F	47	PF ativo	s.i.	5 mg
<b>P281FGS</b>	F	47	PF ativo	s.i.	50 mg
<b>P295EMS</b>	F	34	PF ativo	Generalizada	20 mg
<b>P296ESA</b>	F	54	PF ativo	Localizada	15 mg
<b>P342GVN</b>	F	56	PF ativo	Generalizada	60 mg
<b>P349CPP</b>	F	35	PF ativo	Generalizada	30 mg
<b>P353JME</b>	M	68	PF ativo	Localizada	5 mg

<b>P357MAF</b>	M	52	PF ativo	s.i.	20 mg
<b>P362BCP</b>	F	54	PF ativo	Generalizada	50 mg
<b>P363KHP</b>	F	12	PF ativo	Generalizada	10 mg
<b>P364INS</b>	M	18	PF ativo	Localizada	5 mg
<b>P368AOS</b>	F	38	PF ativo	Generalizada	30 mg
<b>P371ASS</b>	F	42	PF ativo	Generalizada	20 mg
<b>P373ITS</b>	F	44	PF ativo	Generalizada	20 mg
<b>P374JBS</b>	M	60	PF ativo	Generalizada	20 mg
<b>P379FPS</b>	F	25	PF ativo	Generalizada	30 mg*
<b>P380MQJ</b>	F	16	PF ativo	Generalizada	2,5 mg
<b>P381VFS</b>	M	38	PF ativo	Generalizada	40 mg
<b>P385BXI</b>	M	12	PF ativo	s.i.	40 mg
<b>P389DVC</b>	M	17	PF ativo	s.i.	35 mg
<b>P395KEG</b>	M	68	PF ativo	Localizada	10 mg
<b>P396NMK</b>	F	31	PF ativo	Generalizada	60 mg
<b>P397KWV</b>	M	74	PF ativo	Generalizada	50 mg
<b>P398HKU</b>	F	49	PF ativo	Generalizada	10 mg
<b>P399LAF</b>	M	33	PF ativo	Generalizada	20 mg
<b>P407OEV</b>	M	32	PF ativo	Generalizada	20 mg
<b>P408NKP</b>	M	29	PF ativo	Generalizada	5 mg
<b>P411WDS</b>	M	32	PF ativo	Generalizada	50 mg
<b>P420FRW</b>	M	46	PF ativo	Localizada	s.i.

LEGENDA: s.i. = sem informação, s.l. = sem lesão, s.t. = sem tratamento, c.t. = com tratamento, \*medicamento deflasacort.

Tabela 7: Análises de associação e frequências alélicas, genóticas e de portadores para os SNPs de *CR1*

rs6656401										rs3849266										rs2274567									
		Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			
		n	%	n	%				n	%	n	%	n	%				n	%	n	%	n	%				n	%	n
Total	GG	190	83,0	145	81,0	Ref.			Total	CC	104	54,2	66	48,5	Ref.			Total	GG	13	6,8	11	8,1	Ref.					
EU		115	81,6	84	77,1	Ref.			EU		59	53,2	40	47,6	Ref.			EU		6	5,4	6	7,1	Ref.					
AF		75	85,2	61	87,1	Ref.			AF		45	55,6	26	50,0	Ref.			AF		7	8,6	5	9,6	Ref.					
Total	GA	37	16,2	32	17,9	0,88	0,52 - 1,48	0,690	Total	CT	78	40,6	63	46,3	0,79	0,50 - 1,24	0,301	Total	GA	73	38,0	44	32,4	1,40	0,58 - 3,40	0,495			
EU		24	17,0	23	21,1	0,76	0,40 - 1,44	0,418	EU		48	43,2	38	45,2	0,86	0,48 - 1,54	0,655	EU		43	38,7	28	33,3	1,53	0,45 - 5,24	0,537			
AF		13	14,8	9	12,9	1,17	0,47 - 2,93	0,819	AF		30	37,0	25	48,1	0,69	0,34 - 1,42	0,362	AF		30	37,0	16	30,8	1,34	0,36 - 4,90	0,741			
Total	AA	2	0,9	2	1,1	0,76	0,10 - 5,48	1	Total	TT	10	5,2	7	5,2	0,91	0,33 - 2,50	1	Total	AA	106	55,2	81	59,6	1,10	0,47 - 2,60	0,830			
EU		2	1,8	2	1,4	0,73	0,10 - 5,29	1	EU		4	3,6	6	7,1	0,45	0,12 - 1,70	0,317	EU		62	55,9	50	59,5	1,24	0,38 - 4,08	0,767			
AF		0	0,0	0	0,0	0,81	0,02 - 41,65	1*	AF		6	7,4	1	1,9	3,47	0,39 - 30,40	0,411	AF		31	54,3	44	58,6	1,01	0,29 - 3,49	1,000			
Total	G	417	91,1	322	89,9	1,14	0,71 - 1,82	0,630	Total	C	286	74,5	195	71,7	1,15	0,81 - 1,63	0,47	Total	G	99	25,8	66	24,3	1,08	0,76 - 1,55	0,72			
EU		254	90,1	191	87,6	1,28	0,73 - 2,25	0,391	EU		166	74,8	118	70,2	1,26	0,80 - 1,97	0,358	EU		55	24,8	40	23,8	1,05	0,66 - 1,68	0,905			
AF		163	92,6	131	93,6	0,86	0,35 - 2,08	0,83	AF		120	74,1	77	74,0	1,00	0,57 - 0,76	1	AF		44	27,2	26	25,0	1,12	0,64 - 1,96	0,78			
Total	A	41	9,0	36	10,1	0,88	0,55 - 1,41	0,630	Total	T	98	25,5	77	28,3	0,87	0,61 - 1,23	0,474	Total	A	285	74,2	206	75,7	0,92	0,64 - 1,32	0,715			
EU		28	9,9	27	12,4	0,78	0,45 - 1,37	0,391	EU		56	25,2	50	29,8	0,80	0,51 - 1,25	0,358	EU		167	75,2	128	76,2	0,95	0,59 - 1,51	0,905			
AF		13	7,4	9	6,4	1,16	0,48 - 2,80	0,826	AF		42	25,9	27	26,0	1,00	0,57 - 1,75	1	AF		118	72,8	78	75,0	0,89	0,51 - 1,57	0,776			
Total	G+	227	99,1	177	98,9	1,56	0,21 - 11,21	1	Total	C+	182	94,8	129	94,9	0,99	0,37 - 2,66	1	Total	G+	86	44,8	55	40,4	1,19	0,76 - 1,86	0,497			
EU		139	98,6	107	98,2	0,76	0,40 - 1,40	0,430	EU		107	96,0	78	92,9	2,06	0,56 - 7,54	0,333	EU		49	44,1	34	40,5	1,16	0,65 - 2,06	0,662			
AF		88	100,0	70	100,0	1,25	0,02 - 64,06	1*	AF		75	92,6	51	98,1	0,25	0,03 - 2,10	0,246	AF		37	45,7	21	40,4	1,24	0,61 - 2,51	0,593			
Total	A+	39	17,0	34	19,0	0,87	0,52 - 1,45	0,696	Total	T+	88	45,8	70	51,5	0,80	0,51 - 1,24	0,370	Total	A+	179	93,2	125	91,9	1,21	0,52 - 2,79	0,671			
EU		26	18,4	25	22,9	1,30	0,18 - 9,37	1	EU		52	46,9	44	52,4	0,80	0,45 - 1,41	0,472	EU		105	94,6	78	92,9	1,35	0,42 - 4,33	0,765			
AF		13	14,8	9	12,9	1,17	0,47 - 2,93	0,819	AF		36	44,4	26	50,0	0,80	0,40 - 1,61	0,590	AF		74	91,4	47	90,4	1,12	0,61 - 2,51	0,594			
Total	H.W.		0,89		0,87				Total	H.W.		0,34		0,10				Total	H.W.		0,93		0,16						
EU			0,57		0,77				EU			0,12		0,45				EU			0,68		0,46						
AF			0,45		0,57				AF			0,75		0,07				AF			0,57		0,20						

Tabela 7: Análises de associação e frequências alélicas, genótípicas e de portadores para os SNPs de *CR1*

rs3737002										rs11118131										rs11118167									
		Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			
		n	%	n	%				n	%	n	%	n	%				n	%	n	%	n	%				n	%	n
Total	CC	130	60,8	67	45,3	Ref.			Total	CC	128	59,3	93	63,3	Ref.			Total	CC	4	2,0	2	1,5	Ref.					
EU		73	58,4	35	39,3	Ref.			EU		75	59,5	55	62,5	Ref.			EU		4	3,6	1	1,3	Ref.					
AF		57	64,0	32	54,2	Ref.			AF		53	58,9	38	64,4	Ref.			AF		0	0,0	1	1,8	Ref.					
<b>Total</b>	<b>CT</b>	<b>71</b>	<b>33,2</b>	<b>68</b>	<b>46,0</b>	<b>0,54</b>	<b>0,35 - 0,84</b>	<b>0,006</b>	Total	CT	73	33,8	44	29,9	1,20	0,76 - 1,91	0,485	Total	CT	58	29,4	35	26,1	0,83	0,14 - 4,76	1			
<b>EU</b>		<b>43</b>	<b>34,4</b>	<b>43</b>	<b>48,3</b>	<b>0,48</b>	<b>0,27 - 0,86</b>	<b>0,018</b>	EU		42	33,3	28	31,8	1,10	0,61 - 1,99	0,770	EU		38	33,9	24	30,4	0,39	0,04 - 3,76	0,643			
AF		28	31,5	25	42,4	0,63	0,31 - 1,25	0,217	AF		31	34,4	16	27,1	1,39	0,67 - 2,89	0,462	AF		20	23,5	11	20,0	4,92	0,19 - 130,37	0,375*			
Total	TT	13	6,1	13	8,8	0,51	0,23 - 1,17	0,129	Total	TT	15	6,9	10	6,8	1,09	0,47 - 2,53	1	Total	TT	135	68,5	97	72,4	0,70	0,12 - 3,87	1			
EU		9	7,2	11	12,4	0,39	0,15 - 1,03	0,070	EU		9	7,1	5	5,7	1,32	0,42 - 4,16	0,778	EU		70	62,5	54	68,4	0,32	0,03 - 2,98	0,393			
AF		4	4,5	2	3,4	1,12	0,19 - 6,47	1	AF		6	6,7	5	8,5	0,86	0,24 - 3,03	1,000	AF		65	76,5	43	78,2	45,17	0,18 - 113,46	0,403*			
<b>Total</b>	<b>C</b>	<b>331</b>	<b>77,3</b>	<b>202</b>	<b>68,2</b>	<b>1,59</b>	<b>1,14 - 2,21</b>	<b>0,01</b>	Total	C	329	76,2	230	78,2	0,88	0,62 - 1,27	0,53	Total	C	66	16,8	39	14,6	1,18	0,77 - 1,82	0,45			
<b>EU</b>		<b>189</b>	<b>75,6</b>	<b>113</b>	<b>63,5</b>	<b>1,78</b>	<b>1,17 - 2,71</b>	<b>0,007</b>	EU		192	76,2	138	78,4	0,88	0,55 - 1,40	0,641	EU		46	20,5	26	16,5	1,31	0,77 - 2,23	0,353			
AF		142	79,8	89	75,4	1,28	0,74 - 2,24	0,39	AF		137	76,1	92	78,0	0,90	0,52 - 1,57	0,78	AF		20	11,8	13	11,8	0,99	0,47 - 2,09	1			
<b>Total</b>	<b>T</b>	<b>97</b>	<b>22,7</b>	<b>94</b>	<b>31,8</b>	<b>0,63</b>	<b>0,45 - 0,88</b>	<b>0,007</b>	Total	T	103	23,8	64	21,8	1,12	0,79 - 1,60	0,530	Total	T	328	83,3	229	85,5	0,85	0,55 - 1,30	0,451			
<b>EU</b>		<b>61</b>	<b>24,4</b>	<b>65</b>	<b>36,5</b>	<b>0,56</b>	<b>0,37 - 0,85</b>	<b>0,007</b>	EU		60	23,8	38	21,6	1,14	0,71 - 1,80	0,641	EU		178	79,5	132	83,5	0,35	0,04 - 3,16	0,400			
AF		36	20,2	29	24,6	0,78	0,45 - 1,36	0,392	AF		43	23,9	26	22,0	1,11	0,64 - 1,93	0,779	AF		150	88,2	97	88,2	1,00	0,48 - 2,11	1			
Total	C+	201	93,9	135	91,2	1,49	0,67 - 3,31	0,408	Total	C+	201	93,1	137	93,2	0,98	0,43 - 2,24	1	Total	C+	62	31,5	37	27,6	1,20	0,74 - 1,95	0,466			
EU		116	92,8	78	87,6	1,82	0,72 - 4,59	0,240	EU		117	92,9	83	94,3	0,78	0,25 - 2,42	0,783	EU		42	37,5	25	31,7	1,30	0,70 - 2,38	0,443			
AF		85	95,5	57	96,6	0,75	0,13 - 4,20	1	AF		84	93,3	54	91,5	1,30	0,38 - 4,46	0,753	AF		20	23,5	12	21,8	1,10	0,49 - 2,48	0,840			
<b>Total</b>	<b>T+</b>	<b>84</b>	<b>39,3</b>	<b>81</b>	<b>54,7</b>	<b>0,53</b>	<b>0,35 - 0,82</b>	<b>0,003</b>	Total	T+	88	40,7	54	36,7	1,18	0,77 - 1,82	0,446	Total	T+	193	98,0	132	98,5	0,73	0,13 - 4,05	1			
<b>EU</b>		<b>52</b>	<b>41,6</b>	<b>54</b>	<b>60,7</b>	<b>0,46</b>	<b>0,26 - 0,80</b>	<b>0,008</b>	EU		51	40,5	33	37,5	1,13	0,65 - 1,98	0,672	EU		108	96,4	78	98,7	0,35	0,04 - 3,16	0,406			
AF		32	36,0	27	45,8	0,66	0,34 - 1,30	0,303	AF		37	41,1	21	35,6	1,26	0,64 - 2,49	0,606	AF		85	100,0	54	98,2	4,71	0,19 - 117,63	0,392*			
Total	H.W.		0,43		0,47				Total	H.W.		0,31		0,14				Total	H.W.		0,44		0,56						
EU			0,45		0,69				EU			0,36		0,57				EU			0,68		0,35						
AF			0,81		0,27				AF			0,62		0,11				AF			0,22		0,76						

Tabela 7: Análises de associação e frequências alélicas, genóticas e de portadores para os SNPs de *CR1*

										CONCLUSÃO																			
rs17047660										rs4844610										rs12034383									
		Pacientes		Controles		OR	95% IC	P			Pacientes		Controles		OR	95% IC	P	Pacientes		Controles		OR	95% IC	P					
		n	%	n	%				n	%	n	%	n	%				n	%	n	%				n	%			
Total	AA	177	89,9	129	96,3	Ref.			Total	CC	159	81,1	114	81,4	Ref.			Total	GG	58	29,6	35	25,0	Ref.					
	EU	106	94,6	78	98,7	Ref.				EU	92	78,6	66	79,5	Ref.				EU	31	26,5	18	21,7	Ref.					
	AF	71	83,5	51	92,7	Ref.				AF	67	84,8	48	84,2	Ref.				AF	27	34,2	17	29,8	Ref.					
<b>Total</b>	<b>AG</b>	<b>20</b>	<b>10,2</b>	<b>5</b>	<b>3,7</b>	<b>2,91</b>	<b>1,07 - 7,96</b>	<b>0,034</b>	Total	CA	35	17,9	25	17,9	1,00	0,57 - 1,77	1	Total	GA	90	45,9	73	52,1	0,74	0,44 - 1,25	0,294			
	EU	6	5,4	1	1,3	4,41	0,52 - 37,42	0,243		EU	23	19,7	16	19,3	1,03	0,50 - 2,10	1		EU	56	47,9	43	51,8	0,76	0,37 - 1,53	0,481			
	AF	14	16,5	4	7,3	2,51	0,78 - 8,08	0,129		AF	12	15,2	9	15,8	0,95	0,37 - 2,45	1		AF	34	43,0	30	52,6	0,71	0,33 - 1,56	0,430			
Total	GG	0	0	0	0				Total	AA	2	1,0	1	0,7	1,43	0,13 - 16,00	1	Total	AA	48	24,5	32	22,9	0,90	0,49 - 1,67	0,757			
	EU	0	0	0	0					EU	2	1,7	1	1,2	1,43	0,13 - 16,15	1		EU	30	25,6	22	26,5	0,79	0,36 - 1,76	0,684			
	AF	0	0	0	0					AF	0	0,0	0	0,0	0,72	0,01 - 36,85	1		AF	18	22,8	10	17,5	1,13	0,42 - 3,03	1			
<b>Total</b>	<b>G</b>	<b>20</b>	<b>5,1</b>	<b>5</b>	<b>1,9</b>	<b>2,81</b>	<b>1,04 - 7,59</b>	<b>0,04</b>	Total	C	353	90,1	253	90,4	0,96	0,58 - 1,61	1	Total	G	206	52,6	143	51,1	1,06	0,78 - 1,44	0,75			
	EU	6	2,7	1	0,6	4,32	0,51 - 36,25	0,247		EU	207	88,5	148	89,2	0,93	0,49 - 1,75	0,873		EU	118	50,4	79	47,6	1,12	0,75 - 1,67	0,612			
	AF	14	8,2	4	3,6	2,38	0,76 - 7,42	0,14		AF	146	92,4	105	92,1	1,04	0,42 - 2,56	1		AF	88	55,7	64	56,1	0,98	0,60 - 1,59	1			
<b>Total</b>	<b>A</b>	<b>374</b>	<b>94,9</b>	<b>263</b>	<b>98,1</b>	<b>0,35</b>	<b>0,13 - 0,96</b>	<b>0,037</b>	Total	A	39	10,0	27	9,5	1,04	0,62 - 1,74	1	Total	A	186	47,5	137	49,9	0,94	0,69 - 1,28	0,754			
	EU	218	97,3	157	99,4	0,23	0,03 - 1,94	0,247		EU	27	11,5	18	10,8	1,07	0,57 - 2,02	0,873		EU	116	49,6	87	53,4	0,89	0,60 - 1,33	0,612			
	AF	156	91,8	106	96,4	0,42	0,13 - 1,31	0,142		AF	12	7,6	9	7,9	0,96	0,39 - 2,36	1		AF	70	44,3	50	43,9	1,02	0,63 - 1,65	1			
<b>Total</b>	<b>G+</b>	<b>20</b>	<b>10,2</b>	<b>5</b>	<b>3,7</b>	<b>2,91</b>	<b>1,06 - 7,97</b>	<b>0,034</b>	Total	C+	194	99,0	139	99,3	0,70	0,06 - 7,77	1	Total	G+	148	75,5	108	77,1	0,91	0,55 - 1,52	0,795			
	EU	6	5,4	1	1,3	4,41	0,52 - 37,42	0,246		EU	115	98,3	82	98,8	0,70	0,06 - 7,86	1		EU	87	74,4	61	73,5	1,04	0,55 - 1,98	1			
	AF	14	16,5	4	7,3	2,51	0,78 - 8,08	0,129		AF	79	100,0	57	100,0	1,39	0,03 - 70,71	1*		AF	61	77,2	47	82,5	0,72	0,30 - 1,71	0,523			
Total	A+	197	100,0	134	100,0	1,47	0,03 - 47,46	1*	Total	A+	37	18,9	26	18,6	1,02	0,58 - 1,78	1	Total	A+	138	70,4	105	75,0	0,79	0,48 - 1,29	0,388			
	EU	112	100,0	79	100,0	1,42	0,03 - 72,07	1*		EU	25	21,4	17	20,5	1,05	0,53 - 2,10	1		EU	86	73,5	65	78,3	0,77	0,39 - 1,49	0,506			
	AF	85	100,0	55	100,0	1,54	0,03 - 78,78	1*		AF	12	15,2	9	15,8	0,95	0,37 - 2,45	1		AF	52	65,8	40	70,2	0,82	0,39 - 1,70	0,711			
Total	H.W		0,45		0,83				Total	H.W.		0,96		0,77				Total	H.W.		0,27		0,61						
	EU		0,77		0,95					EU		0,69		0,98					EU		0,64		0,72						
	AF		0,41		0,78					AF		0,46		0,52					AF		0,25		0,60						

LEGENDA: AF = Afro-brasileiros; EU = Euro-brasileiros; n = número de alelos ou indivíduos; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; Ref. = utilizado como referência; P = valor de p. NOTA: Valores em negrito indicam significância com valor de p fixado em 0.05. HW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8: Análises estratificadas para os SNPs epistáticos de *CR1* em EU

		Pacientes		Controles		OR	IC	P
rs11118167	rs12034383	n	%	n	%			
C+	A+	24	92,31	28	93,33	0,86	0,11 – 6,55	1
C+	G/G	2	7,69	2	6,67			
T/T	A+	55	83,33	29	72,50	1,90	0,73 – 4,90	0,220
T/T	G/G	11	16,67	11	27,50			
C+	G+	36	90,00	16	80,00	2,25	0,50 – 10,14	0,422
C+	A/A	4	10,00	4	20,00			
T/T	G+	42	63,64	29	72,50	0,66	0,28 – 1,56	0,399
T/T	A/A	24	36,36	11	27,50			
<b>C+</b>	<b>A+</b>	<b>24</b>	<b>30,38</b>	<b>28</b>	<b>49,12</b>	<b>0,44</b>	<b>0,22 - 0,88</b>	<b>0,022</b>
<b>T/T</b>	<b>A+</b>	<b>55</b>	<b>69,62</b>	<b>29</b>	<b>50,88</b>			
C+	G/G	2	15,38	2	15,38	1	0,12 – 8,42	1
T/T	G/G	11	84,62	11	84,62			
C+	G+	36	46,15	16	35,56	1,55	0,73 – 3,31	0,263
T/T	G+	42	53,85	29	54,44			
C+	A/A	4	14,29	4	26,67	0,23	0,04 – 1,44	0,168
T/T	A/A	24	85,71	11	73,33			
<b>T/C</b>	<b>A+</b>	<b>23</b>	<b>63,89</b>	<b>18</b>	<b>94,74</b>	<b>0,10</b>	<b>0,01 - 0,82</b>	<b>0,020</b>
<b>T/C</b>	<b>G/G</b>	<b>13</b>	<b>36,11</b>	<b>1</b>	<b>5,26</b>			

LEGENDA: n = número de alelos ou indivíduos; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; P = valor de p. NOTA: Valores em negrito indicam significância com valor de *p* fixado em 0,05. As quatro primeiras comparações foram estratificadas de acordo com o genótipo do rs12034383, e as últimas cinco comparações foram estratificadas de acordo com o genótipo do rs11118167.

Tabela 9- Análises de associações e frequências dos haplótipos formados pelos 2 SNPs epistáticos de *CR1* (rs11118167- rs12034383).

Haplótipo	Total							EU					AF								
	Paciente		Controle		OR	IC	P	Paciente		Controle		OR	IC	P	Paciente		Controle		OR	IC	P
	n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%			
CA	10	2,89	9	3,60	0,78	0,31 - 1,99	0,643	5	2,53	8	5,56	0,44	0,14 - 1,37	0,163	5	3,38	1	0,94	3,67	0,42 - 31,89	0,252
CG	43	12,43	31	12,40	1	0,61 - 1,64	1,000	30	15,15	18	12,50	1,25	0,67 - 2,34	0,53	13	8,78	13	12,26	0,69	0,30 - 1,55	0,405
TA	157	45,38	124	49,60	0,84	0,61 - 1,17	0,319	97	48,99	77	53,47	0,84	0,54 - 1,28	0,444	60	40,54	47	44,34	0,86	0,52 - 1,42	0,607
TG	136	39,31	86	34,40	1,23	0,88 - 1,73	0,23	66	33,33	41	28,47	1,26	0,79 - 2,00	0,35	70	47,30	45	42,45	1,22	0,74 - 2,01	0,52

LEGENDA: AF = Afro-brasileiros; EU = Euro-brasileiros; n = número de alelos ou indivíduos; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; P = valor de p. NOTA: Valores em negrito indicam significância com valor de *p* fixado em 0,05. As análises foram realizadas utilizando a soma de todos os outros haplótipos como referência.

Tabela 10: Análises de associações e frequências dos haplótipos formados pelos 9 SNPs de CR1 (rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs3737002, rs11118131, rs11118167, rs17047660, rs4844610 e rs12034383).

Haplótipo	Total						EU					AF									
	Pacientes		Controles		OR	IC	P	Pacientes		Controles		OR	IC	P	Pacientes		Controles		OR	IC	P
	n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%			
ACACCTAAG	37	10,69	23	9,20	1,18	0,68 - 2,04	0,583	24	12,12	15	10,42	1,19	0,50 - 2,35	0,731	13	8,78	8	7,55	1,18	0,47 - 2,95	0,819
GCACCCACA	1	0,29	0	0,00	2,17	0,09 - 53,62	1*	1	0,51	0	0,00	2,19	0,09 - 54,27	1*	0	-	0				
GCACCTACA	74	21,39	42	16,80	1,35	0,88 - 2,05	0,174	46	23,23	25	17,36	1,44	0,84 - 2,48	0,224	28	18,92	17	16,04	1,22	0,63 - 2,37	0,619
GCACCTACG	45	13,01	34	13,60	0,95	0,59 - 1,53	0,903	22	11,11	14	9,72	1,16	0,57 - 2,35	0,724	23	15,54	20	18,87	0,79	0,41 - 1,53	0,501
GCACCTGCA	2	0,58	0	0,00	3,63	0,17 - 76,06	0,512	1	0,51	0	0,00	2,19	0,09 - 54,27	1*	1	0,68	0	0,00	2,17	0,09 - 53,69	1*
GCACCTGCG	13	3,76	6	2,40	1,59	0,59 - 4,23	0,480	4	2,02	2	1,39	1,46	0,26 - 8,10	1,000	9	6,08	4	3,77	1,65	0,49 - 5,51	0,566
<b>GCATCTACA</b>	<b>4</b>	<b>1,16</b>	<b>10</b>	<b>4,00</b>	<b>0,28</b>	<b>0,09 - 0,90</b>	<b>0,029</b>	<b>3</b>	<b>1,52</b>	<b>9</b>	<b>6,25</b>	<b>0,23</b>	<b>0,06 - 0,87</b>	<b>0,033</b>	1	0,68	1	0,94	0,71	0,04 - 11,55	1,000
GCGCCTACG	7	2,02	2	0,80	2,56	0,53 - 12,43	0,316	2	1,01	0	0,00	3,68	0,17 - 77,17	0,511	5	3,38	2	1,89	1,82	0,35 - 9,55	0,703
GCGCTCACG	43	12,43	31	12,40	1,00	0,61 - 1,62	1,000	30	15,15	18	12,50	1,25	0,67 - 2,34	0,531	13	8,78	13	12,26	0,69	0,30 - 1,55	0,405
GCGCTTACG	34	9,83	21	8,40	1,19	0,67 - 2,10	0,570	14	7,07	10	6,94	1,02	0,44 - 2,36	1,000	20	13,51	11	10,38	1,35	0,62 - 2,95	0,561
GTACCTACA	15	4,34	8	3,20	1,37	0,57 - 3,28	0,525	9	4,55	5	3,47	1,32	0,43 - 4,04	0,784	6	4,05	3	2,83	1,45	0,35 - 5,94	0,739
GTATCCACA	9	2,60	9	3,60	0,71	0,28 - 1,83	0,629	4	2,02	8	5,56	0,35	0,10 - 1,19	0,133	5	3,38	1	0,94	3,67	0,42 - 31,89	0,252
<b>GTATCTACA</b>	<b>62</b>	<b>17,92</b>	<b>64</b>	<b>25,60</b>	<b>0,63</b>	<b>0,43 - 0,94</b>	<b>0,025</b>	38	19,19	38	26,39	0,66	0,40 - 1,10	0,147	24	16,22	26	24,53	0,59	0,32 - 1,11	0,111

LEGENDA: AF = Afro-brasileiros; EU = Euro-brasileiros; n = número de alelos ou indivíduos; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; P = valor de p. NOTA: Valores em negrito indicam significância com valor de *p* fixado em 0,05. As análises foram realizadas utilizando a soma de todos os outros haplótipos como referência.



## ANEXOS

## ANEXO 1 - FICHA DE AVERIGUAÇÃO - PÊNFIGO

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	Nº DO PRONTUÁRIO	LOCAL	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

**Material coletado**

Biópsia de pele. (1) Sim (2) Não. Sangue periférico: (1) Sim (2) Não. Volume total _____ml. Volume em heparina _____ml. Volume em EDTA para DNA _____ml, para células _____ml. Volume em ativador de coagulação (para soro) _____ml.
---

**1) IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)  
(2) casado(a) (5) Outros: \_\_\_\_\_

(3) viúvo(a)

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: ( \_\_ ) \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_ Próximo a: \_\_\_\_\_

Nome, telefone e endereço de pessoa para contato:

Municípios onde residiu:

Município	Tempo de residência	Exposição a (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	Obs.

Código: (1) Animais, (2) Insetos, (3) Lavouras, (4) Rios

Grupo étnico:

(1) Branco	(5) Negro
(2) Mulato-claro	(6) Indígena
(3) Mulato-médio	(7) Oriental
(4) Mulato-escuro	(8) Branco brasileiro

Obs.: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ anos completos de estudo

Grau de instrução: (1) Analfabeto (5) Médio completo  
(2) Fundamental incompleto (6) Superior incompleto

- (3) Fundamental completo      (7) Superior completo  
 (4) Médio incompleto          (8) Pós-graduação

História ocupacional:

Emprego/Ocupação	Período	Obs.

## 2) EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

Agente	Período	Frequência (vezes por semana)	Obs.

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: \_\_\_\_\_

Nº de cômodos: \_\_\_\_\_

Nº banheiros: \_\_\_\_\_

Saneamento básico: (1) Sim (2) Não

Energia elétrica: (1) Sim (2) Não

Nº de pessoas que vivem na habitação: \_\_\_\_\_

## 3) HISTÓRIA FAMILIAR

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Município de nascimento: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: \_\_\_\_\_

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Município de nascimento: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Ascendência da mãe: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: \_\_\_\_\_

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Pais consanguíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)

Número de irmãos - total: \_\_\_\_\_

Número de irmãos vivos: \_\_\_\_\_

Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não

Ordem de nascimento dos irmãos:

\_\_\_\_\_

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? \_\_\_\_\_

Quantos filhos nasceram vivos? \_\_\_\_\_

Quantos filhos nasceram mortos? \_\_\_\_\_

Algum aborto (perca)? \_\_\_\_\_

Alguém na família tem a mesma doença? (1) Sim (2) Não

Nome e grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)  
A doença foi semelhante à sua? (1) Sim (2) Não

Caso não seja semelhante, especificar abaixo a diferença:

---



---



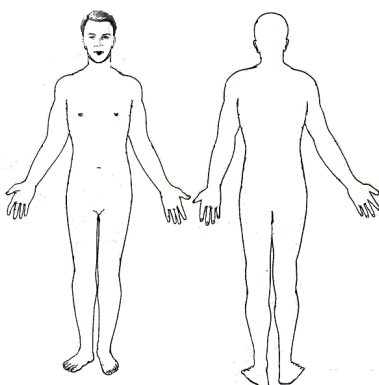
---

#### 4) ASPECTOS CLÍNICOS

##### LESÕES

Apresenta lesões no momento da coleta? (1) Sim (2) Não

Região do corpo: marcar os lugares em que há lesões ativas.



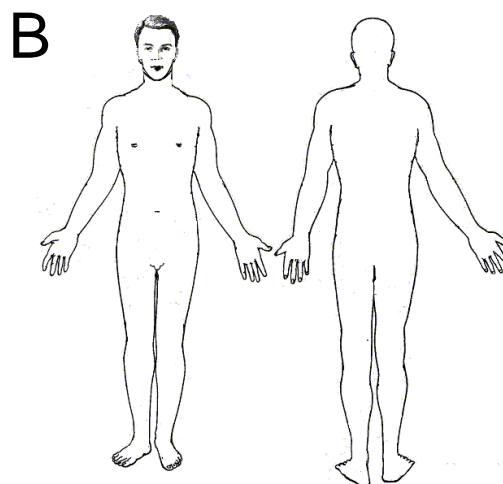
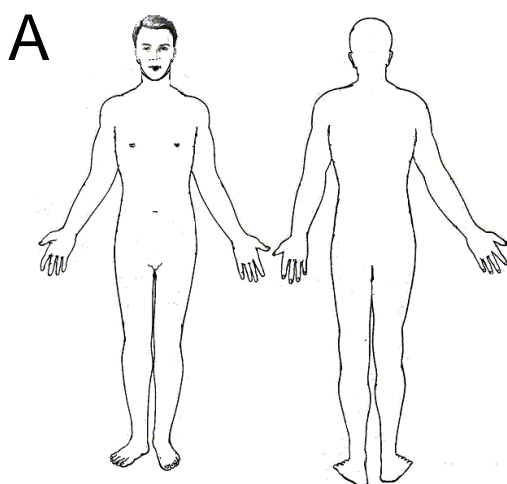
##### EVOLUÇÃO DAS LESÕES

Município em que apareceu a lesão primária: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Ano: \_\_\_\_\_ Mês do ano em que apareceu: \_\_\_\_\_

A lesão se disseminou? (1) Sim (2) Não

Utilize os esquemas abaixo para mostrar: **A**) lesão primária; **B**) evolução em ordem crescente (ex: 1 marca o lugar onde surgiram novas lesões, 2 o segundo e assim sucessivamente). Utilizar a mesma chave numérica na tabela abaixo.



Local (usar número colocado no esquema acima)	Tempo após lesão primária
1	
2	
3	

4	
---	--

**DIAGNÓSTICO DEFINITIVO**

Base do diagnóstico: (1) Informações clínicas (2) Histopatológico (3) Imunohistoquímica

Pênfigo Vulgar ( ) Pênfigo Foliáceo ( ).

Local do diagnóstico - Instuição: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Informações adicionais sobre diagnóstico:

(1) Informações clínicas: \_\_\_\_\_

(2) Histopatológico: \_\_\_\_\_

(3) Imunohistoquímica: \_\_\_\_\_

**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS**

Anticorpo	Data	Título

**TRATAMENTO ATUAL DE PÊNFIGO**

1- Prednisona ( ) Dose \_\_\_\_\_ Posologia \_\_\_\_\_ Início \_\_\_\_\_

2- Azatioprina ( ) Dose \_\_\_\_\_ Posologia \_\_\_\_\_ Início \_\_\_\_\_

3- \_\_\_\_\_ Dose \_\_\_\_\_ Posologia \_\_\_\_\_ Início \_\_\_\_\_

**TRATAMENTOS ANTERIORES DE PÊNFIGO**

Medicamento	Dose	Via de administração (usar código abaixo)	Posologia	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

Houve interrupção do tratamento? (1) Sim (2) Não

Interrupção no tratamento:

1- Prednisona ( ) Sim ( ) Não Tempo: \_\_\_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

2- Azatioprina ( ) Sim ( ) Não Tempo: \_\_\_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

3- \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não Tempo: \_\_\_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

**OUTROS MEDICAMENTOS**

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	DE	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

**OUTRAS DOENÇAS:**

DOENÇA	DATA DE DIAGNÓSTICO	DATA DE CURA	TRATAMENTO

**HÁBITOS ALIMENTARES**

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Frequência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			
(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

## ANEXO 2- FICHA DE AVERIGUAÇÃO - CONTROLES

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	LOCAL	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

**Material coletado**

Biópsia de pele. (1) Sim (2) Não.
Sangue periférico: (1) Sim (2) Não.
Volume total _____ml.
Volume em heparina _____ml.
Volume em EDTA para DNA _____ml, para células _____ml.
Volume em ativador de coagulação (para soro) _____ml.

**1) IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)  
(2) casado(a) (5) Outros: \_\_\_\_\_  
(3) viúvo(a)

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: ( \_\_ ) \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_ Próximo a: \_\_\_\_\_

Nome, telefone e endereço de pessoa para contato:

Municípios onde residiu:

Município	Tempo de residência	Exposição a (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	Obs.

Código: (1) Animais, (2) Insetos, (3) Lavouras, (4) Rios

Grupo étnico:

(1) Branco	(5) Negro
(2) Mulato-claro	(6) Indígena
(3) Mulato-médio	(7) Oriental
(4) Mulato-escuro	(8) Branco brasileiro

Obs.: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ anos completos

de estudo

Grau de instrução: (1) Analfabeto	(5) Médio completo
(2) Fundamental incompleto	(6) Superior incompleto
(3) Fundamental completo	(7) Superior completo
(4) Médio incompleto	(8) Pós-graduação

História ocupacional:

Emprego/Ocupação	Período	OBS

Exposição a agentes químicos (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

Agente	Período	Frequência (vezes por semana)	Obs.

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: \_\_\_\_\_

Nº de cômodos: \_\_\_\_\_

Nº banheiros: \_\_\_\_\_

Saneamento básico: (1) Sim (2) Não

Energia elétrica: (1) Sim (2) Não

Nº de pessoas que vivem na habitação: \_\_\_\_\_

## 2) HISTÓRIA FAMILIAR

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Município de nascimento: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: \_\_\_\_\_

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Município de nascimento: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Ascendência da mãe: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: \_\_\_\_\_

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Pais consanguíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)

Número de irmãos - total: \_\_\_\_\_

Número de irmãos vivos: \_\_\_\_\_

Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não

Ordem de nascimento dos irmãos:

---



---



---

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? \_\_\_\_\_

Quantos filhos nasceram vivos? \_\_\_\_\_

Quantos filhos nasceram mortos? \_\_\_\_\_

Algum aborto (perca)? \_\_\_\_\_

Alguém na família tem pêfigo? (1) Sim (2) Não

Nome e grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)



**3) MEDICAMENTOS**

Toma algum medicamento? (1) Sim (2) Não

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

**4) DOENÇAS**

Tem ou teve alguma doença? (1) Sim (2) Não

DOENÇA	DATA DIAGNÓSTICO	DE	DATA DE CURA	TRATAMENTO

**5) HÁBITOS ALIMENTARES**

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Frequência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			
(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

