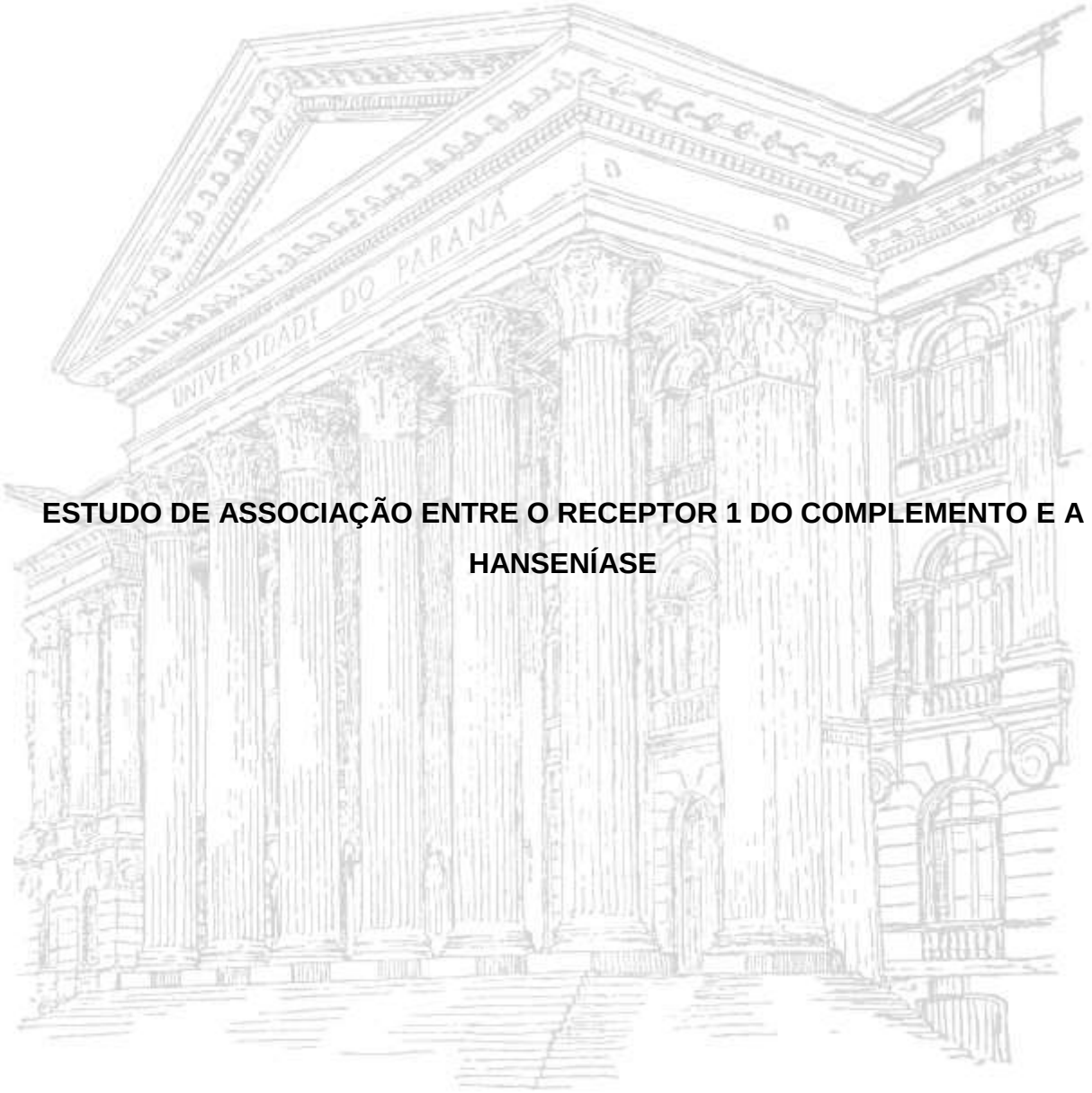
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR

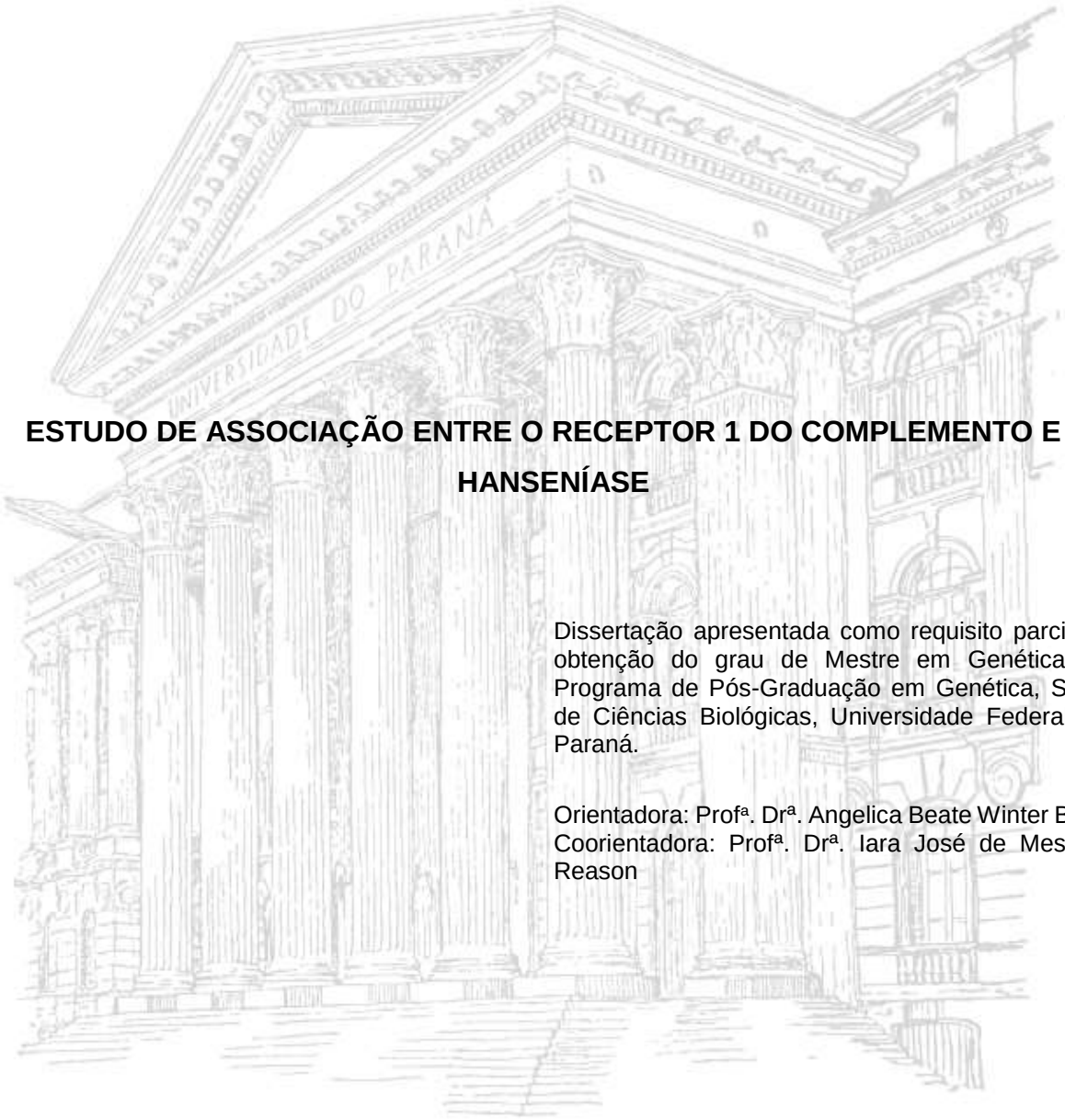


ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O RECEPTOR 1 DO COMPLEMENTO E A HANSENÍASE

CURITIBA

2016

GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O RECEPTOR 1 DO COMPLEMENTO E A HANSENÍASE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª. Drª. Angelica Beate Winter Boldt
Coorientadora: Profª. Drª. Iara José de Messias Reason

CURITIBA

2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR**, 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.
Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 29 de março de 2016

Doutor Marcelo Távora Mira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Membro Titular

Doutora Liana Alves de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - Membro Titular

Doutora Angelica Beate Winter Boldt
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Doutora Ana Claudia Bonatto
Vice-Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
Tel (+41) 33611587 / 33611684 – *Fax* (+41) 33611793 – *e-mail* ppg-gen@ufpr.br

Aos meus amados pais.

Ao meu marido Rafael.

Aos pacientes.

Obrigada

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guiou e iluminou nos momentos difíceis e de dúvidas, me dando força para jamais desistir.

Aos meus amados pais, que me ensinaram o valor e a importância do conhecimento e do caráter, me incentivando a sempre estudar e me aperfeiçoar a fim de contribuir com a sociedade da melhor forma possível.

Ao meu marido Rafael, que sempre me incentivou a perseverar na minha profissão e a não desistir do meu sonho, compreendendo os meus períodos de estresse e ausência, choros e euforias, eu te amo.

A minha querida orientadora Angélica, que me ofereceu uma oportunidade, mesmo quando eu já achava que todas as portas estavam fechadas, que acreditou e confiou no meu potencial, estando sempre ao meu lado me orientando e incentivando, não apenas profissionalmente, mas pessoalmente. Aprendi muito com você. Serei eternamente grata.

A minha co-orientadora Iara, pela idealização desse projeto, assim como por todo apoio e conhecimento compartilhado.

As professoras Maria Luiza, Karin e Dani, por toda ajuda que me deram ao longo do projeto. É uma grande honra poder aprender com vocês.

A todos os amigos e colegas do LGMH: Amanda, Ana, Andressa M. e Andressa V., Carol C., Carol D., Carol M., Débora L. e Débora R., Danillo, Eleonora, Gabi, Iza, Karol, Kathleen, Lari, Li, Lu, Luciana, Maria, Max, Moni, Nicole, Renata, Rodrigo, Sara, Tici, Stephany, Valéria e Vero. A amizade, companherismo e conhecimento de todos vocês foram essenciais durante esse período, fazendo com que me sentisse em casa (honrando o prêmio Moradora LGMH do ano de 2015).

Em especial, agradeço a Luana, que muito mais do que uma parceira *CR1*, foi minha amiga, confidente, psicóloga, motivadora e professora de bancada. A Luciana, brilhante IC, que me ajudou muito com as PCRs. A Sara e Liana, pela incrível paciência em me ensinar a qPCR. A Tici, Danilo, Vero, Li e Gabi, que sempre, com ideias brilhantes, mostravam uma luz no fim do túnel para tudo que estivesse dando errado.

A Sandra, Fabi e Túlio que me ajudaram sempre que foi preciso no HC.

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

Aos meus amigos, em especial Larissa e Rodrigo, a toda a minha família, os amigos do escoteiro (assim como meus lobinhos (as)), e minha professora de flamenco, Carmen, por compreender a minha ausência durante esses dois anos e por me apoiarem sempre que precisei.

Aos pacientes de Hanseníase que tanto sofrem com essa doença e que mesmo assim, se dispuseram a contribuir com esse estudo.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelos patógenos intracelulares obrigatórios *Mycobacterium leprae* e *M. lepromatosis*, os quais invadem macrófagos e células de Schwann. O receptor 1 do complemento (CR1) liga-se a fragmentos C3b/C4b e a lectinas ligante de manoses (MBL) que encontram-se opsonizando a bactéria, facilitando a entrada dessa no fagócito. Nesse trabalho, desenvolvemos PCR multiplex sequência específica (SSP) e haplotipamos nove polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em 213 pacientes e 297 controles: rs6656401 (*1:g.207518704A>G* no intron 4), rs3849266 (*1:g.207579645C>T* no intron 21), rs2274567 (*1:g.207580276A>G* no exon 22, codificando p.His1208Arg), rs3737002 (*1:g.207587428C>T* no exon 26, codificando p.Thr1408Met antígeno sanguíneo York), rs11118131 (*1:g.207587851C>T* no intron 26), rs11118167 (*1:g.207608809T>C* no intron 28), rs17047660 (*1:g.207609511A>G* no exon 29, codificando p.Lys1590Glu antígeno sanguíneo McCoy), rs4844610 (*1:g.207629207A>C* no intron 37) e rs12034383 (*1:g.207630250G>A* no intron 37), medindo os níveis de mRNA e CR1 solúvel em um subgrupo de até 80 amostras. A distribuição alélica dos SNPs em controles correspondiam ao equilíbrio de Hardy Weinberg. Nós identificamos 18 haplotipos, os quais diferem em frequência entre os grupos etnicos (P<0,000001). Afro-brasileiros portadores do haplótipo *4 apresentaram quase quatro vezes mais susceptibilidade à hanseníase (OR= 3,89, p= 0,003), ao contrário dos portadores do haplótipo *1 que apresentam proteção à doença (OR= 0,24, p= 0,011). Euro-brasileiros com o alelo *g.207579645T* do rs3849266 intronico apresentam maior susceptibilidade à hanseníase (OR=1,63, p=0,028), especialmente aqueles com o haplótipo recombinante **3B2B.3A2B.3B1* (OR=2,57, p=0,019). O haplótipo *1, em contraste a Afro-brasileiros, foi associado a formas virchowianas em Euro-brasileiros (OR= 3,25, p=0,015). Esses haplótipos permaneceram associados na amostra total, assim como os haplótipos *2 e **2.3B2B*, que codificam para o antígeno McCoy p.1590E (OR=2,49, p=0,028). Portadores do alelo *g.117682C* do rs11118167 apresentaram uma expressão de mRNA maior que homozigotos T/T (p= 0,036). No entanto, Euro-brasileiros com o alelo *g.207630250A* do rs12034383 apresentaram maior concentração de sCR1 quando comparados a homozigotos G/G (p= 0,0175). Há também uma correlação negativa entre níveis de sCR1 e MBL (r= -0,52; p=0,007). Esses resultados nos levam a sugerir que os polimorfismos de *CR1* modulam a expressão do gene e de níveis de sCR1, assim como a susceptibilidade a hanseníase, mas os efeitos associados dependem da origem étnica.

Palavra-chave: Hanseníase, polimorfismo de *CR1*, mRNA, sCR1

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligate intracellular pathogens *Mycobacterium leprae* and *M. lepromatosis*, which invades macrophages and Schwann cells. Complement receptor 1 (CR1) binds to C3b/C4b fragments and to mannose binding lectin (MBL) deposited on opsonized bacteria, facilitating bacterial entrance into phagocytes. In this work, we developed a multiplex PCR sequence-specific assay and haplotyped nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 213 patients and 297 controls - rs6656401 (*1:g.207518704A>G* in intron 4), rs3849266 (*1:g.207579645C>T* in intron 21), rs2274567 (*1:g.207580276A>G* in exon 22, encoding p.His1208Arg), rs3737002 (*1:g.207587428C>T* in exon 26, encoding p.Thr1408Met of the York blood group), rs11118131 (*1:g.207587851C>T* in intron 26), rs11118167 (*1:g.207608809T>C* in intron 28), rs17047660 (*1:g.207609511A>G* in exon 29, encoding p.Lys1590Glu of the McCoy blood group), rs4844610 (*1:g.207629207A>C* in intron 37) and rs12034383 (*1:g.207630250G>A* in intron 37), measuring mRNA and soluble CR1 levels in a subset of up to 80 samples. Distribution of SNP alleles in controls was in Hardy and Weinberg equilibrium. We identified 18 haplotypes, whose frequencies differed between ethnic groups (P<0.000001). Afro-Brazilians with the **4* haplotype presented almost four times increased susceptibility to leprosy (OR=3.89, p=0.003), but those with the **1* haplotype were protected (OR=0.24, p=0.011). Euro-Brazilians with the intronic rs3849266 *g.207579645T* allele presented higher susceptibility to leprosy (OR=1.63, p=0.028), especially those with the recombinant **3B2B.3A2B.3B1* haplotype (OR=2.57, p=0.019). The **1* haplotype, in contrast to Afro-Brazilians, was associated with the lepromatous form in Euro-Brazilians (OR=3.25, p=0.015). These haplotypes remained associated in the total sample, as well as **2* and **2.3B2B,* encoding the McCoy p.1590E antigen (OR=2.49, p=0.028). Carriers of the rs11118167 *g.117682C* allele presented higher mRNA expression, than *T/T* homozygotes (p=0.036). Yet Euro-Brazilians with the rs12034383 *g.207630250A* allele presented higher sCR1 concentration, compared with *G/G* homozygotes (p=0.0175). There was also a negative correlation between sCR1 and MBL levels (r= -0.52; p=0.007). The results lead us to suggest that CR1 polymorphisms modulate gene expression and sCR1 levels, as well as susceptibility to leprosy, but the associated effects depend on ethnic origin.

Keywords: Leprosy, *CR1* polymorphism, mRNA, sCR1.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE. 20
FIGURA 2 - DISSEMINAÇÃO DA HANSENÍASE PELO MUNDO AO LONGO DOS ANOS COM BASE NA ANÁLISE DE CEPAS DE *M. leprae*. 24
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE REPORTADOS EM 103 PAÍSES PELA WHO EM 2013. 25
FIGURA 4 - PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO MUNDO. 26
FIGURA 5 - COEFICIENTE GERAL DE DETECÇÃO DE HANSENIASE POR 100 MIL HABITANTES EM 2012. A – NOS ESTADOS. B- NO BRASIL. ...26
FIGURA 6 - COEFICIENTE DE DETECÇÃO DE HANSENÍASE POR 100 MIL HABITANTES, SEGUNDO REGIÕES GEOGRÁFICAS. BRASIL, 2003 – 2012. 27
FIGURA 7 - RELAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DA RESPOSTA IMUNE E OS ESPECTROS CLÍNICOS, SURTOS REACIONAIS E DANOS TECIDUAIS NA HANSENÍASE 29
FIGURA 8 - INTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES JÁ CONHECIDAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO *M. leprae* 33
FIGURA 9 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO E FORMAÇAO DO MAC. 38
FIGURA 10 - RECEPTORES DE COMPLEMENTO, RESPECTIVOS FRAGMENTOS C3 LIGANTES E EXPRESSÃO EM CÉLULAS. 41
FIGURA 11 - TRANSCRITOS DO GENE *CR1*. 44
FIGURA 12 - ARQUITETURA GENÔMICA DO LOCUS DE *CR1* EM RELAÇÃO ÀS PRINCIPAIS ISOFORMAS. 46
FIGURA 13 - ESTRUTURA DA VARIANTE MAIS COMUM DE CR1. 49
FIGURA 14 - REGULAÇÃO DA CASCATA DO COMPLEMENTO E DE COMPLEXOS IMUNES PELO RECEPTOR 1 DO COMPLEMENTO (CR1).....51
FIGURA 15 - QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *CR1* EM DIFERENTES TECIDOS.....52
FIGURA 16 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS COMUNS DO GENE *CR1.* 110

FIGURA 17 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE *CR1* INVESTIGADOS. 111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIAGNÓSTICO RECOMENDADO PARA CASOS DE HANSENÍASE..21
TABELA 2 - TRANSCRITOS DO GENE *CR1.* 43
TABELA 3 - ANTÍGENOS DO GRUPO SANGUÍNEO KNOPS.....47
TABELA 4 - VARIANTES DE *CR1* ANALISADAS NESSE ESTUDO PREVIAMENTE ASSOCIADAS A DOENÇAS. 55
TABELA 5 - SNPS DE *CR1,* SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO. 103
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPS DE *CR1* ANALISADOS NESSE ESTUDO. 104
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS DE *CR1,* EM PACIENTES E CONTROLES. 107
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS DE *CR1,* EM PACIENTES ENTRE OS SUBTIPOS CLÍNICOS. 108
TABELA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA DO GENE *CR1* EM PACIENTES DE HANSENÍASE E CONTROLES.....109
TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DE sCR1 EM PACIENTES DE HANSENÍASE E CONTROLES. 109

LISTA DE ABREVIAÇÕES

BCG	Bacillus Calmette-Guérin (Vacina contra a Tuberculose)
BCHE	*Butyrylcholinesterase (B*utirilcolinesterase)
CD	*Cluster of Differentiation (Agrupamento de Diferenciação)*
CCP	*Complement Control Protein (Repetições de Proteínas Controladoras do Complemento)*
CFZ	*Clofazimina*
CNV	*Copy Number Variation (*Variação de Número de Cópias)
CR1	*Complement Receptor 1 (Receptor 1 do Complemento)*
CTCF	*CCCTC-binding factor (Fator de Ligação CCCTC)*
DNA	*Desoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)*
DD	*Bordeline bordeline (Dimorfo dimorfo)*
DDS	*Dapsona*
dNTP	*Desoxyribonucleotide triphosphate (Desoxinucleotídeo Trifosfatado)*
DT	*Bordeline tuberculoid (dimorfo tuberculoide)*
DV	*Bordeline lepromatous (dimorfo virchowiano)*
ECR1	*Erythrocyte Complement Receptor 1 (Receptor 1 do Complemento Associado a Eritrócitos)*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoadsorção Enzimática)*
ENH	*Erythema Nodosum Leprosum (Eritema Nodoso hansênico)*
FCN	*Ficolin (Ficolina)*
fH	*Factor H* (*Fator H)*
GUSB	*Beta-glucuronidase*
GWAS	*Genome-Wide Association Study (Estudo de Associação Ampla do Genoma)*
HLA	*Human Leukocyte antigen (Antígenos Leucocitários Humanos)*
HW	*Hardy Weinberg*
IC	*Confidence Interval (Intervalo de Confiança)*
IFN-γ	*Interferon gama*
Ig	*Immunoglobuline (Imunoglobulinas)*
IL	*Interleukin (Interleucinas)*
LCR	*Low-Copy Repeat (Repetições de Baixo Número de Cópias)*
LHR	*Long Homologous Repeats* (*Longas Repetições Homólogas)*
LPS	*Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)*
LRRK2	*Leucine-rich repeat kinase 2* (*Quinase 2 com Repetições Ricas em Leucina)*
LTA	*Lymphotoxin-α (Linfotoxina-α)*
MAC	Membrane Attack Complex *(Complexo de Ataque a Membrana)*
MASP	*Mannose Biding Lectin Associated Serina Protease (Serina Protease Associada à MBL)*
MB	*Multibacilar*
MBL	*Mannose Biding Lectin (Lectina Ligante de Manose)*
MHC	*Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal De Histocompatibilidade)*
M. leprae	*Mycobacterium leprae*
mRNA	*Messenger ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico Mensageiro)*
MRC	*Mannose R*eceptor *type C* (*Receptor de Manose do tipo C)*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*

NMD	*Nonsense-mediated mRNA decay (Decaimento Mediado por Códon Nonsense)*
NOD2	*Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2* (*Domínio 2 de Oligomerização de Nucleotídeos)*
OR	*Odds Ratio (Razão de Chance)*
PACRG	*PARK2 Co-Regulated (Co-regulador de PARK2)*
PARK2	*Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase (Parquina 2 RBR E3 Ubiquitina-Proteína Ligase)*
PAMPs	*Pathogen-associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)*
PCR	*Polymerase Chain Reaction (Reação de Cadeia Polimerase)*
PCR SSP	*Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores Sequência Específicos)*
PB	Paucibacilar
PQT	*Polychemotherapy (Poliquimioterapia)*
RCA	*Regulators of Complement Activation (Reguladores de Ativação do Complemento)*
RMP	*Rifampicina*
RNA	*Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)*
RNI	*Reactive Nitrogen Intermediates (Reativos Intermediários de Nitrogênio)*
ROI	*Reactive Oxygen Intermediates* (Reativos Intermediários de Oxigênio)
RPKM	*Reads per kilobase per million mapped reads*
SCR	*Short Consensus Repeats (Curtas Repetições Consenso)*
sCR1	*Soluble Complement Receptor 1 (Receptor 1 do Complemento solúvel)*
SLC11A1	*Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1 (Membro 1 da Família 11 do Transportador de Soluto)*
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)*
TCR	*T-Cell Receptor (Receptores de Célula T)*
TDI	*Tuberculoid + borderlines (bacilloscopy negative) + undetermined (Tuberculóides + dimorfos com baciloscopia negativa + indeterminados)*
TGF	*Tumor Growth fator (Fator de Crescimento Tumoral)*
Th1	*T helper Cell 1 (Células T auxiliares tipo 1)*
Th2	*T helper Cell 2 (Células T auxiliares tipo 2)*
TNF	*Tumor necrosis fator (Fator de Necrose Tumoral)*
TT	*Tuberculoid (Tipo tuberculoide)*
UTR	*Untranslated Region (Região não Traduzida)*
VSIG4	*V-Set and Immunoglobulin Domains-Containing Protein 4 (Proteína 4 contendo o conjunto V e domínios de imunoglobulina)*
VV	*Lepromatous (Tipo virchowiano)*
VD	*Lepromatous + Borderlines (bacilloscopy positive) (Virchowianos + dimorfos com baciloscopia positiva)*
VDR	*Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor (*receptor de vitamina D)
WHO	*World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

2.1 HANSENÍASE 19

2.1.1 A doença e seus aspectos clínicos 19

2.1.2 Agente etiológico: Mycobacterium leprae e Mycobacterium lepromatosis 21

2.1.3 Epidemiologia 23

2.1.4 Imunopatologia 27

2.1.5 Fatores Genéticos 30

2.1.6 Profilaxia 34

2.1.7 Diagnóstico 34

2.1.8 Tratamento 35

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO 36

2.2.1 Sistema Complemento e a Hanseníase 38

2.3 FAMÍLIA DOS RECEPTORES DE COMPLEMENTO E SUAS PROTEÍNAS REGULADORAS 40

2.4 GENE *CR1* 42

2.4.1 Estrutura e regulação 42

2.4.2 Polimorfismo gênico 45

2.5 MOLÉCULA CR1 48

2.5.1 Estrutura 48

2.5.2 Função e expressão 49

2.5.3 Associação entre CR1 e doenças 53

3 HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA 56

4 OBJETIVOS 57

4.1 OBJETIVO GERAL 57

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 57

5 ARTIGO 58

6 DISCUSSÃO FINAL 86

7 CONCLUSÕES 90

REFERÊNCIAS.....91

APÊNDICE.....103

ANEXOS 112

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (BEIGUELMAN, 2002; ARAÚJO, 2003) e/ou pelo *Mycobacterium lepromatosis* (HAN *et al*, 2008), que afeta primariamente a pele e o sistema nervoso periférico (PREVEDELLO e MIRA, 2007), podendo posteriormente atingir outros órgãos e sistemas (SOUZA, 1997). O contágio pode ocorrer através das vias aéreas superiores e pela pele erodida de pacientes multibacilares (ARAÚJO, 2003), embora existam suspeitas de outras formas de contágio. A interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro é complexa e multifatorial. Isso resulta em um amplo espectro clínico que varia de acordo com o tipo de resposta imune que o hospedeiro apresente, podendo ser de resistência ou de suscetibilidade (GOULART, PENNA e CUNHA, 2002). Com dois polos antagônicos e formas intermediárias, os pacientes podem apresentar desde formas paucibacilares a multibacilares da doença, dependendo da qualidade da sua resposta imunológica (ARAÚJO, 2003).

O sistema complemento é um componente termo sensível do plasma, constituído de uma complexa rede de mais de 35 proteínas séricas e de membrana, com a capacidade de complementar as propriedades antibacterianas dos anticorpos, interagindo de forma altamente regulada, reproduzindo uma eficiente resposta imunológica inflamatória e citolítica (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001; UTIYAMA *et al.*, 2004; DUNKELBERGER e SONG, 2010; BOLDT, GOELDNER e MESSIAS-REASON, 2012). Determinados microorganismos, como o *M. leprae*, desenvolveram formas de bloquear o sistema complemento (SCHOREY, CARROLL e BROWN, 1997; ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001). A entrada desta micobactéria no macrófago, o qual se torna sua célula hospedeira, é mediada por receptores do complemento como o CR1 (receptor 1 do complemento, também conhecido como CD35). Este liga-se aos fragmentos do C3b/C4b, depositados na bactéria opsonizada (LIU e NIU, 2009; SCHLESINGER e HORWITZ, 1990), levando alguns autores a considerar que mutações no gene *CR1* podem alterar a susceptibilidade ao desenvolvimento da hanseníase (FITNESS *et al*, 2004). O CR1 também é capaz de reconhecer a lectina ligante de manose (MBL), a qual atua como opsonina e como molécula ativadora da via das lectinas do complemento (GHIRAN *et al*., 2000; BOLDT, GOELDNER e MESSIAS-REASON, 2012). Polimorfismos nos genes que codificam proteínas desta via, como a MBL, ficolinas e a serina protease

MASP2, também modulam a suscetibilidade e gravidade da hanseníase (MESSIAS-REASON *et al.*, 2007; SOUZA e PEREIRA, 2007; MESSIAS-REASON, KREMSNER e KUN, 2009; SAPKOTA *et al*., 2010; BOLDT *et al*., 2013a; BOLDT *et al*., 2013b).

O gene *CR1* codifica uma glicoproteína polimórfica multifuncional, de cadeia simples ligada à membrana, pertencente à família de proteínas reguladoras de ativação do complemento (RCA). CR1 é expresso principalmente em eritrócitos, fagócitos e células B. É um receptor para C3b e C4b, regulando a cascata de ativação do sistema complemento e removendo complexos imunes opsonizados, da circulação sanguínea. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *CR1* têm sido relacionados a várias doenças, inclusive as infeciosas, como malária (KARIUKI *et al.*, 2013) e hanseníase (FITNESS *et al.*, 2004), autoimunes como lupus eritematoso e artrite reumatoide (ARORA *et al.*, 2004; PICCOLI *et al.*, 2011; KREMLITZKA *et al.*, 2012) e neurodegenerativas como o Alzheimer (LAMBERT *et al.*, 2009).

Partindo do apresentado, tem-se como objetivo, verificar se existe associação de determinados polimorfismos do gene *CR1*, bem como de níveis de expressão de mRNA e níveis séricos da proteína sCR1, com a suscetibilidade ao desenvolvimento da hanseníase, através de um estudo transversal, caso-controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HANSENÍASE

2.1.1 A doença e seus aspectos clínicos

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo álcool-ácido resistente e Gram-positivo *Mycobacterium leprae* (BEIGUELMAN, 2002; ARAÚJO, 2003) e/ou pelo *Mycobacterium lepromatosis*, recentemente descoberto (HAN *et al*, 2008). Inicialmente, a doença afeta a pele e o sistema nervoso periférico (PREVEDELLO e MIRA, 2007), sendo que posteriormente, poderá atingir outros órgãos e sistemas (SOUZA, 1997).

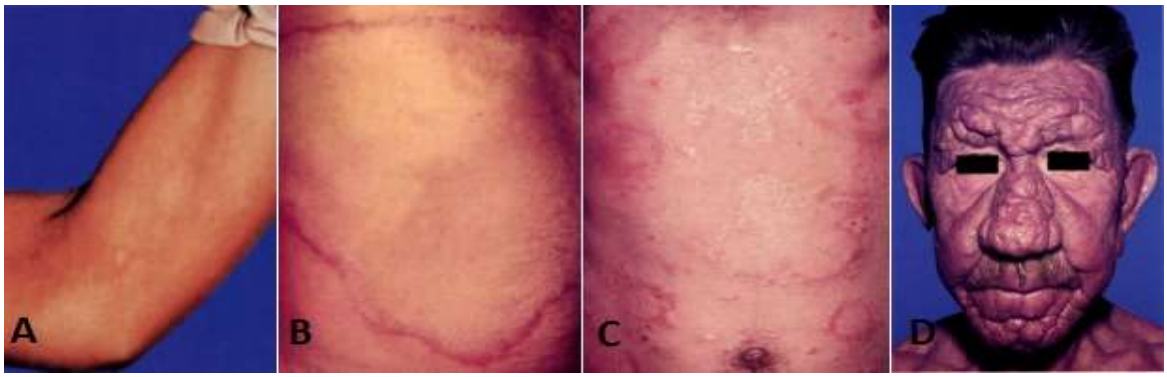
Considera-se que a principal via de contágio ocorra pelas vias aéreas superiores e pela pele erodida de pacientes multibacilares (ARAÚJO, 2003). Há autores que sugerem que a exposição a tatus possa ser considerado um fator de risco ao desenvolvimento da hanseníase, visto que tais animais podem ser reservatórios do bacilo (DEPS *et al.*, 2008). Por meio de estudos realizados por Ravindra *et al.* (2012), observou-se a presença de *M. leprae* em amostras de solo, indicando que este elemento do ambiente também pode influenciar no contágio.

A hanseníase é considerada uma doença espectral (PREVEDELLO e MIRA, 2007). A classificação de Ridley e Jopling (1966) é baseada na forma de resposta imunológica do hospedeiro. Existem dois polos opostos, estáveis, de manifestação da doença: o tipo tuberculoide (TT) considerado de resistência, pois há resposta imune celular à bactéria, na qual os macrófagos conseguem destruir os bacilos de Hansen, fazendo com que as manifestações ocorram de forma mais localizada; e o tipo virchowiano (VV) (também conhecido como lepromatoso) considerado o polo susceptível onde a maior parte da resposta imune é do tipo humoral, pois os macrófagos desses pacientes não conseguem destruir os bacilos em seu interior, o que permite que a doença ocorra de forma sistêmica (BEIGUELMAN, 2002). Entre os polos opostos ocorrem as formas intermediárias dimorfa-tuberculoide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV), (essa terminologia está em consonância com o sugerido por Opromolla e Martelli (2005), que considera a tradução da nomenclatura de Ridley e Jopling do inglês para o português). Esses grupos intermediários representam formas instáveis da doença (FIGURA 1) (PREVEDELLO e MIRA, 2007; CARDOSO *et al.,* 2011$_a$). Há ainda a forma indeterminada, na qual os

pacientes manifestam os sintomas iniciais da hanseníase e podem evoluir para qualquer uma das categorias anteriormente apresentadas (BEIGUELMAN, 2002).

Em 1970, o Professor Abrão Rotberg propôs a mudança da terminologia “lepra” para “hanseníase”, visando diminuir o estigma causado pela doença aos pacientes. Essa proposta foi corroborada pelo secretário de Saúde do Estado de São Paulo, pelo Prof. Dr. Valter Leser e pelo comitê técnico desse órgão, publicando uma resolução que determinou a criação de um novo vocabulário para classificar essa doença, em dezembro de 1970. Assim, a doença passou a ser denominada hanseníase. No mesmo sentido, sugere-se que o termo lepromatoso não seja mais utilizado, o que levou à substituição do termo lepromatoso por virchowiano, em consonância com a Lei 9.010 de 29 de março de 1995 (OPROMOLLA e MARTELLI, 2005).

FIGURA 1 - ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE.



LEGENDA: A - forma indeterminada; B- forma tuberculoide; C- forma dimorfa; D- forma virchowiana.
FONTE: Adaptado de OPROMOLLA e URA, 2002.

A Organização Mundial da Saúde criou uma classificação operacional, visando facilitar o tratamento por poliquimioterapia. Nesta, até cinco lesões na pele, sem o bacilo, são diagnósticas de hanseníase paucibacilar (PB). Por outro lado, pacientes com mais de cinco lesões, apresentando bacilos, são considerados multibacilares (MB) (TABELA 1).

TABELA 1 - DIAGNÓSTICO RECOMENDADO PARA CASOS DE HANSENÍASE.

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

FONTE: Portal da Saúde (2014).

Alguns pacientes podem apresentar surtos reacionais - episódios inflamatórios que se intercalam no curso crônico da hanseníase. As reações podem ser do tipo 1 (reversa), que tendem a surgir mais precocemente no tratamento, ou do tipo 2 (Eritema Nodoso da Hanseníase - ENH), que ocorrem nas formas virchowianas e dimorfas, normalmente após seis meses de tratamento. Estes surtos geralmente possuem um fator desencadeante, como infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, medicamentos iodados e estresse físico e/ou emocional (ARAÚJO, 2003).

2.1.2 Agente etiológico: *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*

O *Mycobacterium leprae* foi descrito primeiramente pelo norueguês Amauer Hansen, em 1873, sendo um bacilo álcool – ácido resistente, parasita intracelular obrigatório com tropismo por células de Schwann e pele, possuindo um alto poder infectante e baixo poder patogênico (ARAÚJO, 2003). O genoma de *M. leprae* apresenta uma extensa redução evolutiva, na qual genes funcionais encontrados em outras micobactérias foram silenciados ou transformados em pseudogenes. Este fato pode estar relacionado com as características únicas apresentadas por esse bacilo, tais como a incapacidade de ser cultivado em meio artificial, o longo tempo de duplicação e altíssima especificidade pelos seus alvos celulares (MONOT *et al*., 2005; PREVEDELLO e MIRA, 2007; EICHELMANN *et al.*, 2013).

Em 2008, foi descoberta uma nova micobactéria chamada *Mycobacterium lepromatosis*, a qual foi relacionada com casos endêmicos de hanseníase lepromatosa difusa (DLL) no México e Caribe (HAN *et al.*, 2008). Em estudo mais recente (HAN *et al*, 2014), *M. lepromatosis* foi encontrado em amostras de pacientes brasileiros (Curitiba-PR e região), onde inclusive ocorreram casos de infecção simultânea por *M. leprae* e *M. lepromatosis*. A DLL é um tipo clínico de hanseníase agressiva e possui características únicas como: ser difusa, presença de infiltração cutânea não nodular, invasão da bactéria no endotélio junto com proliferação endotelial, oclusão vascular e/ou vasculite na derme ou subcutânea, há grandes lesões na pele que ocorrem de forma recorrente e bem demarcadas (fenômeno Lucio) que em fase avançada pode tornar-se ulcerada, particularmente sobre as extremidades inferiores, e até mesmo generalizada, levando à uma infecção secundária e fatal (HAN *et al*, 2008).

Embora o *M. lepromatosis* tenha sido encontrado sempre associado ao tipo clínico DLL no México, pacientes brasileiros que apresentavam essa bactéria eram classificados como tuberculoides, o oposto dos pacientes do México. Os autores sugerem que possivelmente isso resulta de uma diferença entre etnias, visto que as amostras brasileiras eram provenientes do sul, o qual foi colonizado em grande parte por europeus, já a maior parte dos pacientes do México apresenta ascendência ameríndia, além da espanhola (HAN *et al*, 2014).

Em relação ao mecanismo utilizado pelas micobactérias para invasão e permanência na célula do hospedeiro, Schlesinger e Horwitz (1990) e Schlesinger *et al.*(1990) comentam que tanto *M.* tuberculosis quanto M*. leprae* utilizam do sistema complemento para invadir as células. Foi observado que o componente C3 (fixado na superfície bacteriana através do processo de opsonização) é ligado aos receptores do complemento (CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos), os quais medeiam a fagocitose. Além disso, os autores verificaram que a ligação de C3 ocorre especificamente na molécula glicolípidio fenólico-1 (PGL-1), que encontra-se presente em grande quantidade na superfície do bacilo (SCHLESINGER e HORWITZ,1991). Nas células de Schwann, *M. leprae* pode utilizar de receptores como o α-distroglicana para invadir a célula (RAMBUKKANA *et al*.,1998).

Embora os mecanismos de sobrevivência do *M. leprae* no fagócito ainda não estejam completamente elucidados, vários estudos realizados nos últimos anos apresentam algumas respostas para essa questão. Singh *et al.,* (2013), demonstraram

que *M. leprae* pode induzir a expressão diferencial de 13 microRNAs em células do sistema imune do hospedeiro, de acordo com o tipo de lesão que este apresente (virchowiana ou tuberculoide). O microRNA *miR-21*, por exemplo, foi encontrado sendo super expresso em monócitos infectados, inibindo a expressão de genes que codificam dois peptídeos antimicrobianos dependentes de vitamina D, CAMP e DEFB4A. Caso seja possível impedir a produção de *miR-21*, a expressão de CAMP e DEFB4A regularizar-se-á, restaurando a atividade antimicrobiana contra *M. leprae*.

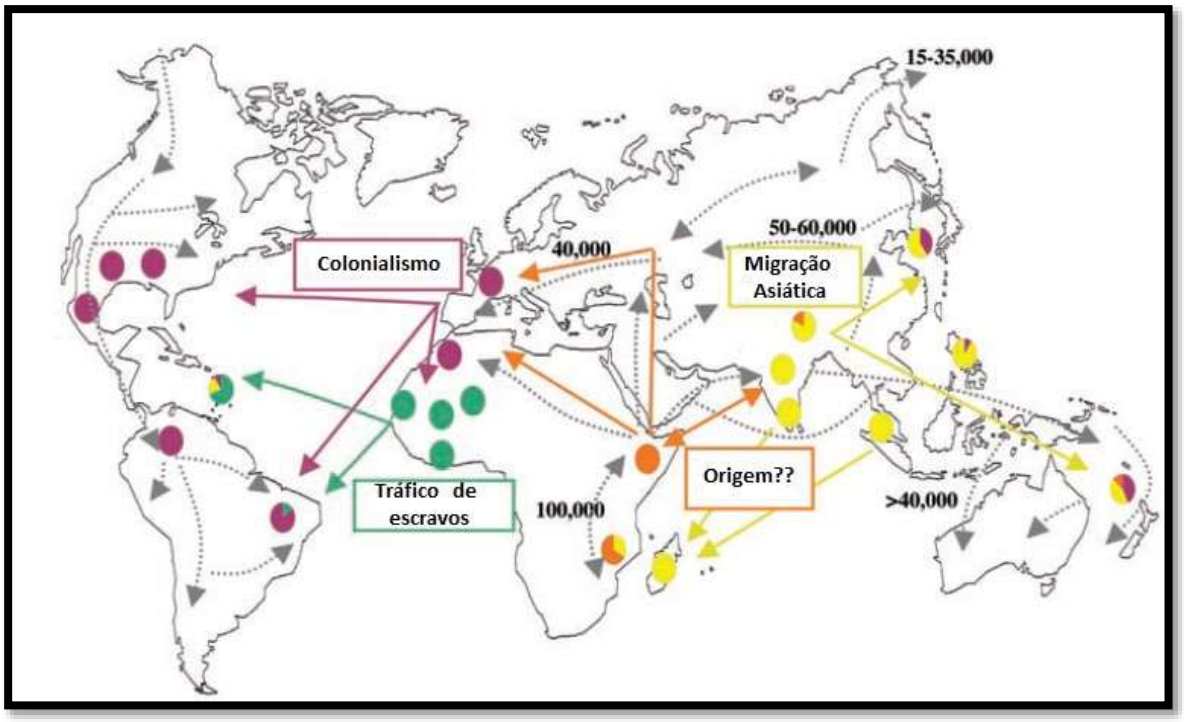
Silva (2009) propõe que a micobactéria modula os mecanismos microbicidas dos macrófagos, através da indução da expressão de fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), que é um hormônio anti-apoptótico e com atividade de proliferação, dessa forma sobrevivendo e replicando dentro da célula. Há relatos para *Leshimania amazonensis* que IGF-I também é capaz de inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e, consequentemente, a produção de óxido nítrico em macrófagos.

2.1.3 Epidemiologia

A hanseníase vem sendo relatada por milênios em várias culturas antigas (HAN e SILVA, 2014). Através da análise genômica comparativa de *M. leprae*, foi sugerida a origem da hanseníase como sendo na África Oriental ou próximo ao Oriente. Através de sucessivas migrações, esta doença espalhou-se pelo mundo, tendo sido introduzida na América do Sul há 500 anos, por europeus e africanos (FIGURA 2) (MONOT *et al*., 2005; PREVEDELLO e MIRA, 2007). Com a descoberta da *M. lepromatosis* em 2008, novos estudos buscam elucidar a origem da hanseníase e a relação filogenética entre as duas micobactérias. Através da comparação entre sequências gênomicas, observou-se que, aparentemente, *M. leprae* é a espécie mais recente (HAN *et al,* 2009; SINGH *et al*, 2015). Segundo Han e Silva (2014), é possível que o parasitismo em seres humanos pelo bacilo de hansen (ou seja, ambas as espécies e seu último ancestral comum) ocorra a mais de 100.000 anos, durante o qual ele foi submetido a uma longa evolução adaptativa redutiva, para chegar ao presente com um genoma mais enxuto e um parasitismo mais eficiente. Isso torna a hanseníase a doença humana-infecciosa mais antiga que se tem conhecimento.

Ambos os bacilos se espalharam pelo globo ao longo dos anos, através das migrações. Han *et al.* (2014) propõem que *M. lepromatosis* chegou ao México com os primeiros colonos vindos da Ásia há 13.000 anos, visto que o fato de encontrarem essa bactéria em populações asiáticas atuais, como de Cingapura e Myanmar, reforça essa ideia. A presença de *M. lepromatosis* na população brasileira se deve ao fato de terem ocorrido migrações da população da América do Norte e Central para a América do Sul.

FIGURA 2 - DISSEMINAÇÃO DA HANSENÍASE PELO MUNDO AO LONGO DOS ANOS COM BASE NA ANÁLISE DE CEPAS DE *M. leprae*.

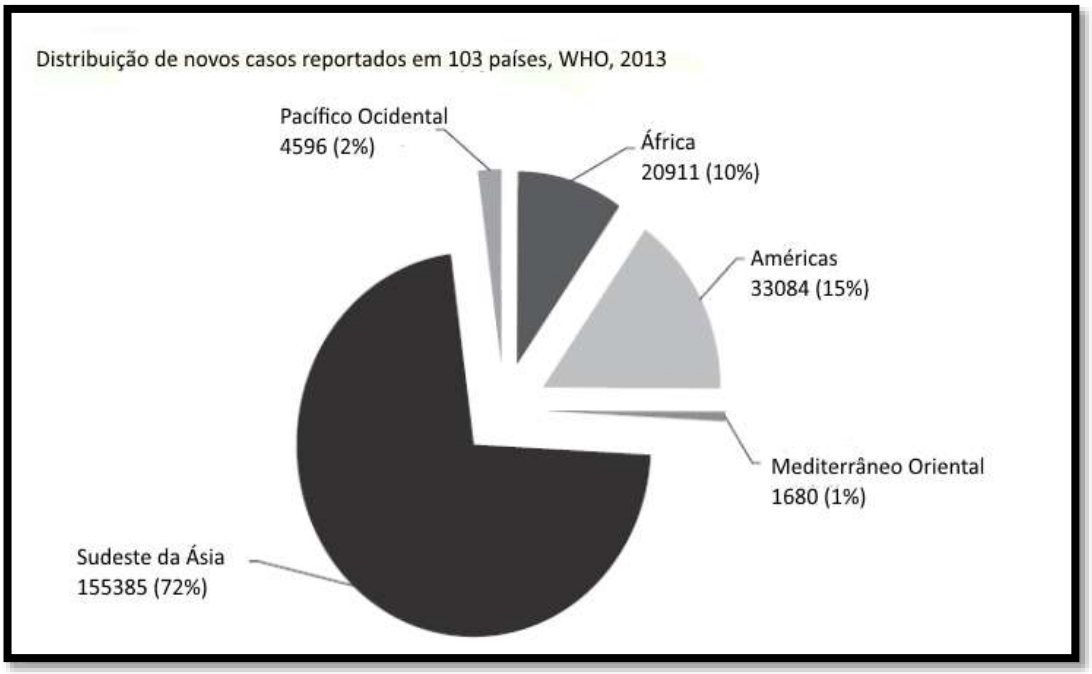


LEGENDA: amarelo: SNP tipo 1; laranja: SNP tipo 2; roxo: SNP tipo 3; verde: SNP tipo 4; flechas cinzas correspondem a rotas de migrações, segundo estudos arqueológicos, genéticos e antropológicos, estimando o tempo da migração em anos. NOTA: com origem na África Oriental ou próximo ao Oriente, a doença se disseminou através das migrações humanas pelo mundo, chegando a América do Sul há 500 anos. Fonte: Adaptado de MONOT *et al*., 2005.

Após a implementação da poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial da Saúde (WHO), mais de 14 milhões de pessoas foram curadas da hanseníase nos últimos 20 anos. Embora esse seja um resultado excelente, cerca de 250.000 novos casos aparecem por ano (FIGURA 3), o que demonstra que a cadeia de transmissão ainda não foi quebrada (SINGH e COLE, 2011). Os países mais afetados pela hanseníase são: India, Brasil, Indonésia, Bangladesh, República Democrática do Congo, Etiópia, Nepal e Nigéria (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014) (FIGURA 4).

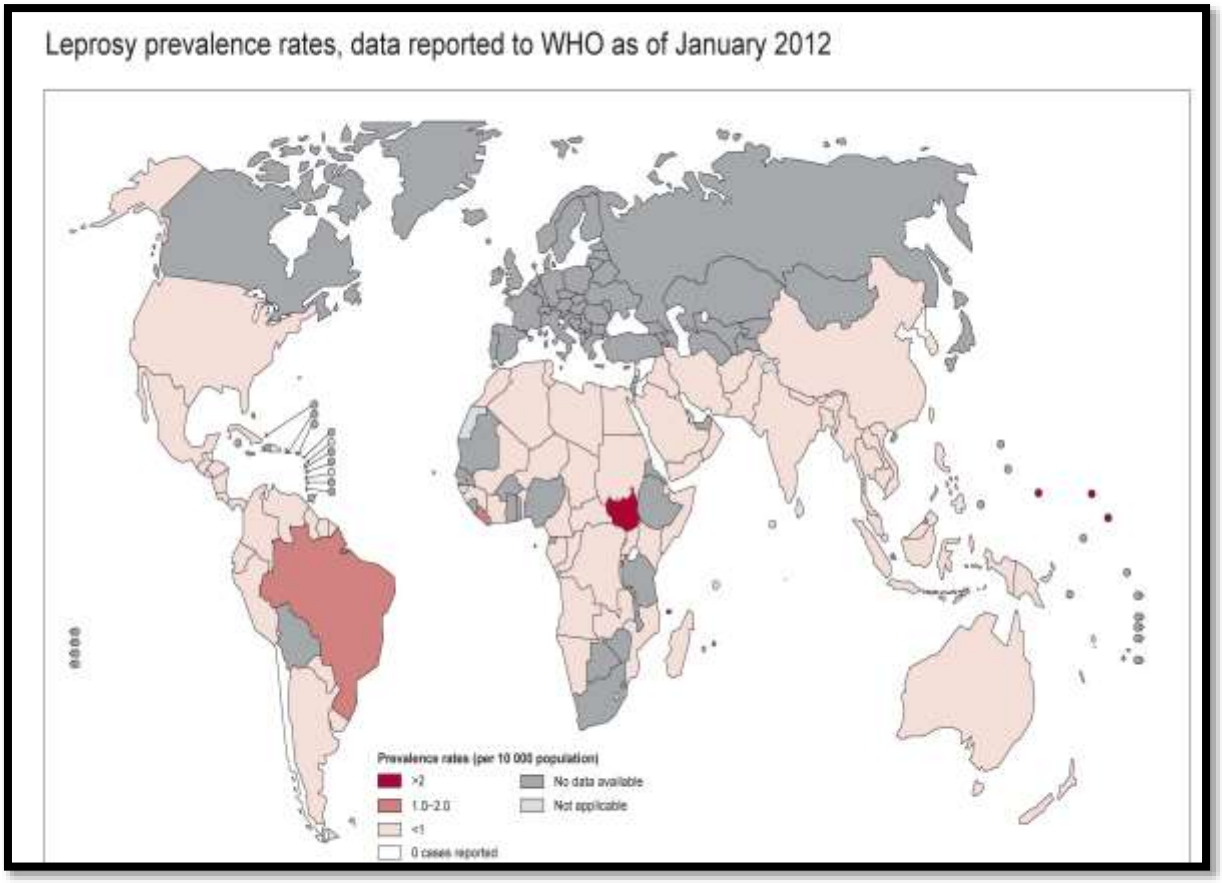
No Brasil, a hanseníase é considerada um problema de Saúde Pública, inclusive com áreas consideradas endêmicas (FIGURA 5). Infelizmente, a redução da prevalência da doença não é acompanhada pela diminuição de novos casos (FIGURA 6). Em 2014, segundo dados preliminares do Ministério da Saúde do Brasil, há uma incidência da doença de 12,14 por 100 mil habitantes. Embora ocorra uma tendência da hanseníase se estabilizar no país, esta ainda apresenta índices muito altos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, onde a maior prevalência foi observada no Mato Grosso (9,03 casos/10.000 hab), enquanto que a menor foi observada no Estado do Rio Grande do Sul (0,13 casos/10.000 hab).

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE REPORTADOS EM 103 PAÍSES PELA WHO EM 2013.



FONTE: Adaptado de World Health Organization (WHO, 2014).

FIGURA 4 - PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO MUNDO.



FONTE: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2012)

FIGURA 5 - COEFICIENTE GERAL DE DETECÇÃO DE HANSENIASE POR 100 MIL HABITANTES EM 2012. A – NOS ESTADOS. B- NO BRASIL.

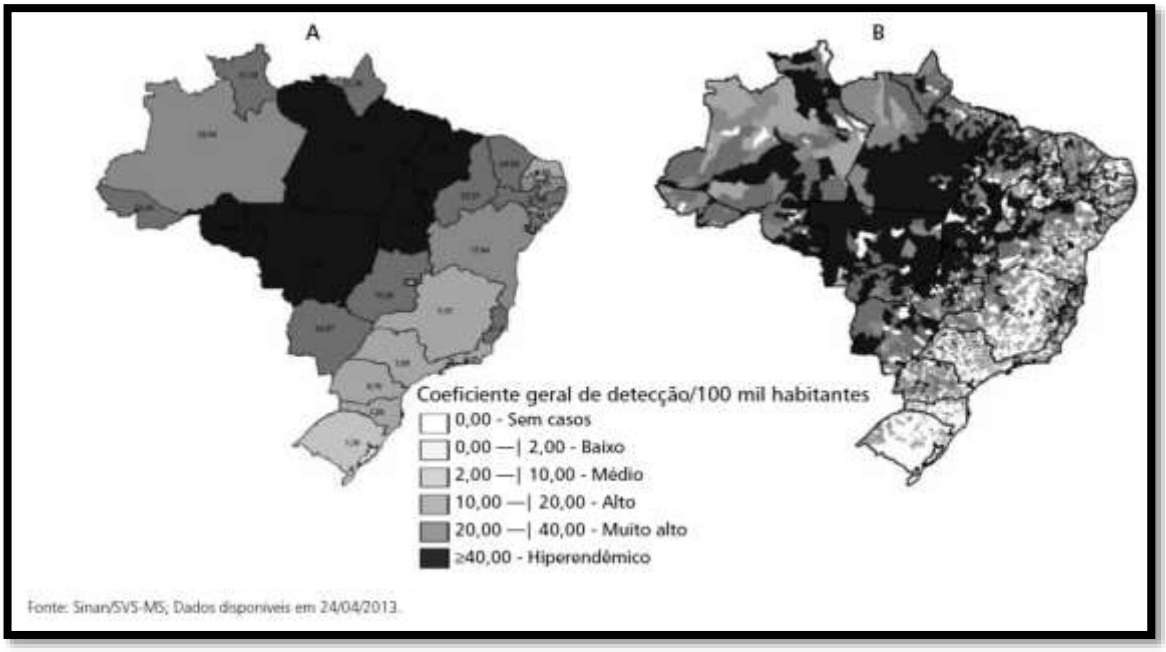
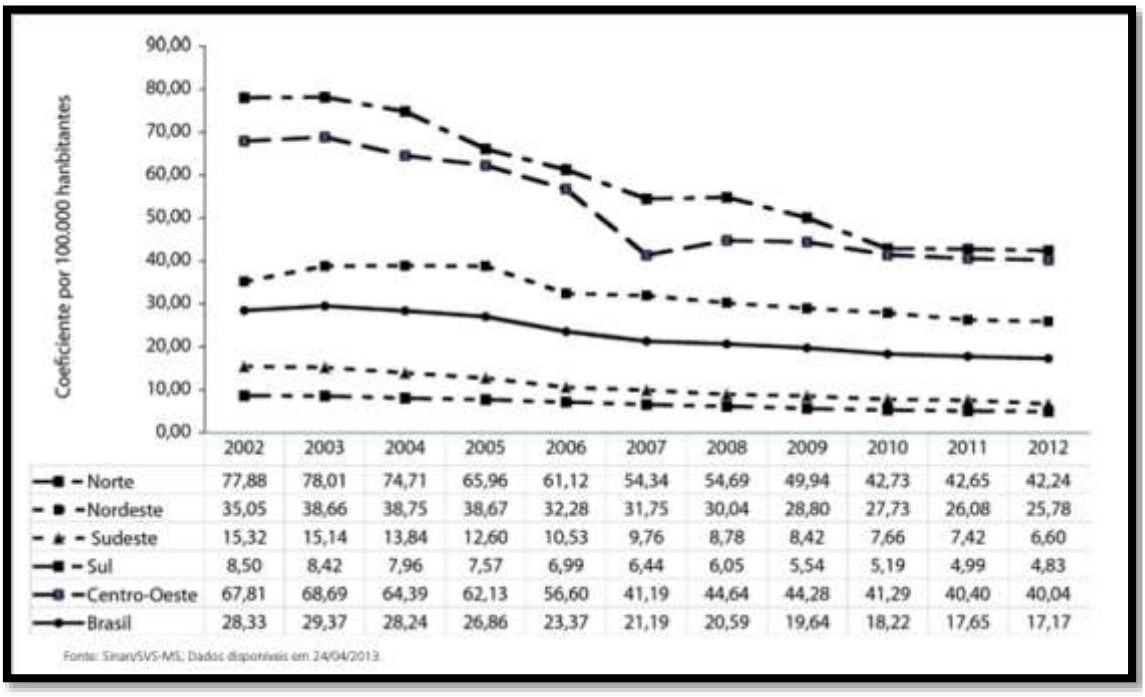


FIGURA 6 - COEFICIENTE DE DETECÇÃO DE HANSENÍASE POR 100 MIL HABITANTES, SEGUNDO REGIÕES GEOGRÁFICAS. BRASIL, 2003 – 2012.



	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Norte	77,88	78,01	74,71	65,96	61,12	54,34	54,69	49,94	42,73	42,65	42,24
Nordeste	35,05	38,66	38,75	38,67	32,28	31,75	30,04	28,80	27,73	26,08	25,78
Sudeste	15,32	15,14	13,84	12,60	10,53	9,76	8,78	8,42	7,66	7,42	6,60
Sul	8,50	8,42	7,96	7,57	6,99	6,44	6,05	5,54	5,19	4,99	4,83
Centro-Oeste	67,81	68,69	64,39	62,13	56,60	41,19	44,64	44,28	41,29	40,40	40,04
Brasil	28,33	29,37	28,24	26,86	23,37	21,19	20,59	19,64	18,22	17,65	17,17

Fonte: Sinan/SVS-MS. Dados disponíveis em 24/04/2013.

Embora a hanseníase seja mais comum em adultos, ela pode acometer todas as faixas de idade. Em relação à distribuição da doença por sexo, homens tendem a apresentar um risco duas vezes maior (IC95%=1,2-4,1) de desenvolver hanseníase, em relação às mulheres (BAKKER *et al*, 2006), porém, isto não é uma regra para todas as populações.

Existe uma associação de fatores naturais e sociais com a distribuição espacial da hanseníase, tais como determinados ecossistemas, condições desfavoráveis de vida e migração (MAGALHÃES e ROJAS, 2007). Segundo Irgens *et al.* (2002), várias das principais áreas consideradas endêmicas no mundo estão sob clima tropical, temperaturas elevadas e altas precipitações pluviométricas.

2.1.4 Imunopatologia

A interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro é complexa e multifatorial. Isto resulta em um amplo espectro clínico, que varia de acordo com o tipo de resposta imunológica que o hospedeiro apresenta (GOULART, PENNA e CUNHA, 2002).

Sabe-se que o polo de resistência à doença (tuberculoide), apresenta uma intensa resposta celular ao patógeno, na qual os macrófagos são capazes de fagocitar

e destruir os bacilos. Nas lesões tuberculoides, prevalecem células T auxiliares do tipo 1 (Th1) que estimulam a produção da interleucina 2 (IL-2) (responsável por estimular o crescimento de células T CD4+) e do interferon gama (IFN-γ, responsável por ativar macrófagos, causando a produção de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, estimular a diferenciação de linfócitos T CD4+ em linfócitos Th1 e inibir a produção de linfócitos Th2) (GOULART, PENNA e CUNHA, 2002; ARAÚJO, 2003; ABBAS *et al*., 2007; MISCH *et al*., 2010). O *M. leprae* induz macrófagos infectados a produzirem o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α, o qual estimula o recrutamento de outros fagócitos para o local, ativando essas células para erradicar o microorganismo) e IL-12 (a qual estimula a produção de IFNγ e a diferenciação de linfócitos T CD4+ em linfócitos Th1). Embora os bacilos sejam destruídos, há uma ineficiência ou ausência de fatores reguladores, originando uma resposta celular exarcebada, tornando-se tão lesiva ao organismo quanto o polo de susceptibilidade, resultando em lesões cutâneas (granulomas) e lesões neurais (ARAÚJO, 2003; MISCH *et al*., 2010).

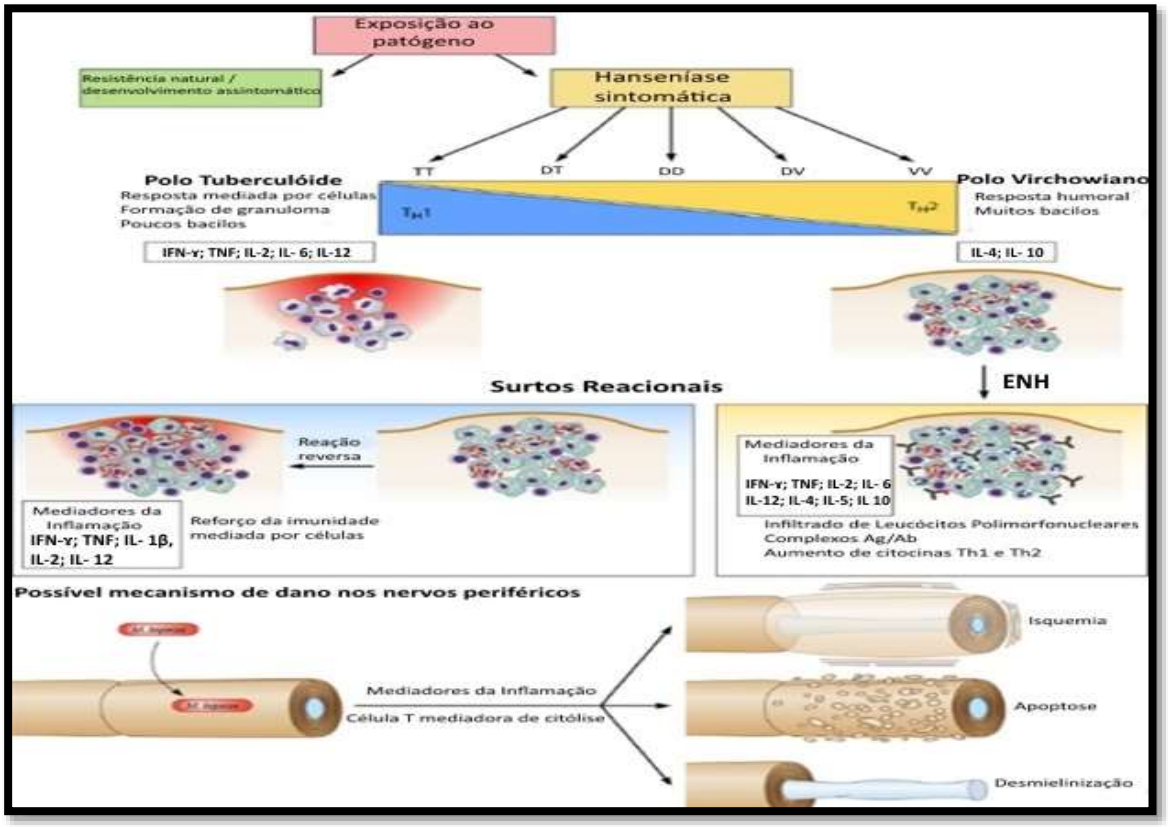
No polo de maior suceptibilidade (virchowiana ou lepromatosa), quase não há resposta celular. Em compensação, existe uma intensa resposta humoral, ineficaz para a eliminação do bacilo. Nesta, ocorre um aumento da produção de citocinas como a IL-4 (estimuladora da diferenciação de linfócitos T CD4+ em linfócitos Th2 e da produção da imunoglobulina IgE, inibidora da diferenciação em linfócitos Th1), IL-10 (inibidora de macrófagos ativados, suprimindo a sua produção de IL-12), fator de crescimento e transformação beta (TGFβ, inibidor da ativação de macrófagos e estimulador da produção de IgA). Também ocorre uma redução de citocinas ativadoras, como TNFα, IL-1 e IFNγ, e uma baixa produção de elementos responsáveis pela oxidação intracelular, como os reativos intermediários de nitrogênio (RNI) e os reativos intermediários de oxigênio (ROI) (FOSS, 1997; ABBAS *et al*., 2007).

Em relação aos surtos reacionais, a reação reversa ou do tipo 1 frequentemente acomete pacientes dimorfos (DT, DD e DV), refletindo a mudança de uma resposta do tipo Th2, para o tipo Th1, acarretando em formação de lesões com indurações, edema e eritemas, seguida de neurite com neuropatia motora e sensorial e até ulcerações (RODRIGUES, 2008). Já a reação do tipo Eritema Nodoso Hansênico (ENH), que ocorre mais em pacientes DV e VV, é uma condição inflamatória aguda envolvendo altos níveis de TNF, infiltração de linfócitos T CD4+ e neutrófilos no tecido com deposição de complexos imunes, resultando em

aparecimento súbito de nódulos inflamatórios dolorosos que podem se desenvolver na face e extremidades, podendo ocorrer pápulas, máculas e placas, além de manifestações extra-cutâneas, como artralgias, até quadros de artrites, linfadenopatias, febre, hepatoesplenomegalia, comprometimento renal e envolvimento ósseo (FIGURA 7) (RODRIGUES, 2008; MISCH *et al*., 2010).

Logo, a evolução clínico-patológica do paciente dependerá da forma de interação das citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, receptores e células do sistema imunológico adaptativo e inato do hospedeiro (LIMA, 2008).

FIGURA 7 - RELAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DA RESPOSTA IMUNE E OS ESPECTROS CLÍNICOS, SURTOS REACIONAIS E DANOS TECIDUAIS NA HANSENÍASE



LEGENDA: O espectro clínico de hanseníase é classificado de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro em: tuberculóide (TT), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano (VV). Cada polo está associado com um perfil imune mediada por células ou humoral. A resposta mediada por células (Th1) do pólo TT apresenta a eliminação ou contenção da micobactéria em granulomas, enquanto que a resposta humoral ineficaz no pólo LL (Th2) permite a proliferação de micobactérias dentro e em torno macrófagos. Reações reversas reflem uma mudança repentina em dimorfos (DT, DD e DV) em direção ao pólo Th1 e pode levar a danos irreversíveis nos nervos (neurites). A reação de tipo II ou reações de eritema nodoso hansênico (ENH) pode ocorrer em pacientes DV ou VV refletindo em um aumento de ambas as respostas mediadas por células e humoral a *M. leprae*. ENH está associada com a liberação sistémica de TNF e IL-4, com um influxo rápido de leucócitos polimorfonucleares (PMN), e deposição do complexo antigénio-anticorpo. O mecanismo da lesão no nervo é clara, onde pode ocorrer isquemia, apoptose, ou desmielinização. FONTE: Adaptado de MISCH *et al,* 2010.

2.1.5 Fatores Genéticos

A partir dos estudos epidemiológicos e microbiológicos, foi possível inferir que a predisposição genética é o principal contribuinte para o estabelecimento da infecção pelo *M. leprae* e as diversas manifestações decorrentes da doença, significando que a presença do bacilo não é condição suficiente para o seu desenvolvimento (CARDOSO *et al.*, 2011_a). De fato, nos últimos 50 anos, muitos pesquisadores sugeriram a associação entre diferentes genes e regiões genômicas, com a hanseníase e a variabilidade de respostas ao agente etiológico (BEIGUELMAN, 2002). Além disso, muitos indivíduos que são infectados oferecem resistência ao patógeno e nem chegam a desenvolver a moléstia (SOUZA, 1997).

A resposta ao bacilo é modulada, em parte, por Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). Estes são codificados por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), cujos polimorfismos estão associados ao padrão clínico correspondente à qualidade da resposta imune. Neste sentido, há evidências de que indíviduos com *HLA-DR2* podem desenvolver tanto o espectro clínico tuberculoide quanto o virchowiano, enquanto que indivíduos com *HLA-DR3* tendem a desenvolver o tipo virchowiano (MIRA, 2006). Outros autores também apontam o *HLA-DQ1* como associado ao desenvolvimento do tipo virchowiano (GOULART, PENNA e CUNHA, 2002). Genes não relacionados ao HLA também têm sido associados com a hanseníase.

Haage *et al*. (2009) observaram que as citocinas linfotoxina-α (LTA) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) desempenham papéis diferentes na iniciação e na manutenção da resposta granulomatosa à infecção por *M. leprae*, onde LTA regula a formação do granuloma, enquanto TNF-α o mantêm íntegro. De fato, Alcaïs *et al.* (2007) observaram que níveis baixos de produção de LTA estão associados com um risco maior de desenvolvimento da hanseníase, o que corrobora os resultados de estudos feitos em modelos animais, onde uma perturbação na via de sinalização de LTA aumentou a susceptibilidade à infecção por agentes patogênicos intracelulares (ROACH *et al*., 2001). Alcaïs *et al.* (2007) verificaram que o efeito do polimorfismo *LTA+80* (portadores de genótipo *AA/AC*) na susceptibilidade à hanseníase é dependente da idade, com uma associação mais forte em indivíduos mais novos (idade menor que 16 anos). Cardoso *et al.* (2011_b) observaram, através de análises funcionais em cultura de células de sangue total, que pacientes de hanseníase

tuberculoides, portadores do polimorfismo na região promotora *-308* de *TNF* (alelo *A*) produzem níveis mais elevados de TNF após o estímulo por lipopolissacarídeo (LPS) (6 horas depois) e *M. leprae* (3 horas depois), isto possivelmente justifica a associação de resistencia a hanseníase, especialmente em amostras da população brasileira. .

Através de uma análise de ligação em 86 famílias vietnamitas, Mira *et al.* (2003) encontraram uma relação causal entre a região 6q25-27 e a susceptibilidade à hanseníase. Em estudo posterior, Mira *et al.* (2004) avaliaram um intervalo de aproximadamente 80 Kb nesta região, e encontraram uma associação entre a hanseníase e 17 SNPs na região reguladora de *PARK2* (gene da doença de Parkinson) e *PACRG* (gene co-regulador), em amostras vietnamitas e brasileiras. PARK2 e PACRG são ambos expressos nas células hospedeiras de *M. leprae*. O gene *PARK2* (Parquina 2 RBR E3 Ubiquitina-Proteína Ligase) codifica a proteína parkina, que está envolvida na degradação de proteínas pelo proteossomo (GIASSON; LEE, 2001). A função do gene *PACRG* (PARK2 co-regulador) ainda não está totalmente elucidada.

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina secretada por células da linhagem de monócitos/macrófagos e subconjuntos de células T, possuindo propriedades imunomoduladoras, suprimindo a produção de mediadores inflamatórios, assim como a apresentação do antígeno. Está presente em níveis elevados nas formas multibacilares da hanseníase (CARDOSO *et al.*, 2011$_a$). Polimorfismos de *IL10* já foram associados com a hanseníase (SANTOS *et al.,*2002; MORAES *et al*., 2004; MALHOTRA *et al.*, 2005).

Os genes *KIR* são os principais reguladores funcionais de células *natural killers*, sendo a atividade dessas células determinadas pelo equilíbrio entre a ação dos receptores ativadores e inibidores que interagem com moléculas HLA de classe I. Em um estudo de Jarduli *et al.* (2014), observou-se que genes inibidores e atividores de *KIR* podem influenciar no desenvolvimento da haseníase, especialmente os genes de ativação, que podem proteger da forma mais agressiva da doença.

A lectina ligante de manose (MBL) é capaz de reconhecer padrões moleculares de açúcares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície de diversos microorganismos. Este reconhecimento possibilita a fagocitose e ativação do complemento (revisto por DORNELLES *et al*., 2006). Embora a deficiência de MBL já tenha sido associada com um aumento de infecções patogênicas recorrentes (SUPER *et al.,* 1989), no estudo de Dornelles, *et al.*, (2006) foi observado que níveis

inferiores de MBL estão associados com a proteção ao tipo clínico virchowiano. Dessa forma, MBL pode otimizar a entrada da micobactéria na célula hospedeira, visto que pode opsonizá-la, o que explica a associação dos níveis altos de MBL no plasma com as formas virchowianas, onde a ocorrência de micobactérias é alta (CARVALHO *et al.*, 2007; MESSIAS-REASON *et al*., 2007).

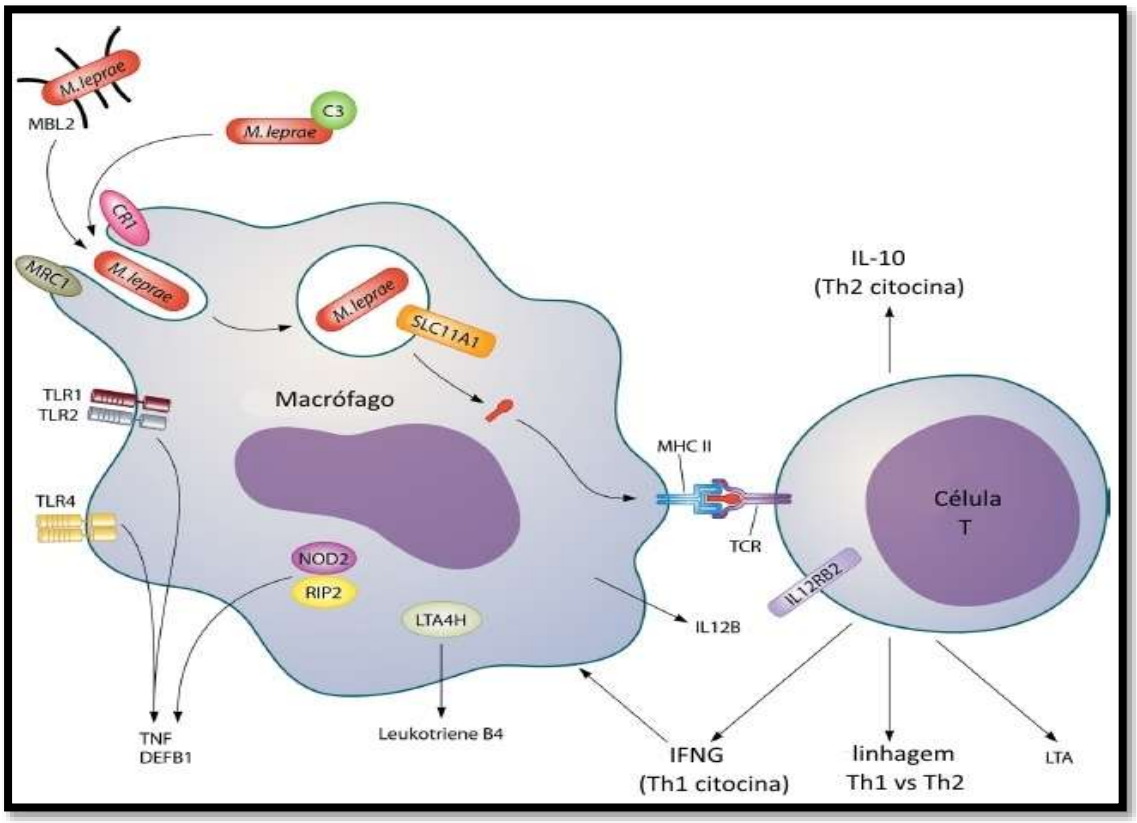
Foi observado por Messias-Reason *et al*. (2009), uma associação entre um haplótipo de *FCN2* relacionado a concentrações intermediárias de FCN-2 no soro e a susceptibilidade à infecção pelo *M. leprae* (MESSIAS-REASON, KREMSNER e KUN, 2009). Além disso, Boldt *et al*. (2013_a), verificaram associação de um haplótipo na região promotora de *FCN1* com a proteção a formas clínicas virchowianas da hanseníase. Em um estudo com *MASP2*, Boldt *et al.* (2013_b) observaram que baixas concentrações da proteína MASP-2 e alguns dos polimorfismos associados, aumentaram a susceptilidade a hanseníase, especialmente a forma virchowiana.

Em um estudo de larga escala realizado com a população do distrito de Karonga (Malawi), Fitness, *et al.* (2004) tentaram replicar os resultados de associações à hanseníase já encontrados em diversos genes para diferentes populações. Os pesquisadores observaram associações para o gene receptor de vitamina D (*VDR*) e o receptor 1 do complemento (*CR1*). O VDR medeia diversos efeitos imunomoduladores da forma ativa da vitamina D, o que inclui a supressão da síntese de citocinas, produção de imunoglobulinas e a proliferação de linfócitos. Fitness *et al.* (2004) encontraram uma associação para o polimorfismo *Taq* I (exon 9, códon 352) onde portadores do genótipo *TT* apresentam uma maior susceptibilidade à hanseníase *per se*. O CR1 medeia a aderência e a fagocitose de agentes patogênicos opsonizados por moléculas do sistema complemento. Dentre os diversos SNPs analisados para *CR1* no estudo de Fitness *et al.* (2004), foi observada uma associação de proteção à hanseníase em indivíduos homozigotos (McC^b / McC^b – *G/G*) para o polimorfismo rs17047660, correspondente ao antígeno McCoy do grupo sanguíneo Knops.

Além dos genes anteriormente citados, também já foram obervados pelo menos um polimorfismo associado dos seguintes genes: o domínio 2 de oligomerização de nucleotídeos (*NOD2*), o membro 1 da família 11 do transportador de soluto (*SLC11A1*, também conhecido como *NRAMP*), receptores do tipo *toll-like* (*TLR*), o receptor de manose do tipo C (*MRC*), a quinase 2 com repetições ricas em leucina (*LRRK2*), butirilcolinesterase (*BCHE*) entre outros, os quais estão associados

com a resposta ao parasita (FIGURA 8). Todos os genes anteriormente citados apresentaram pelo menos um SNP associado com a suceptibilidade ou resistência a hanseníase (GARRED *et* al, 1994; MORAES *et al*., 2006; BOCHUD *et al*., 2008; SAPKOTA *et al*., 2010; MISCH *et al*., 2010; CARDOSO *et al*., 2011 [a]; GOMES *et al.*, 2012).

FIGURA 8 - INTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES JÁ CONHECIDAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO *M. leprae*



LEGENDA: *M. leprae* é inicialmente reconhecido por vários receptores da imunidade inata, incluindo os receptores *Toll-like* (TLRs). A ligação da micobactéria com o domínio extracelular de TLR conduz à ativação de uma via de sinalização e a expressão de quimiocinas e citocinas. Vários outros receptores de sinalização podem estar envolvidos no reconhecimento de *M. leprae*, como por exemplo os demais TLRs. Receptores do complemento, como CR1, desempenham um papel importante na adesão da micobactéria na célula hospedeira. LEGENDA: C3 (componente 3 do complemento), CR1 (receptor 1 do complemento), DEFB1 (defensina beta 1), IFNG (interferon gama), IL-10 (interleucina 10), IL12B (interleucina 12 subunidade p40), IL12RB2 (receptor beta 2 da interleucina 12), LTA4H (leucotrieno A4 hidrolase), LTA (linfotoxina alfa), MHC II (complexo principal de histocompatibilidade de classe II), MBL2 (lectina ligante de manose), MRC1 (receptor de manose do tipo C1), NOD2 (domínio 2 de oligomerização de nucleotídeos), RIP2 (serina-treonina quinase 2 interagindo com receptor); SLC11A1 (transportador de soluto família 11 membro 1, também conhecido como NRAMP), TCR (receptor de células T), Th1 (células T auxiliares do tipo 1), Th2 (células T auxiliares do tipo 2), TLR (receptor do tipo toll-like), TNF (factor de necrose tumoral). FONTE: Adaptado de MISCH et al, 2010.

2.1.6 Profilaxia

As medidas profiláticas recomendadas para a hanseníase envolvem o diagnóstico precoce e a utilização da vacina BCG (ARAÚJO, 2003).

Campanhas realizadas pelo Ministério da Sáude como, por exemplo, a Campanha Nacional de Hanseníase, visam realizar o diagnóstico precoce através de divulgação e instrução em escolas sobre a doença e seus sintomas. Ao detectar um caso de hanseníase, agentes de saúde também avaliam a família para verificar se há mais alguma ocorrência.

Embora a vacina BCG tenha sido desenvolvida com o intuito de prevenir a tuberculose, vários autores já comprovaram que uma única dose confere significante proteção contra a hanseníase (ABEL *et al*., 1990; CUNHA e*t al*., 2003; ZODPEY *et al*., 2005; DÜPPRE *et al*., 2008). O Ministério da Saúde recomenda que as pessoas que possuam contato intradomiciliar com um paciente de hanseníase, como familiares e pessoas que convivem no mesmo domicílio nos últimos 5 anos, tomem a vacina BCG (ARAÚJO, 2003; DÜPPRE *et al*., 2008).

2.1.7 Diagnóstico

Existem vários testes que permitem diagnosticar a hanseníase, assim como o espectro clínico em que o índividuo se encontra. A palpação dos nervos e grupos musculares, assim como sua avaliação funcional, permitem verificar as alterações causadas pela doença. Utiliza-se também a baciloscopia como exame complementar, no qual se avalia o material raspado de tecido dérmico do paciente. Como resultado, a baciloscopia mostra-se negativa para formas tuberculoides e indeterminadas, e positiva para formas virchowianas. O resultado pode ser variado nas formas dimorfas (ARAÚJO, 2003). Além disso, também pode ser realizado biópsia da lesão e exames sorológicos (detecção de PGL-1) (EICHELMANN *et al,* 2013).

A reação de Mitsuda mede a intensidade da resposta imunológica granulomatosa, mediada por macrófagos, ao *M. leprae*. A técnica consiste na injeção intradérmica da lepromina, chamada no Brasil de mitsudina: uma suspensão esterilizada de bacilos de Hansen, mortos pelo calor e extraídos de granulomas de pacientes não tratados ou de tecidos de tatus infectados (BEIGUELMAN, 2002). O resultado do teste apresenta-se positivo para pacientes com a forma clínica

tuberculoide, pois há intensa resposta celular, ocorrendo o contrário para pacientes com a forma clínica virchowiana (GOULART, PENNA e CUNHA, 2002). É importante ressaltar que este teste não é utilizado para o diagnóstico e sim, com fim prognóstico e de classificação, tendo sido substituído progressivamente pela baciloscopia (EICHELMANN *et al,* 2013).

No caso de pacientes que não tenham concluído o tratamento, a hanseníase é diagnosticada clinicamente com base em três sinais cardinais estabelecidos pelo Comitê de Especialistas da WHO em 1997 (EICHELMANN *et al* , 2013):

1. Lesões hipopigmentadas e anestésicas;
2. Nervo periférico espessado;
3. Baciloscopia positiva ou bacilos observados em uma biópsia.

2.1.8 Tratamento

Segundo o Ministério da Saúde, o tratamento da hanseníase deve acontecer a partir do momento em que o paciente apresenta um ou mais dos seguintes sintomas: lesão de pele com alteração da sensibilidade, espessamento do tronco nervoso ou baciloscopia positiva. O tratamento visa a poliquimioterapia (PQT) específica para cada espectro clínico, supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, reabilitação física e psicossocial (ARAÚJO, 2003).

Em 1981, a WHO introduziu a PQT, como tratamento para a hanseníase. O tratamento se constitui da junção de três drogas em dosagens e períodos de uso específíco para cada tipo clínico, sendo estas: dapsona (DDS), clofazimina (CFZ) e rifampicina (RMP) (GOULART *et al*., 2002). Segundo Goulart *et al.* (2002), a dapsona (4,4'- Diamino-Difenil-Sulfona) é a principal droga no tratamento da hanseníase. Essa substância compete com o ácido para-aminobenzoico (PABA), alterando ou bloqueando por completo a síntese do ácido fólico bacteriano. Já a clofazimina (Lampren, B663) é um derivado iminofenazínico que possivelmente interfere diretamente com o DNA bacteriano. A rifampicina (RMP: Rifampim, Rifaldim e Rimactan) é um semi-sintético derivado da rifamicina B, que inibe a transcrição bacteriana, ao se combinar com a RNA polimerase.

O maior problema enfrentado pelos pacientes são os efeitos colaterais dos medicamentos, que muitas vezes resultam no abandono do tratamento. Segundo Goulart *et al.* (2002), a dapsona é a responsável por causar o maior número de

reações adversas, quando comparada às demais drogas. Os efeitos colaterais mais comuns são: gastrite, cefaleia, fotodermatite, anemia hemolítica, agranulocitose, hepatite, síndrome sulfona, neuropatia periférica e síndrome nefrótica, hiperpigmentação cutânea, ictiose, hepatotoxidade, trombocitopenia, psicose, síndrome pseudo-gripal, choque e dispneia (GOULART *et al*., 2002).

Nesse sentido, pesquisas tem sido desenvolvidas com o intuito de encontrar novas drogas a fim de reduzir os efeitos colaterais e/ou resistência da bactéria ao tratamento primário. A WHO relata três novas drogas, sendo elas: a minociclina, ofloxacina e claritromicina, que têm demonstrado potencial para aumentar a eficiência e diminuir a duração da PQT. Além disso, novas drogas podem ser úteis contra cepas de *M. leprae* resistentes aos medicamentos atualmente em uso.

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO

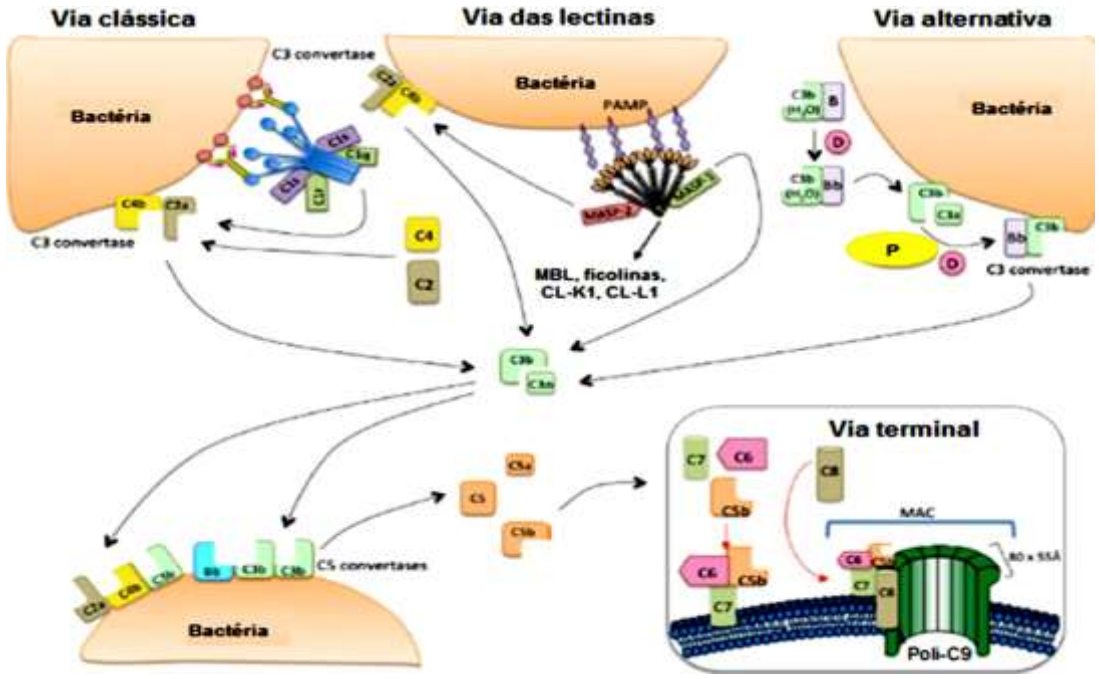
A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa do organismo, reconhecendo patógenos em potencial, através de mecanismos altamente regulados de respostas celulares e humorais. Para ser ativada, deve haver o reconhecimento de padrões específicos presentes na superfície dos patógenos ou de células alteradas. A ativação ocorre de maneira rápida, levando a um processo de inflamação, o qual limita eficientemente a infecção, dando origem a uma resposta imunológica adaptativa. Os efetores da imunidade inata incluem as barreiras epiteliais, fagócitos e células *natural killer*, citocinas, assim como o conjunto de proteínas do sistema complemento (BOLDT, GOELDNER e MESSIAS-REASON, 2012).

O sistema complemento é considerado um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata, além de estabelecer uma ponte com a imunidade adaptativa, atuando como um sinalizador. Foi descoberto em 1896 por Bordet, como um componente termo sensível do plasma, com a capacidade de complementar as propriedades antibacterianas dos anticorpos (DUNKELBERGER e SONG, 2010). Atualmente, sabe-se que se trata de uma complexa rede de mais de 45 proteínas séricas e de membrana, sintetizadas principalmente em hepatócitos, macrófagos e monócitos, que interagem entre si de forma altamente regulada, de modo a reproduzir uma eficiente resposta inflamatória e citolítica (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001; UTIYAMA *et al*., 2004; DUNKELBERGER e SONG, 2010). O sistema complemento contribui para a manutenção da homeostase do organismo, atuando no

estímulo da inflamação (liberação de anafilatoxinas), remoção de complexos imunes e produtos da lesão inflamatória e lise por opsonização seguida de fagocitose ou pela formação do complexo membranolítico, na superfície celular (UTIYAMA *et al*., 2004; LIU e NIU, 2009; DUNKELBERGER e SONG, 2010).

A ativação do complemento pode ocorrer por três vias: via clássica (assim chamada por ter sido a primeira a ser descoberta), via alternativa e via das lectinas (FIGURA 9). A via clássica é ativada primariamente pela interação do componente C1q com complexos imunes (antígeno-anticorpo), embora também possa ser ativada por meio de interações de C1q com moléculas não-imunes (polissacarídeos bacterianos, DNA, RNA, fungos e vírus, entre outros). Estão envolvidos nessa via: o complexo de reconhecimento C1q, associado às serina proteases C1r e C1s; os componentes C4, C2 e C3, além dos componentes C5-C9 necessários à formação do complexo final de ataque à membrana (MAC). Na via alternativa, não há necessidade de ativação por anticorpos, já que ela é ativada diretamente pela superfície das células microbianas, entre outras substâncias biológicas. Esta ativação implica na hidrólise de C3 (que também pode ser espontânea) e deposição dos fragmentos de C3 sobre a célula-alvo. Estão envolvidos nessa via: C3, fator B (FB); fator D (FD) e properdina (P), que após uma cascata de reações levarão à formação do MAC. A via das lectinas é ativada através da ligação da lectina ligante de manose (MBL), ficolinas (FCN 1, 2 ou 3) ou colectina 11 (COLEC11) a resíduos específicos de carboidratos ou resíduos acetilados, presentes na superfície do patógeno ou de células alteradas (no caso de MBL, N-acetil-D-glucosamina, manose, glucose, frutose). Esta ligação leva à autoativação de MASP-1 e à transativação de MASP-2, serina proteases acopladas às moléculas de reconhecimento, que apresentam função similar a C1r e C1s. Dessa forma, haverá a ativação de C4 e C2, levando à formação de C3 convertase e ao MAC (UTIYAMA *et al*., 2004; LIU e NIU, 2009; DUNKELBERGER e SONG, 2010). É importante ressaltar que, independente da via ativada, todas irão convergir na geração de C3 convertase, que clivará C3 em C3a (anafilatoxina) e C3b (opsonina), potencialmente culminando na formação do MAC (DUNKELBERGER e SONG, 2010).

FIGURA 9 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO E FORMAÇAO DO MAC.



LEGENDA: PAMP – padrões moleculares associados a patógenos; MBL – lectina ligante de manose; MASP – serina protease associada a MBL; B – fator H; D – fator D; MAC – complexo de ataque a membrana. FONTE: BELTRAME *et al*. (2015).

2.2.1 Sistema Complemento e Hanseníase

O sistema complemento está associado a muitas doenças, pois a deficiência ou o excesso, ou ainda outra alteração funcional de uma ou mais proteínas da cascata do complemento, poderá acarretar na susceptibilidade aumentada a determinadas doenças. Quando faltam componentes inicias na via clássica, o indivíduo pode apresentar tanto saúde normal, quanto doenças do colágeno ou infecções. Já a deficiência de C3 ou de componentes da via alternativa leva a ocorrência de infecções graves. Para que haja um controle adequado do sistema complemento, existem inibidores endógenos, uma vez que a resposta exarcebada pode levar à destruição inflamatória dos tecidos, prejudicando células autólogas (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001; UTIYAMA *et al*., 2004).

Existem alguns microorganismos, como o *M. leprae*, que desenvolveram meios de evitar as ações do sistema complemento, utilizando-se da opsonização gerada pela ativação do complemento para adentrar sua célula hospedeira, processo conhecido como subversão imunológica (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001). Nesse sentido, o sistema complemento desempenha um fator crucial em doenças

infecciosas, como a hanseníase, levando a vários estudos de associação com genes desse sistema, como *MBL*, *FCN1*, *FCN2, MASP2* e *CR1*.

Embora a deficiência de MBL esteja associada com um aumento de infecções patogênicas recorrentes (SUPER *et al.,* 1989), no estudo de Dornelles, Pereira-Ferrari e Messias-Reason (2006) foi observado que níveis baixos de MBL conferem proteção à forma mais grave da doença (virchowiana). Isto provavelmente se deve ao fato de que MBL pode opsonizar a *M. leprae*, facilitando sua fagocitose pela célula hospedeira, justificando a associação de níveis altos de MBL no plasma com as formas virchowianas, nas quais a ocorrência de micobactérias é alta (CARVALHO *et al.*, 2007; MESSIAS-REASON *et al*., 2007). Segundo Garred *et al.* (1994), doenças causadas por micobactérias poderiam atuar como uma força de seleção positiva sobre polimorfismos causadores da deficiência de MBL.

Além de MBL, Messias-Reason *et al*. (2009) encontraram uma associação entre um haplótipo associado a concentrações intermediárias de FCN-2 no soro e a susceptibilidade à infecção pelo *M. leprae* (MESSIAS-REASON, KREMSNER e KUN, 2009). Além disso, Boldt *et al*. (2013$_a$), verificaram associação de um haplótipo na região promotora de FCN-1 com a proteção a formas clínicas virchowianas da hanseníase. Já em um estudo com MASP-2, Boldt *et al.* (2013$_b$) verificaram que baixas concentrações da proteína MASP-2 e alguns dos polimorfismos associados, aumentaram a susceptilidade a hanseníase, especialmente na forma virchowiana.

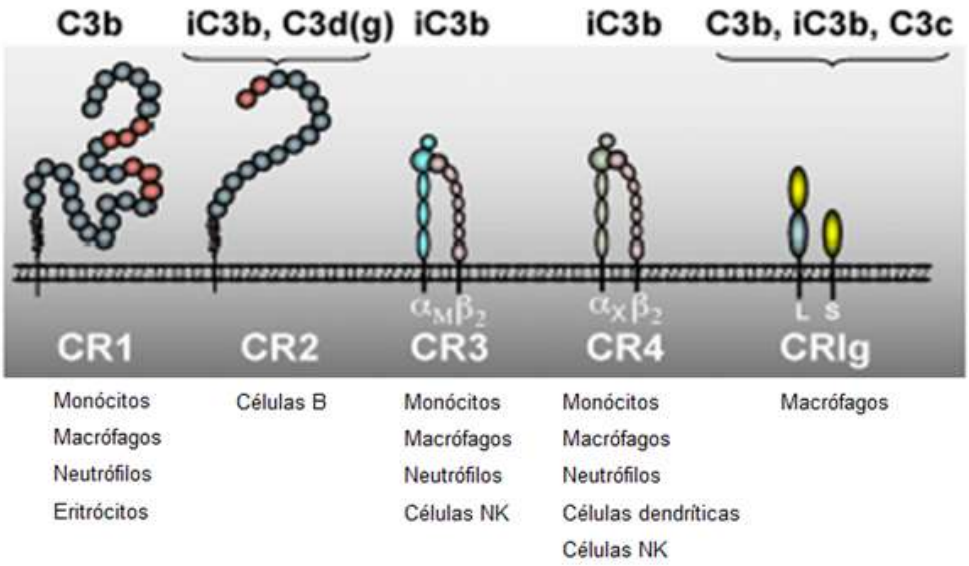
A entrada da micobactéria no macrófago é mediada por receptores do complemento como o CR1, que se liga a fragmentos do complemento C3b/C4b depositados na bactéria (opsonização) (LIU e NIU, 2009; SCHLESINGER e HORWITZ, 1990). Logo, alguns autores consideram que alterações no *CR1* podem modular a suceptibilidade ao desenvolvimento da hanseníase (FITNESS *et al*., 2004). No estudo de Fitness *et al.* (2004), desenvolvido com a população africana de Karonga (Malawi), foi observada uma associação de proteção à hanseníase com homozigose para o polimorfismo rs17047660, correspondente ao antígeno McCoy do grupo sanguíneo Knops (McC^b / McC^b – *G/G*).

2.3 FAMÍLIA DOS RECEPTORES DE COMPLEMENTO E SUAS PROTEÍNAS REGULADORAS

Os receptores do complemento, constituintes da família RCA (reguladores da atividade do complemento), são cinco: CR1 (grupo de diferenciação 35 ou CD35, receptor C3b/C4b); CR2 (CD21); CR3 (CD11b/CD18); CR4 (CD11c/ CD18) e CRIg (HELMY *et al*., 2006; LIU e NIU, 2009). Estes atuam como receptores dos produtos de degradação de C3, facilitando a entrega de antígenos para macrófagos, células dendríticas e células B (PRINGLE *et al*., 2012). CR1 e CR2 são expressos principalmente em células B e células dendríticas foliculares. Já CR3 e CR4 são integrinas expressas em células fagocíticas e em um subconjunto de linfócitos e eosinófilos (PETTY *et al*., 2002). O CRIg (VSIG4) é expresso exclusivamente em macrófagos residentes em tecido e macrófagos sinusoidais, sendo considerado um componente fundamental da imunidade inata, visto que participa na reciclagem constitutiva de vesículas de membrana e na internalização de partículas opsonizadas por células de Kupffer (KCs) (HELMY *et al*., 2006).

As proteínas reguladoras da ativação do complemento (RCA) são: o CR1 (CD35), CR2 (CD21) e o fator H (FH). A estrutura dessas proteínas é muito semelhante, embora apresentem tamanhos diferentes (FIGURA 10). A parte extracelular é composta pelos domínios “repetições de proteínas controladoras do complemento” (CCPs), também conhecidos como ”pequenas repetições consenso” (SCRs), “repetições complementares” (CRs) ou “domínios sushi”, que atuam nas interações entre proteínas e proteína-carboidrato, embora também sirvam como sítios de ligação para patógenos (KRUSHKAL *et al*., 2000; O’LEARY *et al*., 2002; LIU e NIU, 2009).

FIGURA 10 - RECEPTORES DE COMPLEMENTO, RESPECTIVOS FRAGMENTOS C3 LIGANTES E EXPRESSÃO EM CÉLULAS.



LEGENDA: Esferas: pequenas repetições consenso (SCR). Em vermelho: SCR de ligação dos fragmentos C3. Em amarelo: domínio de imunoglobulina tipo IgV. Em azul: domínio de imunoglobulina tipo IgC. NOTA: CR1 e CR2 humanos contêm 30 e 15 pequenas repetições consenso (SCR), respectivamente. CR2 humano liga-se a Ic3b, C3dg ou C3d. CR3 e CR4 contêm subunidades α e β que são glicoproteínas transmembrana do tipo 1, com domínios extracelulares longos e caudas citoplasmáticas curtas. CRIg humano contém duas isoformas, com um ou dois domínios extracelulares de imunoglobulina (formas longa ou L, e curta ou S, respectivamente). FONTE: HE *et al*., 2008.

CR1 é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples, constituída por uma série linear de 30 SCR na parte extracelular, seguida por um curto domínio trasmembranar e intracitoplasmático. A composição de CR2 é muito semelhante, embora este possua apenas 15 domínios SCR. CR1 pode ser expresso em eritrócitos, monócitos, neutrófilos, podócitos glomerulares, algumas células T, células B e células dendríticas foliculares, enquanto CR2 é expresso também em linfócitos B maduros, um subconjunto de células T periféricas, timócitos precoces, basófilos, mastócitos, queratinócitos e outros tipos de células epiteliais (HOLERS, 2003; FURTADO *et al*., 2008). A função biológica de CR1 varia de acordo com a célula onde ocorre. Em eritrócitos, é responsável pela eliminação de complexos imunes. Nas células fagocíticas, liga-se aos fragmentos C3 (C3b/C4b) e otimiza a fagocitose de partículas opsonizadas (BOACKLE *et al*., 2004; LIU e NIU, 2009). Também pode atuar como um regulador negativo do sistema complemento (em todas as vias), inativando as C3 e C5 convertases (FURTADO *et al*., 2008). Além disso, atua como co-fator para a inativação de C3b e C4b, regulando a via alternativa, e também como um receptor

para MBL, internalizando partículas opsonizadas por esta proteína e regulando a ativação da via das lectinas (GHIRAN *et al*., 2000; LIU e NIU, 2009).

O fator H (FH) é expresso de maneira constitutiva no fígado e em outros tipos celulares, como células endoteliais, células epiteliais, plaquetas, entre outros. É uma glicoproteína constituída por 20 domínios CCP. Tem como função regular negativamente a ativação da via alternativa do sistema complemento, como cofator do fator I, e acelerar o decaimento da convertase C3bBb (MORGAN *et al*., 2012).

2.4 GENE *CR1*

2.4.1 Estrutura e regulação

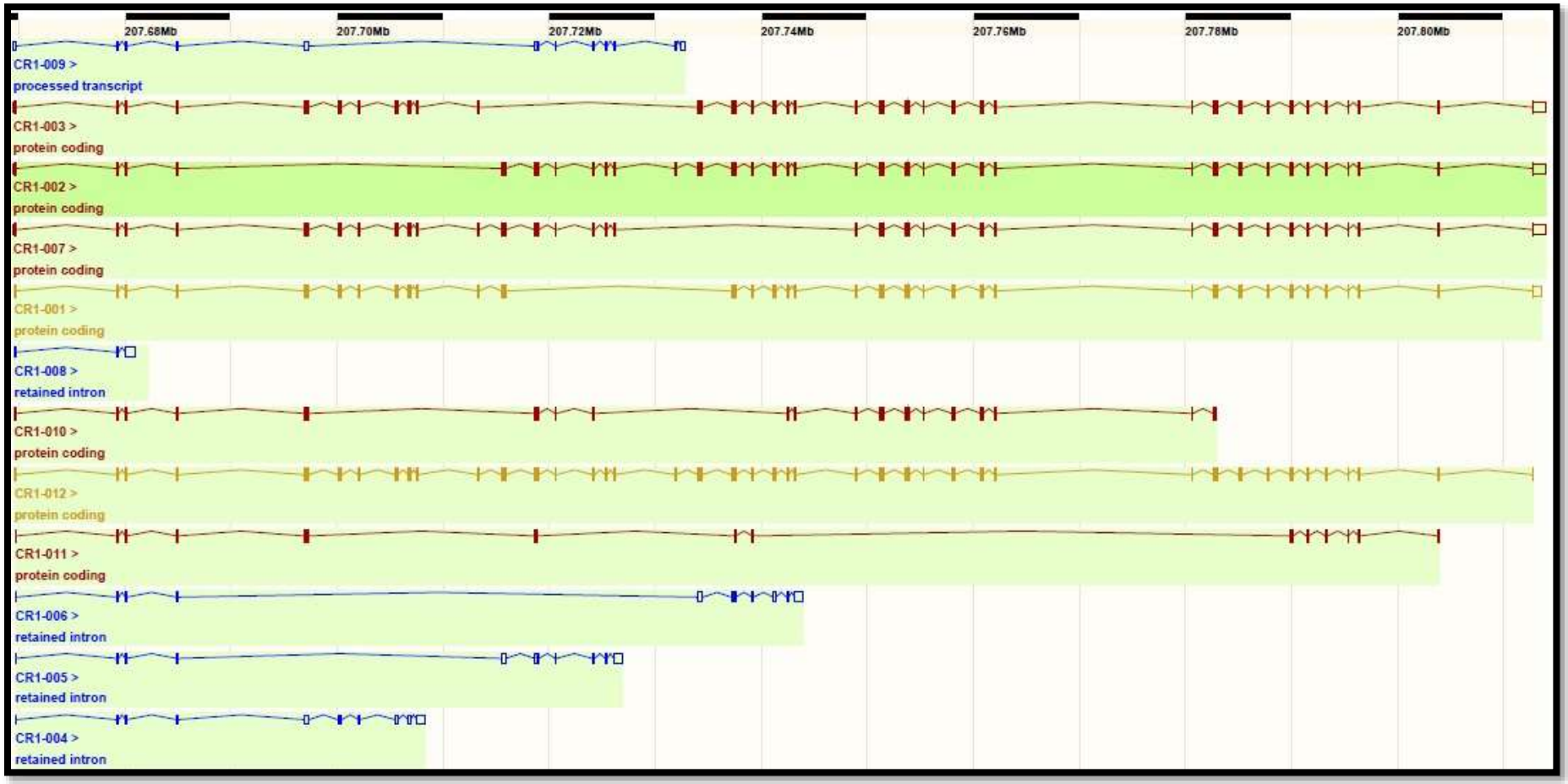
O gene *CR1* (OMIM: 120620) está localizado, juntamente com os genes *CR2* e *FH*, em um agrupamento de genes reguladores de ativação do complemento, na banda 2, da região 3, do braço longo do cromossomo 1 (1q32) (REY-CAMPOS *et al.,* 1988; LIU e NIU, 2009). A maior parte da atividade promotora de *CR1* está concentrada nos primeiros 140 pares de base (pb) (FUNKHOUSER e VIK, 2000), embora haja um elemento regulador negativo entre 700 e 500 pb a montante do sítio de início da transcrição (KIM *et al.,* 1999). O pré-mRNA apresenta processamento alternativo, gerando doze transcritos, cada um deles variando em número de exons. Dentre os transcritos, apenas dois são listados no NCBI RefSeq (CR1-001: NM_000573.3 e CR1-012: NM_000651.4). Sete transcritos 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 e com sequências idênticas de 2039 aminoácidos, apenas diferindo nas regiões não traduzidas (UTR) do mRNA maduro (TABELA 2 e FIGURA 11). Os transcritos 002, 003, 007, 008 e 011 são os mais amplamente expressos, segundo dados do portal GTEX (Disponível em: < http://goo.gl/GY3riL > Acesso em: 23/09/2015).

TABELA 2 - TRANSCRITOS DO GENE *CR1.*

NOME	TRANSCRITO	EXONS	TAMANHO (nuc.)	PROTEÍNA	TAMANHO (aa)	TIPO
CR1-012	ENST00000367049	47	7470	ENSP00000356016	2489	Codificador de proteína
CR1-001	ENST00000400960	39	6959	ENSP00000383744	2039	Codificador de proteína
CR1-002	ENST00000367051	39	7469	ENSP00000356018.1	2039	Codificador de proteína
CR1-003	ENST00000367053	39	7469	ENSP00000356020.1	2039	Codificador de proteína
CR1-007	ENST00000367052	39	7469	ENSP00000356019.1	2039	Codificador de proteína
CR1-010	ENST00000534202	21	3460	ENSP00000436139	1151	Sujeito a decaimento mediado por codon nonsenseeína
CR1-011	ENST00000529814	14	1981	ENSP00000434718	661	Codificador de proteína
CR1-009	ENST00000367050	13	2393	Sem produto proteico	-	Transcrito processado
CR1-004	ENST00000434033	11	2377	Sem produto proteico	-	Com intron retido
CR1-005	ENST00000450439	11	2377	Sem produto proteico	-	Com intron retido
CR1-006	ENST00000436595	11	2377	Sem produto proteico	-	Com intron retido
CR1-008	ENST00000530487	3	1228	Sem produto proteico	-	Com intron retido

LEGENDA: CR1 – receptor 1 do complemento; nuc. – nucleotídeos; aa – aminoácido. Expressão dos diferentes transcritos, resultantes de análises de RNASeq: em negrito – transcritos abundantes no baço e sangue total, com expressão menor no intestino delgado – íleo terminal, pulmão e trompas de Falópio; em itálico – transcritos raros; demais - expressos apenas em linfócitos transformados pelo vírus Epstein-Barr. FONTE: Baseado em dados do Ensembl e do GTEX. Disponível em: <http://goo.gl/29bU2I> e <http://goo.gl/vECDMR> Acesso em 10/10/15.

FIGURA 11 - TRANSCRITOS DO GENE *CR1*.



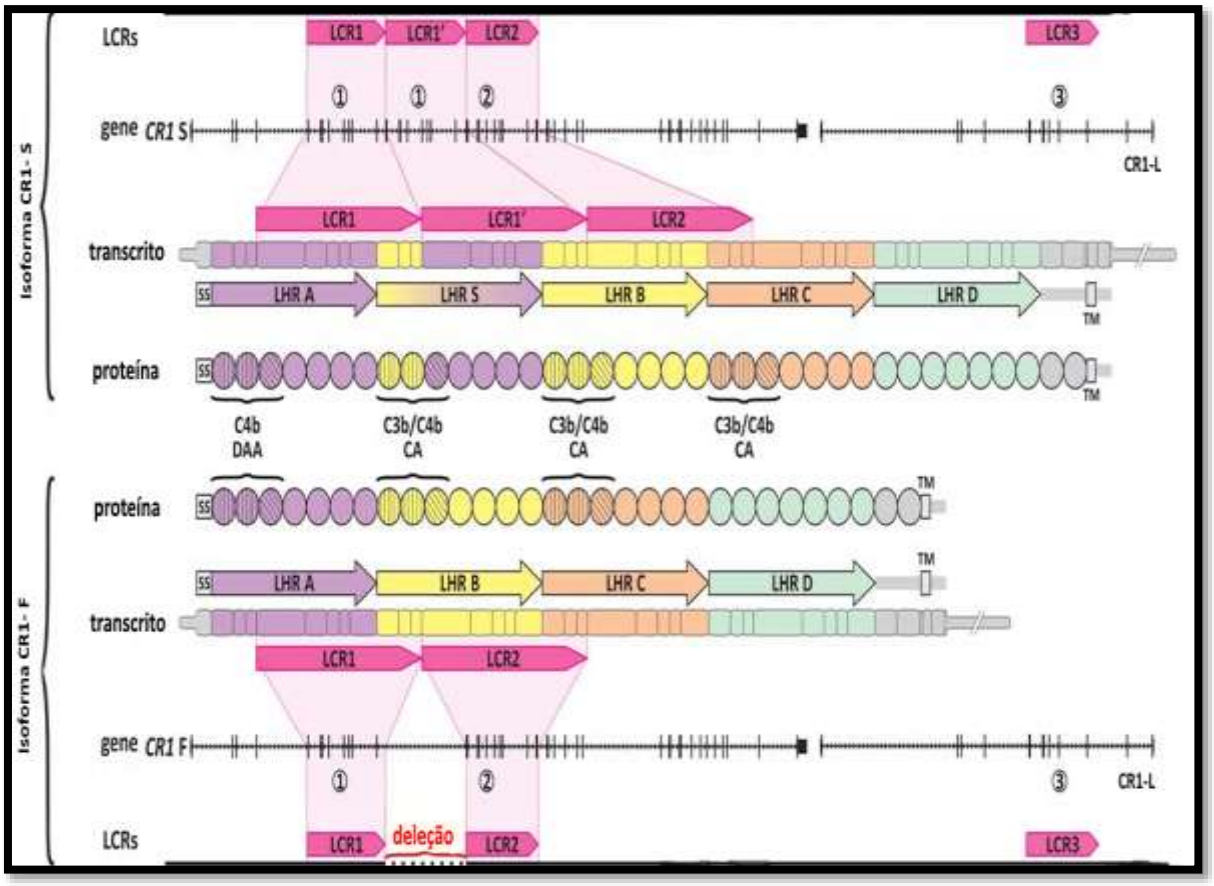
LEGENDA: Os blocos preenchidos representam os exons, os blocos não preenchidos representam regiões não traduzidas, as linhas entre os blocos representam os introns. Os transcritos em vermelho e laranja são codificadores de proteínas; os transcritos em laranja foram analisados pelos navegadores genômicos Ensembl e Havana; e os transcritos em azul são transcritos processados. A flecha indica o sentido da transcrição. FONTE: Disponível em: <http://goo.gl/G2K90n> Acesso em 08/09/14

2.4.2 Polimorfismo gênico

CR1 apresenta sequências repetitivas com baixo número de cópias, chamadas LCR (*Low Copy Repeat*), de cerca de 18 kb. As LCRs 1 e 2 estão localizadas em região codificante, sendo LCR1' uma cópia extra, derivada de LCR1. A presença de LCR1' codifica um sítio extra de ligação para C3b/C4b na isoforma *CR1-B*. A LCR3 está presente no *CR1-L* (gene *CR1-like*) próximo ao *CR1* (FIGURA 12) (BROUWERS *et al*., 2012).

Variações do *CR1* podem ocorrer por deleções e inserções (resultantes de recombinação não homóloga entre as LCRs) ou SNPs, que podem alterar a densidade e tamanho final da molécula de CR1, na superfície da célula (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001, LIU e NIU, 2009). Adições de domínios LHR proporcionam sítios extra de ligação a C3b para as variantes maiores (*CR1-B* e *CR1-D*) (WONG *et al*., 1986). Através das inserções e deleções, podem ocorrer quatro variantes que possuem diferentes tamanhos, sendo elas: *CR1-A* de 220 kDa (também chamado *CR1*1* ou *CR1-F,* onde F significa *fast,* relativo à maior velocidade de migração eletroforética), *CR1-B* de 250 kDa (*CR1*2* ou *CR1-S*, onde S significa *slow,* relativo à menor velocidade de migração eletroforética, comparado a *CR1-F*), *CR1-C* de 190 kDa (*CR1-F'* ou *CR1*3*) e *CR1-D* de 280 kDa (*CR1*4*) (DYKMAN *et al*., 1983; DYKMAN *et al*., 1984; BIRMINGHAM e HEBERT, 2001; BROUWERS *et al*., 2012). Os alelos que ocorrem com maior frequência são *CR1-A* (alótipo F) e *CR1-B* (alótipo S), seguido de *CR1-C*, sendo o alelo *CR1-D* considerado muito raro. A frequência de *CR1-A* é de 87% em europeus, 82% em afro-americanos, 89% em mexicanos e 91,6% em asiáticos. Já a frequência de *CR1-B* é 8,4% em indianos e asiáticos, e 11% nas demais populações investigadas. Os alelos *C* e *D* ocorrem com menos de 5% de frequência, nas populações analisadas (MOULDS *et al*., 2001; BIRMINGHAM e HEBERT, 2001).

FIGURA 12 - ARQUITETURA GENÔMICA DO LOCUS DE *CR1* EM RELAÇÃO ÀS PRINCIPAIS ISOFORMAS.



LEGENDA: Os segmentos genômicos estão representados acima e abaixo, codificando as duas principais isoformas alélicas de *CR1*: *CR1-S* e *CR1-F*, respectivamente, e representando o gene *CR1-L* (barras verticais correspondem a exons). As repetições de baixo número de cópias (LCR) são representados pelas flechas horizontais na cor *pink*, indicando sua localização e orientação da transcrição, sendo que *CR1-F* apresenta deleção do LCR1'. No transcrito maduro, cada bloco representa um exon, cuja cor corresponde a diferentes domínios da proteína. Blocos largos representam sequências codificantes, e blocos estreitos, sequências não traduzidas (UTRs). Setas correspondem a longos domínios homólogos de repetição - LHR (*Long Homologous Repeat*). SS: peptídeo sinal. TM: região transmembrana. Na proteína, círculos representam domínios funcionais de CR1, chamados SCR ou repetição de consenso curta (*Short Consensus Repeat*). As primeiros três SCR em LHR A, S, B e C são necessárias para a ligação ao C3b/C4b, inibindo a formação do MAC (decaimento da atividade ou atividade co-fatora na clivagem de C3b e C4b). FONTE: adaptado de BROUWERS *et al*., 2012.

Outra forma de polimorfismo encontrado em *CR1*, resultante de SNPs e que alteram a proteina CR1, são as variantes do grupo sanguíneo Knops (MOULDS 2010, VELDHUISEN *et al*., 2011) (TABELA 3). Tais SNPs encontram-se no exon 26 (York) e exon 29 (demais antígenos), sendo esses responsáveis por codificar a região LHR-D do gene *CR1* (LIU e NIU, 2009; MOULDS, 2010). Existe uma grande diferença na frequência alélica de McCoy e Swain-Langley/ Villien entre as populações africanas e de origem europeia, sendo os alelos McC^{b} e S12 praticamente inexistentes em europeus, mas frequentes em africanos (MOULDS *et al*., 2001). Fontes *et al.* (2011)

observaram que antígenos Kn^b e $KCAM^+$ estão associados à susceptibilidade à malária, causada por *Plasmodium falciparum*. Outros autores encontraram S12 associado com a proteção a formas mais graves da malária, pois eritrócitos que apresentam esse antígeno possuem uma baixa propensão ao desenvolvimento da formação de rosetas (ROWE *et al*., 1995; ROWE *et al*., 1997; ROWE *et al*., 2000).

TABELA 3: ANTÍGENOS DO GRUPO SANGUÍNEO KNOPS

ANTÍGENO	NUCLEOTÍDEO Cromossomo 1	AMINOÁCIDO ENSP00000356018	SNP
Kn^a	g.207609424G	1561V	rs41274768
Kn^b	g.207609424A	1561M	
McC^a	g.207609511A	1590K	rs17047660
McC^b	g.207609511G	1590E	
S11/Sla	g.207609544A	1601R	rs17047661
S12/Vil	g.207609544G	1601G	
S13+	g.207609571T	1610S	rs4844609
S13-	g.207609571A	1610T	
KCAM+	*g.207609586A*	p.1615I	rs6691117
KCAM-	*g.207609586G*	p.1615V	
Yk^{a+}	*g.207587428C*	p.1408T	rs3737002
YK^{a-}	*g.207587428C*	p.1408M	

FONTE: adaptado de MOULDS, 2010; VELDHUISEN *et al*., 2011; YOON *et al.*, 2013 segundo dados dos navegadores genômicos Ensembl (Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>.> Acesso em: 14/03/2016).

Também há um polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*), obtido com a enzima *Hind III*, que corresponde ao SNP rs11118133 no intron 27 do gene *CR1* (*g.207589899A>T* ou *g.207589899A>C*). O fragmento de 7,4 kb é o alelo *H* e o de 6,9 kb é o alelo *L* (LIU e NIU, 2009). Há associação entre estes alelos e o número de moléculas CR1, expressas na superfície de membrana de eritrócitos (E-CR1). Alelos *L* em homozigose expressam 100 cópias de CR1/célula (baixa expressão), alelos *H* em homozigose expressam 1000 cópias de CR1/célula (alta expressão) e os heterozigotos (*H/L*) apresentam expressão intermediária (KRYCH-GOLDBERG e ATKINSON, 2001). Além disso, Xiang *et al* (1999) sugerem que a presença de vários SNPs em desequilíbrio de ligação com o RFLP *Hind III*, podem influenciar na estabilidade da

proteína 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).

2.5 MOLÉCULA CR1

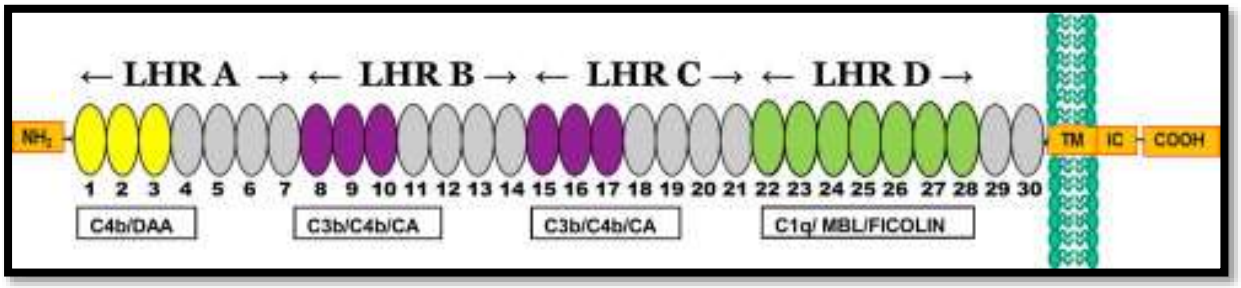
2.5.1 Estrutura

Pertencente à família RCA, CR1 é uma glicoproteina multimodular polimórfica transmembrana de cadeia única, constituída em sua porção extracelular por 30 domínios SCR (também conhecidos como CCP ou domínios sushi), seguido por um curto domínio transmembrana e intracitoplasmático (FURTADO *et al*., 2008; LIU e NIU, 2009; JIN *et al*., 2012; JACQUET *et al*., 2013). Outras formas alélicas de CR1 podem conter 23, 37 ou 44 domínios SCR (LIU e NIU, 2009). Dentro da sequência de CR1, os 30 domínios SCR encontram-se dispostos em grupos de sete, formando quatro longas repetições homólogas (LHR-A, LHR-B, LHR-C e LHR-D), sendo que dois dos 30 SCR constituem os dois domínios terminais (FIGURA 13) (LIU e NIU, 2009).

Funcionalmente, os SCR 1 a 3, presentes no LHR-A, formam o sítio 1, responsável pelo decaimento da C3 convertase em todas as vias do sistema complemento, além de também atuar como sítio ligante de C4b e da proteína PfRh4 da forma merozoíta do *P. falciparum* (LIU e NIU 2009). Já o sítio 2 é composto pelos SCR 8 a 10, presentes no LHR-B, e pelos SCR 15 a 17 do LHR-C, sendo que estes também atuam como co-fator na clivagem de C3b e C4b e também são candidatos a interação com outra proteína de *P. falciparum,* o PfEMP1 (LIU e NIU 2009). O sítio 2 é o principal local 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 corresponde ao SCR 25 presente no LHR-D, sendo que este comporta os antígenos do grupos sanguíneo Knops, tais como Knops (Kna/b), McCoy (McCa/b) e Swain-Langley (Sl1/2) (MOULDS *et al*, 2001; MOULDS, 2010). Além disso, Jacquet

et al. (2013) relatam que os SCR 24 a 25 servem como sítio de ligação para MBL, ficolina 2 e C1q.

FIGURA 13 - ESTRUTURA DA VARIANTE MAIS COMUM DE CR1.



NOTA: Existem três sítios de ligação a C4b (SCR 1-3; 8-10 e 15-17) e dois sítios de ligação de C3b (SCR 8-10 e 15-17). SCRs 22-28 ligam C1q, ficolinas e MBL. Os blocos 24 e 25 carregam antígenos de grupo sanguíneo freqüentes em africanos, mas raros em euro-descendentes. LEGENDA: Cada bloco representa uma SCR. TM, domínio transmembrana; 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 idênticos. Repetições em amarelo são necessárias para a ligação a C4b e atividade de aceleração de decaimento, enquanto aqueles em roxo são necessários para ligação de C3b e C4b e atividade cofatora, e as em verde para ligação a C1q, ficolinas e MBL. FONTE: JAVA *et al*.,(2015).

2.5.2 Função e expressão

A função biológica de CR1 varia, de acordo com a célula onde é expresso (FIGURA 14). Está presente na membrana de células como eritrócitos, neutrófilos, granulócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos B, uma subpopulação de células T CD4+, células dendríticas foliculares, células de Langerhans na pele e podócitos glomerulares, sendo solúvel no plasma e na urina (LIU e NIU, 2009). Noventa por cento do CR1 expresso na membrana de células circulantes encontra-se associado a eritrócitos, devido à grande quantidade relativa destas células. Contudo, a densidade de CR1 na membrana dos eritrócitos é geralmente menor que a densidade em leucócitos (COCKBURN e ROWE., 2006; BIRMINGHAM e HEBERT, 2001). Neutrófilos possuem cerca de 5000 moléculas por célula e este número pode aumentar em cerca de 10x após estimulação celular. Em células B e monócitos, há cerca de 20.000 a 40.000 moléculas por célula (HEBERT *et al.,* 1994) (FIGURA 15).

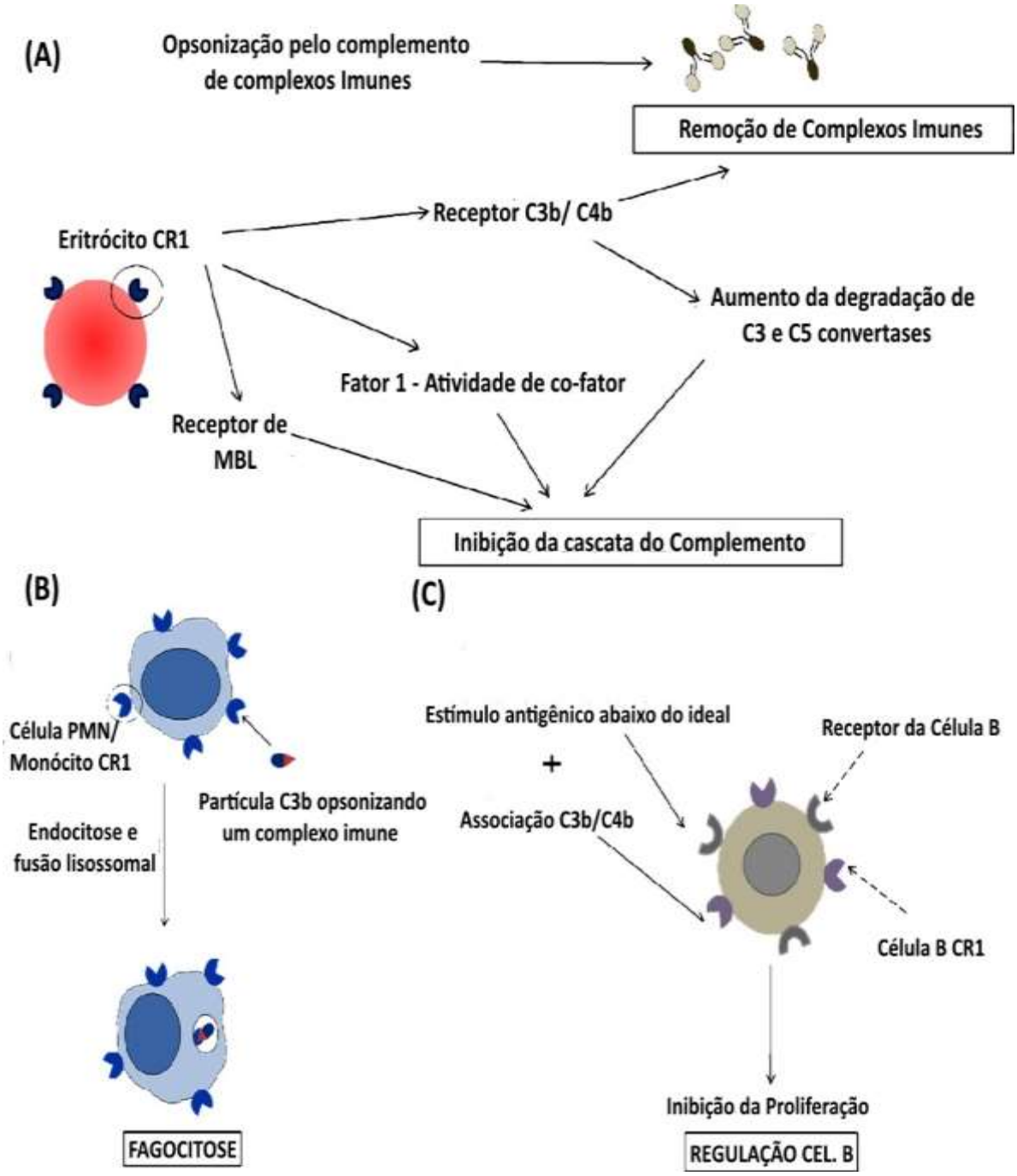
Como regulador negativo do sistema complemento, a molécula de CR1 atua como um receptor para C3b e C4b, aumentando a desestabilização e degradação de C3 e C5 convertases (FURTADO *et al*., 2008; KHERA e DAS, 2009). Também pode atuar como cofator para a inativação do C3b e C4b, regulando a via alternativa (LIU e NIU, 2009). Nas células fagocíticas (PMN – células polimorfonucleares e monócitos),

CR1 liga-se aos fragmentos de C3 (C3b/C4b) e otimiza a fagocitose de partículas, que tenham ativado o sistema complemento (BOACKLE *et al*., 2004; LIU e NIU, 2009). Os receptores Fc-gama e o CR1 operam em conjunto, para promover a absorção de partículas opsonizadas por imunoglobulinas e proteínas do complemento, internalizando-as e destruindo-as nos lisossomos (SENGELOV *et al*., 1994). Em eritrócitos, é responsável pela retirada dos complexos imunes opsonizados por C3b e C4b (FURTADO *et al*, 2008; KHERA e DAS, 2009). Segundo Ghiran *et al.* (2000), CR1 também é um receptor para MBL, mediando a fagocitose de células opsonizadas por esta proteína.

CR1 regula a proliferação de linfócitos B, prevenindo o reconhecimento inadequado de auto-antígenos por estes linfócitos. Se este mecanismo for perturbado, poderá conduzir ao desenvolvimento de desordens auto-imunes. Além disso, linfócitos T CD4+ ativados, com CR1 e CD46 (também chamado proteína cofatora de membrana ou MCP) ligados a partículas C3b, sinergisticamente levam à diferenciação em células T reguladoras, com aumento da expressão de CD25, granzima B e da proliferação celular (KHERA e DAS, 2009; TÖRÖK *et al.*, 2015).

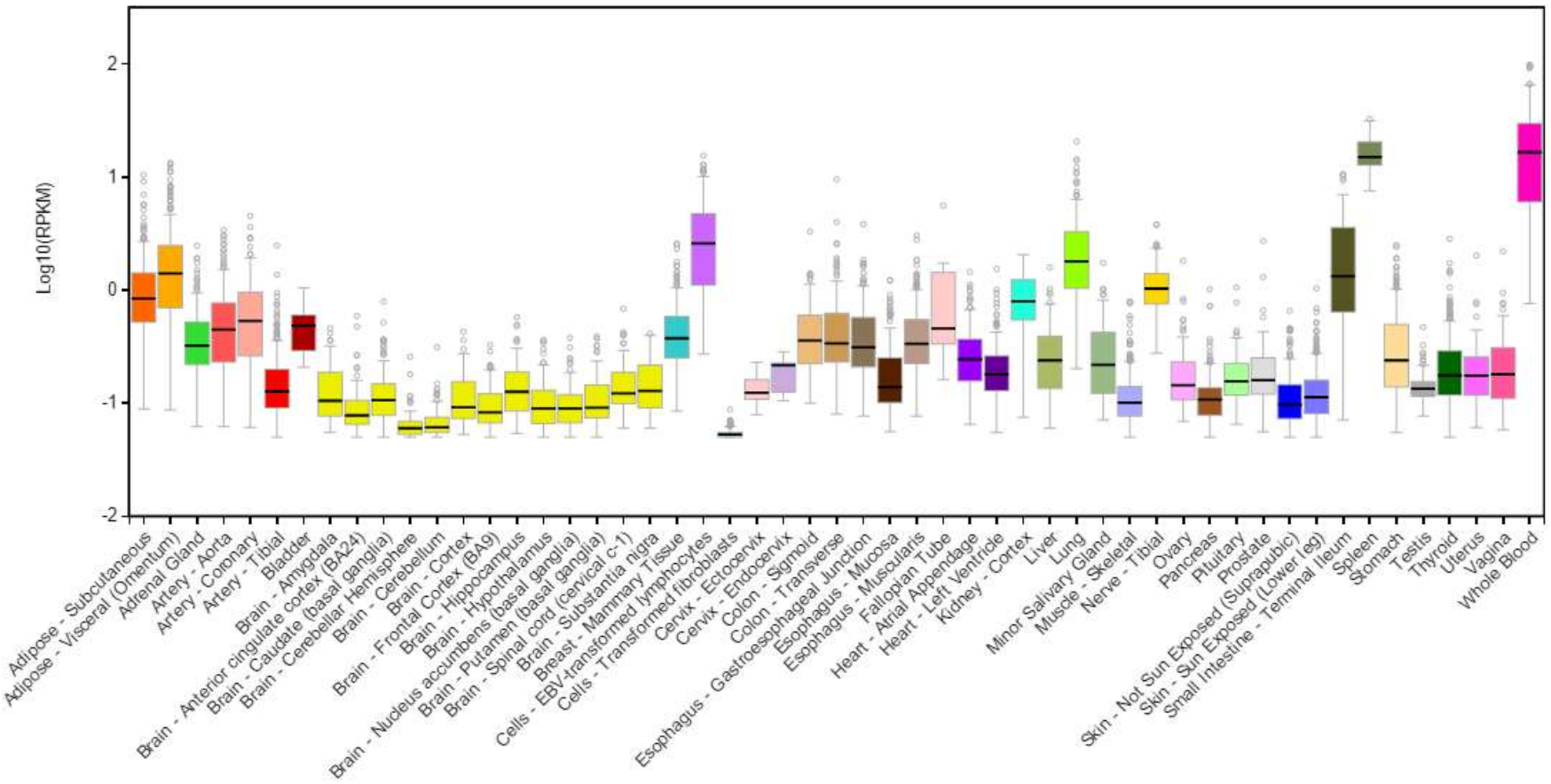
CR1 também pode ser encontrado em forma solúvel (sCR1), sendo resultante de uma clivagem proteolítica na região C-terminal de CR1, em vesículas secretoras terminais ou na membrana (DANIELSSON *et al.,* 1994, HAMER *et al.,* 1998). Possui funções anti-inflamatórias, sendo um potente inibidor da cascata do complemento, com elevado potencial em aplicações terapêuticas (SIVASANKAR *et al*, 1999; KHERA e DAS, 2009).

FIGURA 14 - REGULAÇÃO DA CASCATA DO COMPLEMENTO E DE COMPLEXOS IMUNES PELO RECEPTOR 1 DO COMPLEMENTO (CR1).



LEGENDA: (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. FONTE: Adaptado de KHERA e DAS, 2009.

FIGURA 15 - QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *CR1* EM DIFERENTES TECIDOS.



NOTA: RPKM (Reads per kilobase per million mapped reads) é um método para quantificar a expressão de genes. FONTE: GTEX (Disponível em: < http://goo.gl/GY3riL > Acesso em: 23/09/2015)

2.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE CR1 E DOENÇAS

Atualmente, busca-se avaliar o papel possivelmente modulador de polimorfismos e variações estruturais de *CR1* na susceptibilidade, prognóstico e resposta terapêutica a doenças (KHERA e DAS, 2009). De fato, o polimorfismo de *CR1* tem sido associado a doenças neurodegenerativas, autoimunes e inflamatórias, bem como doenças infecciosas (MORGAN e CARRASQUILLO, 2013). Como exemplo, podemos citar Alzheimer, lupus erimatoso sistêmico, pênfigo foliáceo, malária, leishimaniose e hanseníase.

Na doença de Alzheimer, CR1 pode estar envolvido na depuração de placas β amiloides do cérebro, pois peptídeos Aβ fibrilares ativam a cascata do complemento, tornando-se covalentemente ligados a C3b (OLGIATI *et al*., 2011). Além disso, autores como Brouwers *et al.* (2012) associam a presenã de *CR1-S* com a susceptibilidade à doença de Alzheimer, pois essa isoforma apresenta um sítio adicional de ligação para C3b. Porém, Mahmoudi *et al.* (2015) ressaltam que a densidade dessa isoforma é menor que a da isoforma *CR1-F* no cérebro, o que leva os autores a sugerir que o desenvolvimento da doença se daria pela ineficiência na depuração dos depósitos de placas β amiloides e não apenas pelo aumento da inflamação.

CR1 também está associado a doenças autoimunes. Em lupus eritematoso sistêmico, há baixos níveis de CR1 na membrana de eritrócitos, leucócitos e podócitos glomerulares em pacientes (HAMER *et al*., 1998; ARORA *et al*., 2004). Oliveira (2015) também observou que polimorfismos de *CR1*, assim como a concentração de sCR1 no soro alteram a susceptibilidade ao pênfigo folíaceo e, possivelmente, a manifestação clínica da doença.

Aparentemente, CR1 desempenha um papel importante na malária grave, pois adere à proteína 1 de membrana de eritrócito do *P. falciparum* (PfEMP-1), formando rosetas. 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 (COCKBURN *et al*., 2004; THATHY *et al*., 2005; SINHA *et al*., 2009; HANSSON *et al*., 2013). Já na leishmaniose, observou-se que CR1 pode atuar cooperativamente com Mac-1 a fim de mediar a adesão de promastigotos em eritrócitos e monócitos (ROSENTHAL *et al*., 1996, DOMINGUES e TORAÑO, 1999).

Além disso, *CR1* foi encontrado associado à hanseníase. Schlesinger e Horwitz (1990) observaram que *M. leprae* utiliza o sistema complemento para invadir as células. Isto ocorre pela ligação dos receptores do complemento (CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos) ao componente C3, fixado na superfície bacteriana através do processo de opsonização, mediando a fagocitose. O depósito de C3 ocorre especificamente na molécula glicolípidio fenólico-1 (PGL-1), encontrado em grande quantidade na superfície do bacilo, pela via clássica (SCHLESINGER e HORWITZ,1991 e 1994). Fitness *et al*. (2004) relataram uma associação de proteção à hanseníase em homozigotos (McC^b / McC^b – *G/G*) para o polimorfismo rs17047660, correspondente ao antígeno McCoy do grupo sanguíneo Knops (codificado pelo gene *CR1*). Este alelo é muito mais frequente em africanos, que em outras populações, embora sua frequência também varie entre as populações da África. Devido a esse fato, associações com esse alelo devem ser interpretados com cautela, levando em consideração a sua frequência na população analisada.

Alguns dos polimorfismos já associados a doenças foram escolhidos para o presente estudo de associação (TABELA 4).

TABELA 4: VARIANTES DE *CR1* ANALISADAS NESSE ESTUDO PREVIAMENTE ASSOCIADAS A DOENÇAS.

SNP	Localização no gene	Nucleotídeo Cromossomo 1	Aminoácido ENSP00000356018	Antígeno Sanguíneo	Associação com doenças
rs6656401	Intron 4	*1:g.207518704A>G*	n.s.	n.s.	• Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer (LAMBERT *et al.*, 2009)
rs2274567	Exon 22	Mutação não sinônima *1:g.207580276A>G*	Histidina / Arginina (p.H1208R)	n.s.	• Afeta níveis de expressão de CR1 em eritrócitos (NAITZA *et al.*, 2012) • Proteção contra a malária grave (COCKBURN *et al*., 2004) • Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer, quando presente em certos haplótipos (XIAO-YING *et al.*, 2014)
rs3737002	Exon 26	Mutação não sinônima *1:g.207587428C>T*	Treonina/Metionina (p.T1408M)	York	• Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer, quando presente em certos haplótipos (XIAO-YING *et al.*, 2014)
rs17047660	Exon 29	Mutação não sinônima *1:g.207609511A>G*	Lisina/ Ácido Glutâmico (p.K1590E)	McCoy	• Associado a convulsões causadas por malária (KARIUKI *et al.,* 2013) • Homozigotos McC^{b} aparentam estar protegidos contra a hanseníase (FITNESS *et al.,* 2004)
rs4844610	Intron 37	*1:g.207629207A>C*	n.s.	n.s.	• Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer (HAZRATI *et al,* 2012).
rs12034383	Intron 37	*1:g.207630250G>A*	n.s.	n.s.	• Susceptibilidade aumentada à Doença de Alzheimer (BROUWERS *et al*.,2012) • Afeta níveis de sedimentação em eritrócitos (KULLO *et al.*, 2011)

LEGENDA: n.s.= não se aplica.

3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Pesquisadores que trabalham com os receptores do sistema complemento têm ressaltado a importância destes, em doenças infeciosas. Schlesinger e Horwitz (1990 e 1991) apontam o CR1 como mediador na entrada de *Mycobacterium leprae* no fagócito, através da ligação a C3b e MBL (que opsonizam a bactéria) e subsequente fagocitose, fato já observado para *M. tuberculosis* (SCHLESINGER *et al.*, 1990). Estudos com *Leishmania* já constataram a importância de CR1 na aderência de formas promastigotas do parasita a monócitos e eritrócitos (ROSENTHAL *et al*., 1996, DOMINGUES e TORAÑO, 1999). Além disso, genes do sistema complemento, tais como *MBL*, *FCN1, FCN2* e *MASP2*, anteriormente analisados por nosso grupo, já mostraram associação com a hanseníase, o que demontra que o sistema complemento desempenha um fator crucial nessa doença (DORNELLES *et al.*, 2006; MESSIAS-REASON *et al*., 2007; MESSIAS-REASON *et al*., 2009; BOLDT *et al*., 2013a).

A hipótese levantada neste estudo é a de que determinados polimorfismos podem alterar a expressão do gene e/ou a atividade da proteína CR1 (assim como de sCR1), modulando a susceptibilidade à infecção pela micobactéria e desenvolvimento das formas clínicas da hanseníase. Há somente um estudo a este respeito (FITNESS *et al*., 2004). Devido a essa escassez, e considerando a importância do sistema complemento no desenvolvimento e estabelecimento da infecção pela *M. leprae*, a realização de uma pesquisa que esclareça melhor o papel de CR1 e seus polimorfismos dentro da hanseníase, torna-se necessária.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar possíveis associações entre polimorfismos do gene *CR1*, níveis de expressão de mRNA e da proteína CR1 solúvel (sCR1) e a susceptibilidade à hanseníase *per se*, assim como a suas diferentes formas clínicas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar reações em cadeia da polimerase com dois pares ou mais de iniciadores sequência específicos (PCR-SSP multiplex) para polimorfismos com relevância clínica do gene *CR1,* visando uma rápida haplotipagem física;
- Descrever os haplótipos de polimorfismos de CR1 em pacientes de hanseníase e controles;
- Verificar possíveis associações entre polimorfismos de *CR1* e a susceptibilidade à hanseníase *per se* e à sua forma virchowiana;
- Descrever a expressão de mRNA de *CR1* em pacientes de hanseníase e controles;
- Descrever os níveis séricos de sCR1 em pacientes de hanseníase e controles;
- Verificar possíveis associações entre os genótipos, expressão de mRNA e níveis séricos de sCR1;
- Avaliar possíveis associações entre a expressão do gene (ao nível de mRNA e proteína) e a susceptibilidade à hanseníase *per se* e à sua forma virchowiana.
- Avaliar uma possível correlação entre os níveis de sCR1 e de MBL e a atividade da via das lectinas do complemento.

5 ARTIGO

CR1 association with leprosy in Brazil

Gabriela Canalli Kretzschmar[1], Luana Caroline Oliveira[1], Renato Mitsunori Nisihara[2], Thyrumalaisamy Palanichamy Velavan[3], Sérvio Túlio Stinghen[2], Ewalda R. S. Stahlke[4], Danielle Malheiros Ferreira[1], Maria Luiza Petzl-Erler[1], Iara José de Messias-Reason[2], Angelica Beate Winter Boldt[1,2].

[1] Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
[2] Laboratory of Molecular Imunopathology, Department of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
[3] Human Parasitology, Institut für Tropenmedizin, University Tübingen, Tübingen, Germany.
[4]Departamento Estadual de Saúde 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

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligate intracellular pathogens *Mycobacterium leprae* and *M. lepromatosis*, which invade macrophages and Schwann cells. Complement receptor 1 (CR1) binds to C3b/C4b fragments and to mannose binding lectin (MBL) deposited on opsonized bacteria, facilitating bacterial entrance into phagocytes. In this work, we developed a multiplex PCR sequence-specific assay and haplotyped nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 213 leprosy patients and 297 controls - rs6656401 (*1:g.207518704A>G* in intron 4), rs3849266 (*1:g.207579645C>T* in intron 21), rs2274567 (*1:g.207580276A>G* in exon 22, encoding p.His1208Arg), rs3737002 (*1:g.207587428C>T* in exon 26, encoding p.Thr1408Met of the York blood group), rs11118131 (*1:g.207587851C>T* in intron 26), rs11118167 (*1:g.207608809T>C* in intron 28), rs17047660 (*1:g.207609511A>G* in exon 29, encoding p.Lys1590Glu of the McCoy blood group), rs4844610 (*1:g.207629207A>C* in intron 37) and rs12034383 (*1:g.207630250G>A* in intron 37), measuring mRNA and soluble CR1 levels in a subset of up to 80 samples. Distribution of SNP alleles in controls was in Hardy and Weinberg equilibrium. We identified 18 haplotypes, whose frequencies differed between ethnic groups (P<0.000001). Afro-Brazilians with the **4* haplotype presented almost four times increased susceptibility to leprosy (OR=3.89, p=0.003), but those with the **1* haplotype were protected (OR=0.24, p=0.011). Euro-Brazilians with the intronic rs3849266 *g.207579645T* allele presented higher susceptibility to leprosy (OR=1.63, p=0.028), especially those with the recombinant **3B2B.3A2B.3B1* haplotype (OR=2.57, p=0.019). The **1* haplotype, in contrast to Afro-Brazilians, was associated with the lepromatous form in Euro-descendants (OR=3.25, p=0.015). These haplotypes remained associated in the total sample, as well as **2* and **2.3B2B,* encoding the McCoy p.1590E antigen (OR=2.49, p=0.028). Carriers of the rs11118167 *g.117682C* allele presented higher mRNA expression, than *T/T* homozygotes (p=0.036). Yet Euro-Brazilians with the rs12034383 *g.207630250A* allele presented higher sCR1 concentration, compared to *G/G* homozygotes (p=0.0175). There was also a negative correlation between sCR1 and MBL levels (r= -0.52; p=0.007). The results lead us to suggest that CR1 polymorphisms modulate gene expression and sCR1 levels, as well as susceptibility to leprosy, but the associated effects depend on the ethnic origin.

Keywords: Leprosy, *CR1* polymorphism, mRNA, sCR1

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and *M. lepromatosis* [1], that primarily affects the skin and peripheral nervous system, later reaching other organs and systems [2-3]. With a broad clinical spectrum between two antagonistic poles, patients can present from paucibacillary tuberculoid to multibacillary lepromatous disease [4]. The interaction between mycobacteria and the host is highly complex and disease outcome depends on the quality of immune response [5]. Leprosy has been reported for millennia in many ancient cultures, being currently common and causing great social stigma for affected individuals in India, Brazil, Indonesia, Bangladesh, Democratic Republic of Congo, Ethiopia, Nepal and Nigeria [6-7]. In Brazil, the state with highest prevalence is Mato Grosso (9.03 cases / 10.000 inhabitants) [8].

Entrance of mycobacteria in macrophages is mediated by complement receptors such as CR1 (complement receptor 1, also known as CD35), which binds C3b/C4b complement fragments deposited on the opsonized bacteria [9]. In addition, CR1 recognizes mannose binding lectin (MBL), a protein able to activate the lectin pathway of complement and to modulate susceptibility to leprosy [10-12]. CR1 is a glycoprotein belonging to the family of regulatory proteins of complement activation (RCA), which is mainly expressed by erythrocytes, phagocytes, B and T cells, and can be membrane-bound or soluble [13]. Some *CR1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with the susceptibility to infectious [14-15], autoimmune [16-18] and neurodegenerative diseases, especially Alzheimer [19]. Despite the importance of this receptor in mycobacteria internalization, we found only one association study investigating this gene on leprosy, reporting a protective association with the McCoy^{b} allele [15]. In this work, we aim to fill in this gap by investigating *CR1* polymorphisms, mRNA expression levels and sCR1 serum levels in Brazilian leprosy patients.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and samples

A total of 213 leprosy patients were recruited in two different regions, 144 in South Brazil (Dermatology Service at the Clinical Hospital – UFPR and Regional Center for Metropolitan Specialties, both in Curitiba - PR) and 69 in Centralwest Brazil, (Reference Center for Leprosy and Tuberculosis City Hall, SINOP – MT). Individuals with confirmed clinical diagnosis of leprosy and older than 18 years old, were included. Patients with skin conditions other than leprosy (either autoimmune or infectious), were excluded. All patients were informed about the research and signed a term of informed consent. All subjects were classified according to ethnic origin, based on physical characteristics and self-reported ancestry. Patients were classified as either paucibacillary (PB) or multibacillary (MB), according to clinical presentation and bacilloscopy results, following recommendations of the World Health Organization (WHO). Controls included 222 blood donors from South Brazil (Paraná Hematology Center – HEMEPAR) and 75 health workers and volunteers from Central-Western Brazil (Reference Center for Leprosy and Tuberculosis of SINOP - MT and Adventist Hospital of Pemphigus, Campo Grande - MS). Clinical and demographic characteristics of the participants of this study are listed in Table 1.The Ethics Committee of the Federal University of Paraná (Clinical Hospital) approved this study (protocols 218.104 and 279.970).

CR1 genotyping

We extracted genomic DNA samples of individuals from Curitiba (PR) and SINOP (MT) from buffy coat with the commercial kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, USA), according to the manufacturer's recommendations, and from Campo Grande, MS, using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol for blood [20].

We did not evaluate copy number variants (CNVs), 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* (Suppl. Figure 1). These SNPs were select at least by: (1) being previously associated with disease (as reported in the literature), (2) or being a tag SNP with $r^2 \geq 0.8$ in European (Utah – USA), Mexican, Colombian

or Yoruba populations of the 1000 Genomes Project [21] available in http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers [1]; (3) or by presenting a minor allele frequency higher than 0.05[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 York 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 developed two multiplex PCR-SSP, each allowing for simultaneous identification of four SNPs, by coamplification of DNA fragments differing in size by at least 100 bp. Each reaction included generic primers for the amplification of a non-specific fragment, as a quality control. By this method, it is possible to optimize the amount of DNA sample, time, materials and reagents. In addition to the two multiplex PCR-SSP reactions, we performed a simple PCR-SSP for genotyping an isolated SNP. The sequence of SSPs and control primers are shown in Table 2. All reactions (including one simple PCR-SSP) were carried out in a final volume of 8 µl, 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 33 (simple PCR-SSP and multiplex PCR-SSP 2) or 35 (multiplex PCR-SSP 1) cycles, where each cycle began with 94°C for 20 s and ended with 72°C (extension step) for 40 s. We evaluated the pattern of amplificated fragments after electrophoretic run on 1% agarose gel, stained with Sybrsafe (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA) (Suppl. Figure 2).

For the simple PCR-SSP, where we discriminated the rs6656401 alleles, the annealing temperatures of the primers were 58°C for the initial 11 cycles, 55°C for the following 11 cycles and 52°C for the last 11 cycles. We used 0.3 µM of each SSP

1. A figura 16 do apêndice da dissertação apresenta o plot do desequilíbrio de ligação entre polimorfismos comuns do gene *CR1,* em populações do projeto HapMap.

2 As frequências alélicas dos SNPs de *CR1* estão listadas na tabela 5 do apêndice da dissertação.

and 0.1 µM of each control primer, in the presence of 1.5 mM $MgCl_2$ and 0.04 units of Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA).

In the PCR-SSP multiplex 1, the annealing temperatures of the primers were 59°C for the initial 8 cycles, 57°C for the following 7 cycles, 55ºC for the another 10 cycles and 53°C for the last 10 cycles. We used 0.5 µM of SSPs for discriminating the alleles of rs3737002 and rs11118131, 0.6 µM of specific primers for rs11118167 and rs17047660, 0.06 µM of each control primer, in the presence of 1.5 mM $MgCl_2$ and 0.2 units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA).

In the PCR-SSP multiplex 2, the annealing temperatures of the primers were 63°C for the initial 6 cycles, 61°C for the following 16 cycles, 59ºC for the last 11 cycles. We used 0.18 µM of specific primers for discriminating the alleles of rs3849266 and rs2274567, 0.4 µM of SSPs for rs4844610 and rs12034383, 0.08 µM of each control primer, in the presence of 2 mM $MgCl_2$ and 0.3 units of Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA).

mRNA Quantification

We collected blood from SINOP-MT controls and patients using tubes of the PAXgene® Blood RNA system (PreAnalytiX, QIAGEN / BD®) and extracted total stabilized RNA with the PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX, QIAGEN / BD®), according to the manufacturer's instructions. Following RNA concentration measurements in the 1000 version 3.7.1 NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®, Inc., Massachusetts, USA), we produced cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), and measured *CR1* mRNA levels by quantitative real-time Taqman PCR (no UNG Applied Biosystems®) in ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). To this end, we used the TaqMan inventoried assay Hs00559348_m1, with a probe specific for the exon-exon junction encoding the CR1 domain most proximal to the cell membrane, common to the most abundant *CR1* mRNA transcripts.
All assays were conducted in duplicate and the relative mRNA levels were normalized for mRNA expression of the Beta-glucuronidase gene (*GUSB*) using the TaqMan inventoried assay 4333767F. Cq values (threshold cycle) were calculated using the

Viia 7 Software v1.2 (Applied Biosystems, USA), and gene expression with the comparative Cq method 2-ΔΔCq [22].

sCR1 Quantification

We measured sCR1 levels in the serum of 58 leprosy patients (30 multibacillary and 28 paucibacillary) and 22 healthy controls with similar ethnic frequencies, presenting alleles associated with the disease (Curitiba-PR and SINOP-MT). We used SEB123Hu ELISA kit (USCN Life Science Inc., Wuhan, China), according to the manufacturer's instructions. We correlated these results with previously measured MBL levels and MBL-MASP-2-C4 complex deposition in 30 of the same patients [11].

Statistical and bioinformatical analysis

Allele, genotype and haplotype frequencies were obtained by direct counting. Genotype distributions of control and patient groups were compared between Euro- and Afro-Brazilians from Curitiba-PR and SINOP-MT, using the exact test of population differentiation of Raymond and Rousset, implemented in the Arlequin software package v.5.1 [23]. Highly significant differences were found between Euro and Afro-Brazilian groups, especially in Curitiba-PR ($P<0.000001$ for controls and $P=0.00099$ for patients). Thus, all other analyzes were done within the Euro-Brazilian and Afro-Brazilians[3] ethnic groups, or in the total sample groups, corrected for age, sex and ethnic group distribution, using logistic regression with the software STATA v.9.2 (Statacorps, Lakeway Drive, TX). The hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated with the exact test of Guo & Thompson, also implemented in Arlequin v.5.1. Linkage disequilibrium was evaluated with Haploview 4.2 [24]. Extended haplotypes were manually reconstructed based on linkage disequilibrium and phase information (obtained by the PCR-SSP amplification). Average discrepancy between the frequencies of manually reconstructed haplotypes and those obtained with the EM algorithm (expectation maximization, implemented in Arlequin v.5.1) was 8.6%. Distribution of polymorphisms and haplotypes between patients and controls, adjusted according to ethnicity and gender, were compared using Fisher's exact test. Normality tests (D'Agostino & Pearson and Shapiro-Wilk

[3] Resultados totais encontram-se na Tabela 6 no apêndice da dissertação

test), correlation tests (Spearman) and non parametric comparisons between medians of *CR1* mRNA and sCR1 levels (with Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests) were made using the program GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software) [25].

RESULTS

CR1 SNPs and susceptibility to Leprosy

Genotype distribution followed the predictions of Hardy-Weinberg equilibrium in Euro- and Afro-Brazilian control groups, but greatly differed one from another (Figure 1), especially in Southern Brazil (P<0.000001). Thus, some genetic associations were specific for one ethnic group, independent of age and sex distribution. In Afro-Brazilians, carriers of the *g.207518704A* allele of rs6656401 (in intron 4) and of the *g.207629207A* allele of rs4844610 (in intron 37) occurred in absolute linkage disequilibrium and were more frequent among leprosy patients, than controls (17/45 or 37.8% vs. 11/81 or 13.6%, respectively, OR=3.89 [95%CI=1.57-9.66], p=0.003). In Euro-Brazilians, there were more individuals with the *g.207579645T* allele of rs3849266 (intron 21) among patients, than among controls (98/168 or 58.3% vs. 106/216 or 49.1%, respectively, OR=1.63 [95%CI=1.05-2.53], p=0.028). The distribution of the *g.207609511G* (p.1590E) allele of rs17047660 (exon 29) followed the same pattern in both ethnic groups, nevertheless being much more common in Afro-Brazilians. Individuals with this allele were more frequent among patients, than controls, but significance was only reached after correction for age and ethnic group (18/213 or 8.5% vs. 15/297 or 5.1 %, respectively, OR=2.49 [95%CI=1.10-5.59], p=0.028).

CR1 haplotypes and susceptibility to Leprosy

There was strong linkage disequilibrium (LD) between all pairs of SNPs in Euro-Brazilians, excepting rs11118167 in intron 28 and rs17047660 in exon 29 (p.K1590E, responsible for the McCoy antigen). Only SNPs in the region covering introns 21 - 26 remained in DL in Afro-Brazilians (r^2= 0.82 to 0.93, Suppl. Figure 3)[4]. Nevertheless, we were able to reconstruct haplotypes based on phase information obtained with

[4] Plots de correlação de desequilíbrio de ligação encontram-se na Figura 17 do apêndice da dissertação.

SSP amplification and found 18 haplotypes, half of which possibly recombinants. We named them according to the phylogenetic nomenclature suggested by others [26], adapted for recombinant haplotypes [27] (Figure 2). 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 three recombinant haplotypes (**2.3B2B*, **3A2A.2* and **3B2B.2*) are unique in that they harbor the *1:g.207609511G* allele in exon 29, encoding p.1590Glu, responsible for the McCoy McC^{b} blood group antigen (rs17047660). On the other hand, all haplotypes of clade **3A* and one recombinant (**3A2A.2*) encode p.1208Arg, due to the *1:g.207580276G* allele in exon 22 (rs2274567). Yet clade **3B* harbors all haplotypes with the *1:g.207630250A* allele in intron 37 (rs12034383). They are probably involved in the generation of most recombinant haplotypes, since they reach, together, a frequency higher than 40% (Table 3)[5]. For example, the York Yk^{a}+ 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*), but also by six recombinant haplotypes (**1.3B2B*, *1.3B2B.1*, **1.3B2B.3A2B.3B1*, **3B2B.1*, **3B2B.2* and **3B2B.3A2B.3B1*).

As expected, some haplotype associations were specific for an ethnic group, independent of sex and age distribution. Since the **4* haplotype is the only one with the *g.207518704A* allele of rs6656401 (in intron 4) and the *g.207629207A* allele of rs4844610 (in intron 37), Afro-Brazilians with this haplotype presented almost four times increased susceptibility to leprosy *per se,* as mentioned earlier for these SNPs (OR=3.89 [95%CI=1.57-9.66], p=0.003). On the other hand, the **1* haplotype was associated with protection against leprosy (5/90 or 5.6% in patients vs. 27/162 or 16.7% in controls, OR=0.24 [95%CI=0.08-0.72], p=0.011). There was also a trend for a protective effect of the **3A2A* haplotype, restricted to Afro-Brazilians (OR=0.32 [95%CI=0.1-1.0], p=0.055).

In Euro-Brazilians, the recombinant **3B2B.3A2B.3B1* haplotype was associated with susceptibility to leprosy *per se* (20/336 or 6% in patients vs. 12/432 or 2.8% in

[5] Os resultados do teste exato de Fisher e de OR para frequências alélicas e haplotípicas em cada grupo étnico e na amostra total, encontram-se na Tabela 7 e 8 do apêndice da dissertação.

controls, OR=2.57 [95%CI=1.17-5.66], p=0.019) and the **1* haplotype, with susceptibility to the lepromatous clinical form (OR=3.25 [95%CI=1.26-8.34], p=0.015). Both haplotypes remained associated in the total sample (Table 3, supplementary Tables 1 and 2).

CR1 mRNA and sCR1 expression

Neither *CR1* mRNA expression, nor sCR1 concentration, differed between patients and controls, or between clinical types[6]. Carriers of the rs11118167 *g.117682C* allele in intron 28 presented higher mRNA expression, than homozygous *T/T* subjects (p=0.036) (Figure 3A). This allele is unique to the **3A2B* haplotype and three other recombinant haplotypes. As expected, individuals with the **3A2B* haplotype have have almost twice the chance to increase *CR1* mRNA expression, compared with all others (OR=1.98 [95%CI=1.1-3.56], p=0.024). Regarding sCR1 levels, Euro-Brazilian carriers of the rs12034383 *g.207630250A* allele in intron 37 presented higher sCR1 concentration, compared with *G/G* homozygotes (p=0.0175) (Figure 3B).

We found no correlation between mRNA expression and sCR1 concentration. However, there was a negative correlation between the concentration of sCR1 and MBL (r= -0.52; p=0.007) (Figure 4), and a trend in the same direction with the deposition of MBL-MASP-2-C4 complexes, a measure of the degree of lectin pathway activation (r= -0.70; p= 0.087).

DISCUSSION

Mycobacterium leprae uses the complement receptor CR1 as a gateway into the host cell [9]. Thus, polymorphisms in the *CR1* gene potentially influence establishment of infection and development of the disease [15]. As happened with other genes encoding typical erythrocyte proteins, the *CR1* polymorphism has probably been shaped by natural selection for malaria resistance in Africa [19, 28]. This leads one to expect a high genetic differentiation between ethnic groups historically submitted

[6] Valores de mediana, mínimo e máximo, número amostral e valor de P encontram-se nas tabelas 9 e 10 do apêndice da dissertação.

to contrasting evolutionary pressures, explaining the different associations found in this study.

Regarding the Afro-Brazilian group, we found that individuals with the **4* haplotype presented around four times higher susceptibility to leprosy. The **4* haplotype differs from all other haplotypes identified in this study, by the *g.27577A* allele (rs6656401 in intron 4) and the *g.138080A* allele (rs4844610 in intron 37). Interestingly, *g.27577A* has been associated with susceptibility to Alzheimer's disease in large GWAS studies [19,30]. Mahmoudi *et al*. [31] observed in Caucasian subjects an association between this allele and the expression of *CR1* allelic isoforms, generated by non-homologous recombination. They found that 95% of *GG* homozygotes expressed the *CR1-F* isoform (most common and with four long homologus repeats, or LHRs). Individuals with the *AG* genotype expressed both *CR1-F* and *CR1-S* (isoform with an additional LHR, resulting in an additional site for binding C3b/C4b), whereas *AA* homozygotes only expressed *CR1-S*. Thus, the additional site for C3b/C4b binding, found in *CR1-S* isoforms, may facilitate entry of mycobacteria in the cell, explaining an increased risk for successful infection. The association with *g.138080A* (rs4844610 in intron 37) is most probably a hitch-hiking effect, as suggested by others for Alzheimer's disease [32].

Euro-Brazilians with the rs3849266 *g.207579645T* allele in intron 21 presented twice higher susceptibility to leprosy, especially those with the recombinant **3B2B.3A2B.3B1* haplotype. This allele is located in a regulatory region bound by the transcriptional repressor CTCF (CCCTC binding factor), as well as nine other regulatory proteins [33-34]. The CTCF (protein zinc finger) regulates transcription, binding chromatin isolators [35-36]. Mutations in the DNA sequence recognized by this protein have been associated with cancer, most probably due to an interference with epigenetic regulation [35].

There were contrasting associations between the Euro and Afro-Brazilian ethnic groups. Afro-Brazilian individuals with the most ancestral **1* haplotype were protected against leprosy *per se*. In contrast, this haplotype was associated with three times higher susceptibility to the lepromatous form in Euro-descendant carriers. Also in contrast with a previous association study (the only one investigating *CR1* in leprosy), where the McCoy p.1590E blood group antigen was associated with protection

against leprosy [15], we found that individuals with the **2* and **2.3B2B* haplotypes, encoding the same antigen, have two times higher susceptibility to the disease. These different associations should be clarified by the investigation of larger sample sizes, replication in cohorts sharing the same ethnic origin and functional analysis.

By analyzing mRNA levels of the most common *CR1* transcripts, we observed that *g.117682C* allele carriers (of rs11118167 in intron 28) have higher mRNA expression, compared with *T/T* homozygotes. Individuals with the **3A2B* haplotype, the most frequent haplotype with the *C* allele, have almost twice the chance to increase *CR1* mRNA expression. Interestingly, the *T* allele generates a premature stop codon in a region subjected to nonsense mediated decay (NMD) in the transcript ENST00000534202, justifying a reduction in mRNA expression in *T/T* individuals. Alternatively, the association can rely on alternative pre-mRNA splicing, which can provide a significant reduction in measured mRNA levels of certain transcripts [37].

Regarding sCR1 concentrations, we observed that Euro-Brazilians with the rs12034383 *g.207630250A* allele presented higher sCR1 levels, compared with *G/G* homozygotes. The *g.207630250A* allele occurs in the most frequent haplotypes, belonging to the phylogenetic clade **3B.* Since sCR1 is a potent complement cascade inhibitor [13], it is possible that the frequency of these haplotypes increased in the human population, due to selective advantage given by its anti-inflammatory effect. This SNP was already associated with Alzheimer's disease, where homozygous *AA* individuals had about 20% increase in amyloid Aß cerebrospinal fluid levels [38]. Furthermore, it was also associated with erythrocyte sedimentation rate [39]. Finally, higher sCR1 levels correlated negatively with MBL levels, followed by a trend in reduction of lectin pathway activation. This is in accordance with the inhibitory role played by sCR1 against complement activation [13].

Although we found some *CR1* polymorphisms modulating gene expression and sCR1 levels, the same SNPs were not associated with leprosy. This leads us to suggest that the associated effects most probably rely on the efficiency of phagocytic activity, which was not measured in this study. Furthermore, we found that the associated effects do depend on ethnic origin. Although these results should first be replicated in other cohorts and larger sample sizes, they lead us to call attention to association studies with genes encoding erythrocyte proteins, whose polymorphisms are

probably subjected to natural selection, as those for malaria resistance. In conclusion, different *CR1* polymorphisms probably modulate susceptibility to leprosy, depending on the ethnic origin of the population.

ACKNOWLEDGEMENTS

The subjects of this investigation were informed about the aims of the study and their consent to participate is gratefully acknowledged. We are also thankful to the medical staff of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná and of the Sanitary and Dermatologic Hospital of Paraná for patient recruitment, to the staff of the Laboratório de Imunopatologia Molecular in Curitiba for DNA extraction.

FUNDING

This work was supported by CNPq and a CAPES scholarship for G.C.K.

References

[1] Han, X. *et al.* A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. American Journal of Clinical Pathology, v. 130, p. 856-864, 2008.

[2] Souza, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Medicina, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, 1997.

[3] Prevedello, F.C.; Mira, M.T. Hanseníase: uma doença genética? Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 82, n. 5, p. 451-459, 2007.

[4] Araújo, M.G. Hanseníase no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.

[5] Goulart, I.M.B.; Penna, G.O.; Cunha, G. Imunopatologia da hanseníase a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

[6] World Health Organization. Global leprosy situation. The Weekly Epidemiological Record, v. 89, n.36, p. 389–400, 2014.

[7] Han, X.; Silva, F. On the Age of Leprosy. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2014.

[8] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase, 2014. Disponível em: <http://goo.gl/ESc7cz>. Acesso em 15/03/16).

[9] Schlesinger, L.S.; Horwitz, M.A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. The Journal of Clinical Investigation, v. 85, p. 1304-1314, 1990.

[10] Garred P. *et al.* A. Dual role of mannan-binding protein in infections - another case of heterosis. European Journal of Immunogenetics, v. 21, p.125–131, 1994.

[11] Dornelles, L.N., Pereira-Ferrari, L. & Messias-Reason, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: Deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. Clinical and Experimental Immunology, 145, p. 463-468, 2006.

[12] Messias-Reason, I.J., *et al.* The association between Mannan-Binding Lectin gene polymorphism and clinical Leprosy: new insight into an old paradigm. The Journal of Infectious Diseases, v. 196, p.1379–1385, 2007.

[13] Khera, R.; Das, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. Molecular Immunology. v. 46, p. 761–772, 2009.

[14] Kariuki, S.M. *et al.* The genetic risk of acute seizures in African children with falciparum malária. Epilepsia, v. 54, n. 6, p. 990–1001, 2013.

[15] Fitness, J. *et al.* Leprosy susceptibility in the Karonga district of Malawi. American Journal Tropical Medicine Hygiene, v. 71, n. 3, p. 330–340, 2004.

[16] Arora, V. *et al.* Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus. Molecular Immunology, v. 41, p. 449-456, 2004.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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, p. 1094-1200, 2009.

[20] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning – a laboratory manual. 2 ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[21] 1000 Genomes Project – available in http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers.

[22] Livak, K.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. Methods, v.25, p. 402-408, 2001.

[23] Arlequin v.3.1. Disponível em http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/.

[24] Haploview v.4.2. Disponível em: http://broadinstitute.org/haploview/haploview.

[25] GraphPad Prism v. 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, Disponível em: www.graphpad.com.

[26] Nebert, D.W. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. Human Mutation, v. 20, p.463–72, 2002.

[27] Boldt, A.B.W. *et al.* Multiplex sequence-specific PCR reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and Map19 serum levels. Human Immunology. v. 72, p. 753-760, 2011.

[28] Rowe, J.A. *et al.* P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. Nature, v. 388, p. 292-295, 1997.

[29] 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.

[30] Lord, J.; Morgan, M. Complement Component (3b/4b) Receptor 1 (CR1). Genetic Variants in Alzheimer's Disease, p. 77-101, 2013.

[31] Mahmoudi, R. *et al.* Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform. Neurobiology of Aging, v. 36, p. 1766.e5-12, 2015.

[32] Hazrati, L.N. *et al.* Genetic association of CR1 with Alzheimer’s disease: a tentative disease mechanism. Neurobiology of Aging, v. 33, n. 12, p. 2949, 2012.

[33]ENSEMBL GENOME BROWSER. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html > Acesso em: 13/02/2016.

[34] 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: 15/03/2016.

[35] Ohlsson, R.; Renkawitz, R., Lobanenkov, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. Trends in Genetics, v. 17, n. 9, p. 520-527, 2001.

[36] Cuddapah, S. *et al.* Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. Genome Research, v. 19, p. 24-32, 2009.

[37] Brogna, S.; Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. Nature structural & molecular biology, v.16, n.2, p. 107-113, 2009.

[38] 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.

[39] Kullo, I.J. *et. al.* Complement Receptor 1 Gene Variants are Associated with Erythrocyte Sedimentation Rate. The American Journal of Human Genetics, v. 89, n. 1, p. 131-138, 2011.

[40] Probst, C.M, *et al.* HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. Human Biology, v.72, n. 4, p.597-617, 2000.

[41] Braun-Prado K, *et al.* HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. Tissue Antigens, v.56, p.417, 2000.

[42] Oliveira, L.C. Estudo de associação entre polimorfismos e níveis séricos do receptor 1 do complemento e o penfigo foliáceo.113 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

Table 1 – Demographic data of leprosy patients and controls.

Category *	Euro-Brazilian		Afro-Brazilian	
	Control n= 216	**Patient** n= 168	**Control** n= 81	**Patient** n= 45
LOCATION (%)				
South	87.8		17.2	
	84.3	72	49.4	51.1
Central-Western	56.2		43.8	
	15.7	28	50.6	48.9
SEX (%)				
Male	51.9	57.7	49.4	66.7
AGE				
Median (min/max)	39 (19-76)	50 (18-94)	37 (18-69)	44 (20-90)
CLINICAL TYPE (%)				
MB	-	53.9	-	46.2
PB	-	46.1	-	53.8

Ethnicity was broadly defined based on physical aspects and informations of ancestry. This strategy has been formerly confirmed by HLA genotyping [40- 41], where at least 75% of the genetic component of Euro-Brazilians was found to be of European origin and at least 25% of the genetic component in Afro-Brazilians was found to be of African origin. South= Curitiba/PR; Centralwestern= SINOP - MT and Campo Grande - MS. For the clinical type MB: multibacillary; PB: paucibacillary.

Table 2. Sequence-specific primers* for selected *CR1* polymorphisms.

FORWARD PRIMERS				REVERSE PRIMERS			
Multi.	**SNP**	**Loc.**	**5'→3' Sequence**	**SNP**	**Loc.**	**5'→3' Sequence**	**Frag.**
Simple PCR	rs6656401	Intron 4	5′CTCTGTCTCCATCTTCTC**A** 3′ 5′CTCTGTCTCCATCTTCTC**G** 3′	**Generic Primer**	Intron 4	5′CATAGTTGTAGTTGGGGATT**G** 3′	257bp
Multi.2	rs3849266	Intron 21	5′CTGATGGCTTGGGGTA**T** 3′ 5′CTGATGGCTTGGGGTA**C** 3′	**rs2274567**	Exon 22	5′CTCAATCTGCATTGATCCA**C** 3′ 5′CTCAATCTGCATTGATCCA**T** 3′	667bp
Multi.2	rs4844610	Intron 37	5′CTACACAAAACAGCCTTGT**A** 3′ 5′CTACACAAAACAGCCTTGT**C** 3′	**rs12034383**	Intron 37	5′AGATGTCCATGCCTTAA**C** 3′ 5′AGATGTCCATGCCTTAA**T** 3′	1080bp
Multi.1	rs3737002	Exon 26	5′CCATTTGCCAGTCCTA**C** 3′ 5′CCATTTGCCAGTCCTA**T** 3′	**rs11118131**	Intron 26	5′CAAGAAGAAGGGGTGAT**G** 3′ 5′CAAGAAGAAGGGGTGAT**A** 3′	457bp
Multi.1	rs11118167	Intron 28	5′GCCAATATGTGAATATTATTATCTTA**T** 3′ 5′GCCAATATGTGAATATTATTATCTTA**C** 3′	**rs17047660**	Exon 29	5′TTCTGGAGCTGTGCATT**T** 3′ 5′TTCTGGAGCTGTGCATT**C** 3′	746bp
Control Primers							
Multi. 2 / Simple PCR		HGHf	5′TGCCTTCCCAACCATTCCCTT**A** 3′		HGHr	5′CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTT**C** 3′	431bp
Multi. 1		*HLA*-Ef	5′CGGGACTGACTAAGGGGCG**G** 3′		*HLA*-Er	5′GTAGCCCTGTGGACCCTCTTA**C** 3′	324bp

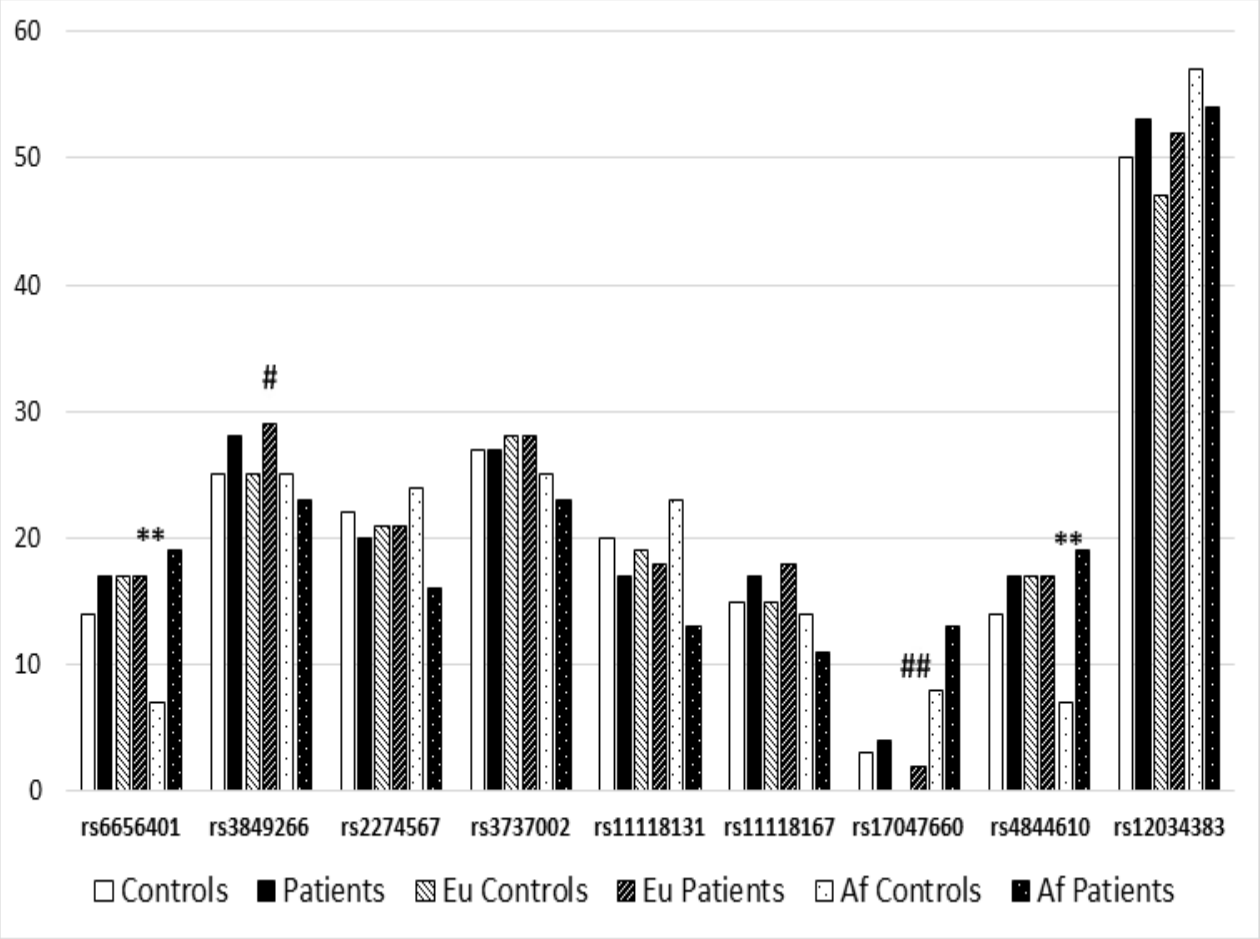
In bold: variant nucleotide. * excepting the generic and control primers. Multi.: multiplex; Loc.: localization; SNP: single nucleotide polymorphism; bp: base pairs; Frag.: Fragment; HGH: human growth hormone; *HLA*-E: Human leukocyte E antigen; f: forward; r: reverse. SOURCE: the autor and [42].

Table 3. Frequencies of *CR1* haplotypes.

Phylogenetic	Nucleotide	Co		Pat					MB		PB				
Haplotypes	**sequence**	**n**	**%**	**n**	**%**	**OR**	**IC**	**P**	**n**	**%**	**n**	**%**	**OR**	**IC**	**P**
***1**	***GCACCTACG***	60	10.1	40	9.4			n.s	26	13	10	5.5	**3.04**	**1.31-7.07**	**0.010 ***
***2**	***GCACCTGCG***	14	2.4	12	2.8			n.s	7	3.5	4	2.2			n.s
***3A1**	***GCGCCTACG***	12	2	12	2.8			n.s	4	2	7	3.8			n.s
***3A2A**	***GCGCTTACG***	53	8.9	30	7			n.s	14	7	12	6.6			n.s
***3A2B**	***GCGCTCACG***	63	10.6	41	9.6			n.s	21	10.5	17	9.3			n.s
***3B1**	***GCACCTACA***	118	19.9	75	17.6			n.s	32	16	36	19.8			n.s
***3B2A**	***GTACCTACA***	17	2.9	17	4			n.s	9	4.5	8	4.4			n.s
***3B2B**	***GTATCTACA***	111	18.7	69	16.2			n.s	26	13	34	18.7			n.s
***4**	***ACACCTAAG***	83	14	74	17.4			n.s	35	17.5	31	17			n.s
***1.3A2B.3B2B**	***GCACCCACA***	11	1.9	7	1.6			n.s	4	2	2	1.1			n.s
***2.3B2B**	***GCACCTGCA***	0	0	1	0.2			n.s							
***1.3B2B**	***GCATCTACA***	27	4.5	10	2.3			n.s	5	2.5	4	2.2			n.s
***3B2B.3A2B.3B1**	***GTATCCACA***	14	2.4	22	5.2	**2.43**	**1.18-5.03**	**0.017 ***	11	5.5	8	4.4			n.s
***1.3B2B.3A2B.3B1**	***GCATCCACA***	0	0	1	0.2			n.s							
***1.3B2B.1**	***GCATCTACG***	6	1	3	0.7			n.s	2	1	1	0.5			n.s
***3A2A.2**	***GCGCTTGCG***	1	0.2	1	0.2			n.s							
***3B2B.1**	***GTATCTACG***	4	0.7	7	1.6			n.s.	3	1.5	2	1.1			n.s
***3B2B.2**	***GTATCTGCG***	0	0	4	0.9			n.s.							
	Total	594		426					100		182				

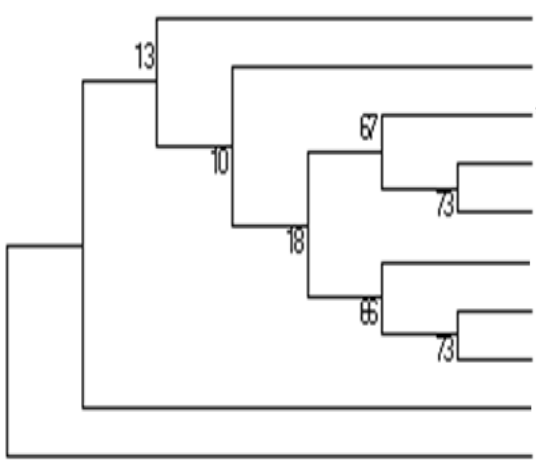
* for individuals presenting this haplotype, independent of age, sex and ethnic group distribution. n: number of chromosomes; Co: controls; Pat: patients; MB: multibacillary; PB: paucibacillary. Haplotypes represented all nine investigated CR1 SNPs (rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs3737002, rs11118131, rs11118167, rs17047660, rs4844610 and rs12034383). n = number of alleles. In bold: haplotypes associated with disease (see text).

Figure 1. 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. Values obtained by Fisher analysis. # P=0.079; ** P=0.006; ## P=0.085, EU Euro-Brazilians, AF Afro-Brazilians

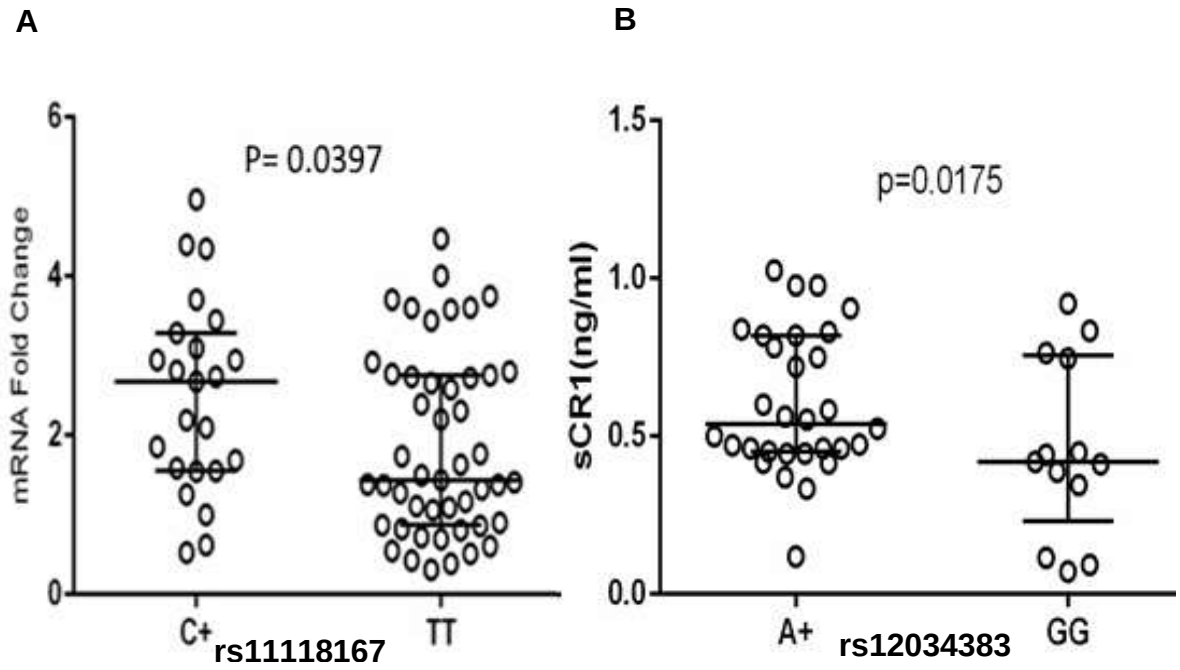
Figure 2. Maximum parsimony tree of *CR1* haplotypes with nucleotide changes and phylogenetic nomenclature.



	rs6656401	rs3849266	rs2274567	rs3737002	rs11118131	rs11118167	rs17047660	rs4844610	rs12034383
*1	G	C	A	C	C	T	A	C	G
*2	.	.	.	.	.	.	G	.	.
*3A1	.	.	G	.	.	.	.	.	.
*3A2A	.	.	G	.	T	.	.	.	.
*3A2B	.	.	G	.	T	C	.	.	.
*3B1	.	.	.	.	.	.	.	.	A
*3B2A	.	T	.	.	.	.	.	.	A
*3B2B	.	T	.	T	.	.	.	.	A
*4	A	.	.	.	.	.	.	A	.
PAN	.	.	.	.	.	.	.	.	.
*1.3A2B.3B2B	.	.	.	.	.	C	.	.	A
*2.3B2B	.	.	.	.	.	.	G	.	A
*1.3B2B	.	.	.	T	.	.	.	.	A
*3B2B.3A2B.3B1	.	T	.	T	.	C	.	.	A
*1.3B2B.3A2B.3B1	.	.	.	T	.	C	.	.	A
*1.3B2B.1	.	.	.	T	.	.	.	.	.
*3A2A.2	.	.	G	.	T	.	G	.	.
*3B2B.1	.	T	.	T	.	.	.	.	.
*3B2B.2	.	T	.	T	.	.	G	.	.

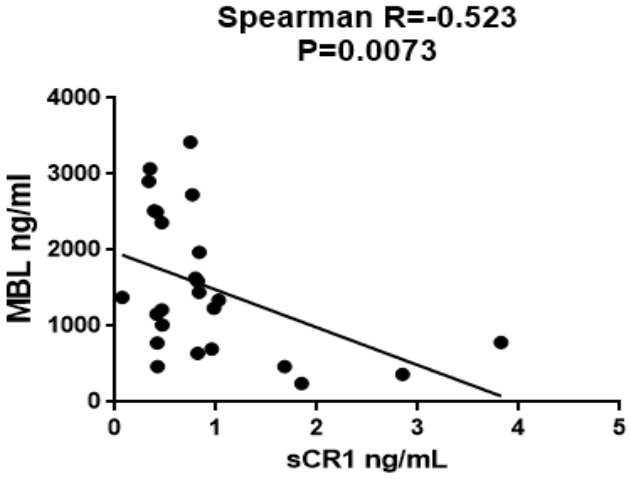
The tree was rooted on the haplotype shared with *Pan troglodytes* (NM_001193675). In the phylogenetic nomenclature system, the first clades to diverge are numbered with Arabic numerals. Sublineages of each clade are subsequently designated with capital letters and individual present-day haplotypes are given Arabic numerals, following the schema numerals/letters/numerals, if they diverge further. Recombinants are named according to the most common inferred parental haplotypes, separated by a dot, and citing the most similar parental haplotype, first. Bootstrap values are given on the respective branches.

Figure 3. Association between the expression of *CR1* mRNA, sCR1 and *CR1* polymorphisms.



NOTE: **A**- Carriers of the C allele to rs11118167 (*CR1*) have a higher rate of mRNA expression than those with the TT genotype (p= 0.0361). C^+= C carriers. Values for C^+ and TT, respectively: n= 23 / 47; Median: 2.680/1.439; minimum: 0.5258/0.3116; maximum: 4.968/4.474. Outliers: 4; criterion for outliers: higher than 6.000. **B-** Euro-Brazilian carriers of the A allele to rs12034383 (*CR1*) have a higher concentration of sCR1 than those with the GG genotype (p = 0.0175). A^+ = A carriers. Values for A^+ and GG, respectively: n= 30 / 13; Median: 0.539/ 0.420; minimum: 0.120/ 0.072; maximum: 1.026/ 0.920. Outliers: 3; For better visualization, we excluded outliers higher than 1.500. Exclusion did not interfere with final results (they remain significant).

Figure 4 - Negative correlation between MBL and sCR1 levels. MBL: Mannose-binding lectin; sCR1: soluble complement receptor 1



Supplementary material

Supplementary Table 1. Frequencies of *CR1* haplotypes in the ethnic groups.

		EURO							AFRO						
		Controls		Patients					Controls		Patients				
	Haplotypes	n	%	n	%	OR	IC	P	n	%	n	%	OR	IC	P
***1**	**GCACCTACG**	33	7.6	35	10.4			n.s.	27	16.7	5	5.6	**0.29**	**0.11-0.79**	**0.010**
***2**	**GCACCTGCG**	1	0.2	2	0.6			n.s.	13	8	10	11.1			n.s.
***3A1**	**GCGCCTACG**	10	2.3	10	3			n.s.	2	1.2	2	2.2			n.s.
***3A2A**	**GCGCTTACG**	42	9.7	36	10.7			n.s.	21	13	5	5.6			n.s.
***3A2B**	**GCGCTCACG**	37	8.6	24	7.1			n.s.	16	9.9	6	6.7			n.s.
***3B1**	**GCACCTACA**	90	20.8	56	16.7			n.s.	28	17.3	19	21.1			n.s.
***3B2A**	**GTACCTACA**	14	3.2	15	4.4			n.s.	3	1.9	2	2.2			n.s.
***3B2B**	**GTATCTACA**	78	18.1	55	16.4			n.s.	33	20.4	14	15.6			n.s.
***4**	**ACACCTAAG**	72	16.7	57	17			n.s.	11	6.8	17	18.9	**3.20**	**1.42-7.17**	**0.005**
***1.3A2B.3B2B**	**GCACCCACA**	11	2.5	5	1.5			n.s.	0	0	2	2.2			n.s.
***2.3B2B**	**GCACCTGCA**	0	0	1	0.3			n.s.	0	0	0	0			n.s.
***1.3B2B**	**GCATCTACA**	24	5.6	8	2.4	**0.41**	**0.18-0.93**	**0.030**	3	1.9	2	2.2			n.s.
****3B2B.3A2B.3B1***	**GTATCCACA**	12	2.8	20	6	**2.22**	**1.07-4.60**	**0.044**	2	1.2	2	2.2			n.s.
***1.3B2B.3A2B.3B1**	**GCATCCACA**	0	0	1	0.3			n.s.	0	0	0	0			n.s.
***1.3B2B.1**	**GCATCTACG**	5	1.2	3	0.9			n.s.	1	0.6	0	0			n.s.
***3A2A.2**	**GCGCTTGCG**	1	0.2	0	0			n.s.	0	0	1	1.1			n.s.
***3B2B.1**	**GTATCTACG**	2	0.5	5	1.5			n.s.	2	1.2	2	2.2			n.s.
***3B2B.2**	**GTATCTGCG**	0	0	3	0.9			n.s.	0	0	1	1.1			n.s.
	Total	432		336					162		90				.

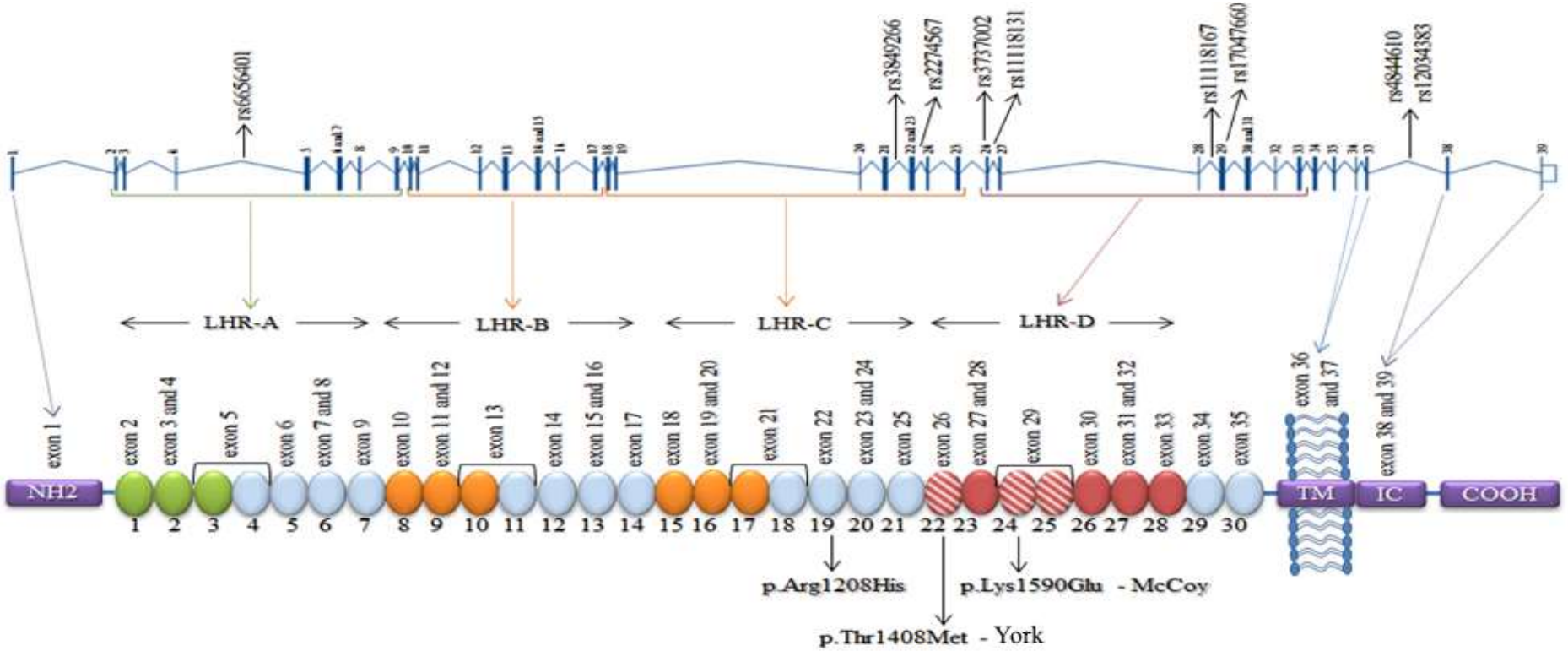
Haplotypes represented all nine investigated *CR1* SNPs (rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs3737002, rs11118131, rs11118167, rs17047660, rs4844610 and rs12034383). EURO: Euro-Brazilian; AFRO: African-Brazilian; n= number of alleles. In bold: haplotypes associated with disease (see text).

Supplementary Table 2. Frequencies of *CR1* haplotypes in Clinical Type.

		EURO							AFRO*			
		MB		PB					MB		PB	
	Haplotypes	n	%	n	%	OR	IC	P	n	%	n	%
***1**	**GCACCTACG**	23	14	8	5.7	**3.25**	**1.26-8.34**	**0.015**	3	8.3	2	4.8
***2**	**GCACCTGCG**	0	0	2	1.4			n.s	7	19.4	2	4.8
***3A1**	**GCGCCTACG**	4	2.4	5	3.6			n.s	0	0	1	2.4
***3A2A**	**GCGCTTACG**	20	12.2	13	9.3			n.s	1	2.8	4	9.5
***3A2B**	**GCGCTCACG**	12	7.3	10	7.1			n.s	2	5.6	2	4.8
***3B1**	**GCACCTACA**	25	15.2	26	18.6			n.s	7	19.4	10	23.8
***3B2A**	**GTACCTACA**	8	4.9	7	5			n.s	1	2.8	1	2.4
***3B2B**	**GTATCTACA**	22	13.4	27	19.3			n.s	4	11.1	7	16.7
***4**	**ACACCTAAG**	28	17	23	16.4			n.s	7	19.4	8	19
***1.3A2B.3B2B**	**GCACCCACA**	4	2.44	1	0.7			n.s	0	0	1	2.4
***2.3B2B**	**GCACCTGCA**	0	0	1	0.7			n.s	0	0	0	0
***1.3B2B**	**GCATCTACA**	4	2.4	3	2.1			n.s	1	2.8	1	2.4
****3B2B.3A2B.3B1***	**GTATCCACA**	10	6.1	7	5			n.s	1	2.8	1	2.4
***1.3B2B.3A2B.3B1**	**GCATCCACA**	1	0.6	0	0			n.s	0	0	0	0
***1.3B2B.1**	**GCATCTACG**	2	1.2	2	1.4			n.s	0	0	0	0
***3A2A.2**	**GCGCTTGCG**	0	0	0	0			n.s	0	0	1	2.4
***3B2B.1**	**GTATCTACG**	1	0.6	2	1.4			n.s	2	5.6	0	0
***3B2B.2**	**GTATCTGCG**	0	0	3	2.1			n.s	0	0	1	2.4
	Total	82		70					18		21	

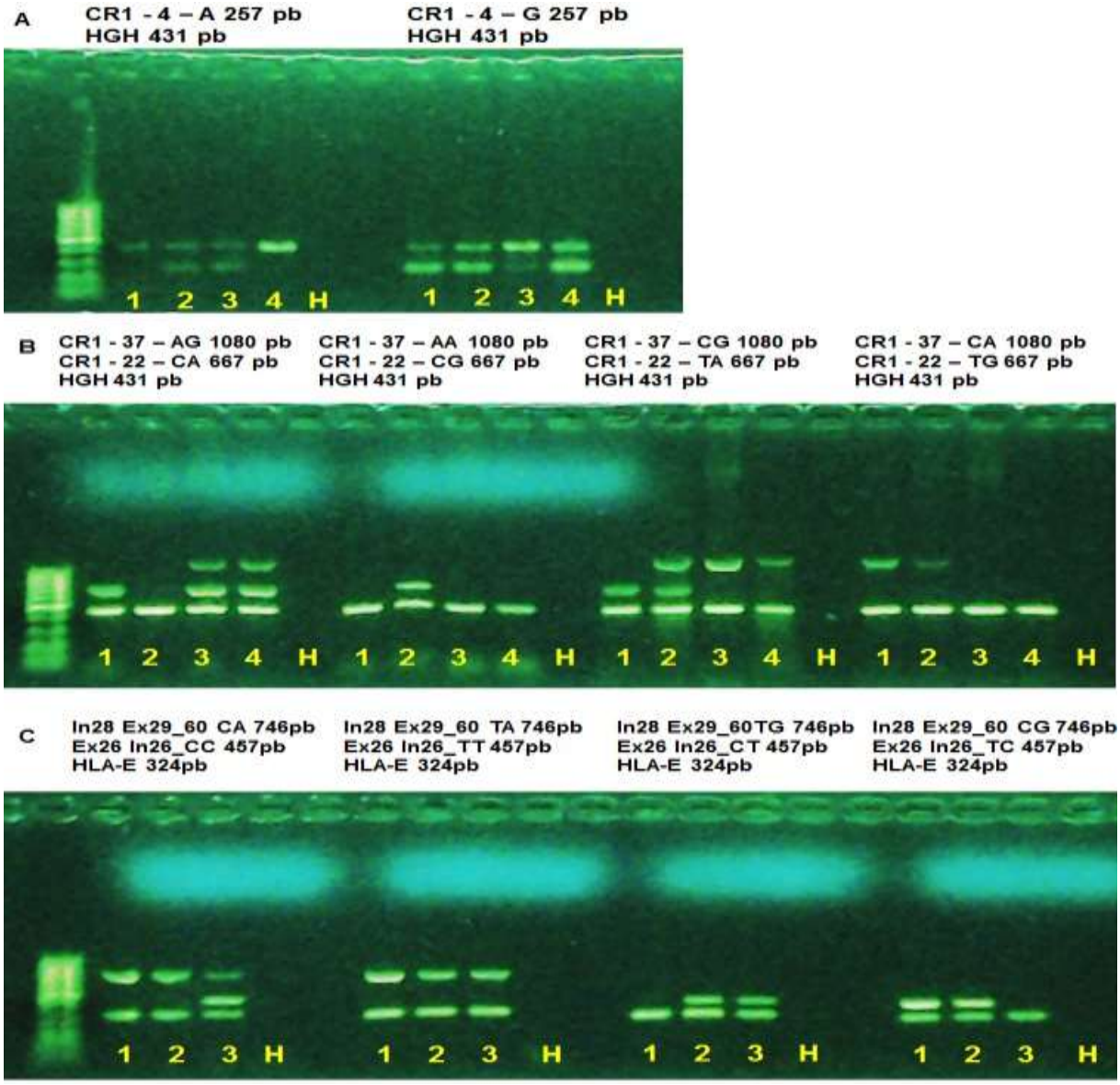
Haplotypes represented all nine investigated *CR1* SNPs (rs6656401, rs3849266, rs2274567, rs3737002, rs11118131, rs11118167, rs17047660, rs4844610 and rs12034383). MB: multibacillary; PB: paucibacillary; EURO: Euro-Brazilian; AFRO: African-Brazilian; *= There was no association with clinical type; n= number of alleles. In bold: haplotypes associated with disease (see text).

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



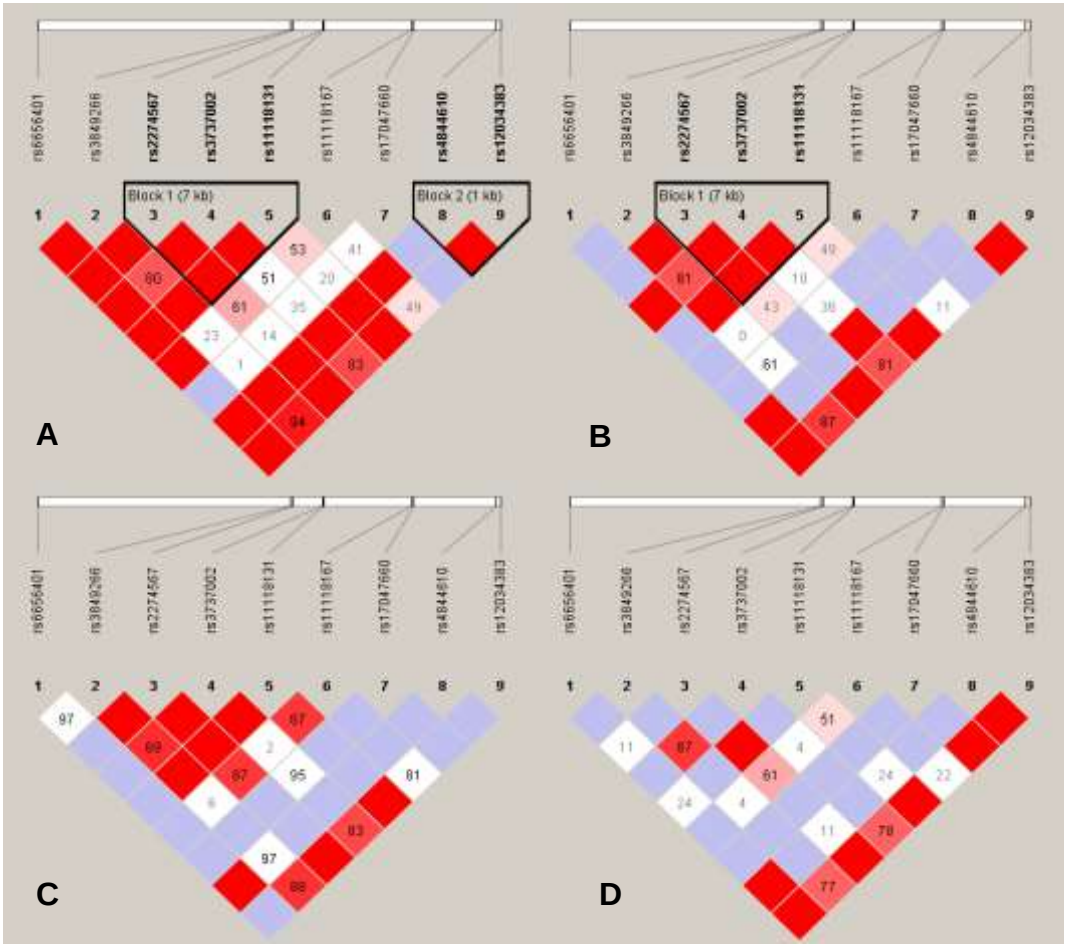
Each block represents a SCR (short consensus repeat), encoded by the exons listed just above. There are three C4b binding sites (SCR 1-3, 8-10 and 15-17) and two C3b binding sites (SCR 8-10 and 15-17). SCRs 22-28 bind C1q, MBL and ficolins, and SCRs 22, 24 and 25 carry blood group antigens frequent in 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. SOURCE: [42]

Supplementary figure 2. Simple PCR-SSP and 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 3 - Linkage disequilibrium between polymorphisms of *CR1* investigated.



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

6 DISCUSSÃO FINAL

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelas micobactérias *M. leprae* (ARAÚJO, 2003) e/ou *M. lepromatosis* (HAN *et al*, 2008), afetando a pele e o sistema nervoso periférico, podendo posteriormente afetar órgãos e sistemas (SOUZA, 1997). O sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata, sendo fundamental na defesa a doenças infecciosas (UTIYAMA *et al*, 2004). Contudo, alguns microrganismos como o *M. leprae*, utilizam-se dos receptores do complemento como porta de entrada na célula hospedeira, visto que esses medeiam o processo de fagocitose (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001; PRINGLE *et al*., 2012). Este é o caso de *CR1,* que é expresso em fagócitos como monócitos e macrófagos (LIU e NIU 2009), ligando-se aos fragmentos C3b/C4b e/ou a moléculas iniciadoras do complemento livres de serinas proteases, que opsonizam patógenos. Desta forma, CR1 otimiza o processo de fagocitose (GHIRAN et al., 2000; BOACKLE et al., 2004; LIU e NIU, 2009), inclusive da *M. leprae* (SCHLESINGER e HORWITZ, 1990 e 1991). CR1 também atua na regulação negativa do sistema complemento – especialmente na forma solúvel (KHERA e DAS, 2009). Sendo assim, polimorfismos no gene *CR1* podem interferir no desenvolvimento e estabelecimento da infecção, facilitando ou dificultando a entrada do patógeno na célula (FITNESS *et al.* 2004).

Nesse estudo, foram investigados nove polimorfismos (SNPs) do gene *CR1* através da técnica de PCR-SSP, o que possibilitou a identificação simultânea de pelo menos quatro SNPs, através da reunião dos iniciadores em dois conjuntos de multiplex. Além de facilitar e agilizar a haplotipagem, a técnica apresentou uma relação de custo-benefício elevada, já que ocorreu uma redução de reações pela metade, como relatado em estudo com gene *MASP2* (BOLDT *et al.,* 2011).

Como observado para outros genes codificando proteínas eritrocitárias, o polimorfismo do gene *CR1* sofreu a ação da seleção natural para resistência à malária na África (ROWE *et al*. 1994; COCKBURN *et al*. 2004). Diferentes pressões evolutivas moldaram historicamente o polimorfismo deste gene, de forma a divergir grandemente entre populações humanas. Isto permite explicar as associações restritas a certo grupo étnico, observadas neste trabalho.

Afro-brasileiros portadores do haplótipo **4,* com os alelos *g.27577A* de rs6656401 (intron 4) e *g.138080A* de rs4844610 (intron 37), apresentaram uma

susceptibilidade em torno de 4 vezes maior, ao desenvolvimento da hanseníase. Como esses SNPs estão em forte desequilíbrio de ligação (r^2= 1), o resultado obtido foi o mesmo para ambos. Porém, qual dos dois SNPs está realmente relacionado com a susceptibilidade a hanseníase e qual está sob o efeito carona?

O rs6656401 (*g.27577A>G*) já foi associado com a doença de Alzheimer em um Estudo de Associação Ampla do Genoma (GWAS) (LAMBERT *et al.*, 2009). Tentando elucidar essa associação, Mahmoudi *et al.* (2015) observaram que 95% dos indivíduos que possuíam o genótipo *GG* apresentavam a isoforma *CR1-F* (mais comum e com 4 LHRs). Já os indivíduos que possuíam o genótipo *AG* apresentavam tanto *CR1-F*, quanto *CR1-S* (isoforma com um LHR a mais, originando um sítio adicional para ligação de C3b/C4b). Os indivíduos que apresentaram genótipo *AA* expressaram apenas a forma *CR1-S*. Considerando que afro-brasileiros apresentam susceptibilidade a hanseníase quando são portadores do alelo *A*, sugere-se que esta associação se deva ao sítio extra de ligação C3b/C4b, facilitando a entrada da micobactéria na célula. Já o SNP rs4844610 (*g.138080A>C*) encontra-se fora das regiões de longa repetição, não estando relacionado com as isoformas de CR1, embora esteja em forte desequilíbrio de ligação com o rs6656401 (*g.27577A>G*), e sua associação com a doença provavelmente se deve a um efeito carona.

Euro-brasileiros portadores do alelo *g.207579645T* para o SNP rs3849266 (intron 21) apresentaram susceptibilidade duas vezes maior à hanseníase, especialmente indivíduos com o haplótipo recombinante **3B2B.3A2B.3B1.* Não há relatos na literatura de associações com doenças para esse polimorfismo, mas sabe-se que este SNP encontra-se em uma região reguladora, reconhecida por nove proteínas, incluindo o repressor transcricional CTCF (fator de ligação CCCTC) (ENSEMBL, 2016). O CTCF (proteína dedo de zinco) é um fator de transcrição essencial, podendo executar funções distintas, dependendo de como interage com o DNA, sendo que essas incluem a ativação ou repressão da transcrição, silenciamento de genes, além de poder se ligar a isoladores da cromatina (OHLSSON, RENKAWITZ e LOBANENKOV, 2001; CUDDAPAH *et al.*, 2009). Mutações na sequência de DNA alvo dessa proteína já foram associadas ao câncer, muito provavelmente devido a desregulação epigenética (OHLSSON, RENKAWITZ e LOBANENKOV, 2001). É possível que este SNP interfira na regulação epigenética feita por CTCF.

Houve associações que contrastaram entre grupos étnicos. Afro-brasileiros com o haplótipo **1* foram associados com proteção à hanseníase *per se*, enquanto

euro-brasileiros portadores deste haplótipo, apresentaram susceptibilidade três vezes maior à forma clínica virchowiana. Os resultados deste estudo também diferiram dos observados em um trabalho anterior (o único investigando *CR1* na hanseníase), onde o antígeno McCoy p.1590E foi associado a proteção contra a doença na populção africana de Karonga (Malawi) (FITNESS *et al.* 2004). Após correção para a distribuição sexual, étnica e etária, este mesmo antígeno, codificado pelos haplótipos **2* e **2.3B2B,* foi associado com susceptibilidade duas vezes maior à doença, no grupo total. Estas associações devem ser esclarecidas por meio da investigação em outras coortes, com tamanhos amostrais maiores, compartilhando a mesma origem étnica, e ensaios funcionais, visto que esse SNP possui uma frequência extremamente diferenciada entre as populações (até mesmo entre as populações africanas).

Ao analisar os níveis de mRNA dos transcritos mais abundantes de *CR1*, observamos que portadores do alelo *g.117682C* para o SNP rs11118167 (intron 28), apresentam uma maior expressão de mRNA que indivíduos homozigotos com o genótipo *TT*. Indivíduos com o haplótipo **3A2B*, que é o haplótipo mais frequente com este alelo, têm duas vezes maior probabilidade de apresentar uma expressão gênica aumentada. Não há relatos na literatura sobre o SNP rs11118167, porém sabe-se que está localizado no transcrito ENST00000534202, em uma região sujeita a decaimento mediado por códon nonsense (NMD), sendo esse um mecanismo acoplado à tradução que elimina mRNAs que contêm códons de término prematuros. Além disso, também pode estar ligado ao mecanismo de splicing alternativo do pré-mRNA (BROGNA e WEN, 2009). Ao analisar a sequência do gene, verificou-se que o nucleotídeo T pode originar um códon de término prematuro. Considerando isso, é possível que o alelo *g.117682T* interfira no splicing alternativo ou então crie um códon de parada prematuro nesse transcrito. Importante ressaltar que isso é encontrado apenas em um transcrito do gene, pois esta região não é incluída nos demais transcritos (inclusive os mais comuns). Embora tenha sido observado essa relação do alelo com a taxa de expressão do mRNA, esse SNP não foi associado com a doença. Provavelmente, a taxa de expressão de mRNA de *CR1* não influencia a doença.

Ao analisar as concentrações de sCR1, observamos que euro-brasileiros portadores do alelo *g.207630250A* (rs12034383, no intron 37) apresentam uma concentração maior de sCR1, que indivíduos homozigotos com o genótipo *G/G*. O alelo *g.207630250A* é encontrado nos haplótipos mais frequentes do gene *CR1*, pertencentes ao clado filogenético **3B.* Levando-se em conta que sCR1 é um potente

inibidor da cascata do complemento (KHERA e DAS, 2009), é possível que a frequência deste alelo tenha aumentado nas populações humanas, por seleção natural, devido ao papel anti-inflamatório de sCR1. Indivíduos *G/G* aparentemente possuem uma baixa concentração de sCR1, o que permite que a atuação do sistema complemento no local, mediando fagocitose, destruição celular e inflamação. Contudo, deve-se lembrar que o SNP rs12034383 é intrônico e a razão da associação observada ainda precisa ser esclarecida. O fato desse SNP não ter sido observado alterando a expressão de mRNA, muito provavelmente se deva ao fato do processamento do sCR1 ocorrer a partir da própria proteina CR1, não tendo dessa forma um mRNA específico para sCR1. Esse SNP já foi associado a doença de Alzheimer, na qual homozigotos *A/A* apresentaram aproximadamente 20% de aumento no nível de proteína amiloide Aβ, mensurada no líquido cefalorraquidiano (BROUWERS *et al*., 2012). Além disso, também foi associado com a taxa de sedimentação de eritrócitos (KULLO *et al*, 2011). Importante considerar que esse SNP não foi observado associado com a hanseníase e sim com o níveis de sCR1 no plasma, sendo assim, muito provavelmente os níveis de sCR1 não influenciam a doença.

Neste trabalho, níveis mais elevados de sCR1 foram correlacionados com concentrações mais baixas de MBL, o que foi acompanhado por uma tendência no mesmo sentido na capacidade desta proteína em ativar a via das lectinas. Este resultado leva-nos a confirmar o papel inbidor, desempenhado pelo sCR1 contra o complemento.

Embora tenha-se observado que alguns polimorfismos de *CR1* modulem a expressão do gene e os níveis de sCR1, estes mesmos SNPs não foram associados à hanseníase. Logo, a razão da associação encontrada com a doença, poderia ser encontrada na eficiência da capacidade fagocítica da célula hospedeira, através das diferentes isoformas de CR1, embora isso não tenha sido experimentalmente verificado. Além disso, observou-se que os efeitos associados dependiam do grupo étnico investigado. Embora estes resultados devam ser replicados em outros coortes e tamanhos amostrais maiores, os mesmos levam-nos a chamar a atenção para as diferenças étnicas na distribuição alélica de genes que foram historicamente submetidos à seleção natural, uma vez que codificam proteínas típicas de eritrócitos, que podem conferir resistência à malária grave (possível caso de *CR1*).

7 CONCLUSÕES

- As PCR-SSP multiplex, otimizadas neste trabalho, possibilitaram a haplotipagem física de oito variantes do gene *CR1* em apenas oito reações, ao invés de 16 com PCRs-SSP biespecíficas;
- Foram identificados 18 haplótipos, nomeados de acordo com sua possível origem filogenética, sendo a metade destes, recombinante;
- O haplótipo **4*, associado à expressão da isoforma *CR1-S* , a qual contém um sítio adicional de ligação a opsoninas do complemento, aumenta a susceptibilidade à hanseníase na população afro-descendente;
- O alelo *g.207579645T* do SNP rs3849266, presente em região reconhecida pela proteína CTCF, aumenta a susceptibilidade à hanseníase na população euro-descendente;
- O antígeno McCoy p.1590E (rs17047660) aumenta a susceptibilidade à doença, independente do grupo étnico;
- O haplótipo ancestral **1* provavelmente aumenta a susceptibilidade à forma virchowiana em euro-descendentes, mas protege contra a hanseníase *per se*, em afro-descendentes;
- Não houve diferença de expressão de mRNA dos transcritos mais abundantes de *CR1* e de sCR1, entre pacientes e controles e tipos clínicos da doença;
- O alelo *g.117682C* do SNP rs11118167 provavelmente aumenta a expressão de mRNA;
- O alelo *g.207630250A* do SNP rs12034383 está associado com concentração aumentada de sCR1;
- Níveis inferiores de sCR1 estão correlacionados com concentrações aumentadas de MBL e provavelmente com maior atividade da via das lectinas do complemento.

REFERÊNCIAS

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

ABEL, L. *et al.* Leprosy and BCG in Southern Vietnam. **Lancet**, v. 335, p. 1536, 1990.

ALCAÏS, A. *et al.* Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. **Nature genetics**, v. 39, p. 517-522, 2007.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.

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

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

BAKKER, M. I. *et al*. Risk factors for developing leprosy-a population-based cohort study in Indonesia. **Leprosy Review**, v. 77, n. 1, p. 48–61, 2006.

BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 117-128, 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.

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.

BOCHUD, P. Y. *et al*. Toll-Like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 253–261, 2008.

BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Relevance of the Lectin Pathway of Complement in Rheumatic Diseases. **Advances In Clinical Chemistry**, v. 56, p. 105-137, 2012.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the Mannose-Binding lectin locus. **Human Immunology**, v. 67, p. 722–734, 2006.

BOLDT, A. B. W. *et al*. Haplotype specific-sequencing reveals MBL2 association with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection. **Malaria Journal**, v. 8, p. 97, 2009.

BOLDT, A. B. W. *et al*. Multiplex sequence-specific PCR reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and Map19 serum levels. **Human Immunology**. V. 72, p. 753-760, 2011.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Susceptibility to Leprosy is Associated with M-ficolin Polymorphisms. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 210-219, 2013a.

BOLDT, A. B. W. *et al*. Leprosy Association with Low MASP-2 Levels Generated by MASP2 Haplotypes and Polymorphisms Flanking Map19 Exon 5. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, 2013b.

BRASIL. Lei Federal nº 9.010 de 29 de março de 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília. DF. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências; n.62, p. 4509, 30 mar 1995, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase, 2014. Disponível em: <http://goo.gl/ESc7cz>. Acesso em 15/03/16).

BRAUN-PRADO K, *et al*. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.56, p.417, 2000.

BROGNA, S.; WEN, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. **Nature structural & molecular biology**, v.16, n.2, p. 107-113, 2009.

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.

CARDOSO, C. C. *et al*. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology***,* v. 6, n. 5, p. 533–549, 2011a.

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

CARVALHO, E. *et al.* Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 30, n.5, p. 187-193, 2007.

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 Immunogenetic**, v. 33, p. 17-20, 2006.

CUDDAPAH, S. *et al.* Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. **Genome Research**, v. 19, p. 24-32, 2009.

CUNHA, S. S. *et al*. Design of the leprosy component of the Brazilian BCG revaccination trial for assessing BCG effectiveness against leprosy in school children. **International Journal of Leprosy**, v. 72, n. 1, 2003.

DANIELSSON, C*. et al*. Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. **The Journal of Immunology**, v. 24, p. 2725 – 2731, 1994.

DEPS, P. D. *et al*. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: A case control study. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 74, p. 338-342, 2008.

DOMINGUES, M.; TORAÑO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. **The Journal of Experimental** Medicine, v. 189, n. 1, p. 25-35, 1999.

DORNELLES, L. N., PEREIRA-FERRARI, L. & MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: Deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clinical and Experimental Immunology**, 145, p. 463-468, 2006.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, p. 34-50, 2010.

DÜPPRE, N. C. *et al*. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 631-638, 2008.

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 Medecine**, 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.

EICHELMANN, K. *et al.* Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermosifiliográfica**, v. 104, n. 7, p. 554-563, 2013.

ENSEMBL GENOME BROWSER. **Gene CR1 ENSG00000203710**. Disponível em:http://goo.gl/R48aua. Acesso em: 08/09/2014.

ENSEMBL GENOME BROWSER. **SNP rs3849266266**. Disponível em:< http://goo.gl/djwKJo> Acesso em: 13/02/2016.

FITNESS, J. *et al*. Leprosy susceptibility in the Karonga district of Malawi. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 330–340, 2004.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 335-339, 1997.

FONTES, A. M. *et al*. Association between Knops blood group polymorphisms and susceptibility to malaria in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34,n. 4, p. 539-545, 2011.

FUNKHOUSER, T.; VIK, D. P. Promoter activity of the 5′ flanking region of the complemente 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.

GARRED P. *et al.* A. Dual role of mannan-binding protein in infections - another case of heterosis. **European Journal of Immunogenetics**, v. 21, p.125–131, 1994.

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.

GOMES, H. *et al.* Investigation of association between susceptibility to leprosy and SNPs inside and near the BCHE gene of butyrylcholinesterase. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GOULART, I. M. B. *Et al*. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 453-460, 2002.

GraphPad Prism v. 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, Disponível em: www.graphpad.com.

GTEx PORTAL. **CR1 gene page**. Disponível em: < http://goo.gl/GY3riL > Acesso em: 23/09/2015.

HAGGE, D. A, *et al.* Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. American Journal Pathology, v.174, p.1379-1389, 2009.

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.

HAN, X. *et al*. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, p. 856-864, 2008.

HAN, X. *et al*. Comparative sequence analysis of Mycobacterium leprae and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n.19, p. 6067-6074, 2009.

HAN, X. *et al*. Analysis of the leprosy agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in four countries. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 142, p. 524-532, 2014.

HAN, X.; SILVA, F. On the Age of Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2014.

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.

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.* Genetic association of *CR1* with Alzheimer's disease: a tentative disease mechanism. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 12, p. 2949, 2012.

HE, J. Q. *et al*. A role of macrophage complement receptor CRIg in immune clearance and inflammation. **Molecular immunology**, v. 45, n. 16, p. 4041–7, 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*. CRIg: A macrophage complement receptor required for phagocythosis of circulating pathogens. **Cell**, v. 124, p. 915-927, 2006.

HOLERS, V. M. The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. **Clinical Immunology**, v. 107, p. 140–151, 2003.

IRGENS, M. A. *et al***.** Disappearance of leprosy from Norway: an exploration of critical factors using an epidemiological modelling approach**. International Journal of Epidemiology**, v. 31, p. 991-1000, 2002.

ITURRY-YAMAMOTO, S. G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquirida. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

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.

JARDULI, L., *et al.* Influence of KIR genes and their HLA ligands in the pathogenesis of leprosy in a hyperendemic population of Rondonópolis, Southern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 438-445, 2014.

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**, v. 67, n.2, p. 584-595, 2015.

JIN, C. *et al*. Association of the CR1 polymorphism with late-ons*et al*zheimer'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 malária. **Epilepsia**, v. 54, n. 6, p. 990–1001, 2013.

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**, v.31, p.933, 1999.

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 complemente 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 Sedimentation Rate. **The American Journal of Human Genetics**, v. 89, n. 1, 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, p. 1094-1200, 2009.

LIMA, L. W. O. **Avaliação imunohistoquímica da atividade macrofágica e sua relação com o fenômeno de apoptose na hanseníase**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

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.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v.25, p. 402-408, 2001.

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

MAGALHÃES, M. C. C.; ROJAS, L. I. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 75 - 84, 2007.

MAHMOUDI, R. *et al*. Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform. **Neurobiology of Aging**, v. 36, p. 1766.e5-12, 2015.

MALHOTRA, D., *et al.* IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Human Genetics**, v. 118, n. 2, p. 295–300, 2005.

MESSIAS-REASON, I. J., *et al*. The association between Mannan-Binding Lectin gene polymorphism and clinical Leprosy: new insight into an old paradigm. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p.1379–1385, 2007.

MESSIAS-REASON, I. J.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. Functional Haplotypes That Produce Normal Ficolin-2 Levels Protect against Clinical Leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 801–804, 2009.

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1124-1131, 2006.

MIRA, M. T., *et al.* Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 412–415, 2003.

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

MISCH, E. A. *et al.* Leprosy and the Human Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 4, p. 589-620, 2010.

MONOT, M. *et al*. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, p. 1040- 1042, 2005.

MORAES M. O., *et al.* Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immunology**, v.5, p. 592-595, 2004.

MORAES, M. O. *et al*. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v. 77, p. 189–202, 2006.

MORGAN, H. P. *et al.* Structural Analysis of the C-Terminal Region (Modules 18–20) of Complement Regulator Factor H (FH). **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, e32187, 2012.

MORGAN, K.; CARRASQUILLO, M. M. **Genetic Variants in Alzheimer' s Disease**. New York: Springer, 2013.

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

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.

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. **PloS Genetics**, v. 8, n. 1, e1002480, 2012.

NEBERT, D. W. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. **Human Mutation**, v. 20, p.463–72, 2002.

OHLSSON, R.; RENKAWITZ, R., LOBANENKOV, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 9, p. 520-527, 2001.

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, 2002.

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.

OLIVEIRA, L. C. **Estudo de associação entre polimorfismos e níveis séricos do receptor 1 do complemento e o penfigo foliáceo.**113 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

OMIM – ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN. **Complement component receptor 1; CR1.** Disponível em: <http://omim.org/entry/120620>. Acesso em: 08/09/2014.

OPROMOLLA, D. V. A.; URA, S. **Atlas de Hanseníase**. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 2002.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A Terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, n. 3, p; 293-294, 2005.

PEREIRA, A. C., *et al.* Genetic, epidemiologic and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for −819 C/T in leprosy susceptibility. **Genes Immunoly**, v. 10, p. 174-180, 2009.

PETTY, H. R.; WORTH, R. G.; TODD, R. R. Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes. **Immunologic Research**, v. 25, p. 75– 95, 2002.

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.

PORTAL DA SAÚDE: **Informações técnicas sobre hanseníase.** Disponível em: < http://goo.gl/NNtZMM >. Acesso em: 03/09/2014.

PRINGLE, E. S. *et al*. Expression of complement receptors 1 (CR1/CD35) and 2 (CR2/CD21), and co-signaling molecule CD19 in cattle. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, p. 487–494, 2012.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 451-459, 2007.

PROBST, C. M, *et al*. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Human Biology**, v.72, n. 4, p.597-617, 2000.

SINGH, P.; COLE, S.T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, 2011.

RAMBUKKANA, A., *et al.* Role of α-dystroglycan as a Schwann Cell receptor for *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 282, p. 2076-2079, 1998.

RAVINDRA, P. *et al*. Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: Deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 121–126, 2012.

REY-CAMPOS, J.; RUBINSTEIN, P.; CORDOBA, S. R. Physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 664-669, 1988.

RIDLEY, D. S.; JOPLING W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

ROACH, D.R.; *et al.* Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. **Journal Experimental Medicine**, v. 193, p.239-246, 2001.

RODRIGUES, A.G. **Estudo do polimorfismo C2029T no gene do receptor *toll-like* tipo 2 e da resposta imune humoral em pacientes com Hanseníase.** 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)- Dept. de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, 2008.

ROSENTHAL, L. A. *et al*. *Leishmania major* - Human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b / CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 2206-2215, 1996.

ROWE, J. A. *et al*. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with Malaria severity in Kenya. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2323–2326, 1995.

ROWE, J.A. *et al*. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. **Nature**, v. 388, p. 292-295,1997.

ROWE, J. A. *et al*. Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for *Plasmodium falciparum* rosetting and demonstration of the importance of CR1 in rosetting in field isolates. **The Journal of Immunology**, v.165, p. 6341-6346, 2000.

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

SANTOS A. R., *et al.* Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **The Journal Infectious Diseases**, v.186, p.1687-1691, 2002.

SAPKOTA, B. R. *et al*. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Human Immunology**, v. 71, p. 992–998, 2010.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 1304-1314, 1990.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 1031-1038, 1991.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: Antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 280-289, 1994.

SCHLESINGER, L. S. *et al.* Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. **Journal Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2771-2780, 1990.

SCHOREY, J. S.; CARROLL, M. C. e BROWN, E. J. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. **Science**, v. 277, p. 1091-1093, 1997.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE − Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n. 11, 2013.

SENGELOV, H. *et al.* Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils**. The Journal of Immunology**, v. 153, p. 804–810, 1994.

SINGH, P. K.; SINGH, A. V.; CHAUHAN, D. S. Current understanding on Micro RNAs and its regulation in response to Mycobacterial infections. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 14, 2013.

SINGH, P. *et al.* Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 14, p. 4459-4464, 2015.

SILVA, L. R. B. **Análide da produção de Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-I (IGF-I) e seu efeito na geração de óxido nítrico em macrófagos estimulados com micobactérias.** 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

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.* Levels of plasma soluble complement receptor 1 (sCR1) in normal indian adult population. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 14, n.2, p. 237-240, 1999.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 325-334, 1997.

SOUZA, V. N. B., PEREIRA, A. C. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. **Hansen International**, v. 32, n 1, p. 81-93, 2007.

SUPER, M. *et al.* Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet**, v. 2, p. 1236-1239, 1989.

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

TÖRÖK, K., *et al*. Complement receptor type 1 (CR1/CD35) expressed on activated human CD4+ T cells contributes to generation of regulatory T cells. **Immunology Letters**, v.164, p. 117-124, 2015.

UTIYAMA, S. R. R.; MESSIAS- REASON, I. T.; KOTZE, L. M. S. Sistema complemento nas doenças: genética e patogenia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 4, p. 277-286, 2004.

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.

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.

XIAO-YING, M. *et al*. Missense variants in CR1 are associated with increased risk of Alzheimer' disease in Han Chinese. **Neurobiology of Aging**, v. 35, p. 443.e17-443.e21, 2014.

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: 15/03/2016.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 89, n.36, p. 389–400, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Leprosy elimination.** Disponível em: <http://www.who.int/lep/transmission/en/ >. Acesso em: 22/09/2015.

YOON, J. H. *et al*. The polymorphism of Knops blood group system in Korean population and their relationship with HLA system. **Human Immunology**, v. 74, p. 196-198, 2013.

ZODPEY, S. P.; AMBADEKAR, N. N.; THAKUR, A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. **Public Health**, v. 119, p. 209-216, 2005.

APÊNDICE

TABELA 5 - SNPS DE *CR1,* SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO.

SNP	Sequência de Ref. NG_007481.1	Localização	Frequência do alelo menos comum* (%)	
			AFR	**EUR**
rs6656401	*g.27577A>G*	Intron 4	*A*: 0	*A*: 13
rs3849266	*g.88518C>T*	Intron 21	*T*: 4	*T*: 32
rs2274567	*g.89149A>G*	Exon 22	*G*: 25	*G*: 17
rs3737002	*g.96301C>T*	Exon 26	*T*: 4	*T*: 32
rs11118131	*g.96724C>T*	Intron 26	*T*: 22	*T*: 16
rs11118167	*g.117682T>C*	Intron 28	*C*: 1	*C*: 16
rs17047660	*g.118384A>G*	Exon 29	*G*: 26	*G*: 1
rs4844610	*g.138080A>C*	Intron 37	*A*: 0	*A*: 11
rs12034383	*g.139123G>A*	Intron 37	*A*: 13	*G*: 33

LEGENDA: SNP= polimorfismo de nucleotídeo único, NCBI= *National Center of Biotechnology*, * alelo menos comum na população ibérica, AFR= população Yoruba africana, EUR= população europeia ibérica. FONTE: Navegador genômico Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html).

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPS DE *CR1* ANALISADOS NESSE ESTUDO.

continua

rs6656401	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
G/G	149	69%	111	66,1%	Ref.	-	-	70	86,4%	28	62,2%	Ref.	-	-	219	73,7%	139	65,3%	Ref.	-	-
G/A	62	28,7%	57	33,9%	1,234	0,80-1,91	0,3735	11	13,6%	17	37,8%	**3,864**	**1,61-9,28**	**0,0032**	73	24,6%	74	34,7%	**1,597**	**1,08-2,35**	**0,0224**
A/A	5	2,3%	0	0%	0,223	0,03-1,88	0,2446	0	0%	0	0%	2,448	0,15-40,47	1	5	1,7%	0	0%	0,262	0,03-2,20	0,2574
G	360	83,3%	279	83%	0,979	0,67-1,43	0,9228	151	93,2%	73	81,1%	**0,313**	**0,14-0,70**	**0,0057**	511	86%	352	82,6%	0,773	0,55-1,09	1,8829
A	72	16,7%	57	17%	1,022	0,70-1,50	0,9228	11	6,8%	17	18,9%	**3,197**	**1.42-7,17**	**0,0057**	83	14%	74	17,4%	1,294	0,92-1,82	1,8829
G+	211	97,7%	168	100%	4,783	0,57-40,11	0,1417	81	100%	45	100%	0,561	0,03-9,18	1	292	98,3%	213	100%	4,382	0,52-36,67	0,2477
A+	67	31%	57	33,9%	1,142	0,74-1,76	0,5829	11	13,6%	17	37,8%	**3,864**	**1,61-9,28**	**0,0032**	78	26,3%	74	34,7%	**1,495**	**1,02-2,19**	**0,0400**
HW	0,8073		0,0048			-		1		0,3197			-		1		0,0006			-	

rs3849266	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
C/C	127	58,8%	83	49,4%	Ref.	-	-	45	55,6%	25	55,6%	Ref.	-	-	172	57,9%	108	50,7%	Ref.	-	-
C/T	72	33,3%	72	42,9%	1,530	1,00-2,35	0,0636	32	39,5%	19	42,2%	1,069	0,50-2,26	1	104	35,0%	91	42,7%	1,394	0,96-2,02	0,0890
T/T	17	7,9%	13	7,7%	1,170	0,54-2,54	0,8425	4	4,9%	1	2,2%	0,450	0,05-4,25	0,6531	21	7,1%	14	6,6%	1,062	0,52-2,18	0,8563
C	326	75,5%	238	70,8%	0,790	0,57-1,09	0,1618	122	75,3%	69	76,7%	1,077	0,59-1,97	0,8786	448	75,4%	307	72,1%	0,841	0,63-1,11	0,2469
T	106	24,5%	98	29,2%	1,266	0,92-1,75	0,1618	40	24,7%	21	23,3%	0,928	0,51-1,70	0,8786	146	24,6%	119	27,9%	1,189	0,90-1,58	0,2469
C+	199	92,1%	155	92,3%	1,019	0,48-2,16	1	77	95,1%	44	97,8%	2,286	0,25-21,10	0,6541	276	92,9%	199	93,4%	1,082	0,54-2,18	0,8611
T+	89	41,2%	85	50,6%	1,461	0,97-2,19	0,0790	36	44,4%	20	44,4%	1	0,48-2,08	1	125	42,1%	105	49,3%	1,338	0,94-1,91	0,1250
HW	0,1432		0,7113			-		0,7671		0,4084			-		0,3481		0,4953			-	

rs2274567	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
A/A	135	62,5%	108	64,3%	Ref.	-	-	48	59,3%	32	71,1%	Ref.	-	-	183	61,6%	140	65,7%	Ref.	-	-
A/G	72	33,3%	50	29,8%	0,868	0,56-1,35	0,5761	27	33,3%	12	26,7%	0,667	0,30-1,50	0,4191	99	33,3%	62	29,1%	0,819	0,56-1,20	0,3290
G/G	9	4,2%	10	6,0%	1,389	0,54-3,54	0,6332	6	7,4%	1	2,2%	0,250	0,03-2,18	0,2453	15	5,1%	11	5,2%	0,959	0,43-2,15	1
A	342	79,2%	266	79,2%	1	0,70-1,42	1	123	75,9%	76	84,4%	1,721	0,88-3,38	0,1462	465	78,3%	342	80,3%	1,129	0,83-1,54	0,4822
G	90	20,8%	70	20,8%	1	0,70-1,42	1	39	24,1%	14	15,6%	0,581	0,30-1,14	0,1462	129	21,7%	84	19,7%	0,885	0,65-1,20	0,4822
A+	207	95,8%	158	94,0%	0,687	0,27-1,73	0,4810	75	92,6%	44	97,8%	3,520	0,41-30,20	0,4200	282	94,9%	202	94,8%	0,977	0,44-2,17	1
G+	81	37,5%	60	35,7%	0,926	0,61-1,41	0,7495	33	40,7%	13	28,9%	0,591	0,27-1,29	0,2468	114	38,4%	73	34,3%	0,837	0,58-1,21	0,3530
HW	1		0,2391			-		0,5405		1			-		0,7334		0,2763			-	

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPS DE *CR1* ANALISADOS NESSE ESTUDO.

continuação

rs3737002	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
C/C	110	50,9%	88	52,4%	Ref.	-	-	44	54,3%	27	60,0%	Ref.	-	-	154	51,9%	115	54,0%	Ref.	-	-
C/T	91	42,1%	66	39,3%	0,907	0,59-1,38	0,6675	33	40,7%	15	33,3%	0,741	0,34-1,61	0,5580	124	41,8%	81	38,0%	0,875	0,60-1,27	0,5104
T/T	15	6,9%	14	8,3%	1,167	0,53-2,55	0,6955	4	4,9%	3	6,7%	1,222	0,25-5,88	1	19	6,4%	17	8,0%	1,198	0,60-2,41	0,7206
C	311	72,0%	242	72,0%	1,002	0,73-1,38	1	121	74,7%	69	76,7%	1,113	0,61-2,03	0,7623	432	72,7%	311	73,0%	1,014	0,77-1,34	0,9432
T	121	28,0%	94	28,0%	0,998	0,73-1,37	1	41	25,3%	21	23,3%	0,898	0,49-1,64	0,7623	162	27,3%	115	27,0%	0,986	0,74-1,30	0,9432
C+	201	93,1%	154	91,7%	0,821	0,38-1,75	0,6980	77	95,1%	42	93,3%	0,727	0,15-3,40	0,6996	278	93,6%	196	92,0%	0,788	0,40-1,55	0,4896
T+	106	49,1%	80	47,6%	0,943	0,63-1,41	0,8370	37	45,7%	18	40,0%	0,793	0,38-1,66	0,5779	143	48,1%	98	46,0%	0,918	0,64-1,31	0,6537
HW	0,6133		0,7055		-			0,7678		0,6784		-			0,464		0,6036		-		

rs11118131	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
C/C	145	67,1%	116	69%	Ref.	-	-	50	61,7%	34	75,6%	Ref.	-	-	195	65,7%	150	70,4%	Ref.	-	-
C/T	62	28,7%	44	26,2%	0,887	0,56-1,40	0,6433	25	30,9%	10	22,2%	0,588	0,25-1,38	0,2977	87	29,3%	54	25,4%	0,807	0,54-1,20	0,3123
T/T	9	4,2%	8	4,8%	1,111	0,42-2,97	1	6	7,4%	1	2,2%	0,245	0,03-2,13	0,2429	15	5,1%	9	4,2%	0,780	0,33-1,83	0,6719
C	352	81,5%	276	82,1%	1,045	0,72-1,51	0,8508	125	77,2%	78	86,7%	1,924	0,95-3,91	0,0705	477	80,3%	354	83,1%	1,206	0,87-1,67	0,2882
T	80	18,5%	60	17,9%	0,957	0,66-1,38	0,8508	37	22,8%	12	13,3%	0,520	0,26-1,06	0,0705	117	19,7%	72	16,9%	0,829	0,60-1,15	0,2882
C+	207	95,8%	160	95,2%	0,870	0,33-2,30	0,8067	75	92,6%	44	97,8%	3,520	0,41-30,20	0,4200	282	94,9%	204	95,8%	1,206	0,52-2,81	0,8326
T+	71	32,9%	52	31%	0,915	0,59-1,41	0,7412	31	38,3%	11	24,4%	0,863	0,49-1,53	0,6614	102	34,3%	63	29,6%	0,803	0,55-1,17	0,2912
HW	0,4975		0,1848		-			0,3392		0,5699		-			0,2005		0,1476		-		

rs11118167	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
T/T	153	70,8%	108	64,3%	Ref.	-	-	59	72,8%	36	80,0%	Ref.	-	-	212	71,4%	144	67,6%	Ref.	-	-
T/C	60	27,8%	58	34,5%	1,369	0,88-2,12	0,1799	21	25,9%	8	17,8%	0,624	0,25-1,56	0,3786	81	27,3%	66	31,0%	1,200	0,81-1,77	0,3722
C/C	3	1,4%	2	1,2%	0,944	0,15-5,75	1	1	1,2%	1	2,2%	1,639	0,10-27,02	1	4	1,3%	3	1,4%	1,104	0,24-5,01	1
T	366	84,7%	274	81,5%	0,797	0,54-1,17	0,2435	139	85,8%	80	88,9%	1,324	0,60-2,92	0,5620	505	85,0%	354	83,1%	0,867	0,62-1,22	0,4336
C	66	15,3%	62	18,5%	1,255	0,86-1,84	0,2435	23	14,2%	10	11,1%	0,755	0,34-1,67	0,5620	89	15,0%	72	16,9%	1,154	0,82-1,62	0,4336
T+	213	98,6%	166	98,8%	1,169	0,19-7,08	1	80	98,8%	44	97,8%	0,550	0,03-9,01	1	293	98,7%	210	98,6%	0,956	0,21-4,31	1
C+	63	29,2%	60	35,7%	1,349	0,88-2,08	0,1868	22	27,2%	9	20,0%	0,670	0,28-1,61	0,3983	85	28,6%	69	32,4%	1,195	0,82-1,75	0,3796
HW	0,429		0,072		-			1		0,429		-			0,359		0,218		-		

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPS DE *CR1* ANALISADOS NESSE ESTUDO.

conclusão

rs17047660	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
A/A	214	99,1%	162	96,4%	Ref.	-	-	68	84%	34	75,6%	Ref.	-	-	282	94,9%	196	92%	Ref.	-	-
A/G	2	0,9%	6	3,6%	3,963	0,79-19,89	0,0846	13	16%	10	22,2%	1,538	0,61-3,87	0,4688	15	5,1%	16	7,5%	1,535	0,74-3,18	0,2635
G/G	0	0%	0	0%	1,319	0,08-21,25	1	0	0%	1	2,2%	3,943	0,34-45,00	0,2740	0	0%	1	0,5%	2,878	0,26-31,96	0,5714
A	430	99,5%	330	98,2%	0,256	0,05-1,28	0,0859	149	92%	78	86,7%	0,567	0,25-1,30	0,1918	579	97,5%	408	95,8%	0,587	0,29-1,18	0,1518
G	2	0,5%	6	1,8%	3,909	0,78-19,49	0,0859	13	8%	12	13,3%	1,763	0,77-4,05	0,1918	15	2,5%	18	4,2%	1,703	0,85-3,42	0,1518
A+	216	100%	168	100%	0,779	0,05-12,54	1	81	100%	44	97,8%	0,268	0,02-3,04	0,2892	297	100%	212	99,5%	0,357	0,03-3,97	0,5743
G+	2	0,9%	6	3,6%	3,963	0,79-19,89	0,0846	13	16%	11	24,4%	1,692	0,69-4,17	0,3436	15	5,1%	17	8%	1,631	0,79-3,34	0,1976
HW	1		1			-		1		0,5699			-		1		0,3125			-	

rs4844610	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
C/C	149	69%	111	66,1%	Ref.	-	-	70	86,4%	28	62,2%	Ref.	-	-	219	73,7%	139	65,3%	Ref.	-	-
C/A	62	28,7%	57	33,9%	1,234	0,80-1,91	0,3735	11	13,6%	17	37,8%	**3,864**	**1,61-9,28**	**0,0032**	73	24,6%	74	34,7%	**1,597**	**1,08-2,35**	**0,0224**
A/A	5	2,3%	0	0%	0,223	0,03-1,88	0,2446	0	0%	0	0%	2,448	0,15-40,47	1	5	1,7%	0	0%	0,262	0,03-2,20	0,2574
C	360	83,3%	279	83%	0,979	0,67-1,43	0,9228	151	93,2%	73	81,1%	**0,313**	**0,14-0,70**	**0,0057**	511	86%	352	82,6%	0,773	0,55-1,09	1,8829
A	72	16,7%	57	17%	1,022	0,70-1,50	0,9228	11	6,8%	17	18,9%	**3,197**	**1,42-7,17**	**0,0057**	83	14,0%	74	17,4%	1,294	0,99-1,82	1,8829
C+	211	97,7%	168	100%	4,783	0,57-40,11	0,1417	81	100%	45	100%	0,561	0,03-9,18	1	292	98,3%	213	100%	4,382	0,52-36,67	0,2477
A+	67	31%	57	33,9%	1,142	0,74-1,76	0,5829	11	13,6%	17	37,8%	**3,864**	**1,61-9,28**	**0,0032**	78	26,3%	74	34,7%	**1,495**	**1,02-2,19**	**0,0400**
HW	0,8073		0,0048			-		1		0,3197			-		1		0,0006			-	

rs12034383	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
G/G	48	22,2%	40	23,8%	Ref.	-	-	24	29,6%	16	35,6%	Ref.	-	-	72	24,2%	56	26,3%	Ref.	-	-
G/A	107	49,5%	95	56,5%	1,065	0,64-1,76	0,8982	45	55,6%	17	37,8%	0,567	0,24-1,32	0,2005	152	51,2%	112	52,6%	0,947	0,62-1,45	0,8282
A/A	61	28,2%	33	19,6%	0,649	0,36-1,18	0,1748	12	14,8%	12	26,7%	1,500	0,54-4,16	0,4498	73	24,6%	45	21,1%	0,793	0,48-1,32	0,4365
G	203	47,0%	175	52,1%	1,226	0,92-1,63	0,1675	93	57,4%	49	54,4%	0,887	0,53-1,49	0,6918	296	49,8%	224	52,6%	1,116	0,87-1,43	0,4092
A	229	53,0%	161	47,9%	0,816	0,61-1,08	0,1675	69	42,6%	41	45,6%	1,128	0,67-1,89	0,6918	298	50,2%	202	47,4%	0,896	0,70-1,15	0,4092
G+	155	71,8%	135	80,4%	1,610	0,99-2,61	0,0562	69	85,2%	33	73,3%	0,478	0,19-1,18	0,1542	224	75,4%	168	78,9%	1,217	0,80-1,85	0,3951
A+	168	77,8%	128	76,2%	0,914	0,57-1,47	0,7154	57	70,4%	29	64,4%	0,763	0,35-1,66	0,5512	225	75,8%	157	73,7%	0,897	0,60-1,34	0,6061
HW	0,729		0,493			-		0,264		0,133			-		0,729		0,493			-	

LEGENDA: EURO = Euro-brasileiros; AFRO = Afro-brasileiros; n = número de alelos ou indivíduos; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; Ref. = utilizado como referência; P = valor de p Valores destacados em cinza indicam significância com valor de *p* menor do que 0,05. Teste utilizado: Fisher bicaudal. HW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS DE *CR1,* EM PACIENTES E CONTROLES.

HAPLÓTIPO	EURO							AFRO							TOTAL						
	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P	CONTROLE		PACIENTE		OR	95% IC	P
N	216	%	168	%				81	%	45	%				297	%	213	%			
ACACCTAAG	72	16,7%	57	17%	1,022	0,70-1,49	0,9228	11	6,8%	17	18,9%	**3,197**	**1,42-7,17**	**0,0057**	83	14%	74	17,4%	1,294	0,92-1,82	0,1591
GCACCCACA	11	2,5%	5	1,5%	0,578	0,20-1,68	0,4461	0	0%	2	2,2%		-		11	1,9%	7	1,6%	0,885	0,34-2,30	1
GCACCTACA	90	20,8%	56	16,7%	0,760	0,53-1,10	0,1644	28	17,3%	19	21,1%	1,281	0,67-2,45	0,5009	118	19,9%	75	17,6%	0,862	0,63-1,19	0,3738
GCACCTACG	33	7,6%	35	10,4%	1,406	0,85-2,31	0,2009	27	16,7%	5	5,6%	**0,294**	**0,11-0,79**	**0,0104**	60	10,1%	40	9,4%	0,922	0,60-1,40	0,7494
GCACCTGCA	0	0%	1	0,3%		-		0	0%	0	0%		-		0	0%	1	0,2%		-	
GCACCTGCG	1	0,2%	2	0,6%	2,581	0,23-28,58	0,5841	13	8,0%	10	11,1%	1,433	0,60-3,41	0,4944	14	2,4%	12	2,8%	1,201	0,55-2,62	0,6897
GCATCCACA	0	0%	1	0,3%		-		0	0%	0	0%		-		0	0%	1	0,2%		-	
GCATCTACA	24	5,6%	8	2,4%	**0,415**	**0,18-0,93**	**0,0298**	3	1,9%	2	2,2%	1,205	0,20-7,35	1	27	4,5%	10	2,3%	0,505	0,24-1,05	0,0882
GCATCTACG	5	1,2%	3	0,9%	0,769	0,18-3,24	1	1	0,6%	0	0%		-		6	1%	3	0,7%	0,695	0,17-2,79	0,7421
GCGCCTACG	10	2,3%	10	3,0%	1,294	0,53-3,15	0,6501	2	1,2%	2	2,2%	1,818	0,25-13,13	0,6185	12	2%	12	2,8%	1,406	0,62-3,16	0,4112
GCGCTCACG	42	9,7%	36	10,7%	1,114	0,70-1,78	0,7182	21	13,0%	5	5,6%	0,395	0,14-1,09	0,0832	63	10,6%	41	9,6%	0,898	0,59-1,36	0,6750
GCGCTTACG	37	8,6%	24	7,1%	0,821	0,48-1,40	0,5035	16	9,9%	6	6,7%	0,652	0,25-1,73	0,4880	53	8,9%	30	7%	0,773	0,48-1,23	0,2978
GCGCTTGCG	1	0,2%	0	0%		-		0	0%	1	1,1%		-		1	0,2%	1	0,2%	1,395	0,09-22,37	1
GTACCTACA	14	3,2%	15	4,5%	1,395	0,66-2,93	0,4465	3	1,9%	2	2,2%	1,205	0,20-7,35	1	17	2,9%	17	4,0%	1,411	0,71-2,80	0,3773
GTATCCACA	12	2,8%	20	6%	**2,215**	**1,07-4,60**	**0,0436**	2	1,2%	2	2,2%	1,818	0,25-13,13	0,6185	14	2,4%	22	5,2%	**2,256**	**1,14-4,46**	**0,0240**
GTATCTACA	78	18,1%	55	16,4%	0,888	0,61-1,30	0,5651	33	20,4%	14	15,6%	0,720	0,36-1,43	0,4010	111	18,7%	69	16,2%	0,841	0,60-1,17	0,3185
GTATCTACG	2	0,5%	5	1,5%	3,248	0,63-16,84	0,2498	2	1,2%	2	2,2%	1,818	0,25-13,13	0,6185	4	0,7%	7	1,6%	2,464	0,72-8,47	0,2172
GTATCTGCG	0	0%	3	0,9%		-		0	0%	1	1,1%		-		0	0%	4	0,9%		-	

NOTA: os haplótipos foram reconstruídos com base na informação de fase fornecida pela PCR-SSP biespecífica e desequilíbrio de ligação entre os alelos.
LEGENDA: EURO= Euro-brasileiros; AFRO= Afro-brasileiros; n= número de alelos ou indivíduos; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; P= valor de p.
Valores destacados em cinza indicam significância com valor de *p* menor do que 0,05. Teste utilizado: Fisher bicaudal.

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS DE *CR1,* EM PACIENTES ENTRE OS SUBTIPOS CLÍNICOS.

HAPLÓTIPO	EURO							AFRO							TOTAL						
	MB		PB		OR	95% IC	P	MB		PB		OR	95% IC	P	MB		PB		OR	95% IC	P
N	82	%	70	%				18	%	21	%				100	%	91	%			
ACACCTAAG	28	17,1%	23	16,4%	1,047	0,57-1,92	1	7	19,4%	8	19%	1,026	0,33-3,17	1	35	17,5%	31	17%	1,033	0,61-1,76	1
GCACCCACA	4	2,4%	1	0,7%	3,475	0,38-31,46	0,3787		-	1	2,4%		-		4	2%	2	1,1%	1,837	0,33-10,15	0,6871
GCACCTACA	25	15,2%	26	18,6%	0,789	0,43-1,44	0,4462	7	19,4%	10	23,8%	0,772	0,26-2,29	0,7849	32	16,0%	36	19,8%	0,772	0,46-1,31	0,3512
GCACCTACG	23	14,0%	8	5,7%	**2,691**	**1,16-6,23**	**0,0216**	3	8,3%	2	4,8%	1,818	0,29-11,54	0,6574	26	13,0%	10	5,5%	**2,570**	**1,20-5,49**	**0,0138**
GCACCTGCA		-	1	0,7%		-			-		-		-			-	1	0,5%		-	
GCACCTGCG		-	2	1,4%		-		7	19,4%	2	4,8%	4,828	0,93-24,95	0,0726	7	3,5%	4	2,2%	1,614	0,46-5,61	0,5480
GCATCCACA	1	0,6%		-		-			-		-		-		1	0,5%		-		-	
GCATCTACA	4	2,4%	3	2,1%	1,142	0,25-5,19	1	1	2,8%	1	2,4%	1,171	0,07-19,42	1	5	2,5%	4	2,2%	1,141	0,30-4,32	1
GCATCTACG	2	1,2%	2	1,4%	0,852	0,12-6,13	1		-		-		-		2	1%	1	0,5%	1,828	0,16-20,33	1
GCGCCTACG	4	2,4%	5	3,6%	0,675	0,18-2,56	0,7372		-	1	2,4%		-		4	2%	7	3,8%	0,510	0,15-1,77	0,3635
GCGCTCACG	20	12,2%	13	9,3%	1,357	0,65-2,84	0,4631	1	2,8%	4	9,5%	0,271	0,03-2,55	0,3662	21	10,5%	17	9,3%	1,139	0,58-2,23	0,7351
GCGCTTACG	12	7,3%	10	7,1%	1,026	0,43-2,45	1	2	5,6%	2	4,8%	1,176	0,16-8,80	1	14	7%	12	6,6%	1,139	0,58-2,23	0,7351
GCGCTTGCG		-		-		-			-	1	2,4%		-			-	1	0,5%		-	
GTACCTACA	8	4,9%	7	5%	0,974	0,34-2,76	1	1	2,8%	1	2,4%	1,171	0,07-19,42	1	9	4,5%	8	4,4%	1,025	0,39-2,71	1
GTATCCACA	10	6,1%	7	5%	1,234	0,46-3,33	0,8041	1	2,8%	1	2,4%	1,171	0,07-19,43	1	11	5,5%	8	4,4%	1,266	0,50-3,22	0,6465
GTATCTACA	22	13,4%	27	19,3%	0,648	0,35-1,20	0,2104	4	11,1%	7	16,7%	0,625	0,17-2,34	0,5328	26	13,0%	34	18,7%	0,650	0,37-1,13	0,1589
GTATCTACG	1	0,6%	2	1,4%	0,423	0,04-4,72	0,5964	2	5,6%		-		-		3	1,5%	2	1,1%	1,371	0,23-8,30	1
GTATCTGCG		-	3	2,1%		-			-	1	2,4%		-			-	4	2,2%		-	

NOTA: os haplótipos foram reconstruídos com base na informação de fase fornecida pela PCR-SSP biespecífica e desequilíbrio de ligação entre os alelos.
LEGENDA: EURO = MB= Pacientes diagnosticados como Virchowianos ou Dimorfos com baciloscopia positiva; PB= Pacientes diagnosticados como Tuberculoide ou dimorfos com baciloscopia negativa ou indeterminados; Euro-brasileiros; AFRO = Afro-brasileiros; n = número de alelos ou indivíduos; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; P = valor de p. Valores em negrito indicam significância com valor de *p* menor do que 0,05. Teste utilizado: Fisher bicaudal.

TABELA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA DO GENE *CR1* EM PACIENTES DE HANSENÍASE E CONTROLES.

	PAC.	**CONT.**	**MB**	**PB**	**C^+**	**TT**
n=	43	30	8	38	24	47
MIN.	0.3889	0.3116	-0.2890	-0.4100	0.5258	0.3116
MED.	19.190	16.090	0.2160	0.3530	24.350	14.390
MAX.	49.680	44.740	0.8200	0.8620	49.680	44.740
P=	0.8851		0.6379		**0.0397**	

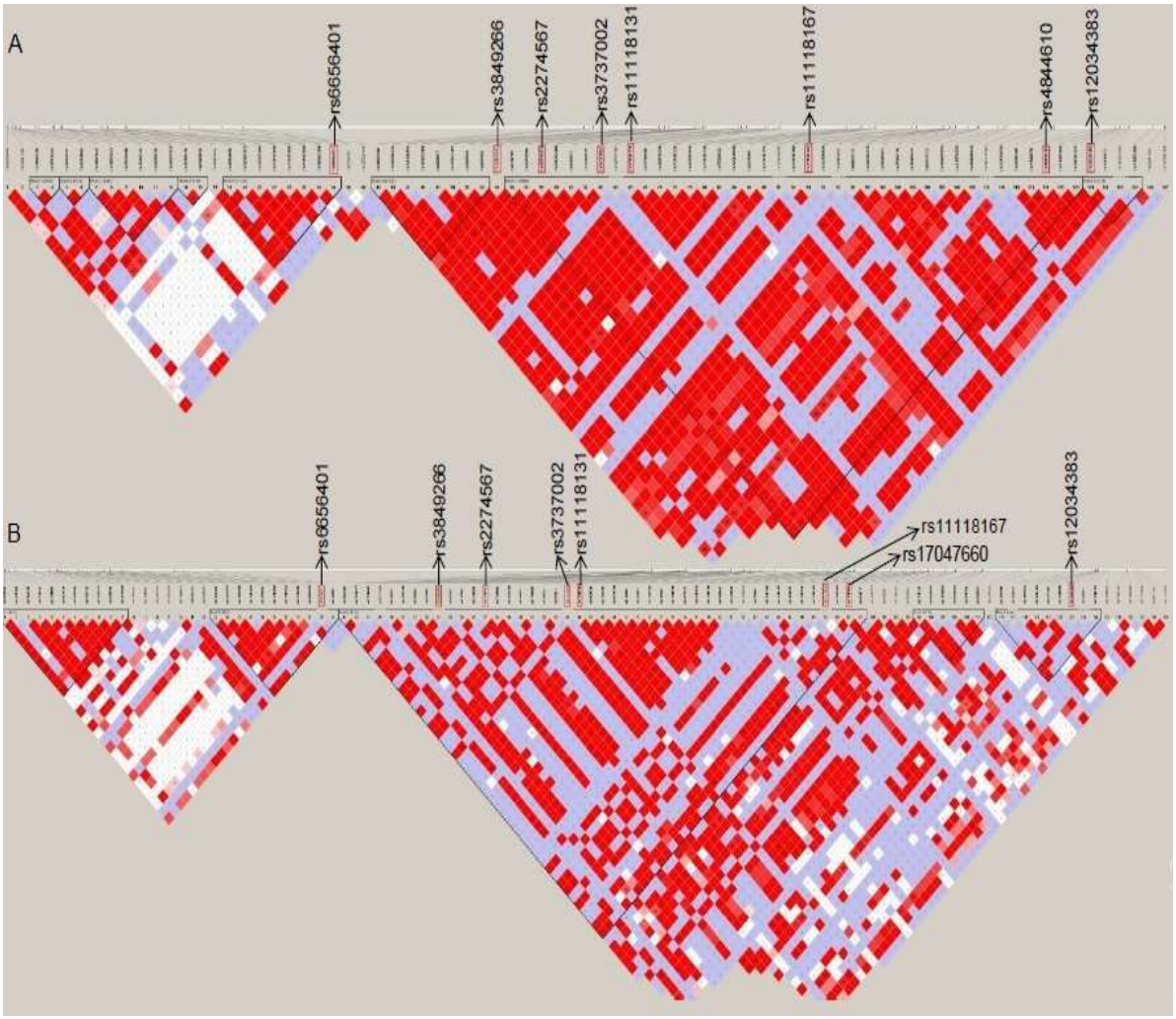
LEGENDA: Pac= Paciente; Cont= controle; MB= multibacilar; PB= paucibacilar; n= número de amostras; min= mínimo; med= mediana; max= máxima; P= valor de P. C + e TT são correspondentes ao SNP rs11118167. Em negrito: valor significativo de p <0,05.

TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DE sCR1 EM PACIENTES DE HANSENÍASE E CONTROLES.

	PAC.	**CONT.**	**MB**	**PB**	**A^+**	**GG**
n=	53	22	28	25	30	13
MIN.	0.0702	0.0860	0.0720	0.0820	0.1200	0.0720
MED.	0.4620	0.4540	0.4570	0.4620	0.5390	0.4200
MAX.	11.510	0.9780	10.450	11.510	10.260	0.9200
P=	0.9471		0.4079		**0.0175**	

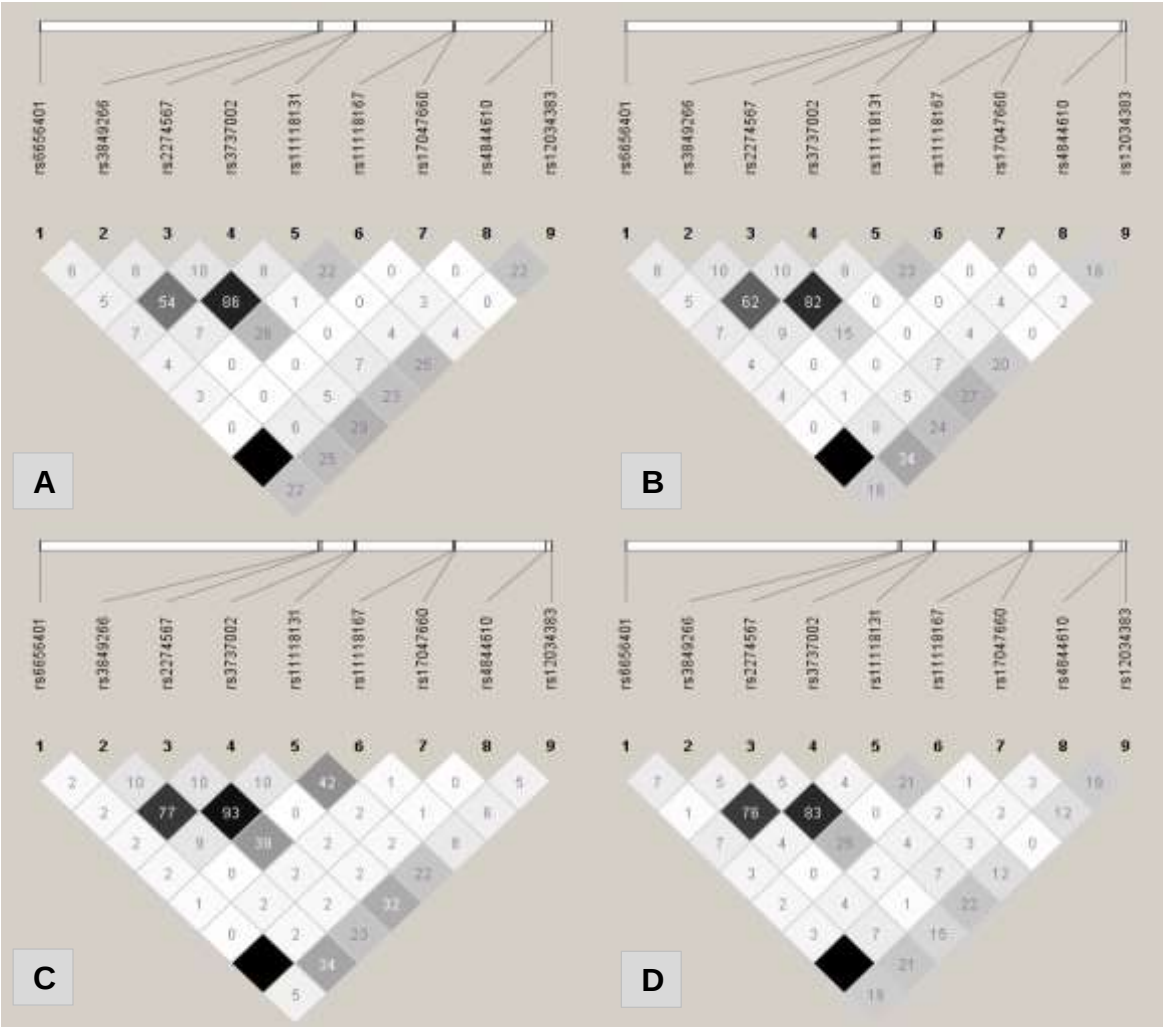
LEGENDA: Pac= Paciente; Cont= controle; MB= multibacilar; PB= paucibacilar; n= número de amostras; min= mínimo; med= mediana; max= máxima; P= valor de P. A^+ e GG correspondem ao SNP rs12034383. Em negrito: valor significativo de p <0.05.

FIGURA 16 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS COMUNS DO GENE *CR1.*



LEGENDA: (A) população europeia do estado de Utah, EUA; (B) africana Yoruba. 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, por OLIVEIRA, 2015.

FIGURA 17 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE *CR1* INVESTIGADOS.



LEGENDA: A) Controles Euro-Brasileiros; B) Pacientes Euro-Brasileiros; C) Controles Afro-Brasileiros; D) Pacientes Afro-Brasileiros. Valores nos losangos indicam o valor de r^2. Quanto mais escuro, maior é a significância.

ANEXOS

ANEXO I - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR - PARCECER CONSUBSTANCIADO Nº 218.104

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS-

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase.
Pesquisador: SÉRVIO TÚLIO STINGHEN
Área
Temática
Versão: 3
CAAE: 10137212.6.0000.0102
Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 218.104

Data da Relatoria: 13/03/2013
Apresentação do Projeto:

INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GÊNICA NOS

RECEPTORES DE COMPLEMENTO NA HANSENÍASE

Doutorando: Sérvio Túlio Stinghen

Orientadora: Profa. Dra Iara José de Messias-Reason

Co-orientadora: Dra Angelica Beate Winter Boldt

Trata-se de projeto de pesquisa visando tese de doutorado, no qual os autores pretendem estudar polimorfismos genéticos de receptores para o sistema complemento e associação com a hanseníase

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL - Estudar polimorfismos de uma única base (SNPs) e haplótipos dos genes que codificam os receptores de complemento e verificar sua influência na hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: baixo risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico, que pode acarretar dor, hematoma e edema. Os pesquisadores informam que em caso de alguma complicação maior, cuidarão para que o paciente seja atendido por profissional de saúde ou, quando necessário, por uma equipe multiprofissional de saúde, sendo o atendimento gratuito.

Benefícios: a compreensão dos mecanismos poderá vir a contribuir para a terapêutica e prevenção dessa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sendo a hanseníase uma doença importante do ponto de vista da saúde pública, a pesquisa em tela se reveste de relevância. Para o estudo in vitro os autores se propõem a estudar 300 amostras de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de hanseníase e 300 amostras de doadores voluntários de sangue saudáveis (grupo controle). Os pacientes serão aqueles portadores de hanseníase atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

(HC-UFPR) e no Centro Regional de Especialidades Metropolitano - CRE METROPOLITANO. As amostras do grupo controle serão coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR. Os indivíduos das amostras deverão ter idade igual ou superior a 18 anos e serão pareados por sexo e idade. As amostras serão obtidas pela coleta de 5 ml de sangue venoso periférico com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras dos pacientes com hanseníase serão obtidas no Serviço de Dermatologia do HC ¿ UFPR e no Centro Regional de Especialidades Metropolitano ¿ CRE METROPOLITANO. As amostras do grupo
controle serão obtidas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná ¿ HEMEPAR. Os testes laboratoriais (parte prática) serão realizados no Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC ¿ UFPR. Das amostras, serão utilizados os macrófagos para infecção in vitro e análise da expressão e bloqueio dos receptores sob estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constam as anuências dos serviços envolvidos (CRE Metropolitano, Serviço de Dermatologia da UFPR e Hemepar) e demais documentos exigidos por este CEP. A análise de mérito consta da ata de aprovação do projeto em reunião do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, datada de 2010.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas, o projeto está aprovado.

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, o qual será reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa. O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS);

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Co participante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

CURITIBA, 13 de Março de 2013

Assinado por:
Claudia Seely
Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2ª andar **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

ANEXO II – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR - PARCECER CONSUBSTANCIADO Nº 279.970

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase.

Pesquisador: SÉRVIO TÚLIO STINGHEN
Área Temática:
Versão: 4
CAAE: 10137212.6.0000.0102
Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 279.970
Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto:
Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase.
Pesquisador: Doutorando SÉRVIO TÚLIO STINGHEN.
Trata-se de projeto de pesquisa visando tese de doutorado, no qual os autores pretendem estudar polimorfismos genéticos de receptores para o sistema complemento e associação com a hanseníase.

Objetivo da Pesquisa:
Estudar polimorfismos de uma única base (SNPs) e haplótipos dos genes que codificam os receptores de complemento e verificar sua influência na hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos: baixo risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico, que pode acarretar dor, hematoma e edema. Os pesquisadores informam que em caso de alguma complicação maior, cuidarão para que o paciente seja atendido por profissional de saúde ou, quando necessário, por uma equipe multiprofissional de saúde, sendo o atendimento gratuito.
Benefícios: a compreensão dos mecanismos poderá vir a contribuir para a terapêutica e prevenção dessa doença.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de solicitação de emenda a protocolo de pesquisa previamente aprovado (em 13/03/2013). Os pesquisadores anexam ofício solicitando emenda incluindo o serviço Centro de referência em Hanseníase e Tuberculose da PM de Sinop, MT e justificam a inclusão por ser o estado do Mato Grosso o que apresenta maior prevalência/incidência de hanseníase no Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores anexam como nova documentação solicitação de adendo ao protocolo incluindo novo serviço para a execução do estudo, o termo de anuência da prefeitura Municipal de SINOP, concordando com a realização.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa,bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2ª andar **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -

CURITIBA, 22 de Maio de 2013

Assinador por:
Claudia Seely Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2ª andar **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

ANEXOS III - TCLE- PACIENTES

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES

Título do Projeto: "Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase"
Investigador: Sérvio Túlio Stinghen
Local da Pesquisa: Laboratório de Imunopatologia Molecular – Serviço de Anatomia Patológica – HC/UFPR
Endereço para contato com o pesquisador: Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2º andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular.
Horário para contato: das 14 às 18 horas.
Telefones para contato com o pesquisador: Tel. (41)3360-1800 Ramal 6523; Celular: (41) 9681-7701 (Sérvio Túlio).

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.
O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença milenar, de grande importância para a saúde pública, devido seu alto poder incapacitante. A doença causa lesão nos braços e pernas, o que provoca perda sensorial na pele e fraqueza muscular. A transmissão da hanseníase ocorre principalmente por uma bactéria eliminada pela boca e pelo nariz de indivíduos doentes não tratados. Entretanto, os mecanismos de defesa do organismo (sistema imunológico) conseguem destruir a bactéria que causa hanseníase e poucos indivíduos que entram em contato com pessoas doentes desenvolvem a doença. Os indivíduos que ficam doente podem desenvolver uma forma mais leve da doença (hanseníase tuberculóide) ou mais grave (hanseníase virchowiana). Essas diferenças observadas podem estar relacionada com os mecanismos de defesa e o estudo destes mecanismos podem contribuir para o tratamento e prevenção da hanseníase.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Pretendemos, através desse estudo, investigar mecanismos de defesa do organismo contra a hanseníase. Será utilizado o material biológico, adquirido por meio da coleta de sangue, para formar um "banco de material biológico" para este estudo e para futuros projetos de pesquisa. Entretanto, este material será apenas utilizado em outros projetos de pesquisa, caso estes sejam aprovados pelo Comitê de Ética e você será contactado(a) a cada nova pesquisa para autorizar ou negar sua participação. Este banco será mantido por 05 anos, sob a responsabilidade da Professora Iara Jose de Messias-Reason, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Após este período, o material será descartado conforme as normas da Vigilância Sanitária.

SELEÇÃO

Nesta pesquisa incluímos pessoas que possuem hanseníase e indivíduos saudáveis, apenas adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.
Não farão parte da pesquisa pessoas com idade abaixo de 18 anos e que não concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

PROCEDIMENTOS

Este estudo envolve duas etapas: aplicação de um questionário e coleta de sangue. Haverá risco mínimo de desconforto relacionado à coleta de sangue. Você poderá apresentar uma leve dor, ardência e a formação de manchas roxas. Em caso de desconforto na coleta do sangue nos responsabilizamos para que seja atendido por profissional de saúde no local da coleta, sendo o atendimento gratuito.

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal_____
Pesquisador Responsável_____
Orientador_____ Orientado_____

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.

Em, 13 / 03 / 2013

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:
Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS
Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO
Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:
O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.
Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com a pessoa responsável pelo estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS
Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do indivíduo, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar Sérvio Túlio Stinghen, pelo telefone (41) 3076-5546 (residencial) ou pelo celular (41) 9681-7701, ou pessoalmento no endereço Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2° andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular, no horário das 14 às 18 horas.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ _____

Local e data (Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

_____

(Assinatura do pesquisador)

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.

Em, 13 / 03 / 2013

ANEXO IV – TCLE – GRUPO CONTROLE

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO CONTROLE

Título do Projeto: "Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase"
Investigador: Sérvio Túlio Stinghen
Local da Pesquisa: Laboratório de Imunopatologia Molecular – Serviço de Anatomia Patológica – HC/UFPR
Endereço para contato com o pesquisador: Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2º andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular.
Horário para contato: das 14 às 18 horas.
Telefones para contato com o pesquisador: Tel. (41)3360-1800 Ramal 6523; Celular: (41) 9681-7701 (Sérvio Túlio).

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.
O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença milenar, de grande importância para a saúde pública, devido seu alto poder incapacitante. A doença causa lesão nos braços e pernas, o que provoca perda sensorial na pele e fraqueza muscular. A transmissão da hanseníase ocorre principalmente por uma bactéria eliminada pela boca e pelo nariz de indivíduos doentes não tratados. Entretanto, os mecanismos de defesa do organismo (sistema imunológico) conseguem destruir a bactéria que causa hanseníase e poucos indivíduos que entram em contato com pessoas doentes desenvolvem a doença. Os indivíduos que ficam doente podem desenvolver uma forma mais leve da doença (hanseníase tuberculóide) ou mais grave (hanseníase virchowiana). Essas diferenças observadas podem estar relacionada com os mecanismos de defesa e o estudo destes mecanismos podem contribuir para o tratamento e prevenção da hanseníase.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Pretendemos, através desse estudo, investigar mecanismos de defesa do organismo contra a hanseníase. Será utilizado o material biológico, adquirido por meio da coleta de sangue, para formar um "banco de material biológico" para este estudo e para futuros projetos de pesquisa. Entretanto, este material será apenas utilizado em outros projetos de pesquisa, caso estes sejam aprovados pelo Comitê de Ética e você será contactado(a) a cada nova pesquisa para autorizar ou negar sua participação. Este banco será mantido por 05 anos, sob a responsabilidade da Professora Iara Jose de Messias-Reason, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Após este período, o material será descartado conforme as normas da Vigilância Sanitária.

SELEÇÃO

Nesta pesquisa incluímos pessoas que possuem hanseníase e indivíduos saudáveis, apenas adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.
Não farão parte da pesquisa pessoas com idade abaixo de 18 anos e que não concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

PROCEDIMENTOS

Este estudo envolve duas etapas: aplicação de um questionário e coleta de sangue. Haverá risco mínimo de desconforto relacionado à coleta de sangue. Você poderá apresentar uma leve dor, ardência e a formação de manchas roxas. Em caso de desconforto na coleta do sangue nos responsabilizamos para que seja atendido por profissional de saúde no local da coleta, sendo o atendimento gratuito.

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal_____
Pesquisador Responsável_____
Orientador_____ Orientado_____

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.

Em, 13 / 03 / 2013

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:
Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS
Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO
Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:
O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.
Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com a pessoa responsável pelo estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS
Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do indivíduo, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar Sérvio Túlio Stinghen, pelo telefone (41) 3076-5546 (residencial) ou pelo celular (41) 9681-7701, ou pessoalmente no endereço Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2° andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular, no horário das 14 às 18 horas.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ _____
Local e data (Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

_____
(Assinatura do pesquisador)

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Em, 13 / 03 / 2013