

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA BOSLOOPER GONÇALVES

**ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS DO GENE C3 E A ASSOCIAÇÃO
COM A SUSCETIBILIDADE E EXPRESSÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE**

CURITIBA

2017

LETÍCIA BOSLOOPER GONÇALVES

**ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS DO GENE C3 E A ASSOCIAÇÃO
COM A SUSCETIBILIDADE E EXPRESSÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE**

Monografia apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná

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

Co-orientadora: Dr^a. Fabiana Antunes Andrade

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e disposição em realizar este trabalho;

À minha mãe, Margareth Boslooper, que sempre me incentivou e aceitou minhas escolhas;

Ao meu companheiro, Luiz Paulo Paredes Soppa, pelo incentivo, paciência e compreensão nos momentos de ausência;

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Iara José de Messias-Reason, pela oportunidade, incentivo e orientação;

À minha co-orientadora, Dra. Fabiana Antunes Andrade, pela disposição e paciência em me ensinar e orientar;

À minha prima, Lígia Caroline Ganss, por me auxiliar com o Excel;

Aos pacientes e indivíduos controles que participaram desta pesquisa;

A todos da equipe do LIPM que contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* ainda endêmica no Brasil e considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde. O sistema imunológico desempenha papel fundamental tanto no desenvolvimento da hanseníase, como na manifestação clínica da doença, que está altamente relacionada à resposta imune do organismo frente ao *M. leprae*. O sistema complemento (SC) é parte essencial da resposta imune inata, desempenhando importante função no combate a infecções assim como na ativação da resposta inflamatória. As proteínas do SC podem ser ativadas por três diferentes vias: a via clássica, mediada por anticorpos; a via das lectinas, mediada por MBL, ficolinas e colectinas; e a via alternativa, ativada através da clivagem espontânea de C3, sendo que a proteína C3 tem papel central na ativação das três vias. A ativação do SC gera uma série de consequências biológicas importantes na defesa contra infecções, tais como: opsonização e fagocitose de patógenos, promoção de quimiotaxia de polimorfonucleares e resposta inflamatória, e lise celular. Além disso, o SC promove a remoção de complexos imunes e de debris celulares, exercendo papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo. O SC tem significativo papel no mecanismo de infecção pelo *M. leprae*, uma vez que o bacilo utiliza-se do componente C3 fixado a sua superfície para infectar fagócitos, através dos receptores do CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos. O objetivo deste trabalho foi analisar o impacto de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene C3 do SC (intron 2 rs2250656, exon 3 rs2230199 e exon 9 rs1047286) na suscetibilidade e expressão das diferentes formas clínicas da hanseníase. O DNA de pacientes com hanseníase e controles foi extraído pelo método *Salting Out* de amostras previamente coletadas. As sequências alvo de DNA foram amplificadas por *PCR-multiplex* em 143 pacientes com hanseníase da região de Curitiba-PR e 166 controles pareados por sexo e etnia, aplicadas em gel de agarose a 1,5%, corado com *Syber Safe* e visualizado em luz azul. Para as análises de associação foram realizados testes de contingência entre as variáveis utilizando-se o teste de Fisher bicaudal, calculado com auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism 5*, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Foi encontrada associação entre o haplótipo CG, formado pelo par de SNPs em desequilíbrio de ligação rs2230199 (exon 3) e rs1047286 (exon 9), e a suscetibilidade à hanseníase ($P = 0,038$; $OR = 1,64$, $[IC95\% = 1,03-2,6]$). Não foram observadas associações entre os genótipos e alelos quando os SNPs foram avaliados separadamente, bem como entre os haplótipos formados pelos três SNPs (rs2230199, rs1047286 e rs2250656). Estudos complementares dos polimorfismos deste gene e seus produtos gênicos são necessários para validar o papel do gene na infecção pelo *M. leprae*.

Palavras – chave: Hanseníase; sistema complemento; gene C3

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C1, C2, C3 E C4 - componentes 1,2, 3 e 4 do Complemento

C3a e C3b - fragmentos do componente C3

CR1, CR3, CR4 - receptores do complemento 1,3 e 4

DFC - demais formas clínicas

DMRI - degeneração macular relacionada à idade

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

CRP - proteína C reativa

FCV - forma clínica virchowiana

hab - habitantes

HC - Hospital de Clínicas

HEMEPAR - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná

HLA - antígeno leucocitário humano

HT - hanseníase tuberculoide

HV - hanseníase virchowiana

HW - Hardy-Weinberg

IC - intervalo de confiança

IFN- γ - interferon gama

IG2 - incapacidade de grau 2

IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 - interleucina 2, 4, 5 e 10

LIPM - Laboratório de Imunopatologia Molecular

MAC - complexo de ataque à membrana

MASP 1, MASP 2, MASP 3 - serinaprotease associada à MBL 1, 2 e 3

MB - multibacilares

MBL - lectina ligante de manose

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

mL - mililitro

NaCl - cloreto de Sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

OR = *odds ratio*

pb - pares de bases

PB - paucibacilares

PCR - reação em Cadeia da Polimerase

PR - Paraná

RBCL - tampão de lise de células vermelhas

rpm - rotações por minuto

SC - sistema complemento

SMet - síndrome metabólica

SNPs - polimorfismos de Nucleotídeos Únicos

T.A. - temperatura Ambiente

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

UFPR - Universidade Federal do Paraná

μ L - microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA	09
1.2 OBJETIVOS	10
1.3 JUSTIFICATIVA	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 HISTÓRICO DA HANSENÍASE	11
2.2 EPIDEMIOLOGIA	13
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	15
2.4 CLASSIFICAÇÃO E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA.....	17
2.5 O SISTEMA IMUNOLÓGICO NA HANSENÍASE.....	19
2.5.1 Reconhecimento celular e fagocitose do <i>Mycobacterium leprae</i>	20
2.6 GENÉTICA DA HANSENÍASE.....	21
2.7 O SISTEMA COMPLEMENTO (SC).....	23
2.7.1 Via clássica	24
2.7.2 Via das lectinas.....	25
2.7.3 Via alternativa.....	25
2.7.4 Etapa final de ativação do complemento.....	26
2.7.5 Receptores do complemento.....	27
2.7.6 Componente 3 do complemento (C3)	28
2.8 GENE C3	29
3 METODOLOGIA	32
3.1 CASUÍSTICA	32
3.1.1 Pacientes	32
3.1.2 Controles	32
3.3 PESQUISA DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO.....	34
3.3.1 Local de realização do trabalho	34
3.3.2 Extração de DNA.....	34
3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase	36
3.3.3.4 PCR- <i>multiplex</i> para o gene C3	37
3.3.4 Corrida Eletroforética	41
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4. RESULTADOS	42

4.1 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	42
4.2 ANÁLISE GENOTÍPICA E ALÉLICA	43
4.3 ANÁLISE HAPLOTÍPICA	44
4.4 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DO GENE C3.....	45
4.5 ANÁLISE DOS SNPs EM DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	46
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

O sistema complemento (SC) faz parte da resposta imune inata do sistema imunológico e é composto por mais de trinta proteínas distribuídas através dos fluidos corporais e tecidos. Estas proteínas encontram-se na forma de pré-enzimas que são ativadas em cascata desencadeando suas ações. O SC é essencial no combate a infecções bacterianas e virais, assim como na ativação da resposta inflamatória em regiões lesionadas. As proteínas do SC podem ser ativadas por três diferentes vias: a via clássica, mediada por anticorpos; a via alternativa, mediada pela clivagem espontânea da proteína C3; e a via das lectinas, ativada pela lectina ligante de manose (MBL), ficolinas e colectinas. As três vias convergem para a síntese da enzima C3-convertase que, quando clivada gera C3a e C3b, esta última liga-se covalentemente à superfície dos patógenos, facilitando a fagocitose por células fagocíticas (ABBAS et al., 2012). Contudo, por mais que a fagocitose de patógenos por células fagocíticas seja imprescindível no combate a infecções, esta mesma internalização pode servir como porta de entrada para microorganismos intracelulares obrigatórios, como o *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991).

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica com alta endemicidade nos países em desenvolvimento da Ásia, África e das Américas (NOORDEEN, 1993). A expressão clínica da hanseníase é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro que influenciam na resposta imune do organismo quando este é exposto ao *M. leprae*, acarretando no desenvolvimento de formas clínicas distintas da doença. A hanseníase tuberculoide (HT) é uma forma mais benigna e localizada, embora os danos teciduais e neurológicos sejam frequentes. Enquanto que indivíduos com hanseníase virchowiana (HV), apresentam numerosas lesões de pele e crescimento descontrolado dos bacilos, resultando em grande quantidade de *M. leprae* viáveis nas lesões da pele (MISCH et al., 2010)

1.2 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Estudar polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) do gene *C3*, codificador da proteína *C3* do Sistema Complemento, verificando sua influência na suscetibilidade e nas diferentes expressões clínicas da hanseníase.

- Objetivos específicos

- Determinar a frequência genotípica, alélica e haplotípica de polimorfismos do gene *C3* em pacientes com hanseníase e controles saudáveis,
- Verificar associação entre os polimorfismos avaliados e a suscetibilidade a hanseníase, bem como às diferentes expressões clínicas da doença.

1.3 JUSTIFICATIVA

Os mecanismos de infecção pelo *M. leprae* e de evasão do sistema imune não são completamente conhecidos, levando a necessidade de estudos que possam contribuir para uma melhor compreensão da etiologia da hanseníase, bem como melhora no diagnóstico e tratamento. A importância do SC na infecção pelo *M. leprae* tem sido demonstrada através de diferentes estudos de associação do SC com a suscetibilidade à doença (PREVEDELLO; MIRA, 2007; SAUER et al., 2015; ANDRADE et al., 2017). *C3* é a molécula central do SC e possui um papel crucial na infecção por *M. Leprae*, uma vez que fixa-se na superfície bacteriana através principalmente da ativação da via alternativa, atuando como ligante para os receptores CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos, mediando a fagocitose do patógeno. Além disso, a ligação de *C3* acontece de maneira específica ao glicolípido fenólico-1 (PGL-1), uma molécula presente em grande quantidade na superfície do bacilo (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991). Apesar de seu papel crucial na infecção, polimorfismos no gene que codifica *C3* (gene *C3*), não foram avaliados quanto a sua possível influência na suscetibilidade à hanseníase, justificando o presente estudo. Os polimorfismos avaliados no presente trabalho

foram selecionados com base em sua frequência populacional, associação com outras doenças e potencial alteração na função da proteína. O SNP rs2230199, presente no exon 3 do gene C3, refere-se à troca do nucleotídeo Citosina para Guanina (C>G), levando à mudança do aminoácido Arginina para Glicina (Arg>Gli). (YATES et al., 2007). Este polimorfismo é descrito como responsável por formas variadas da proteína C3, denominadas alótipos, que já foram associadas com diversas doenças (DELANGHE et al., 2013). O SNP rs2250656, localizado no intron 2 no gene C3 leva a alteração do nucleotídeo Timina para Citosina (T>C) e não causa alteração de aminoácido porque não ocorre na região codificadora do gene. Contudo, indivíduos com esta mutação apresentam maiores riscos de desenvolver síndrome metabólica e degeneração macular relacionada à idade, quando comparados aos indivíduos que não possuem o polimorfismo (PHILLIPS et al., 2009; QIAN-QIAN et al.; 2015). O SNP rs1047286, localizado no exon 9 do gene C3, leva a alteração de uma Guanina para uma Adenina (G>A) acarretando na mudança do aminoácido Prolina para Leucina (Pro>Gli). Este polimorfismo, assim como o anterior, foi associado ao risco de degeneração macular relacionado à idade (QIAN-QIAN et al., 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

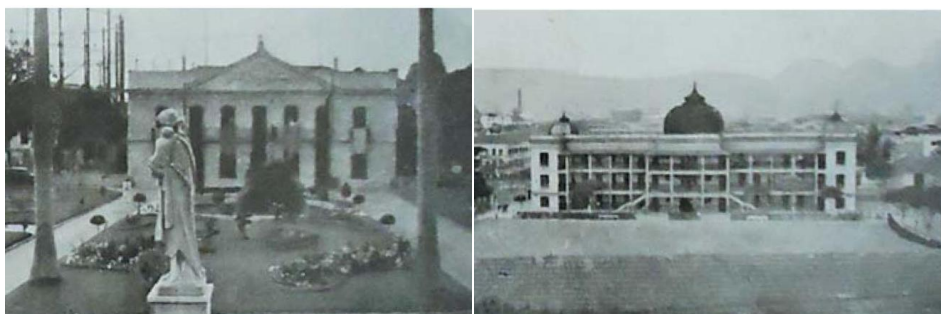
2.1 HISTÓRICO DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença milenar, com registros datados do século 6 a.C. que sugerem seu surgimento no Oriente, em regiões da Índia, China e Egito (BROWNE, 2003). A disseminação para os outros continentes provavelmente ocorreu através de tribos nômades e navegadores. Desde então, a hanseníase desencadeia grande estigma e preconceito por parte da sociedade, devido às deformidades causadas pelas lesões de pele e nervos. Conhecida antigamente por Lepra ou Mal de Lázaro, era associada à desonra, ao pecado e à impureza da alma. No Brasil, a introdução da doença se deu provavelmente, pela chegada dos europeus durante o período colonial (DAMASCO, 2005).

Até meados do século XX o destino dos enfermos brasileiros eram os leprosários ou lazaretos, onde tinham seus pertences queimados e eram completamente isolados da sociedade, com o intuito de não disseminar a doença

(YAMANOUCHI et al., 1993). O primeiro leprosário construído no Brasil foi o Hospital dos Lázaros do Rio de Janeiro (figura 1), atual Hospital Frei Antônio, localizado em São Cristóvão (ARAÚJO, 1956).

FIGURA 1 - HOSPITAL DE LÁZAROS DO RIO DE JANEIRO



FONTE: History of Leprosy in Rio de Janeiro, 2014. Fotos tiradas por Dr. Heraclides Souza Araújo em 27 de maio de 1943.

Aqueles que não eram enviados aos leprosários eram impedidos de frequentar espaços públicos, como igrejas, e eram obrigados a utilizar luvas e roupas especiais, além de carregar sinos que alertassem os demais sobre a sua presença (figura 2) (BRASIL, 1989).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DE UM INDIVÍDUO COM HANSENÍASE ANTIGAMENTE



FONTE: <http://www.ibamendes.com/2011/02/lepra-origem-do-estigma.html>

A sulfona, primeiro medicamento eficaz no combate à hanseníase, surgiu na Europa em meados de 1940. A partir da década de 1950, a sulfona começou a ser empregada no tratamento da enfermidade e foi difundida para todos os estados, substituindo o tratamento com óleo de chaulmoogra, medicamento fitoterápico

indiano administrado por meio de injeções que causavam fortes efeitos colaterais como vômitos e diarreia. Com a sulfona muitos pacientes obtiveram a cura e, conseqüentemente a liberdade do leprosário. Somente em 1962, através do Decreto de n.968 de 07 de maio, o isolamento em leprosários foi banido como medida de combate à doença (DAMASCO, 2005). Em 1977 o Brasil adota o termo *hanseníase* para designar a doença, com intuito de substituir o termo *lepra* e os pacientes passaram a ser designados como hanseniano e não leproso, morfético, e repugnante de outrora. Em 1995, foi sancionada a lei nº 9.010, que proibiu o uso da denominação lepra e seus derivados nos documentos oficiais da administração brasileira, em uma tentativa de reduzir o estigma da doença (BRASIL, 1995).

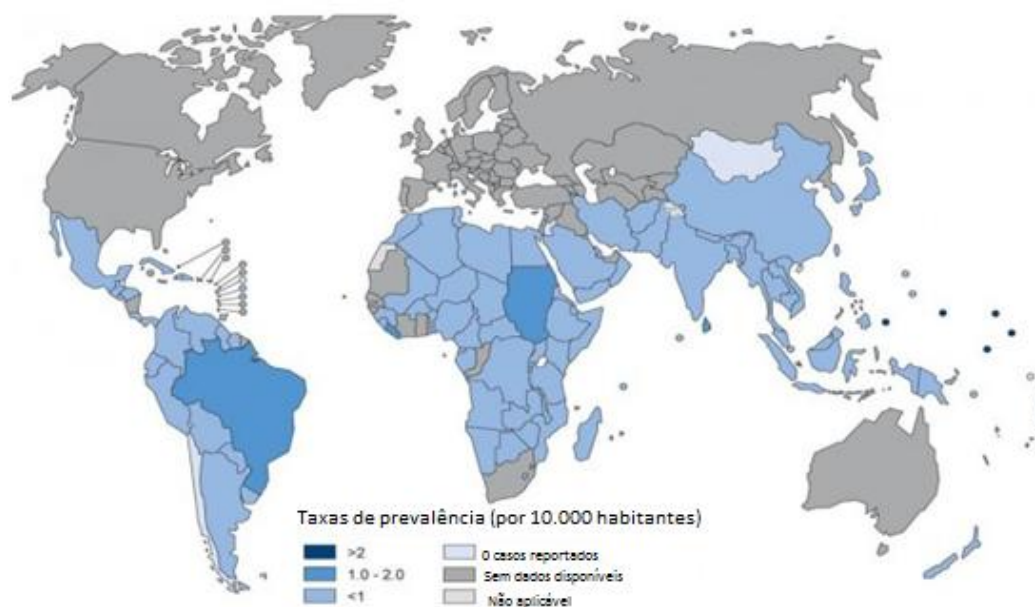
Atualmente o tratamento específico da hanseníase se baseia no uso de poliquimioterapia – PQT, uma associação de Rifampicina, Dapsona e Clofazimina, recomendado pela Organização Mundial de Saúde - OMS e preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil. A PQT é administrada seguindo esquema padrão, de acordo com a classificação do exame baciloscópico do paciente: paucibacilares (PB) - casos com até cinco lesões de pele e/ou apenas um tronco nervoso comprometido; ou multibacilares (MB) - casos com mais de cinco lesões de pele e/ou mais de um tronco nervoso acometido (ARAUJO, 2003). A PQT mostrou-se eficaz no tratamento da hanseníase rompendo a cadeia epidemiológica da doença e se, realizada adequadamente garante a cura da doença (BRASIL, 2014).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Mesmo não sendo uma doença altamente transmissível e com tratamento quimioterápico (poliquimioterapia) eficiente há décadas, a hanseníase ainda afeta endemicamente populações de diversos países em desenvolvimento da África, Ásia, América Latina e do Pacífico (MISCH et al., 2010). Em 2014, 213.899 novos casos foram notificados, sendo que 94% dos pacientes eram habitantes da Índia, Mianmar, Indonésia, Brasil, Nigéria, Sudão, Madagascar, Bangladesh, República Democrática do Congo, Etiópia, Nepal, Filipinas, Sri Lanka e República Unida da Tasmânia (Figura 3). Entre os novos casos notificados, 18.869 (8,8%) eram crianças e 14.110 (6,6%) apresentavam incapacidade de grau 2 (IG2). O Brasil é o segundo país do mundo em número de casos de hanseníase, com aproximadamente 31 mil

casos novos registrados em 2013, ficando atrás apenas da Índia, com 127 mil novos casos (OMS, 2014).

FIGURA 3 - TAXA DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO MUNDO (2011)



FONTE: WHO - World Health Organization

LEGENDA: azul escuro: >2/10.000hab; azul: 1,0 - 2,0/ 10.000hab; azul claro: <1/10.000hab; cinza claro: 0 casos reportados; cinza escuro: sem dados disponíveis; branco: não aplicável

Entre os anos de 2006 a 2013 obteve-se uma redução progressiva nos novos casos de hanseníase nas Américas, de 47.612 em 2006 para 33.084 casos em 2013 (redução de 30,5%), devido principalmente ao aumento nos esforços para a prevenção, tratamento e combate da doença, como por exemplo a "Estratégia global para aliviar a carga da hanseníase e manter as atividades de controle da hanseníase" (período do plano: 2006-2010) e a "Estratégia Global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase" período do plano: 2011-2015 (WHO,2016).

Dentre os casos registrados nas Américas, 31.044 ocorreram no Brasil (93,9%). Desta forma, a prevalência da doença no Brasil foi estimada em 1,42 casos por 10.000 habitantes em 2013 (OMS, 2014). Cabe ressaltar que a OMS utiliza o padrão de menos de um caso por 10.000 habitantes para que a hanseníase não

seja considerada problema de saúde pública para o país. Em 2014, segundo o Ministério da Saúde, foram notificados 24.612 novos casos de hanseníase em adultos e 1.793 novos casos em indivíduos menores de 15 anos, gerando uma prevalência de 1,56 por 10 mil habitantes no Brasil. Dos casos notificados, 80% encontram-se nos estados do Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Rondônia e Goiás. No Mato Grosso, por exemplo, a prevalência chega a 9,03 casos por 10.000 habitantes.

No Paraná, de acordo com a Secretaria de Saúde do Estado, a doença está próxima de ser erradicada como problema de saúde pública, uma vez que houve um decréscimo na prevalência nos últimos anos, de 2,1/10.000hab em 2004 para 0,9/10.000hab em 2013 (PARANÁ, 2014).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O *Mycobacterium leprae* (figura 4), agente causador da hanseníase, é um bacilo intracelular obrigatório pertencente a ordem *Actinomycelalis* e a família *Mycobacteriaceae*. Multiplica-se através do processo de divisão binária (figura 4), é gram-positivo e fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen. Possui parede celular com 20nm de espessura, constituída por peptideoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídeas (MACIEIRA, 2000). Apresenta também uma cápsula lipídica externa à parede constituída principalmente por dois lipídios, 1-ftiocerol dimicocerosato (PM) e 2-glicolípídeo fenólico 1 (PGL-1), onde a molécula de C3 se liga para o reconhecimento do patógeno (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991).

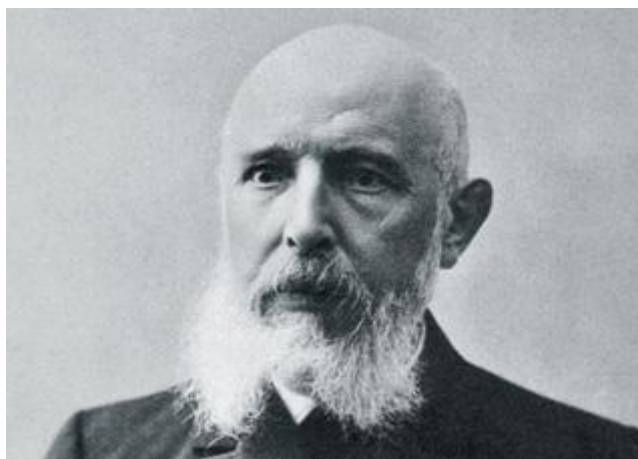
FIGURA 4 - *Mycobacterium leprae* EM PROCESSO DE DIVISÃO CELULAR



FONTE: MACIEIRA, 2000

O *M. leprae* foi identificado em 1874 pelo médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912) (figura 5), sendo considerada a primeira descoberta de um microrganismo como causador de uma doença humana. O médico dedicou seus estudos, no Hospital São Jorge (Bergen, Noruega), à doença milenar que mutilava, deformava e exilava seus portadores. Passou a questionar a crença da época de que a hanseníase seria uma doença hereditária, pois acreditava que esta era causada por um microrganismo. Examinou materiais oriundos de lesões onde visualizou os bacilos, mesmo sem coloração. Inoculou a bactéria em animais, em si próprio e nos olhos de uma paciente mulher, que posteriormente o processou, resultando na perda temporária do seu direito de exercer a profissão de médico (BECHLER, 2012).

FIGURA 5 - MÉDICO NORUEGUÊS GERHARD HENRIK ARMAUER HANSEN



FONTE: <https://alchetron.com/Gerhard-Armauer-Hansen-1172199-W>

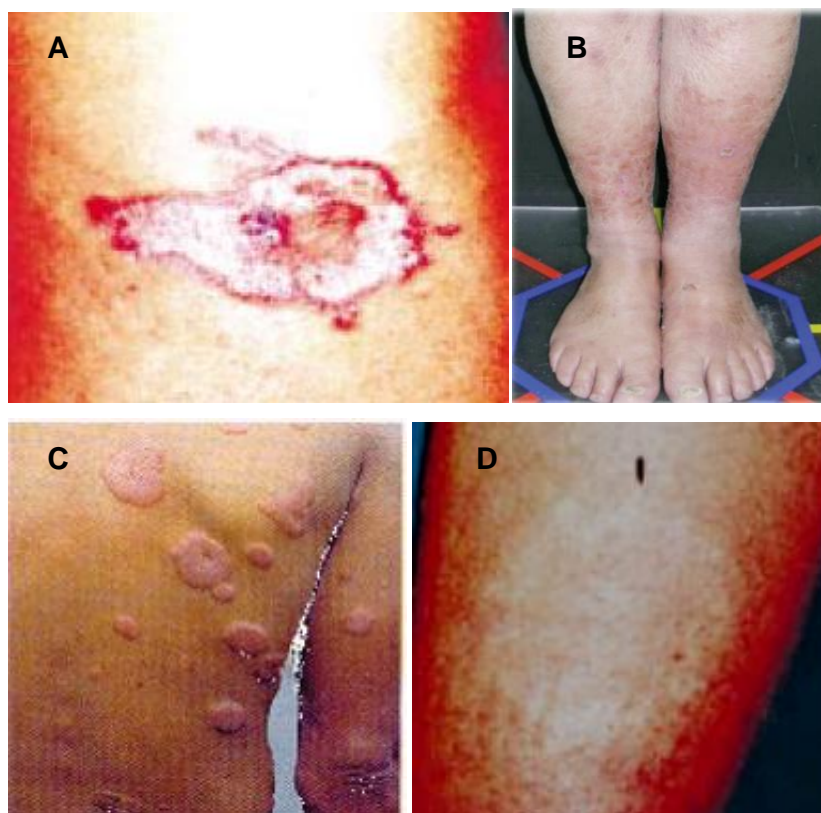
O bacilo infecta principalmente macrófagos e células de Schwann do sistema nervoso periférico (MISCH et al., 2010). Apresenta alta infectividade (infecta grande quantidade de pessoas) e baixa patogenicidade (poucos adquirem a doença), com período de incubação de 2 a 7 anos. As vias aéreas superiores (mucosa nasal e orofaringe) são as principais vias de eliminação do bacilo e infecção, desta forma acredita-se que a transmissão da hanseníase seja através de gotículas nasais. Outra forma de contágio é por contato direto entre a lesão do indivíduo doente e a pele lesionada de indivíduos sadios (GELBER, 2008). Pacientes com mais de cinco lesões de pele e/ou nervos periféricos acometidos podem transmitir o *M. leprae*

antes de iniciar o tratamento com poliquimioterápicos, logo o contato próximo com esses indivíduos aumenta o risco de desenvolver a doença (LOCKWOOD, 2011).

2.4 CLASSIFICAÇÃO E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

A hanseníase sintomática possui duas expressões clínicas polares distintas, a tuberculoide e a virchowiana. Entre as formas polares podem ser observadas formas intermediárias da doença, determinadas: tuberculoide limítrofe (*boderline* ou dimorfa) e virchowiana limítrofe (*boderline* ou dimorfa), além da forma indeterminada (RIDLEY; JOPLING, 1966). A hanseníase tuberculoide (HT) ocorre em indivíduos resistentes ao *M. leprae*, acarretando em uma forma mais benigna e localizada. É caracterizada pela presença de placas eritematosas, eritemato-hipocrômicas bem definidas, com regiões anestesiadas e comprometimento de nervo. Em contrapartida, indivíduos com alta suscetibilidade à infecção desenvolvem a hanseníase virchowiana (HV), com lesões de pele abundantes e proliferação descontrolada dos bacilos. Comumente apresentam eritema e infiltrações difusas, placas eritematosas infiltradas e de bordas pouco definidas, tubérculos e nódulos, lesões das mucosas com alteração de sensibilidade. Indivíduos com a forma indeterminada apresentam áreas com anestesia, parestesias, manchas hipocrômicas, com ou sem redução da sudorese e diminuição de pelos. As formas dimorfas caracterizam-se pelas lesões eritematosas planas com o centro claro (pré-foveolares); eritematopigmentares com a tonalidade ferruginosa ou pardacenta (foveolares) e alterações de sensibilidade. Pacientes com as formas tuberculoide e indeterminada podem evoluir para cura espontânea, o que não acontece em pacientes virchowianos (ARAUJO, 2003; MISCH et al, 2010). A doença pode ser altamente incapacitante com comprometimento sistêmico descrito em alguns casos (figura 6) (RENAULT; ERNST, 2010).

FIGURA 6 - LESÕES DE PELE OBSERVADAS NAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE

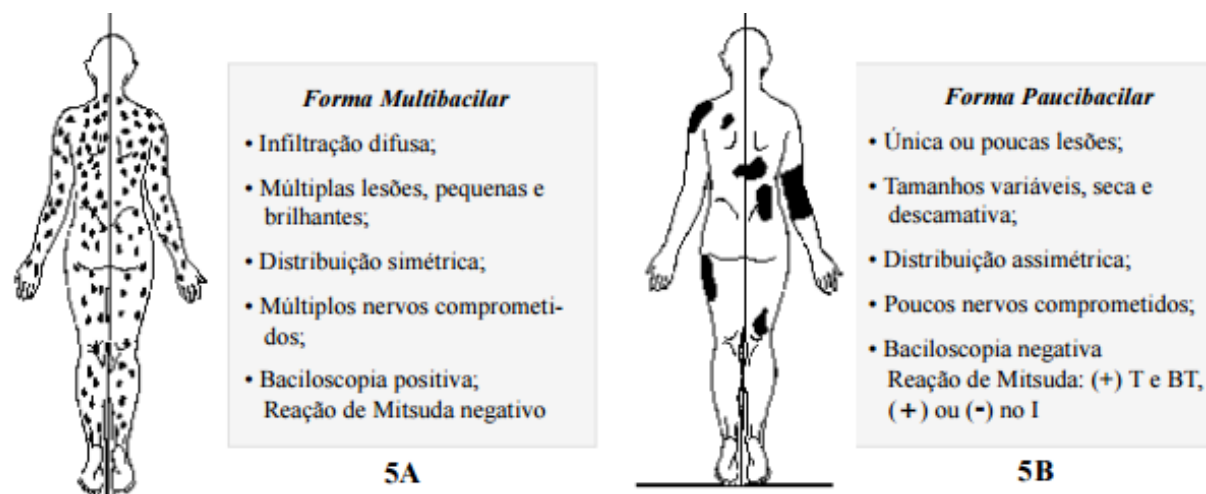


FONTE: ARAÚJO, 2003; ITO, 2014; <http://www.inf.furb.br/sias/parasita/Textos/hansenias.e.htm>

LEGENDA: A= Hanseníase tuberculoide; B= Hanseníase Virchowiana; C= Hanseníase *Boderline*/dimorfa D= Hanseníase indeterminada

Para fins de classificação, os pacientes são agrupados de acordo com o número de lesões de pele e/ou número de nervos acometidos; pacientes que apresentam mais de cinco lesões são denominados multibacilares e os que possuem menos de cinco são paucibacilares. Normalmente, indivíduos com a forma indeterminada e tuberculoide são classificados como paucibacilares e pacientes virchowianos e dimorfos como multibacilares (figura 7) (BARBIERE; MARQUES, 2009).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FORMAS CLÍNICAS MULTIBACILAR (5A) E PAUCIBACILAR (5B) DA HANSENÍASE



FONTE: SOUZA, 1997

LEGENDA: T=Tuberculoide; BT= Boderline-Tuberculoide; I= Indeterminada

2.5 O SISTEMA IMUNOLÓGICO NA HANSENÍASE

As expressões clínicas distintas da hanseníase estão relacionadas com a resposta imunológica do indivíduo acometido. A HT está relacionada com a ativação dos linfócitos T CD4+ subtipo Th1. Estas células produzem interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interfeiron gama (IFN- γ) que recrutam e ativam fagócitos mononucleares e contribuem para a eliminação ou inibição do crescimento do *M. leprae*, o que acarreta em uma forma mais moderada da doença ou na cura. Por outro lado, a forma HV está associada com ativação dos linfócitos T CD4+ subtipo Th2 que secretam IL-4, IL-5 e IL-10, ampliando a resposta humoral, suprimindo a ação dos macrófagos e favorecendo o crescimento descontrolado dos bacilos (MODLIN, 1994). Um dos mecanismos de evasão do *M. leprae* é justamente a inibição da produção de IL-2 e, conseqüentemente, da proliferação de células Th1 (DAGUR et al., 2010).

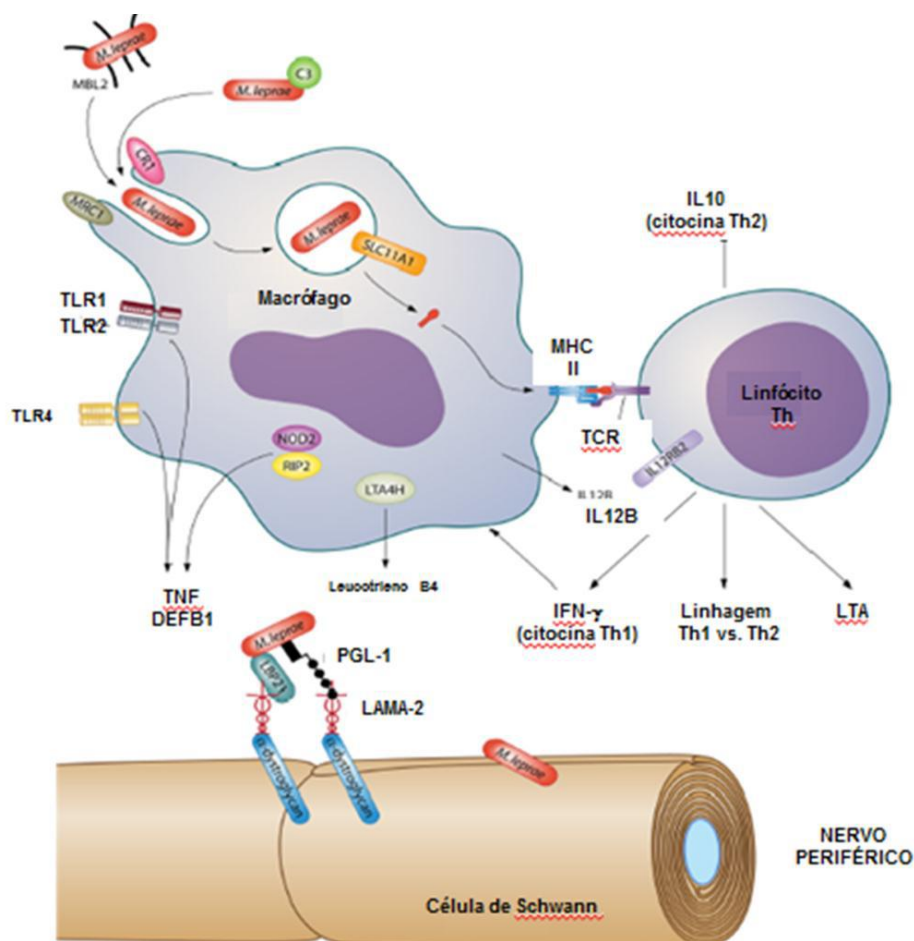
Pacientes hansenianos podem apresentar dois tipos de reações imunológicas/hansênicas: a do tipo I ou do tipo 2. A reação do tipo I ou reação reversa com ativação súbita da resposta Th1 inflamatória contra os antígenos do *M. leprae* ocorre com mais frequência em pacientes dimorfos, normalmente após o início do tratamento. É caracterizada pelo surgimento de novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), que podem ser eritemato-infiltradas (aspecto

erisipelóide), alterações de cor e edema nas lesões antigas, assim como dor ou espessamento dos nervos (neurites). A reação do tipo 2 ou eritema nodoso é uma condição inflamatória aguda com concentrações elevadas de fator de necrose tumoral (TNF), infiltração tecidual de neutrófilos e células CD4+, deposição de imunocomplexos e proteínas do complemento, gerando vasculopatia associada a formação de imunocomplexos, paniculite e uveíte. Caracteriza-se pela presença de nódulos vermelhos e dolorosos, dores articulares, dor e espessamento nos nervos, febre e mal-estar generalizado, mas sem alteração nas lesões antigas (MISCH et al, 2010).

2.5.1 Reconhecimento celular e fagocitose do *Mycobacterium leprae*

O sistema imune inato é o primeiro a ser ativado na defesa do hospedeiro contra infecções. O reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) é imprescindível para ativação de proteínas do SC, fagocitose e destruição de microorganismos patogênicos. A fagocitose de patógenos por macrófagos e monócitos através de receptores celulares elimina os microorganismos rapidamente, evitando infecções. Contudo, essa via pode também ser utilizada como entrada por patógenos intracelulares obrigatórios como o *M. leprae* (MISCH et al., 2010; SCHLESINGER; HORWITZ, 1990, 1991).

Vias de infecção do *M. leprae* em fagócitos mononucleares, relacionadas a ativação do SC, foram previamente descritas na literatura (SCHLESINGER; HORWITZ, 1990). Foi observado que o componente C3 é fixado na superfície bacteriana por meio da ativação da via alternativa do complemento, agindo como ligante para os receptores CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos, os quais medeiam a fagocitose do patógeno. Além disso, foi esclarecido que a ligação de C3 acontece de forma específica ao glicolípido fenólico-1 (PGL-1), uma molécula presente em grande quantidade na superfície do bacilo (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991). A molécula PGL-1 também está envolvida na infecção das células de Schwann no sistema nervoso periférico (NG et al., 2000) (figura 8).

FIGURA 8 - RECONHECIMENTO, FAGOCITOSE E RESPOSTA IMUNE CONTRA O *M. LEPRAE*

FONTE: adaptado de MISCH et al., 2010.

LEGENDA: LPB21 = laminina ligante de proteína 21; PGL-1 = glicolípido fenólico-1; C3 = proteína 3 do complemento; CR1 = receptor de complemento 1; DEFB1 = beta-defensina-1; IFN- γ = interferon gama; IL-10 = interleucina 10; IL12B = interleucina 12 subunidade 40p; IL12BR2 = receptor de interleucina beta-2; LTA4H = hidrolase de leucotrieno A4; LTA = linfotóxina α ; TNF = fator de necrose tumoral; MBL 2 = lectina ligante de manose 2; MRC1 = receptor de manose; LAMA2 = α 2-laminina-2; TCR = receptor de células T; Th1 e Th2= célula T auxiliar 1 e 2.

2.6 GENÉTICA DA HANSENÍASE

Atualmente sabe-se que a exposição ao *M. leprae* não é condição única para desenvolvimento da hanseníase e que diferentes conjuntos de genes estão relacionados com a suscetibilidade do hospedeiro à doença. Sauer e colaboradores (2015) citam três diferentes conjuntos de genes que controlariam três diferentes estágios desde a exposição até o desenvolvimento da doença: I) Controle da infecção independentemente da sua manifestação clínica (hanseníase per se); II) Após a infecção estar estabelecida, determinam o tipo de resposta imune do

hospedeiro e a forma clínica da doença e III) Relacionados ao risco de desenvolvimento de reações hansênicas.

Polimorfismos em diversos genes já foram associados à hanseníase. Polimorfismo é o termo designado à ocorrência simultânea de dois ou mais genótipos, resultantes da combinação de alelos de um mesmo *locus* gênico, que podem ou não gerar fenótipos distintos. Entretanto, para que um *locus* seja polimórfico, o alelo mais frequente não deve ultrapassar 99% de ocorrência na população, de forma que o outro alelo polimorfo apresente, no mínimo, 1% de frequência. Os alelos são as variações encontradas em um gene, que diferem entre si por pequenas alterações na sequência do DNA. Os alelos fazem parte de um mesmo *locus* gênico em cromossomos homólogos e são os responsáveis pelo fenótipo do indivíduo. O fenótipo de um indivíduo é o resultado visível ou detectável da expressão dos genes e das condições ambientais em que este organismo está inserido (UTIYAMA, 2004).

Diversos estudos tem demonstrado que SNPs presentes no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), estão associados a suscetibilidade à hanseníase. O SNP rs602875 da região HLA-DR-DQ foi altamente relacionados a suscetibilidade à hanseníase na população chinesa (ZHANG, 2009). Shankarkumar e colaboradores (2004) demonstraram que os alelos *A*206*, *A*1102*, *B*4016*, *B*5110*, *Cw*0407* e *Cw*0703* presentes no complexo HLA de classe I apresentaram frequência significativamente maior em pacientes indianos com hanseníase em comparação aos controles. Alter et al (2011) analisaram 682 SNPs em uma região de 1.9 Mb na região do complexo HLA. Destes, 59 foram encontrados associados com a suscetibilidade à hanseníase na população vietnamita.

A proteína MBL do SC reconhece diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como domínios de manose, N-acetilglucosamina, fucose e glicose presentes na superfície de diversos microorganismos. Esse reconhecimento possibilita a fagocitose e a posterior ativação do complemento (DORNELLES et al., 2006). Polimorfismos do gene *MBL-2* foram investigados em pacientes com hanseníase e os resultados indicaram que a frequência do haplótipo LYPA, associado com uma maior expressão da proteína MBL, foi significativamente maior em pacientes com hanseníase e com a forma clínica virchowiana quando comparados com controles (MESSIAS-REASON et al., 2007).

A frequência da variante p.126L do gene *MASP2* do SC, associada a baixas concentrações da proteína, foi significativamente maior em pacientes com hanseníase, indicando que baixos níveis de *MASP2* aumentariam a suscetibilidade à doença (BOLDT et al., 2013^a)

Messias-Reason et al (2009) observaram que o haplótipo AGA do gene *FCN2* da proteína ficolina-2 do SC foi mais frequente em controles que pacientes com hanseníase, indicando um efeito protetor à doença.

Andrade e colaboradores (2017) determinaram recentemente que polimorfismos no gene *FCN3* colaboram para a elevação da concentração de ficolina-3 e que este aumento estaria relacionado ao favorecimento à infecção pelo *M. leprae*.

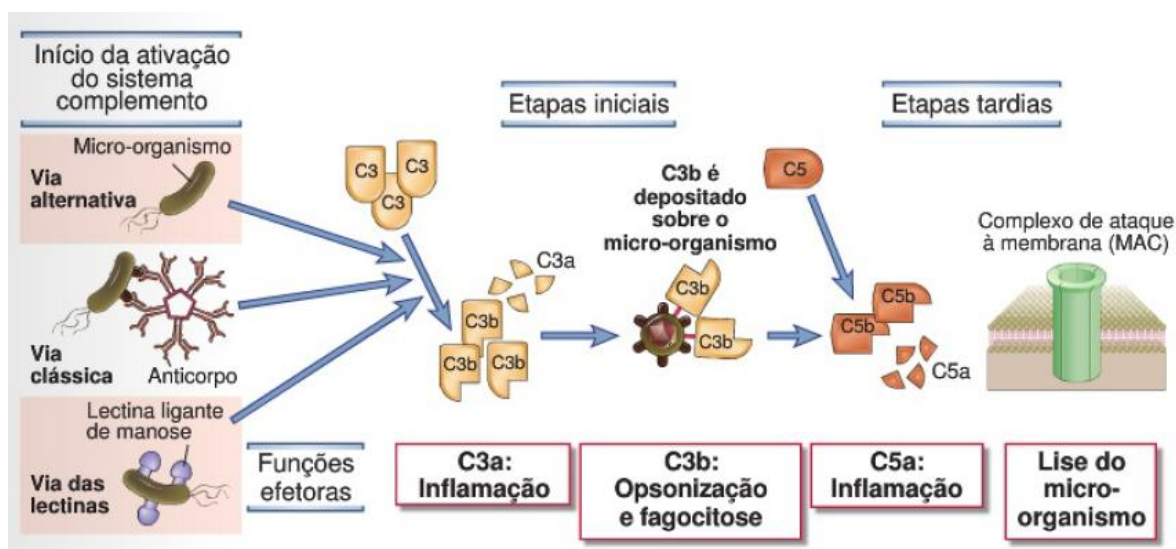
2.7 O SISTEMA COMPLEMENTO (SC)

O sistema complemento (SC) é parte essencial da resposta imune inata, desempenhando importante função no combate a infecções por patógenos, assim como na ativação da resposta inflamatória. Há mais de cem anos atrás, o termo complemento foi utilizado para descrever uma substância que causava lise em bactérias e eritrócitos revestidos com anticorpo, pois gerava um complemento na ação deste. Atualmente, o sistema do complemento (SC) é composto por mais de trinta proteínas séricas e ligadas à membrana celular, as quais são essenciais na imunidade inata e que também colaboram na imunidade adaptativa (PETTIGREW et al., 2009; LISZESWSKI; ATKINSON, 2010). As proteínas do complemento têm um papel importante no controle de infecções bacterianas e virais levando a opsonização e fagocitose de patógenos, ativação da resposta inflamatória, lise celular, remoção de complexos imunes e de debris celulares.

As proteínas do SC estão extensamente distribuídas através dos fluidos corporais e dos tecidos como pré-enzimas que são ativadas em cascata por três diferentes vias: (1) via clássica, dependente de anticorpos; (2) via alternativa, mediada através da ligação direta de C3 hidrolisado (C3b) aos patógenos e; (3) via da lectina ligante de manose (MBL), também ativada por ficolinas e colectinas. As três vias de ativação convergem para a síntese de C3 convertase, enzima proteolítica responsável pela clivagem da proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b então que se liga covalentemente aos patógenos (opsonização), facilitando a

fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos. O fragmento C3a permanece livre e tem a função de ativar a resposta inflamatória. O C3b pode se ligar a outras proteínas do complemento formando a enzima C5 convertase, a qual cliva C5 em C5a (inflamação) e C5b que se fixa na membrana celular. O C5b inicia a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), formando-se poros na membrana celular e levando à lise osmótica (figura 9) (MURPHY et al., 2010; ABBAS et al., 2011).

FIGURA 9 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: ABBAS et al, 2011.

LEGENDA: C3= componente 3 do complemento; C3a/C3b= fragmentos ativos de C3; C5= componente 5 do complemento; C5a/C5b= fragmentos ativos de C5; MAC= complexo de ataque à membrana.

2.7.1 Via clássica

A ativação desta via ocorre por reações sequenciais envolvendo C1, C4, C2 e C3. C1 é um complexo multimolecular dependente de íons Cálcio composto por três proteínas: C1q, C1r e C1s. A ativação da via se inicia com a ligação de C1q aos domínios Fc de IgM e IgG (sub-classes IgG1, IgG2 e IgG3 – IgG4 não ativa complemento) ou pelo reconhecimento direto de determinados patógenos e da proteína C reativa (CRP), gerando a ativação de C1r que ativa C1s. A ativação de C1s acarreta na clivagem de C2 e C4 e formação da C3 convertase (C4b2a), a qual cliva a proteína C3 nos fragmentos C3a e C3b. C3b se liga aos patógenos, opsonizando-os, o que promove sua eliminação por fagocitose. C3b também pode

se ligar à C3 convertase, formando a C5 convertase utilizada na etapa final de ativação do SC. (ABBAS, 2011; DEGN; THIEL, 2013; MAYILYAN, 2012).

2.7.2 Via das lectinas

A via das lectinas é iniciada pela ligação da MBL ou ficolinas (FCN-1, FCN-2 e FCN-3) a carboidratos ou moléculas acetiladas, respectivamente, na superfície de microorganismos. Essas lectinas estão complexadas com serina proteases denominadas serina protease associada à MBL (MASPs: MASP-1, MASP-2 e MASP-3) (MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2013). Após MBL ou ficolinas terem se ligado aos seus alvos, as MASPs são ativadas. MASP-1 e MASP-2 são necessárias para a formação das C3 e C5 convertases da via das lectinas (C4b2a e C4b2a(C3b)_n). MASP-1 ativa C2 e pode clivar C3 diretamente levando à ativação da via alternativa, MASP-2 ativada cliva C4 e C2. O fragmento C4b se liga a C2a, formando C4b2a, a C3 convertase das vias clássica e das lectinas (ALI et al., 2012). Após a clivagem de C2 e C4 pela MASP-2, a ativação prossegue de modo similar a da via clássica (ABBAS, 2011; MAYILYAN, 2012).

2.7.3 Via alternativa

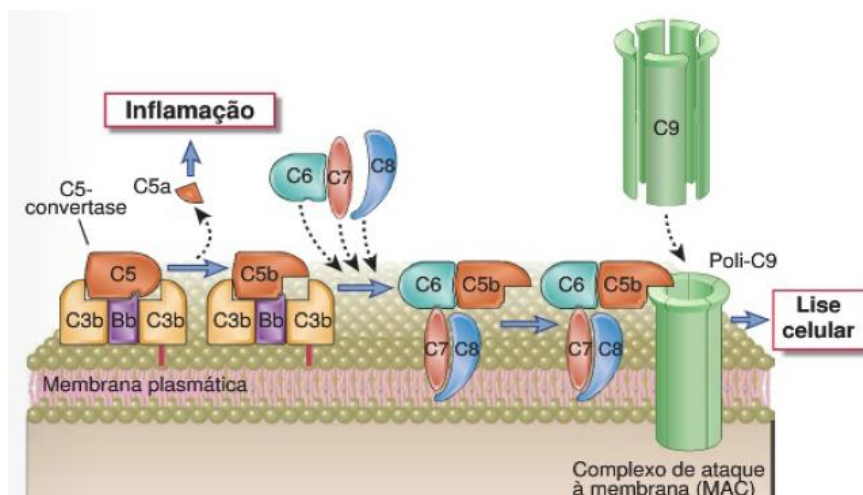
A via alternativa foi descoberta mais tarde, mas é filogeneticamente mais antiga que a via clássica. Sua ativação é uma das primeiras respostas do sistema imune à infecções bacterianas. A ativação é desencadeada pela clivagem espontânea da proteína C3 nos produtos C3a e C3b. C3a é responsável pela resposta inflamatória na quimiotaxia de neutrófilos do sangue para o local de injúria. O C3b é um produto instável que pode sofrer hidrólise quando permanece solúvel, sua função é ligar-se covalentemente à superfície de patógeno, facilitando a fagocitose pelas células fagocíticas. Quando C3b sofre alteração conformacional pós-clivagem, ocorre a exposição de um sítio de ligação para a proteína plasmática Fator B. Esta proteína por sua vez, é clivada por uma serinoprotease plasmática denominada Fator D, liberando um fragmento pequeno (Ba) e um maior (Bb), este último permanece ligado ao C3b. O complexo C3bBb é a C3-convertase da via alternativa, pois apresenta a função de clivar mais moléculas de C3 gerando uma sequência de amplificação da ativação do complemento. Outra proteína da via

alternativa, denominada properdina, também pode se ligar ao complexo C3bBb para estabilizá-lo. Algumas das proteínas de C3b geradas pelo complexo C3bBb podem se ligar a própria convertase, formando a C5 convertase da via alternativa, que consiste num complexo que contém uma metade Bb e duas moléculas de C3b (ABBAS et al., 2011).

2.7.4 Etapa final de ativação do complemento

Com a formação da C5 convertase inicia-se a ativação dos componentes finais do SC, que culmina na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) com atividade lítica. A C5 convertase cliva a proteína C5 nos produtos C5a e C5b, este último que permanece ligado às proteínas do complemento aderidas à superfície celular do patógeno. O C5b mantém transitoriamente uma conformidade capaz de se ligar às proteínas subsequentes da cascata, C6 e C7. O componente C7 do complexo C5b,6,7 é hidrofóbico, desta forma é capaz de inserir-se na bicamada lipídica das membranas celulares dos patógenos, onde se transforma em um receptor de alta afinidade para a proteína C8, que liga-se ao complexo. O complexo resultante (C5b-8) é inserido de maneira estável e possui a habilidade de lisar células. A formação do MAC completamente ativo é acompanhado pela ligação da proteína sérica C9 (componente final da cascata) ao complexo C5b-8. C9 se polimeriza no local da ligação ao C5b-8 para formar poros nas membranas plasmáticas, formando canais por onde trafegam água e íons, acarretando na necroptose celular (figura 10) (ABBAS et al., 2011).

FIGURA 10- ETAPA FINAL DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: ABBAS et al, 2011.

LEGENDA: C3a/C3b= fragmentos de C3; C5a/C5b= fragmentos de C5; B= fator B; Bb= fragmento do fator B, C6= componente 6 do complemento; C7= componente 7 do complemento; C8= componente 8 do complemento; C9= componente 9 do complemento; MAC= complexo de ataque à membrana.

2.7.5 Receptores do complemento

A fagocitose dos patógenos é dependente da presença de receptores na superfície da membrana dos fagócitos, os receptores para região Fc de imunoglobulinas (Ig) e os receptores do complemento que reconhecem fragmentos de C3. Na ausência de anticorpos, o revestimento de células próprias ou estranhas com fragmentos de C3 é essencial para o seu reconhecimento pelos fagócitos através de receptores específicos do complemento (GORGANI et al., 2008).

Quatro receptores para fragmentos do complemento foram identificados: CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18). CR1 está presente em macrófagos, monócitos, eritrócitos e neutrófilos e reconhece o fragmento C3b. CR2 está presente nos linfócitos B e reconhece iC3b e C3d(g). CR3 e CR4 estão presentes em macrófagos, monócitos, neutrófilos, células NK e nas células dendríticas (apenas CR4), são heterodímeros transmembranares que reconhecem iC3b (HE et al., 2008). Contudo, a fagocitose também pode funcionar como via de entrada para parasitas intracelulares obrigatórios, como o *M. leprae* (MISCH et al., 2010). No momento da infecção pelo *M. leprae*, principalmente a via alternativa do Sistema Complemento é ativada, com a fixação do componente C3 à superfície bacteriana, este que atua como ligante para os receptores mediadores de fagocitose CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos.

2.7.6 Componente 3 do complemento (C3)

O componente 3 do complemento (187 kDa) surgiu a cerca de 700 milhões de anos, pertence a família das α 2-macroglobulinas (α 2M) e é uma das proteínas mais importantes do SC (JANSSEN, 2005). Comum às três vias do complemento, uma vez que todas convergem para clivagem de C3 na anafilatoxina C3a (9kDa) e no fragmento maior C3b (177kDa). O fragmento C3a contribui atuando como quimioatraente para células efectoras do sangue para o local da infecção. Fragmentos de C3b ligam-se covalentemente à superfície de patógenos, processo denominado "fixação do complemento" a qual marca o patógeno para destruição pelos fagócitos (PARHAM, 2011).

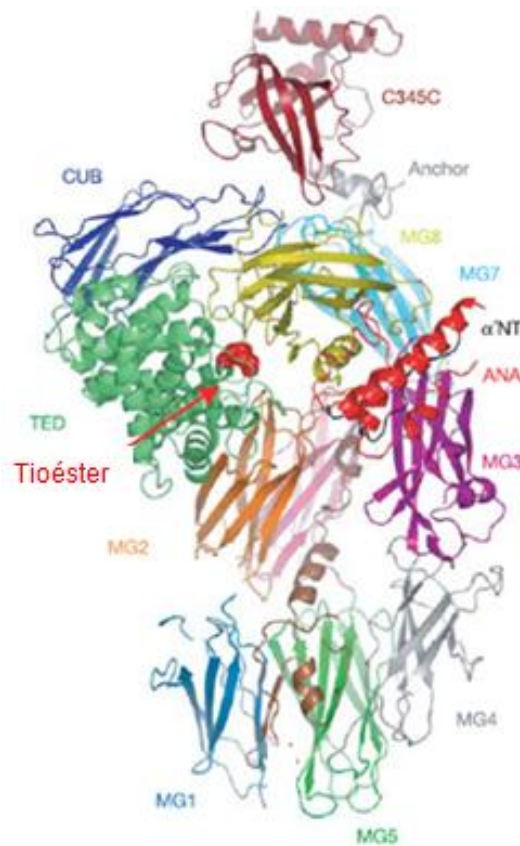
A proteína C3 é composta por 2 cadeiras - β (resíduos 1-645) e α (resíduos 650-1641), que juntas dão origem à 13 domínios. A característica da proteína C3 que fundamenta sua função é uma ligação tioéster de alta energia dentro da glicoproteína (figura 11). C3 produzida entra na forma inativa na circulação sanguínea, onde o tioéster encontra-se estabilizado no interior hidrofóbico da proteína. Com a sua clivagem, esta ligação torna-se exposta e sujeita a um ataque nucleofílico por moléculas de água ou por grupamentos amino e hidroxila das proteínas e carboidratos das superfícies dos patógenos. Isso faz com que C3b ligue-se covalentemente ao microorganismo. As ligações tioéster da maioria das moléculas C3b são atacadas por água, permanecendo em solução na forma inativa e hidrolisada (PARHAM, 2011).

Embora C3 seja predominantemente sintetizado no fígado, outros tipos de células também são capazes de produzir C3, como monócitos e macrófagos funcionalmente ativos, neutrófilos, células T, células apresentadoras de antígenos (APCs) e células dendríticas (DELANGHE et al., 2013). C3 é a proteína do complemento mais abundante, presente em uma concentração de 1,0-1,5 g/L no plasma humano (DELANGHE et al., 2013).

A deficiência de C3 está associada ao desenvolvimento de infecções graves sucessivas, uma vez que esta deficiência compromete as atividades de opsonização e fagocitose de patógenos, gerando uma suscetibilidade maior à infecções por bactérias piogênicas. (ABBAS et al., 2011; UTIYAMA, 2004). Deficiências de fator I e H estão relacionadas com degradação anormal de C3b, desencadeando um descontrole na clivagem de C3 pela C3 convertase da via alternativa, o que leva à

indução de uma deficiência secundária, por consumo de C3, desencadeando infecções bacterianas (ROTHER, 1992). A falta de fator H também predispõe a glomerulonefrites, pois a ativação contínua de C3 na região próxima à membrana basal glomerular leva ao acúmulo de C3b no glomérulo e, conseqüentemente, inflamação do local (ABBAS, 2012)

FIGURA 11 - ESTRUTURA TRIDIMENCIONAL DA PROTEÍNA C3 COM A LIGAÇÃO TIOÉSTER



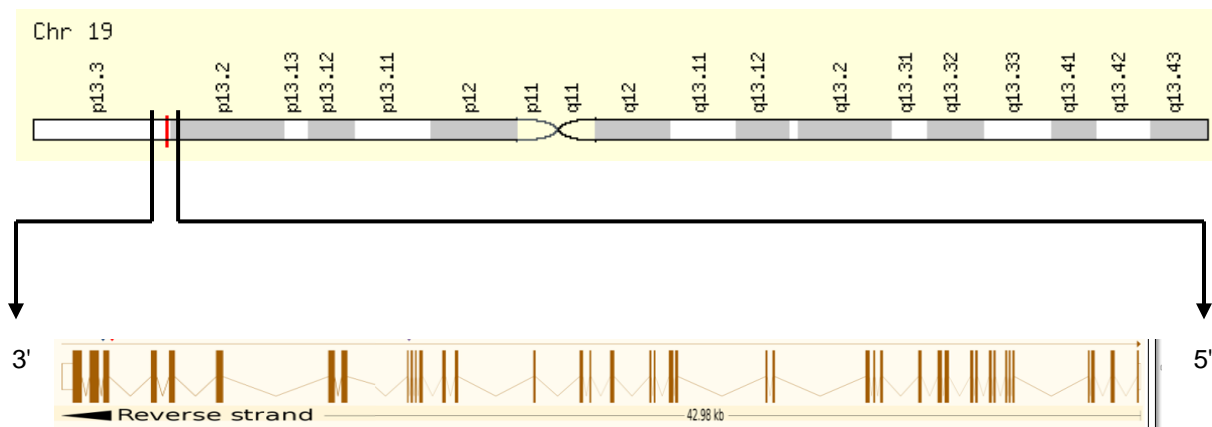
FONTE: JANSSEN, 2005

2.8 GENE C3

A proteína C3 é codificada pelo gene que leva o mesmo nome, localizado no cromossomo 19 (19p13.3) (WHITEHEAD, 1982), composto por 41 exons (figura 12). O gene C3 apresenta nove variantes comuns descritos (rs2230199 C/G-R102G, rs1047286 C/T-P314L, rs2241394 G/C, rs2250656 A/G-190V, rs344542 A/G, rs2230205 A/G, rs339392 T/G, rs3745565 C/G e rs11569536 G/A-Q1270H), dentre

os quais 3 foram investigados neste trabalho (rs2230199 C/G, rs1047286 C/T, rs2250656 A/G) (figura 13).

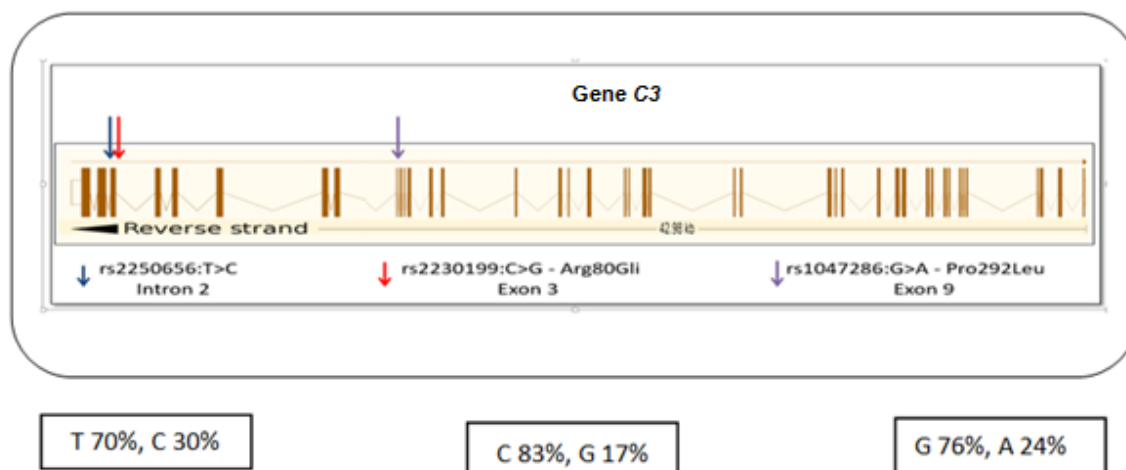
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DO GENE C3 NO CROMOSSOMO 19



FONTE: GeneCards: human gene database; o autor (2017)

INTERPRETAÇÃO: O gene C3 encontra-se no braço curto do cromossomo 19, região 3, banda 3 e apresenta 41 exons

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DOS SNPS ESTUDADOS PRESENTES NO GENE C3



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: A= adenina. T= timina. C= citosina. G= guanina

O SNP rs2230199 ocorre no exon 3 do gene C3 e refere-se à troca do nucleotídeo Citosina para Guanina (C>G), levando à troca do aminoácido Arginina para Glicina (Arg>Gli) (YATES et al., 2007). Este polimorfismo é descrito como responsável por formas variadas da proteína C3, chamadas de alótipos S (slow) e F

(fast), com base em sua mobilidade em eletroforese agarose. Estes alótipos dão origem aos fenótipos C3SS, C3FS e C3FF, que compreendem 98% de todos os fenótipos C3 (DELANGHE et al., 2013). O alótipo C3F já foi associado a diversas doenças como doença de Crohn (ELMGREEN et al., 1984), vasculite sistêmica (FINN et al, 1994), lipodistrofia parcial (FINN; MATHIESON 1993), tuberculose (SENBAGAVALLI et al., 2011), câncer de pulmão (SUADICANI; HEIN; GYNTELBERG, 2011) e progressão para cardiomiopatia chagásica (MESSIAS-REASON; URBANETZ; CUNHA; 2003).

Phillips e colaboradores (2009) determinaram que os polimorfismos rs2250656 e rs2230199 de C3 seriam responsáveis pela modulação do risco de desenvolver Síndrome Metabólica (SMet). Pacientes homozigotos AA para o polimorfismo rs2250656: A/G apresentaram um aumento no risco de desenvolver SMet ($P=0,01$), quando comparados àqueles que possuíam o alelo G. Aqueles que apresentavam o alelo A desenvolveram o perfil clássico da SMet: triglicerídeos aumentados e menor concentração de HDL ($P<0,05$), aumento do índice de massa corpórea ($P<0,05$), obesidade abdominal ($P=0,006$) e diminuição da sensibilidade à insulina ($P=0,035$). Além disso, também apresentavam níveis de inflamação elevados, com aumento de C3 no plasma ($P=0,005$). Análises de regressão logística revelaram que aqueles que apresentavam o alelo A tinham a chance dobrada de desenvolver SMet, em relação aos homozigotos GG. Já os indivíduos homozigotos GG para o polimorfismo rs11569562 teriam o risco de desenvolver SMet reduzido, em comparação aos que apresentavam o alelo A. Os homozigotos GG para o segundo polimorfismo tinham uma concentração de C3 menor que os homozigotos AA e risco diminuído de apresentar quadros de hipertrigliceridemia, em comparação aos com alelo A.

Qian-Qian e colaboradores (2015) publicaram uma meta-análise na qual examinaram 22 artigos disponíveis no PubMed onde analisaram os nove polimorfismos encontrados no gene C3 (rs2230199 C/G, rs1047286 C/T, rs2241394 G/C, rs2250656 A/G, rs344542 A/G, rs2230205 A/G, rs339392 T/G, rs3745565 C/G e rs11569536 G/A). Foi encontrado uma associação positiva entre o polimorfismo rs2230199: C/G e a suscetibilidade a desenvolver degeneração macular relacionada a idade (DMRI). A meta-análise também indicou uma associação positiva entre o polimorfismo rs1047286:C/T e a suscetibilidade à DMRI. Em ambos os SNPs foi encontrado uma associação significativa entre a suscetibilidade e a etnia, onde os

caucasianos eram mais suscetíveis, quando comparado às demais etnias. Em contrapartida, foi encontrada uma associação negativa (fator de proteção) entre o SNP rs2250656: A/G e a DMRI. O polimorfismo rs11569536 G/A também está relacionado à suscetibilidade à DMRI. Os demais polimorfismos não apresentaram relação com a DMRI.

3 METODOLOGIA

Este trabalho constituiu-se de um estudo de associação, caso-controle realizado no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HC/UFPR. O trabalho foi incluído no projeto "Influência da variabilidade gênica nos receptores do complemento na Hanseníase", o qual foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR de acordo com os pareceres consubstanciados do nº 218.104 e 279.970.

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Pacientes

Foram incluídos 143 pacientes com diagnóstico clínico de hanseníase, maiores de 18 anos, atendidos no Ambulatório de Hanseníase do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e no Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná. Os pacientes apresentavam pelo menos uma das seguintes características: lesões de pele com alteração de sensibilidade, acometimento de nervo(s) com espessamento neural e baciloscopia positiva.

3.1.2 Controles

Foram selecionadas 166 doadores voluntários de sangue, maiores de 18 anos, do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR). Os controles foram pareados por sexo e grupo étnico com os pacientes incluídos neste trabalho.

Os dados demográficos dos indivíduos dos grupos controle e pacientes estão demonstrados na tabela 1. A origem étnica dos indivíduos foi previamente definida através do questionamento aberto em relação a sua ascendência.

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DE PACIENTES E CONTROLES

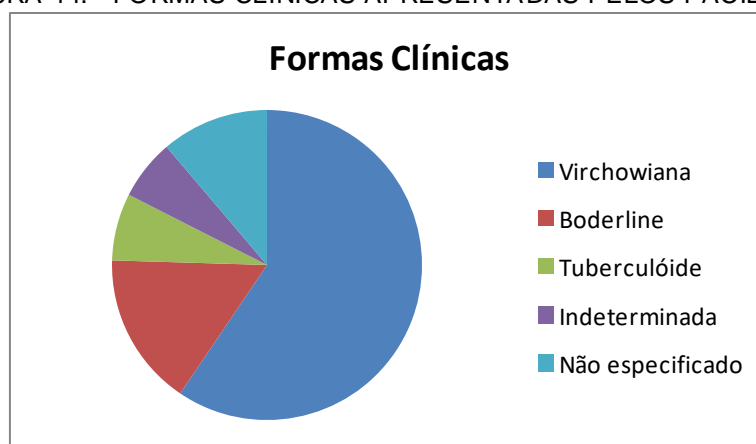
		Curitiba-PR	
		N= 309	
		Grupo Controle	Pacientes
		N= 166	N= 143
Sexo	Masculino	86 (52%)	87 (61%)
	Feminino	80 (48%)	56 (39%)
Idade (média)		~40	51
Grupo	Euro-brasileiro	134 (81%)	115 (80%)
Étnico	Afro-brasileiro	29 (17%)	26 (18%)
	Oriental	0	0
	Indígena	3 (2%)	2 (1,3%)

FONTE: o autor (2017)

LEGENDA: N = número de amostras

Em relação às formas clínicas dos pacientes, a maior frequência observada foi da forma virchowiana (59,4% ou 85/143). As frequências das demais formas clínicas foram: 16% (23/143) *boderline*, 7% (10/143) tuberculóide e 6,3% (9/143) indeterminada. Não foi especificada a forma clínica de 11,2% (16/143) pacientes (figura 14). Devido ao tamanho amostral, foram realizadas análises estatísticas entre pacientes lepromatosos e não lepromatosos (que incluem hanseníase tuberculóide, limítrofe e indeterminada).

FIGURA 14. - FORMAS CLÍNICAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES



FONTE: O autor (2017)

3.3 PESQUISA DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs)

3.3.1 Local de realização do trabalho

Todos os experimentos e análises relacionados a este projeto foram realizados no Laboratório de Imunopatologia Molecular (LIPM), localizado no Hospital de Clínicas de Curitiba (HC-UFPR), vinculado à Universidade Federal do Paraná, sob supervisão da prof^a. Dr^a. Iara José de Messias-Reason.

3.3.2 Extração de DNA

Tanto as amostras de sangue de pacientes quanto controles foram previamente coletadas e centrifugadas para isolamento da massa leucocitária. O DNA foi extraído utilizando o kit comercial de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) ou pelo método de extração *Salting Out*, ambos seguindo as etapas de lise eritrocitária, lise nuclear dos linfócitos, precipitação de proteínas, precipitação e reidratação do DNA.

Para a extração com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* foi utilizado um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5mL, onde se adicionou 150µL de amostra e 600µL de solução de lise celular. Após homogeneização adicionou-se 12µL de proteinase K e o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi removido. Foram adicionados 300µL da solução de lise nuclear no tubo que continha as células ressuspensas, a solução foi homogeneizada e incubada a 37°C em estufa por 5 minutos. Foi adicionado 1,5µL da solução de *RNase* na parede do tubo e 300µL de solução de precipitação proteica ao lisado nuclear e, logo após, incubado à 37°C por 5 minutos. O tubo foi agitado vigorosamente no agitador Vórtex seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo de microcentrífuga de 1,5µL, previamente preenchido com 300µL de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada suavemente até que se formassem fios de DNA visíveis e o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 300µL de etanol 70% a temperatura ambiente. O tubo foi homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O etanol foi descartado e o tubo foi invertido sobre papel absorvente até a completa evaporação do etanol. Foi

adicionado 50µL de solução de reidratação do DNA. O tubo contendo o DNA extraído foi incubado por 12 horas em geladeira a 4°C.

Para o método de extração *Salting Out* foram utilizados tubos de microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL, onde se adicionou 800µL de tampão de lise de células vermelhas (RBCL 1X) e 500µL de buffy-coat. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante desprezado. O botão de células remanescente foi ressuspensionado em 1mL de RBCL 1X, os tubos foram passados no vórtex por 10 segundos e deixados por 5 minutos no *shaker*. Após os 5 minutos, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante desprezado. A ressuspensão do botão de células seguido pelos demais passos foram repetidos por mais 2 vezes. Adicionou-se, então, 1mL de água tipo I nos tubos, que foram homogeneizados no vórtex por 10 segundos e deixados no *shaker* por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante desprezado. Após a centrifugação foram adicionados 80µL de tampão da Proteinase K, 40µL da Proteinase K, 200µL de SDS a 20% (T.A.) e 240µL de água Tipo I. A solução foi homogeneizada em vórtex por 10 segundos e no *shaker* por 5 minutos e incubada em banho seco a 55°C por 40 minutos. Depois de retirados do banho, aguardou-se até que a solução atingisse a T.A. novamente. Foi adicionado aos tubos 100µL de solução saturada de NaCl (6M), agitados no vórtex por 10 segundos, no *shaker* por 5 minutos e centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL previamente preenchido com 100µL de NaCl (6M), a solução foi agitada em vórtex por 10 segundos, no *shaker* por 5 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL com 800µL de etanol absoluto gelado e homogeneizado 30 vezes por inversão para precipitação do DNA. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante desprezado e adicionado 1mL de etanol 70% a T.A. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante desprezado e os tubos vertidos sobre papel toalha para retirada do excesso de etanol. Os tubos foram mantidos em banho seco por aproximadamente 15 minutos para completa evaporação do etanol. Posteriormente o DNA foi ressuspensionado em 50µL de água Tipo I e deixado na geladeira por 24h para reidratação.

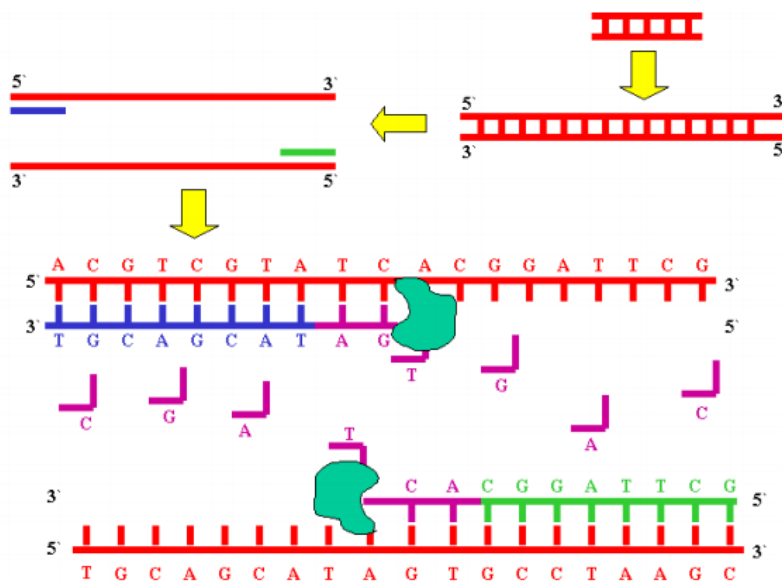
Para determinar as concentrações de DNA das amostras, os tubos foram deixados em banho seco a 55°C por 30 minutos e, posteriormente feita a

determinação em espectrofotômetro NanoDrop 1000 versão 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). As amostras foram diluídas proporcionalmente à concentração de DNA e armazenadas em freezer a -20°C até sua utilização na *PCR-multiplex*.

3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica considerada simples, altamente sensível, que permite a rápida amplificação *in vitro* de uma região específica do DNA, produzindo-se bilhões de cópias. Foi desenvolvida por Kary Millus em 1987 e consiste na realização de sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento e extensão de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pela ação da enzima *Taq*, DNA polimerase termoestável isolada da bactéria de fontes termais *Thermus aquaticus* (figura 15). Esta enzima se mantém estável em temperaturas de até 117°C e possui temperatura ótima de 72°C (GARIBYAN; AVASHA, 2013).

FIGURA 15 - ESQUEMA DOS PROCESSOS REALIZADOS EM UMA PCR



FONTE: VIERA

LEGENDA: A= adenina; T= timina; C= citosina; G= guanina. Após a desnaturação das fitas-molde, ocorre o pareamento dos primers. A enzima *Taq*, representada em verde, adiciona os desoxinucleotídeos pareados às fitas-molde.

A quantidade de DNA ao final da reação segue a seguinte função exponencial:

$$N = N_0 \times 2^n$$

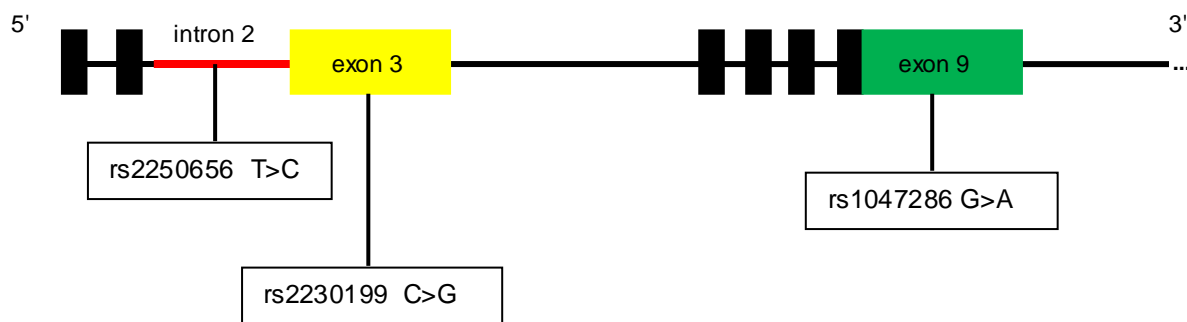
onde N é o número final de cadeias de DNA, N_0 é o número inicial de DNA molde e n é o número de repetições do ciclo.

A reação é feita a partir de uma amostra com concentração mínima de 5µg/mL de DNA molde, previamente extraído de material biológico (sangue, tecido, saliva, etc). É importante que o ácido nucleico esteja livre de impurezas, como proteínas, lipídios e reagentes de extração. A DNA polimerase mais empregada ainda é a *Taq*, numa concentração que varia de 1 a 4U/µL de solução. Para que a *Taq* funcione corretamente, é necessário o cofator íon Mg^{2+} , este que é doado pelo reagente $MgCl_2$, adicionado à reação. Os desoxinucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) são a matéria-prima para a síntese das fitas-filhas, uma vez que são adicionados pela polimerase à fita-molde. (VIERA)

3.3.3.4 PCR-*multiplex* para o gene *C3*

Os polimorfismos avaliados no presente trabalho foram selecionados com base em sua frequência populacional, associação com outras doenças e potencial alteração na função da proteína. O SNP rs2250656 está localizado no intron 2 e leva a alteração do nucleotídeo timina para citosina (T>C). O SNP rs2230199 está localizado no exon 3 e leva a substituição do nucleotídeo citosina para guanina (C>G), gerando uma troca de aminoácido na posição 102, de Arginina para Glicina (R102G). Já o SNP rs1047286, localizado no exon 9, leva a alteração de uma guanina para uma adenina (G>A), levando a uma mudança do aminoácido na posição 314 de prolina para leucina (P314L) (figura 16). As frequências alélicas dos SNPs estudados, observadas em populações de origem europeia (CEU) e africana (YRI) do banco de dados do Ensembl, podem ser observadas na Tabela 2.

FIGURA 16 - LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NO GENE C3



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: A= adenina. T= timina. C= citosina. G=guanina

TABELA 2 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS SNPS ESTUDADOS EM POPULAÇÕES DO BANCO DE DADOS DO ENSEMBL DE ORIGEM EUROPEIA (CEU) E AFRICANA (YRI).

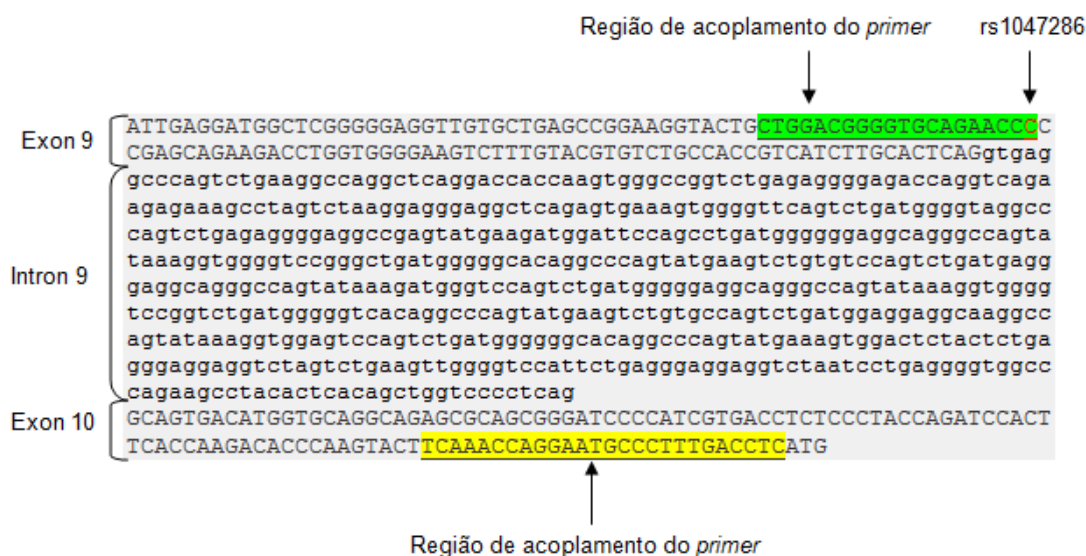
SNP	Alelos	Europeus	Africanos
rs2250656	T>C	T: 70%	T: 87%
		C: 30%	C: 13%
rs2230199	C>G	C: 82%	C: 99%
		G: 18%	G: 1%
rs1047286	G>A	G: 80%	G: 100%
		A: 20%	

FONTE: Banco de dados do Ensembl

LEGENDA: A= adenina. T= timina. C= citosina, G= guanina

A técnica de PCR-*multiplex* foi utilizada para avaliar os SNPs do gene C3. Ela consiste na amplificação simultânea de dois ou mais segmentos genômicos em uma única reação, cada um com o seu par de primers. Para a realização da PCR-*multiplex* para os SNPs de interesse no gene C3 foram, primeiramente, determinados os pares de *primers* iniciadores da reação para cada um dos três SNPs, conforme a tabela 3 a seguir:

b) Exon 9/ Intron 9/ Exon 10



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: A= adenina. T= timina. C= citosina. G= guanina

O protocolo da PCR-*multiplex* para os polimorfismos do gene C3 foi previamente otimizado pelo grupo de pesquisa. A solução de reação consiste na utilização DNA genômico, tampão coral (@Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), glicerol, MgCl₂, deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), oligonucleotídeos iniciadores (Eurofins MWG Operon, CA, Estados Unidos), *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), de acordo com as concentrações dadas na tabela 4:

TABELA 4 - PROTOCOLO DE PCR-MULTIPLEX PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA DO GENE C3

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
H2O			7,94
Glicerol	10%	1,5%	2,25
Tampão (x)	10	1	1,5
MgCl ₂ (mM)	25	0,5	0,3
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer controle MBL for	10	0,1	0,15
Primer controle MBL rev	10	0,1	0,15
Primer C3 for (1,2)	10	0,2	0,3
Primer C3 for (5,6)	10	0,3	0,45
Primer C3 rev (3, 4)	10	0,2	0,3

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Primer C3 rev (7)	10	0,3	0,45
Taq DNA polimerase (U/ul)	5	0,03	0,09
DNA (ng/ul)	20	20	1
Total			15

Produtos esperados

controle - MBL	1059 pb
C3 (1,2,3,4)	182 pb
C3 (5,6,7)	752pb

FONTE: Laboratório de Imunopatologia Molecular (HC-UFPR)

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; for = direto; rev = reverso; MBL = lectina ligante de manose.

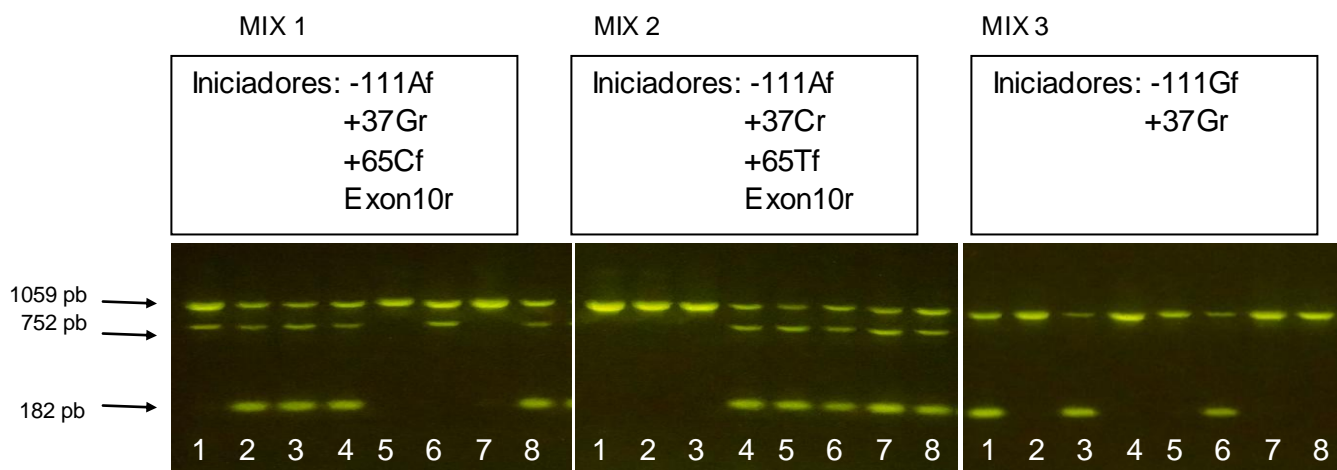
O programa de ciclos no termociclador consiste na repetição de 3 passos por 35 vezes: primeiramente há um aquecimento à 94°C por 3 minutos, para a desnaturação da dupla fita de DNA - este passo ocorre apenas no primeiro ciclo - o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ocorre nos 45 segundos subsequentes à mesma temperatura; para a extensão do molde pela *Taq* DNA polimerase, a temperatura é diminuída até 64°C, a qual permanece constante por 30 segundos; por fim, a última etapa consiste em elevar a temperatura até 72°C para que ocorra a desnaturação da fita adquirida, para que esta sirva de molde para o próximo ciclo.

3.3.4 Corrida Eletroforética

Os resultados obtidos na PCR-*multiplex* foram observados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com corante *SYBR Safe* (@Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), as quais são fluorescentes sob luz azul. A genotipagem é baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.

Os padrões eletroforéticos da PCR-*multiplex* para o gene *C3* estão demonstrados na figura 18.

FIGURA 18 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PA PCR-MULTIPLEX PARA O GENE C3



FONTE: O autor (2017)

INTERPRETAÇÃO: Tamanho dos fragmentos de DNA: controle endógeno = 1059pb; sequências-alvo estudadas: 752 pb e 182pb. Interpretação dos genótipos: 1 = GG/CC/CC; 2= GG/TC/TC; 3= GG/TC/CC; 4= GA/TC/TG; 5=AA/TG/TG; 6=GA/TG/CC; 7=AA/TG/TG; 8= GA/TC/TG

LEGENDA: pb= pares de bases. A= adenina. T= timina. C= citosina. G= guanina.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas através de contagem direta. A avaliação da hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como a fase haplotípica e frequência dos haplótipos foi realizada através do programa *ARLEQUIN* versão 3.5.2.2. Para as análises de associação, foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se o teste de Fisher bicaudal com auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism 5*. Quando necessário, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. O desequilíbrio de ligação entre os SNPs avaliados foi determinado pelo programa *HAPLOVIEW* versão 4.2. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos

4. RESULTADOS

4.1 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As frequências genóticas de controles e pacientes não foram diferentes daquelas esperadas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando que as populações não estão sofrendo influência de fatores evolutivos.

4.2 ANÁLISE GENOTÍPICA E ALÉLICA

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs avaliados em pacientes e controles podem ser observadas na tabela 5. Para análise de possíveis associações foram realizadas comparações entre os grupos: controle vs. pacientes, controle vs. forma clínica virchowiana, controle vs. demais formas clínicas e entre forma clínica virchowiana vs. demais formas clínicas. Não foram observadas diferenças significativas quanto às frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estudados entre os grupos avaliados.

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE C3 EM CONTROLES E PACIENTES

Genótipo	Controles (%)	Pacientes (%)*	FCV (%)	DFC (%)
Intron 2 rs2250656:T>C	N= 166	N= 143	N= 85	N= 42
TT	54,2	54,5	56,9	47,7
TC	39,7	41,2	41,9	42,8
CC	6	4,2	1,2	9,5
Alelo				
T	74,1	75,2	77,9	69,1
C	25,9	24,8	22,1	30,9
Dominante				
TT	54,2	54,5	56,9	47,7
TC+CC	45,7	45,4	43,1	52,3
Recessivo				
CC	6	4,2	1,2	9,5
TT+TC	93,9	95,7	98,8	90,5
Exon 3 rs2230199:C>G				
CC	71,7	77,7	75,3	83,3
CG	24,7	21,5	23,5	16,7
GG	3,6	0,7	1,2	0
Alelo				
C	84	88,5	87	91,7
G	16	11,5	13	8,3
Dominante				

Genótipo	Controles (%)	Pacientes (%)*	FCV (%)	DFC (%)
CC	71,7	77,7	75,3	83,3
CG+GG	28,3	22,2	24,7	16,7
Recessivo				
GG	3,6	0,7	1,2	0
CC+CG	96,4	99,2	98,8	100
Exon 9 rs1047286:G>A				
GG	75,3	81,1	80	83,3
GA	21,7	18,2	18,8	16,7
AA	3	0,7	1,2	0
Alelo				
G	86,1	90,2	89,4	91,7
A	13,9	9,8	10,6	8,3
Dominante				
GG	75,3	81,1	80	83,3
GA+AA	24,7	18,9	20	16,7
Recessivo				
AA	3	0,7	1,2	0
GG+GA	97	99,3	98,8	100

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: FCV: forma clínica virchowiana. DFC: demais formas clínicas (tuberculoide, indeterminada e *boderline*). *16 pacientes não apresentaram classificação quanto à forma clínica. Modelo genético dominante: genótipo mais frequente vs. heterozigoto + homozigoto de menor frequência; Modelo genético recessivo: genótipo homozigoto de menor frequência vs. genótipo homozigoto de maior frequência + heterozigoto.

4.3 ANÁLISE HAPLOTÍPICA

O haplótipo C3 TCG foi o mais frequente tanto em controle quanto em pacientes, enquanto C3 CCA e TCA foram os mais raros e observados apenas em controles. A frequência dos haplótipos em pacientes e controles pode ser observada na tabela 6. Não houve diferença nas frequências haplotípicas entre os grupos.

TABELA 6 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DE C3 EM CONTROLES E PACIENTES

Haplótipo	Controles (%)	Pacientes (%)	FCV (%)	DFC (%)
TCG	57,8	64,0	65,3	60,7
CCG	25,0	24,8	22,4	31
TGA	12,7	9,8	10,6	8,3
TGG	3,3	1,4	1,4	0,0
CCA	0,9	0,0	0,0	0,0
TCA	0,3	0,0	0,0	0,0
	N=332	N=286	N=170	N=84

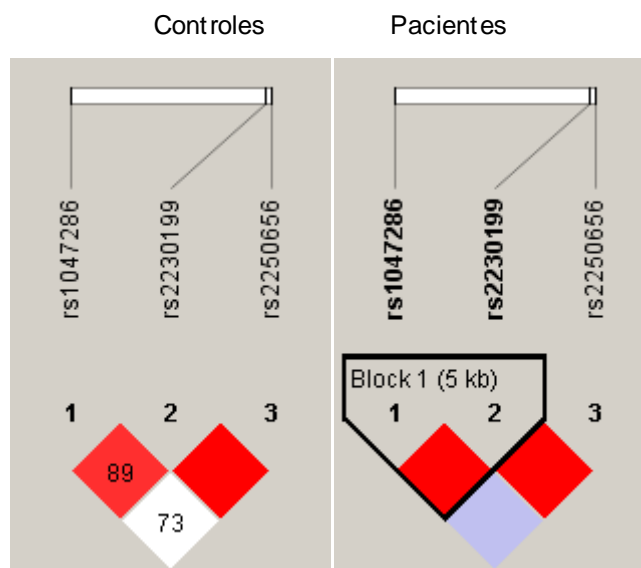
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: N= número de cromossomos. FCV: forma clínica virchowiana. DFC: demais formas clínicas.

4.4 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE C3

Foi observado um forte Desequilíbrio de Ligação (DL) entre os SNPs rs1047286 (exon 9) e rs2230199 (exon 3), bem como entre rs2230199 (exon3) e rs2250656 (intron 2), tanto em pacientes quanto em controles (figura 19), justificado a análise em haplótipos dos pares de SNPs. O desequilíbrio de ligação é a associação não alélica entre alelos de diferentes locus, que pode ser influenciada por diversos fatores, como taxa de recombinação, características demográficas (idade, taxa de crescimento, etc) e fatores evolutivos (deriva genética, mutação, seleção e fluxo gênico).

FIGURA 19 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs ESTUDADOS DO GENE C3 EM CONTROLES E PACIENTES



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: rs1047286 = exon 9; rs2230199 = exon 3; rs2250656 = intron 2; LOD = *Log of the likelihood odds ratio score*. Tons de rosa = $LOD \geq 2$ e $D' < 1$; vermelho = $LOD \geq 2$ e $D' = 1$.

NOTA: $LOD \geq 2$ = desequilíbrio de ligação significativo; $D' = 0$ sem desequilíbrio de ligação; $D' = 1$ desequilíbrio de ligação absoluto.

4.5 ANÁLISE DOS SNPs EM DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

As frequências genóticas considerando os pares de SNPs em DL (rs2250656 (Intron 2) e rs2230199 (exon 3), rs1047286 (exon 9) e rs2230199 (exon 3)), foram determinadas por contagem direta e podem ser observadas nas tabelas 7 e 8. Não foram observadas diferenças significativas com relação às frequências genóticas entre os grupos. Contudo, o genótipo CC/GG (exon 3/ exon 9) apresentou uma tendência a maior frequência no grupo de pacientes quando comparado a controles ($p=0.09$).

TABELA 7- FREQUÊNCIA GENOTÍPICA CONJUNTA DOS SNPs DO INTRON 2 E EXON 3 (rs2250656 e rs2230199) DE C3 EM CONTROLES E PACIENTES

Genótipo	Controles (%)	Pacientes (%)	FCV (%)	DFC (%)
rs2250656/rs2230199				
TT/CC	34,3	37,8	37,7	35,7
TT/CG	16,2	16,08	18,07	12
TT/GG	3,6	0,8	1,17	0

TC/CC	31,4	36,5	36,5	38,1
TC/CG	8,5	4,8	5,9	4,8
Genótipo rs2250656/rs2230199	Controles (%)	Pacientes (%)	FCV (%)	DFC (%)
CC/CC	6,03	4,1	1,2	9,5
	N= 166	N= 143	N= 85	N=42

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: FCV: forma clínica virchowiana. DFC: demais formas clínicas.

TABELA 8 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA CONJUNTA DOS SNPs DO EXON 3 E EXON 9 (rs1047286 E rs2230199) DE C3 EM CONTROLES E PACIENTES

Genótipo rs1047286/rs2230199	Controles (%)	Pacientes (%)	FCV (%)	DFC (%)
CC/GG	69,3	78,3	75,3	83,3
CG/GG	6,02	2,8	4,7	0
GG/GA	0,6	0	0	0
CG/GA	18,7	18,2	18,8	16,6
CC/GA	2,4	0	0	0
GG/AA	3,01	0,7	1,2	0
	N= 166	N= 143	N= 85	N= 42

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: FCV: forma clínica virchowiana. DFC: demais formas clínicas.

As frequências dos haplótipos considerando os pares de SNPs em DL também foram estimadas (tabelas 9 e 10). Não foi observada diferença entre as frequências dos haplótipos formados pelos SNPs do intron 2 e exons 3 (rs2250656 e rs2230199). Contudo, o haplótipo C3 CG, formado pelos SNPs do exon 3 e 9 (rs1047286 E rs2230199), foi observado mais frequente em pacientes quando comparado com controles ($p=0,038$, $OR=1,64$ [1,03-2,6]). As demais comparações entre os grupos não foram significativas.

TABELA 9. - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA CONSIDERANDO OS SNPs DO INTRON 2 E EXON 3 (rs2250656 e rs2230199) DE C3 EM CONTROLES E PACIENTES

Haplótipo rs2250656, rs2230199	Controles (%)	Pacientes (%)	FCV (%)	DFC (%)	p; OR [IC]
TC	58,1	64	64,7	60,7	n.s
CC	25,9	24,8	22,3	31	n.s
TG	16	11,2	13	8,3	n.s
	N= 332	N= 286	N= 170	N= 84	n.s

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: FCV: forma clínica virchowiana. DFC: demais formas clínicas.

TABELA 10 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA CONSIDERANDO OS SNPs DO EXON 3 E EXON 9 (rs1047286 E rs2230199) DE C3 EM CONTROLES E PACIENTES

Haplótipo rs1047286, rs2230199	Controles (%)	Pacientes (%)	FCV (%)	DFC (%)	p; OR [IC]
CG	82,8	88,8	87	91,7	0,038; 1,64 [1,03-2,6]*
GA	12,7	9,8	10,6	8,3	n.s
GG	3,3	1,4	2,4	0	n.s
CA	1,2	0	0	0	n.s
	N=332	N=286	N=170	N=84	n.s

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: FCV: forma clínica virchowiana. DFC: demais formas clínicas. *Pacientes vs. Controles.

As demais comparações não foram significativas.

5 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa milenar e, mesmo com terapêutica eficiente há décadas, permanece um problema de saúde pública em diversos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil. Foram registrados cerca de 30.000 casos em todo o território nacional no ano de 2013, gerando um coeficiente de prevalência igual a 1,42 casos/10 mil hab (BRASIL, 2014). Neste estudo, foram incluídos controles e pacientes residentes de Curitiba-PR e região metropolitana, onde a prevalência da doença é de 0,9 casos/10 mil hab, menor que a média nacional (BRASIL, 2014).

A hanseníase é considerada uma doença complexa, uma vez que seu desenvolvimento é condicionado por diversos fatores, como genéticos, imunológicos e ambientais (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Estudos de associação têm evidenciado a participação de polimorfismos gênicos na suscetibilidade à doença e progressão para suas diferentes formas clínicas, como os genes *HLA*, *PACRG* e *PARK2* e genes que codificam proteínas do complemento (*MBL2*, *MASP2*, *FCN2*) (MIRA et al.; 2004; ZHANG et al., 2009, 2013; MESSIAS-REASON et al., 2007, 2009; BOLDT et al., 2013a, 2013b, ANDRADE et al., 2017). O ambiente no qual o indivíduo está inserido também interfere no surgimento da enfermidade, uma vez que a hanseníase está intrinsecamente relacionada à pobreza, falta de condições sanitárias e residência em regiões rurais. Além destes fatores elencados acima, o sistema imunológico do hospedeiro desempenha papel fundamental tanto no desenvolvimento da hanseníase, como na manifestação clínica da doença, que está altamente relacionada à resposta imune do organismo frente ao *M. leprae*. Após a exposição ao *M. leprae*, a maioria dos indivíduos é intrinsecamente resistente à infecção. Entre aqueles que são suscetíveis, a infecção pode progredir para as formas clínicas indeterminada, tuberculoide, *boderline* ou virchowiana. Esta última é mais grave, pois não há resposta imune eficiente contra o patógeno, acarretando em múltiplas lesões e crescimento descontrolado do bacilo (MISCH, 2010).

Os mecanismos moleculares de infecção pelo *M. leprae* e de evasão do sistema imune não estão completamente conhecidos, contudo, diversos estudos tem apontado a importância do SC tanto na suscetibilidade quanto na proteção a hanseníase. O haplótipo *LYPA* do gene *MBL2*, associado com uma maior expressão da proteína, foi significativamente associado com hanseníase e a forma clínica

virchowiana quando comparados com controles (MESSIAS-REASON et al., 2007). Já os haplótipos do gene *FCN2* associados a níveis normais de ficolina-2 no soro apresentaram um efeito protetor contra a hanseníase (MESSIAS-REASON et al., 2009), e os polimorfismos do gene *FCN1* -271DeIT, -399A, -542G, -1981A foram associados a suscetibilidade à hanseníase (BOLDT et al., 2013). Além disso, polimorfismos no gene *FCN3* colaboram para a elevação da concentração de ficolina-3, e ao favorecimento à infecção pelo *M. leprae* (Andrade et al., 2017).

O componente C3 é a molécula central do SC e possui papel crucial nas três vias de ativação do complemento, desempenhando importantes funções biológicas como: formação da C3 e C5 convertases, essenciais na cascata de ativação do SC; produção da opsonina C3b, que se liga covalentemente à superfície de patógenos mediando sua fagocitose; produção de C3a, uma potente molécula inflamatória, levando ao recrutamento de células imunes; e a solubilização e depuração de complexos imunes que estão ligados a C3b. Receptores do complemento presentes em diferentes células reconhecem esses complexos imunes que são então removidos pelos fagócitos do fígado evitando que estes se depositem no endotélio, e conseqüentemente reações inflamatórias (REIS et al., 2006).

A proteína C3 possui um papel crucial na infecção por *M. Leprae*, uma vez que fixa-se na superfície bacteriana através do domínio contendo tioéster (TED), atuando como ligante para os receptores CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos, mediando a fagocitose do bacilo. A ligação de C3 acontece de maneira específica ao glicolípido fenólico-1 (PGL-1), molécula presente em grande quantidade na superfície do bacilo (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991). A fagocitose de patógenos por células fagocíticas é imprescindível no combate a infecções, contudo, esta mesma internalização pode servir como porta de entrada para microorganismos intracelulares obrigatórios, como o *M. leprae*, que se estabelece e multiplica principalmente em macrófagos e células de Schwann do hospedeiro (MISCH et al., 2010).

Apesar de seu papel crucial na infecção por *M. Leprae*, polimorfismos no gene que codifica a proteína C3 (gene *C3*) não foram avaliados quanto a sua possível influência na suscetibilidade a hanseníase e suas formas clínicas, sendo este o primeiro estudo investigando esta possível associação. O presente estudo avaliou três SNPs do gene *C3*: um localizado no intron 2 (rs2250656), um no exon 3 (rs2230199, R102G) e um no exon 9 (rs1047286, P314L).

Não foram identificadas diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas entre controles e pacientes e entre as formas clínicas da doença para nenhum dos três SNPs estudados (rs2250656, rs2230199 e rs1047286), indicando que isoladamente estes polimorfismos não estão envolvidos com o estabelecimento da doença. O mesmo resultado foi observado para os haplótipos formados pelos três SNPs. Contudo, quando avaliada a influência aditiva dos SNPs rs2230199 e rs1047286 (exon 3, exon 9), os quais apresentaram grande DL, observamos que pacientes com o haplótipo C3 CG apresentam uma chance quase 2 vezes maior de desenvolver a doença com relação ao grupo controle [P= 0,038; OR= 1,64; IC95%= 1,03-2,6].

Ambos os SNPs rs2230199 (exon 3) e rs1047286 (exon 9) levam a uma substituição de aminoácido (R102G e P314L, respectivamente) e estão localizados na primeira alça do domínio proteico macroglobulina de C3, principal elemento para a correta orientação do domínio tioester (TCD), região que fixa-se na superfície dos patógenos (NISHIDA et al., 2006). Esta troca de aminoácidos, portanto pode alterar a conformação da macroglobulina, tendo como resultado final uma possível alteração na fixação de C3 a superfícies celulares patogênicas e outras proteínas do complemento (QIAN QIAN, et al., 2015). O haplótipo C3 CG associado a um risco aumentado para a hanseníase é composto pelos alelos selvagens dos SNPs rs2230199 e rs1047286. Assim, nossa hipótese seria de que C3b nos pacientes com o haplótipo C3 CG, por não apresentarem alteração conformacional na proteína, estaria fixando-se ao bacilo com maior eficiência, favorecendo a infecção pelo *M. leprae*.

Concluindo, o presente estudo buscou investigar a possível associação de polimorfismos do gene C3, codificador da proteína C3 do SC com a suscetibilidade à hanseníase e suas formas clínicas. Foi observado uma associação entre o haplótipo C3 CG, formado pelo SNPs rs2230199 (exon 3) e rs1047286 (exon 9), e um aumento no chance de desenvolver a doença. Este haplótipo codificaria para uma proteína que se fixaria ao bacilo com maior eficiência, favorecendo a infecção pelo *M. leprae*. Contudo, estudos complementares com outros polimorfismos e com maior número de indivíduos devem ser realizados a fim de se estabelecer se variantes genéticas C3 estão ou não associadas ao desenvolvimento da hanseníase e da sua expressão clínica.

6 CONCLUSÕES

- Observou-se associação entre o haplótipo C3 CG, formado pelos alelos selvagens dos SNPs do exon 3 e exon 9 e a suscetibilidade a hanseníase;
- As frequências genóticas dos SNPs rs2250656, rs2230199 e rs1047286 avaliados em controles e pacientes não foram diferentes das esperadas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Não foram identificadas diferenças significativas nas frequências genóticas, alélicas e haplotípicas dos SNPs rs2250656, rs2230199 e rs1047286 entre controles e pacientes ou entre as formas clínicas da doença;
- Os SNPs rs2250656 (intron 2) e rs2230199 (exon 3), bem como rs2230199 (exon 3) e rs1047286 (exon 9) apresentaram forte desequilíbrio de ligação em pacientes e controles.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592 páginas.

ALTER, A., HUONG, N.T, SINGH, M, et al. Human leukocyte antigen class I region single-nucleotide polymorphisms are associated with leprosy susceptibility in Vietnam and India. **J Infect Dis**. v. 203, p.1274-1281, 2011.

ALI, Y. M. et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002793, 2012.

ALPER, C.A.; PROPP, R.P. Genetic of polymorphism of the third component of human complement (C3). **J Clin Invest** v. 47 p. 2181-91, 1968.

ARAÚJO, H. *História da Lepra no Brasil – Período Republicano (1890-1952)*. Rio de Janeiro: Departamento de Imprensa Nacional, 1956.

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

BARBIERE, C.L.A.; MARQUES, H.H.S. Hanseníase em crianças e adolescentes: revisão bibliográfica e situação no Brasil. **Pediatria (São Paulo)**, v. 31, n. 4, p. 281-290, 2009.

BECHLER, R.G. Hansen versus Neisser: controvérsias científicas na 'descoberta' do bacilo da lepra. **Hist. cienc. saude-Manguinhos (Rio de Janeiro)**. v.19, n.3. p.815-841, 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.

BRASIL. Lei n. 9.010, de 29 de março de 1995. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 mar. 1995, seção 1, p. 4509.

BRASIL. Ministério da Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Hanseníase atividades de controle e manual de procedimentos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/rio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniaze/11298-situacao-epidemiologica-dados>. <acesso em 20/05/17>.

BRASIL. Portal da Saúde. Tratamento poli-quimioterápico. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniose/11299-tratamento>> Acesso em: 06/04/2017

BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; STAHLKE, E. R. S.; 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, 2013a.

BOLDT, A. B. W.; SANCHEZ, M. I. N.; STAHLKE, E. R. S.; et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 210–219, 2013b.

BROWNE, S.G. *Lepra na Bíblia – Estigma e Realidade*. Minas Gerais: Ed. Ultimato, 2003.

DAGUR, P. K.; SHARMA, B.; KUMAR, G.; et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 5, p. 943–52, 2010.

DAMASCO, M.S. *História e memória da hanseníase no Brasil do século XX: o olhar e a voz do paciente*. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2005.

DELANGHE, J.R.; SPEECKART, R.; SPEECKART, M.M. Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences. **Pathology** v. 00 n. 00, p. 1-10, 2013.

DEGN, S. E.; THIEL, S. Humoral Pattern Recognition and the Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 78, n. 2, p. 181–193, 2013.

DOMINGUEZ, B. Problema persistente: prevalência cai, mas Brasil é o único no mundo que não conseguiu eliminar a propagação da doença. **Revista Radis: comunicação e saúde**, n. 150, p.24-26, 2015.

DORNELLES, L. N.; PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I.J.T. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against lepromatous but not tuberculoid form. **Clinical and Experimental Immunology**, v.145, p. 463-468, 2006.

ELMGREEN, J.; SORENSEN, H.; BERKOWICZ, A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the C3F gene in Crohn's disease. **Acta Med Scand**. v. 215, p. 375–8, 1984

FINN, J.E.; MATHIESON, P.W. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with nephritic factor. **Clin Exp Immunol** v. 91, p. 410–4, 1993.

FINN, J.E.; ZHANG, L.; AGRAWAL, S.; JAYNE, D.R.; OLIVEIRA, D.B.; MATHIESON, P.W. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. **Nephrol Dial Transplant** v. 9 p. 1564–7,1994.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **The Journal of Investigative Dermatology**, 2013.

GELBER, R.H. **Leprosy (Hansen's disease)**. In: FAUCI, A.S. et al. Harrison's principles of internal medicine. 17.ed. 2008.

GORGANI, N.N.; HE, J.Q.; KATSCHKE JR, K.J.; HELMY, K.Y.; XI, H.; STEFFEK M.; HASS, P.E.; van LOOKEREN, C.M. Complement receptor of the Ig superfamily enhances complement-mediated phagocytosis in a subpopulation of tissue resident macrophages. **J Immunol**. v. 181, n. 11, p.7902-7808, 2008.

HE, J. Q.; WIESMANN, C.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. **Molecular immunology**, v. 45, n. 16, p. 4041–7, 2008.

JANSSEN, B.J.C.; HUIZINGA, E.G.; RAAIJMAKERS, M.C.A.; ROOS, A.; DAHA, M.R.; NILSSON-EKDAHL, K.; NILSSON, B.; GROS, P. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. **Nature**, v.437, n.22, p. 505-511, 2005

LISZEWSKI, K.; ATKINSON, J.P. Exploring the complement system in human disease: novel disease associations revealed by whole genome screens. **The Rheumatologist**. v. 4, n. 2, p.15-23, 2010.

MACIEIRA, S. Aspectos Microbiológicos do Mycobacterium leprae, Em Noções de Hansenologia. **Opromolla, D. V. A., Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato**, São Paulo, Bauru, 2000

MAYILYAN, K. R. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. **Protein & cell**, v. 3, n. 7, p. 487–96, jul. 2012.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 4, p. 273–83, ago. 2013.

MESSIAS-REASON, I.J.; URBANETZ, L.; CUNHA, C.P. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**. v. 62 p. 308–12, 2003.

MESSIAS-REASON, I.J.; BOLDT, A.B.W.; BRAGA, A.C.M.; STAHLKE, E..R.S.; DORNELLES, L.; PEREIRA-FERRARI, L.; KREMSNER, P.G.; KUN, J.F.J. 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 producing normal Ficolin-2 protect against clinical leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 801-804, 2009.

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

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

MISCH, E.A; BERRINGTON, W.R.; VARY, J.C.; HAWN, T.R. Leprosy and the human genome. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 4, p. 589–620, 2010.

MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol.** n. 102, p. 828-832, 1994.

NG, V.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–524, 2000.

NISHIDA, N.; WALZ, T.; SPRINGER, T.A. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 103, n. 52, p. 19737-42, 2006

NOORDEEN, S. K. Epidemiology and control of leprosy-a review of progress over the last 30 years. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 87, n. 5, p.515-517, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Weekly epidemiological record.** n.36 (89), p.389-400. Suíça, 2014.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. Paraná está próximo de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. Postado em 23/11/2014. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=3862>>. Acesso em: 26/04/17.

PARHAM, P. **O Sistema Imune.** 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011. 608 páginas.

PETTIGREW, H. D.; TEUBER, S. S.; GERSHWIN, M. E. Clinical significance of complement deficiencies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, p. 108–23, 2009.

PHILLIPS, C.M.; GOUMIDI, L.; BERTRAI, S.; FERGUSON, J.F.; GIELD, M.R.; KELLU, E.D.; PELOSO, G.M.; CUPPLES, L.A.; SHEN, J.; ORDOVAS, J.M.; MCMANUS, R.; HERCBERG, S.; PORTUGAL, H.; LAIRON, D.; PLANELLS, R.; ROCHE, H.M. Complement component 3 polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of metabolic syndrome. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.90; p. 1665-1673, 2009.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Leprosy: a genetic disease? **An Bras Dermatol.** v. 82, n. 5, p.451-9, 2007.

QIAN-QIAN, Y.; YONG, Y.; JING, Z.; XIN, B.; TIAN-HUA, X.; CHAO, S.; JIA, C. Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the complement component 3 gene are associated with risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. **Gene**, v. 561 n.2, p. 249–55, 2015.

RENAULT, C.A.; ERNST, J.D. *Mycobacterium leprae*. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 7^a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; p. 3165-76, 2010

RIDLEY, D.S.; JOPLING, M.J. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. **Int J Lepr.** v. 34, p. 255-73, 1966

RODRIGUES L.C.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis.** v.11:464-70, 2011.

ROTHER, K.O.; ROTHER, U. **Complement deficiencies**. In: Roitt, IM; Delves, PJ. Encyclopedia of Immunology. 2^a edição. London, Academic Press, p.378-80, 1992.

SAUER, M.D.; SALOMÃO, H.; RAMOS,G.B.; D`ESPINDULA,H.D.R; RODRIGUES, R.S.A.; MACEDO, W.C.; SINDEAUX, R.H.M., MIRA, M.T. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. **Clinics in Dermatology** v. 33, p.99–107, 2015.

SCHLESINGER, L.S.; HORWITZ, M.A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **JCI.** v. 85, p. 1304-1314, 1990.

SCHLESINGER, L.S.; HORWITZ, M.A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement C3 in serum. **J.Exp.Med.** v. 174, p.1031-1038, 1991.

SENBAGAVALLI, P.; KUMAR, N.; KAUR, G.; MEHRA, N.K.; GEETHA, S.T.; RAMANATHAN, V.D. Major histocompatibility complex class III (C2, C4, factor B) and C3 gene variants in patients with pulmonary tuberculosis. **Hum Immunol** v. 72, p. 173–8, 2011.

SHANKARKUMAR, U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. **Leprosy review**, v. 75, n. 1, p. 79–85, 2004.

SOBRINHO, R.A.S.; MATHIAS, T.A.F.; GOMES, E.A.; LINCOLN, P.B. Avaliação do grau de incapacidade em hanseníase: uma estratégia para sensibilização e capacitação da equipe de enfermagem. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.15, n.6, p. 1125-1130, 2007

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

SUADICANI, P. ; HEIN, H.; GYNTELBERG, F. Complement C3 Genotype Variants and Risk of Lung Cancer Mortality. **ISRN Pulmonology** v. 2011 p. 1–4, 2011.

UTIYAMA, S.R.R.; MESSIAS-REASON, I.T.; KOTZE, L.M.S. O sistema complemento nas doenças: genética e patogenia. **Rev Bras Reumatol**, v.44, n.4, p.277-86, 2004.

WANG, J.; YANG, M.M.; LI, Y.B.; LIU, G.D.; TENG, Y.; LIU, X.M. Association of CFH and CFB gene polymorphisms with Retinopathy in type 2 diabetic patients. **Mediators of Inflammation**. v. 2013, p.1-7.

WHITEHEAD, A.S.; SOLOMON, E.; CHAMBERS, S.; BODMER, W.F.; POVEY, S.; FEY, G. Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 79, n. 16, p. 5021-5, 1982.

YAMANOUCH, A.A.; CARON, C.R.; SHIMAKU, D.T.; et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **Anais Bras. Dermatol.** v. 6, p.396-404, 1993

YATES, J.R.W; SEPP, T.; MATHARU, B.K.; KHAN, J.C.; THURLBY, D.A.; SHAHID, H.; CLAYTON, D.G.; WRIGHT, A.F.; ARMBRECHT, A.M.; DHILLON, B.; DEARY, I.J; REDMOND, E.; BIRD, A.C.; MOORE, A.T. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. **The New England Journal of Medicine**, v.357 n.6, p. 553–561, 2007

ZHANG, F.R.; HUANG, W.; CHEN, S.M. et al. Genomewide association study of leprosy. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 2009.

ZHANG, D.F.; HUANG, X.Q.; WANG, D.; LI, Y.Y., YAO, Y.G. Genetic variants of complement genes Ficolin-2, Mannose-binding lectin and Complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Human Genetics**. Volume 132, Issue 6, pp 629-640, 2013.