

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA SNAP PARA ANÁLISE DE VARIANTES
GENÉTICAS DE *CR1* EM PACIENTES COM HANSENÍASE

LETICIA SILVA NASCIMENTO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
ABRIL DE 2019

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA SNAP PARA ANÁLISE DE VARIANTES
GENÉTICAS DE *CR1* EM PACIENTES COM HANSENÍASE

LETICIA SILVA NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências – CBB, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alba Lucínia Peixoto Rangel

Campos dos Goytacazes

Abril de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

N244

Nascimento, Leticia Silva.

Utilização da técnica SNAP para análise de variantes genéticas de *CR1* em pacientes com hanseníase. / Leticia Silva Nascimento. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

63 f. : il.

Bibliografia: 55 - 61.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.
Orientadora: Alba Lucinia Peixoto Rangel.

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Hanseníase. 3. SNP. 4. CR1. 5. SNAP. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA SNAP PARA ANÁLISE DE VARIANTES
GENÉTICAS DE *CR1* EM PACIENTES COM HANSENÍASE

LETICIA SILVA NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências – CBB, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

Aprovada em 01 de Abril de 2019.

Banca Examinadora:

Dr^a. Alba Lucínia Peixoto Rangel – LBR/UENF (Orientadora)

Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão .– LPBIO-URFJ RJ

Dr^a. Thaís Louvain –Pós Doc/ LBT/UENF

Dr^a. Elena Lassounskaia – LBR/UENF

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que iluminou todo o meu caminho nessa caminhada, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem. Autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, e ao CNPq pela bolsa concedida.

À Prof^a Alba, pela orientação, amizade e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

As Dr^{as} Elena Lassounskaia, Dr^a. Thaís Louvain e Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão, por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

A Dr^a Fernanda Bueno, por aceitar ser minha revisora e por todo apoio concedido durante a escrita deste trabalho.

As minhas heroínas Roselane Miranda, Maria José Rodrigues e Maria Helena, que me deram apoio, incentivo e colo nas horas difíceis de desespero, cansaço e desânimo, me incentivando a nunca desistir, obrigada por serem as melhores mães e avós do mundo. Ao meu pai e avô, que apesar de todas as dificuldades, me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

Aos meus tios que sempre torceram muito por mim e me deram muito apoio durante toda essa jornada.

Ao meu namorado Lucas, que sempre me incentivou a não desistir do meu sonho, compreendendo os meus períodos de estresse e ausência, choros e euforias. As minhas primas, que me fizeram sorrir quando queria chorar, por me darem colo e um ombro amigo. Ao João Pedro e Pedro Henrique, que mesmo não entendendo muito, e mesmo não sabendo, me ajudaram muito. A todos os amigos do Laboratório LBR, Rhonia, Leonardo, Luciana, Juliana, Luisa, Milena e Rebeka.

A todos do Laboratório NUDIM por terem me recebido de forma tão acolhedora. Em especial ao Professor Enrique Medina e a Professora Ana Beatriz por todos os ensinamentos.

Meus amigos Ronaldo, Elisa, Brunielli, Rodrigo por caminharem junto comigo durante essa jornada. Em especial Bellinha e Yuri que não foram apenas amigos, mas irmãos, que me mostraram que para ser irmão não precisa de laços sanguíneos. Amo vocês!

Amigos do JBM, Nádia, Ruliana, Taynara, Fellipe, Jonathan, por me mostrarem que grandes amizades ultrapassam todas as distâncias.

Ao Dr. Edilbert Pellegrini, por ser um grande parceiro no desenvolvimento desse trabalho, disponibilizando as amostras dos pacientes.

E a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A hanseníase é uma doença crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. Considerando a importância de CR1 na resposta imune contra *M. leprae*, foram selecionados dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), um relacionado ao tamanho de CR1 (*rs6656401*) e o outro ao número de cópias deste receptor nos glóbulos vermelhos (*rs11118133*), com o objetivo de verificar a associação entre esses polimorfismos e a manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase em pacientes em comparação a indivíduos controle de Campos dos Goytacazes, por meio da técnica de *Single Amplified Polymorphism* (SNAP). Amostras de sangue periférico de um total de 300 indivíduos, sendo 150 portadores das diferentes formas clínicas da hanseníase e 150 indivíduos controles saudáveis, tiveram seus resultados de genotipagem obtidas por meio da técnica SNAP associados as formas clínicas da hanseníase pelo teste estatístico qui quadrado. As frequências alélicas dos polimorfismos *rs6656401* e *rs11118133* na população estudada foram de 0,46 e 0,39 respectivamente. No entanto, devido a observação de um excesso de heterozigotos nos resultados de genotipagens por SNAP para ambos os marcadores, fato este que poderia interferir nos resultados das análises, algumas checagens sobre a confiabilidade dos dados foram feitas. Inicialmente, foi observado que de fato as amostras estavam fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP *rs6656401* ($p = 1,73 \times 10^{-13}$) e para o SNP *rs11118133* ($p = 2,25 \times 10^{-8}$). Como tais resultados podem estar relacionados a erros na genotipagem ou na seleção de amostras, três amostras de DNA amplificadas com iniciadores de cada SNP foram enviadas para sequenciamento na empresa *Helixxa - Genomics Service Provider* para confirmação e/ou rejeição dos resultados obtidos pelo método SNAP. Como resultado, foi encontrado erro na identificação dos genótipos homozigotos, indicando que a técnica não estava funcionando de forma específica. Assim, não foi possível inferir sobre a associação genética destes marcadores com a hanseníase. Estudos adicionais de re-padronização da técnica de SNAP segundo os parâmetros dos sequenciamentos devem ser feitos ou mesmo o uso de uma outra

técnica *highthroughput* para genotipagem dessas amostras devem ser realizados a fim de determinar se há associação entre os marcadores *rs6656401* e *rs11118133* presentes no gene *CR1* e a manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes.

Palavras-chaves: *Mycobacterium leprae*, Hanseníase, SNP, CR1, SNAP.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic disease caused by the *Mycobacterium leprae* bacillus. Considering the importance of CR1 in the immune response against *M. leprae*, two single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected, one related to the size of CR1 (*CR1_rs6656401*) and another to the number of copies of this receptor on red blood cells (*CR1_rs11118133*), with the objective of verifying the association among these polymorphisms and the manifestation of the different clinical forms of leprosy in patients and control individuals of Campos dos Goytacazes, through the *Single Amplified Polymorphism* (SNAP) methodology. Peripheral blood samples from a total of 300 individuals, 150 being carriers of the different clinical forms of leprosy and 150 healthy controls, had their results of SNAP genotyping associated with the clinical forms of leprosy by the chi-square statistical test. The allele frequencies of the polymorphisms *rs6656401* and *rs11118133* in the study population were 0.46 and 0.39, respectively. However, due to the observation of an excess of heterozygotes in the results of SNAP genotypes for both markers, which could interfere in the results of the analyzes, some checks on the reliability of the data were made. Initially, it was observed that in fact the samples were outside the *Hardy-Weinberg Equilibrium* (HWE) for the SNP *CR1_rs6656401* ($p = 1.73 \cdot 10^{-13}$) and for the SNP *CR1_rs11118133* ($p = 2.25 \cdot 10^{-9}$). As results may be related to errors in genotyping or sample selection, three DNA samples amplified with primers from each SNP were sent for sequencing at *Helixxa-Genomics Service Provider* for confirmation and/or rejection of the results obtained by the method SNAP. As result an error was found in the identification of the homozygous genotypes, indicating that the technique was not worked correctly. Thus, it is not possible to infer about the genetic association of these markers with leprosy. Further studies of re-standardization of the SNAP technique according to the parameters of the sequencing should be done or even the use of another highthroughput technique for genotyping of the samples should be performed in order to determine if there is association between the markers *rs6656401* and

rs11118133 present in the gene *CR1* and the manifestation of the different clinical forms of leprosy in the city of Campos dos Goytacazes.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, Leprosy, SNP, CR1, SNAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias clássica, via das lectinas e via alternativa do sistema complemento.	29
Figura 2. Representação esquemática de CCPs, LHRs e sítios de ligação da molécula mais comum de CR1.....	33
Figura 3. Distribuição numérica dos indivíduos participantes do estudo.....	44
Figura 4. Gel de Agarose representativo dos perfis alélicos obtidos por SNAP do SNP <i>CR1_rs6656401</i>	45
Figura 5. Gel de Agarose para validação dos perfis alélicos obtidos por SNAP do SNP <i>CR1_rs6656401</i>	47
Figura 6. Sequenciamento pelo método Sanger para validação dos perfis alélicos obtidos por SNAP do SNP <i>CR1_rs6656401</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase.....	23
Tabela 2. Descrição dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) selecionados no gene <i>CR1</i>	40
Tabela 3. Desenho dos iniciadores para a genotipagem pelo método SNAP..	41
Tabela 4. Características gerais dos indivíduos participantes da pesquisa.....	44
Tabela 5. Frequências alélicas para os marcadores <i>CR1</i> dos indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- BB** – *Borderline*- borderline
BL- *Borderline*- lepromatoso
BT – *Borderline*- tuberculoide
CCP - Proteína de controle do complemento
CR1- Receptor do complemento do tipo 1
CR3- Receptor do complemento do tipo 3
D- Dimorfa
DD- Dimorfa-dimorfa
DNA- Ácido desoxirribonucléico
DT- Dimorfo-tuberculoide
FDA- Fator acelerador da dissociação
HLA- Antígeno leucocitário humano
I - Indeterminada
IFN-g- Interferon gama
IL-10- Interleucina 10
IL-12- Interleucina 12
IL-13- Interleucina 13
IL-4- Interleucina 4
IL- 5- Interleucina 5
LL - Lepromatosa
LHR - Repetições homólogas longas
MAC- Complexo de ataque a membrana
MB- Multibacilar
MBL- Lectina ligadora de manose
OMS- Organização Mundial da Saúde
PB- Paucibacilar
PCM- Proteína cofatora de membrana
PCR- Reação em cadeia polimerase
PGL-1- Antígeno glicolípido fenolico -1
PQT- Poliquimioterapia

RNA- Ácido ribonucléico

SNP- Polimorfismo de nucleotídeo único

TCD4+- Linfócito TCD4+

TCD8+ - Linfócito TCD8+

SNAP- Polimorfismo de Única Base Amplificada

Th1- Células T *Helper* do Tipo 1

Th2- Células T *Helper* do Tipo 2

TLRs- Receptores do Tipo Toll

T- Tuberculoíde

V- Virchowiana

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão da Literatura.....	19
2.1. Histórico.....	19
2.2. Epidemiologia.....	20
2.3. Classificação.....	22
2.4. Diagnóstico.....	23
2.5. Transmissão.....	24
2.6. Tratamento.....	24
2.7. Resposta imune do hospedeiro a <i>Mycobacterium leprae</i>	26
2.8. Sistema Complemento.....	28
2.9. Receptor de complemento tipo 1 (CR1).....	31
2.10. Gene <i>cr1</i>	32
2.11. Metodologias para genotipagem de SNPs.....	35
3. Justificativa.....	36
4. Objetivo Geral.....	37
4.1. Objetivos específicos.....	37
5. Material e métodos.....	38
5.1. População Estudada.....	38
5.2. Coletas de Sangue e Extração de DNA.....	39
5.3. Quantificação do DNA.....	40
5.4. <i>Análise in silico</i> : Seleção dos SNPs e desenvolvimento dos marcadores SNAP.....	40
5.5 Polimorfismo de única base amplificada (SNAP).....	41
5.5.1. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	42

5.5.2. Gel de Agarose.....	42
5.6. Análises Estatísticas.....	42
6. Resultados.....	44
6.1. Casuística do estudo.....	44
6.2. Genotipagem dos Polimorfismos de Nucleotideo único (SNPs).....	45
6.3 Tentativa de validação da genotipagem pelo Sequenciamento Sanger.....	46
7. Discussão.....	49
8. Conclusão.....	54
9. Referências bibliográficas.....	55
10. ANEXO 1.....	62

1. Introdução

De acordo com a classificação proposta por Ridley e Jopling (1966) a infecção por *Mycobacterium leprae* pode levar ao desenvolvimento das principais formas clínicas da doença: Tuberculoide (T), Virchowiana (V), Indeterminada (I) e Borderline (B). A hanseníase Tuberculoide é a forma clínica mais branda da doença associada ao desenvolvimento da resposta imune mediada por células (resposta do tipo Th1). Na hanseníase Virchowiana, que é a forma mais severa da doença, predomina a resposta do padrão Th2. Nas formas intermediárias chamada Borderline, os dois tipos de respostas podem ser identificados (Abulafia et al., 1999). Essa diversificação no curso clínico da doença e os fatores do hospedeiro que regulam essa susceptibilidade diferencial ocasionada pela promoção de tipos de respostas imunes diferentes não são ainda bem estabelecidos (Johnson et al., 2007). Estudos em genes da imunidade inata sugerem que fatores genéticos podem influenciar na susceptibilidade individual à hanseníase e as variadas formas clínicas da doença (Johnson et al., 2007).

O receptor do sistema complemento, CR1 ou CD35, pode ser encontrado na forma solúvel (sCR1) possuindo funções anti-inflamatórias e reguladora, sendo um potente inibidor da ativação das três vias da cascata do complemento diminuindo lesão tecidual dependente de complemento nos casos de lesão inquêmica isquemia, com elevado potencial em aplicações terapêuticas (Sivasankar et al., 1999; Khera e Das, 2009) . Na forma membranar, pode apresentar diversas funções, dependendo da célula na qual for expresso. Em células fagocíticas, o receptor CR1 liga-se aos fragmentos C3 e C4 (C3b/C4b) de partículas opsonizadas e otimiza a fagocitose das mesmas (Boackle et al., 2004; Liu&Niu, 2009), enquanto nos linfócitos B, regula a ativação de células B e a apresentação de antígenos a células T (József et al., 2002). Em eritrócitos, liga-se a micro-organismos ou imunocomplexos opsonizados por C3b ou C4b, processando e transportando para o baço e fígado para processamento pelos fagócitos (Piccoli et al., 2011). Funciona também como um co-fator para a inativação de C3b e C4b, regulando a via

alternativa, e como um receptor fagocitário em leucócitos polimorfonucleares para bactérias opsonizadas com MBL-Imunoglobulina G (Ghiran *et al.*, 2000; Liu&Niu, 2009).

O gene *CR1* está localizado na banda 2, da região 3, do braço longo do cromossomo 1 (1q32) (Liu&Niu, 2009). A maior parte da atividade promotora do *CR1* está concentrada nos primeiros 140 pares de base (pb) (Funkhouser e Vik, 2000), embora haja um elemento regulador negativo entre 700 e 500 pb a montante do sítio de início da transcrição (Kim *et al.*, 1999). Três tipos de polimorfismos foram caracterizados em *CR1*: aqueles que geram variantes de tamanho (*rs6656401*), aqueles que resultam em diferenças de número de cópias nos glóbulos vermelhos - RBC (*rs11118133*) e aqueles que geram os antígenos do grupo sanguíneo Knops (*rs17047660*) (Fonseca *et al.*, 2016).

A estrutura do *CR1* humano consiste em 3 a 6 repetições homólogas longas (LHR), cada uma contendo sete motivos curtos de proteína de controle do complemento (PCC). As diferentes isoformas de tamanho de *CR1* resultam do número diferente de LHRs. As formas F (migração rápida, *CR1*1*) e S (migração lenta, *CR1*2*) são as mais comuns na população (83 e 15%, respectivamente), sendo o maior *CR1* (*CR1 * 4*) raro (<1%) e o menor (*CR1*3* ou F ') com frequência gênica de 1 a 3%. Foi visto que o SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) *rs6656401* presente em um segmento não codificante do gene *CR1*, está associado à inclusão de um quinto domínio LHR, também referido como forma de migração lenta (S), e assim contém um sítio de ligação adicional a C3b (Fonseca *et al.*, 2016).

O número de moléculas de *CR1* nos eritrócitos foi relacionado com um polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição HindIII. Indivíduos Homozigotos para alelos de baixo número de cópias (L) podem expressar menos de 200 cópias de *CR1* por eritrócito, enquanto os homozigotos para alelos de alto número de cópias (H) expressam 3-4 vezes mais (Liu&Niu, 2009 e Fonseca *et al.*, 2016).

Este trabalho teve como foco de estudo os polimorfismos relacionados a produção de diferentes isoformas de *CR1* de membrana (*rs6656401*) e a densidade molecular de *CR1* (*rs11118133*). Devido o *CR1* estar envolvido no

processo de internalização de *M. leprae*, além de exercer outras importantes funções biológicas, os SNPs *rs6656401* e *rs11118133*, podem exercer influência na capacidade de internalização da micobactéria e/ou na modulação da resposta imune e, portanto, estar intimamente relacionado ao amplo espectro clínico da hanseníase incentivando o estudo na população de Campos dos Goytacazes, já que o município apresenta um Centro de Referência da doença.

2. Revisão da Literatura

2.1 Histórico

A hanseníase é uma doença, mundialmente conhecida como lepra, morfeia ou ainda mal de Lázaro (Cunha, 1997).

Muitos estudos foram feitos a fim de descobrir a origem da hanseníase, entretanto, ainda não existe um senso comum em relação à origem da doença, pois não existem muitos registros e referências sobre o tema, o que possibilita uma interpretação imprecisa (Santos et al., 2011). Alguns autores acreditam que a doença seja originária da Ásia por existirem referências em tratados médicos, com descrições compatíveis com pacientes portadores da hanseníase. Outros autores também apontam a África como berço desta doença. Ainda hoje, ocorrem discussões a respeito de sua origem (Edit, 2004).

A hanseníase já era conhecida há mais de três ou quatro mil anos na Índia, China e Japão, contudo a doença já existia no Egito quatro mil anos antes de Cristo. Existem evidências da doença em esqueletos descobertos no Egito, datando do segundo século antes de Cristo (Brasil, 1989).

Durante a Idade Média, acredita-se que a hanseníase teve uma alta incidência na Europa e Oriente Médio. As descrições literárias mostraram que os médicos consideravam a hanseníase, até então conhecida como lepra, uma doença altamente contagiosa e hereditária (Pinto, 1995). Entretanto, décadas depois com as melhorias socioeconômicas, a incidência elevada teve um declínio, desaparecendo dos países europeus. Embora, a doença tenha se mantido em taxas elevadas de prevalência na Ásia e na África, assim possibilitando a introdução da doença no Novo Mundo através da importação de escravos africanos. Nesse período da colonização da América Latina, a mesma tornou-se uma nova área endêmica (Edit, 2004).

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa humana de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas as quais levam a diminuição de sensibilidade térmica e tátil. Essas manifestações são resultantes da ação da micobactéria, que compromete as células cutâneas e nervosas periféricas. Foi o médico

norueguês Gerhard Armauer Hansen, quem identificou, em 1873, este bacilo como o causador da até então nomeada lepra. A doença teve seu nome modificado graças a Lei Federal N°9.010, no dia 29 de março de 1995, no governo do Presidente da República Fernando Henrique Cardoso, em que o termo “lepra” e seus derivados não deveriam mais ser empregados para designar o doente. Então o nome da doença foi alterado para hanseníase em homenagem ao seu descobridor (Brasil, 1995). Os primeiros casos da doença no Brasil foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (Edit, 2004).

2.2 Epidemiologia

A hanseníase é uma doença de notificação compulsória e investigação obrigatória em todo o território brasileiro, principalmente por apresentar um potencial incapacitante e por acometer uma grande parte da população economicamente ativa (Ministério da Saúde, 2005). Vários fatores influenciam na permanência da alta taxa de prevalência da doença, o que impossibilita sua completa erradicação. As condições socioeconômicas e culturais contribuem majoritariamente com estas taxas devido às condições precárias de habitação, baixo grau de escolaridade e ainda, movimentos migratórios que facilitam a difusão da doença (Amaral, 2008). A magnitude e o alto poder incapacitante mantêm a doença como um problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2018).

O país que apresenta as taxas mais elevadas de prevalência à hanseníase é a Índia, seguida pelo Brasil, que são dois dos países que ainda não atingiram a meta estipulada pela OMS em 1991, que determina a taxa de prevalência da doença inferior a 1 caso para cada 10.000 habitantes (Ribeiro et al., 2018). Em 2017, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 147 países reportaram 211.009 novos casos de hanseníase. No Brasil, no mesmo ano, foram notificados 26.875 novos casos, apresentando uma taxa de detecção de 12,8/100 mil habitantes (WHO, 2018).

Entretanto, o Brasil está em concordância com as recomendações da Estratégia Global para eliminação da Hanseníase 2016-2020 da OMS, que tem como principal objetivo reduzir a carga da doença. A estratégia pauta-se em três grandes pilares: o fortalecimento do controle e da parceria governamental, o combate da hanseníase e suas complicações, e o enfrentamento da discriminação com promoção da inclusão social. Esses pilares abrangem a detecção precoce de casos novos (objetivo de diagnosticar 90% dos casos novos antes do aparecimento de deformidades físicas), o tratamento imediato com esquema de poliquimioterapia (PQT), o desenvolvimento de pesquisas básicas e o enfrentamento do estigma, promovendo a mobilização e sensibilização junto à comunidade reduzindo assim a taxa de prevalência em 15% a 20% ao ano (Ministério da Saúde, 2018 e Ribeiro et al., 2018).

A prevalência da doença é observada de forma desigual entre as diferentes regiões do país e acompanhada pela desigualdade socioeconômica regional. Análises dos indicadores por macrorregião mostraram que as regiões Centro-Oeste (37,3/100 mil hab.) e Norte (34,3/100 mil hab.) exibiram as maiores taxas de casos detectados no período de 2012-2016, enquanto as menores foram registradas nas regiões Sul (3,75 por 100 mil habitantes) e Sudeste (5,31 por 100 mil habitantes). Foi possível observar maiores taxas de detecção no sexo masculino em comparação com o sexo feminino. Os maiores valores deste indicador no sexo masculino foram observados nos Estados do Mato Grosso, Maranhão, Tocantins e Rondônia, enquanto nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Alagoas as taxas médias de casos detectados foram mais próximas entre os sexos (Ministério da Saúde, 2018).

No Estado do Rio de Janeiro, os números de casos novos sofreram queda ao longo dos últimos anos. Em 2017, foram registrados 917 casos de Hanseníase, enquanto em 2015, foram 1.066. Há mais de uma década, o número era mais do que o dobro: em 2005, foram 2711 casos (Mascarenhas, 2015 e DATASUS 2018).

Em Campos dos Goytacazes, o número total de pacientes diagnosticados com hanseníase e notificados no ano de 2017 foi de 48 indivíduos. Em relação à forma clínica da doença, 41,6% dos pacientes

possuíam a forma Tuberculoide. Em relação à faixa etária, 95,83% da população de Campos dos Goytacazes que foi diagnosticada com hanseníase apresentavam 15 anos ou mais (DATASUS, 2018).

2.3 Classificação

A hanseníase tem sua classificação baseada na resposta imune estabelecida pelo hospedeiro. De acordo com Ridley e Jopling (1966), a hanseníase é classificada de forma espectral, obedecendo critérios clínicos e bacteriológicos, sendo enfatizado os aspectos imunológicos e histopatológicos. Foi sugerido a possibilidade de as formas clínicas oscilarem de acordo com o espectro da doença, sendo a forma de resistência imune tuberculoide-tuberculoide (T) ou para a forma de susceptibilidade lepromatoso-lepromatoso (L) representando os dois polos da doença. A mesma apresenta três subgrupos: *borderline*-tuberculoide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL). Ainda há a forma clínica indeterminada (I) que é considerada a fase inicial da doença (Araújo, 2005).

A classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença unidos aos critérios bacteriológicos da hanseníase. Dessa forma, os grupos polares são definidos como: tuberculoide (T) e virchowiana (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma *borderline* (B) ou dimorfa (D) (Souza,1997).

A inespecificidade das formas clínicas associadas ao padrão dimórfico dificulta o diagnóstico correto da doença. Para auxiliar o diagnóstico, a OMS estabeleceu um método de classificação operacional que divide os pacientes em dois grupos diferentes de acordo com o número de lesões. O paciente classificado como paucibacilar (PB) – apresenta até cinco lesões cutâneas e/ou apenas um tronco nervoso afetado; multibacilar (MB) – mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso afetado. A partir dessa classificação, os pacientes PB abrangem as formas I e T, e os pacientes MB compreendem as formas D e V (WHO, 1998; Jacobson & Krahenbuhl, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1.Relação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase. Fonte: Souza. 1997

MADRI	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B)	Virchoviana V
Ridley & Jopling		TT	BT* BB BL	LL
OMS	PAUCIBACILARES		MULTIBACILARES	

TT: Tuberculóide-tuberculóide; *BT: *Borderline-tuberculóide*, embora apresente características da forma paucibacilar, operacionalmente tem sido classificada como multibacilar; BB: *Borderline-borderline*; *Borderline-lepromatoso* e LL: *Lepromatoso-lepromatoso*.

2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é feito principalmente com base em avaliação clínica feita pelo exame dermatoneurológico, através do descobrimento de lesões na pele que altera a sensibilidade e coloração do tom de pele. A sensibilidade nas lesões pode estar diminuída (hipoestesia), ausente (anestesia) ou, em menor frequência, aumentada (hiperestesia) (Yawalkar, 2002).

O diagnóstico laboratorial também é utilizado para auxiliar no diagnóstico diferencial para com outras doenças dermatoneurológicas. Um dos testes mais utilizado para confirmar o diagnóstico é a baciloscopia, que tem como objetivo a visualização do bacilo a partir da coloração do esfregaço intradérmico pelo método de Ziehl-Neelsen. Outro exame utilizado frequentemente é a histopatologia das lesões biopsiadas, que consiste numa observação dos nervos cutâneos afetados e identificação de bacilos álcool-ácidos-resistentes (BAAR) pela coloração de Wade ou Fite-Faraco (Lastória& Morgado de Abreu, 2014).

Outro exame complementar ao diagnóstico da infecção por *M. leprae* é o teste imunológico de ELISA (*Enzyme Linked Immunsorbent Assay*), para detecção de anticorpos anti-PGL-1 que indicam a exposição ao *M. leprae* e mostrem correlação positiva com a baciloscopia em pacientes multibacilares. Porém, pacientes paucibacilares, geralmente são negativos em testes de detecção de anticorpos (Moura et al., 2008). Sendo assim, esse ensaio pode contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na

classificação dos pacientes e, ainda, no monitoramento da eficácia do tratamento (Moura et al., 2008). Contudo, consiste em uma técnica de alto custo e que demanda uma equipe de profissionais qualificados para a execução dos procedimentos.

Foi visto em um recente estudo exploratório, que fatores como o estigma social associado à hanseníase, a ausência de esclarecimento dos pacientes sobre a mesma e erros no diagnóstico, são fatores determinantes para a ocorrência de diagnósticos tardios no Brasil (Henry, 2016). Todos esses fatores contribuem para que se torne mais difícil o controle e a eliminação completa da doença enquanto problema de saúde pública.

2.5 Transmissão

A principal forma de transmissão da hanseníase é através das vias aéreas, sendo os pacientes que apresentam em seu organismo um grande número de bacilos, chamados multibacilares (virchowianos e borderline), considerados epidemiologicamente importantes na transmissão da infecção e, por isso, seus contatos domiciliares, independente do gênero, são os mais susceptíveis ao contágio (Sales et al., 2001). Esses pacientes abrigam grande quantidade de bacilos, tanto no trato respiratório superior quanto na pele, e permanecem como fonte de transmissão da doença até que seja instituído o tratamento adequado (Lockwood, 2005). *M. leprae* apresenta uma cinética de crescimento lento e por isso o período de incubação da doença costuma ser longo, podendo demorar de meses a décadas para manifestação clínica da doença (Ministério da Saúde, 2010).

2.6 Tratamento

O tratamento é fundamental para a cura da hanseníase, sendo o meio mais estratégico para o controle e eliminação da doença quanto ao problema de saúde pública (Brasil, 2002).

A doença manteve-se sem tratamento até o ano de 1940, quando o primeiro medicamento foi desenvolvido, a dapsona, um fármaco capaz de tratar a doença (Misch et al., 2010). Entretanto, de acordo com as avaliações

clínicas de Adams & Waters (1966) e Friedmann (1973), o uso único e indiscriminado da dapsona provocou o surgimento de cepas micobacterianas possivelmente resistentes ao fármaco em meados de 1960.

A OMS, em 1982, implantou o tratamento de multidrogaterapia (MDT) ou poliquimioterapia (PQT) que consiste na utilização de três fármacos: dapsona, rifampicina e clofazimina (Amorim, 2017). Este esquema terapêutico possui o objetivo de evitar o surgimento de cepas quimioresistentes e a eliminação da população micobacteriana viável em um curto período de tempo. A poliquimioterapia age tornando o bacilo inviável, evitando a evolução da doença e prevenindo as incapacidades e deformidades causadas pelo *M. leprae*. Logo no início do tratamento, a transmissão da doença é interrompida pela ação do medicamento. A administração conjunta evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento durante o tratamento (Ministério da Saúde, 2010).

O tratamento da hanseníase no Brasil segue um esquema padrão do Ministério da Saúde, que estabelece o tratamento de acordo com a classificação operacional Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB), tornando assim o diagnóstico clínico fundamental para a informação sobre a classificação do paciente e seleção do tratamento adequado ao seu caso (Ministério da Saúde, 2010).

Para os pacientes que são diagnosticados com a forma PB da doença, a duração do tratamento é de 6 meses utilizando a rifampicina e dapsona. Já os pacientes que são diagnosticados com a forma clínica MB o tratamento contempla o uso da rifampicina, dapsona e clofazimina e tem duração de 12 meses. Para os dois tipos de poliquimioterapia as doses podem ser ajustadas dependendo da faixa etária do paciente (WHO 2000; Ministério da Saúde, 2010).

2.7 Resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*

O amplo espectro de manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase se deve a diversidade da resposta imune desenvolvida frente ao *M. leprae* (Nath et al., 2015). Ambas as respostas imunes, inata e adquirida, estão envolvidas na defesa contra o patógeno. A polarização dessas duas respostas imune específicas ao *M. leprae* é considerada de grande importância na determinação da forma clínica (Nath et al., 2015). A interação inicial entre o patógeno e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares das micobactérias, os receptores *Toll-like* (TLRs). Os mesmos são essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta imune inata. Dos TLRs que já foram identificados, os heterodímeros, TLR2-TLR1, e os homodímeros, TLR2 e TLR4, são importantes para o reconhecimento de micobactérias. Especialmente o TLR-2 que é ativado por lipoproteínas e glicolipídeos de *M. leprae* (Mendonça et al., 2008).

A capacidade de iniciar a resposta protetora é caracterizada pela apresentação de mecanismos que se baseiam no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas superfícies dos linfócitos T e B. Essa resposta imune pode ser categorizada em celular (ou do tipo 1), e humoral (ou do tipo 2). A capacidade dos linfócitos auxiliares (TCD4+), também conhecidos como linfócitos *T helper* (*Th*), em induzir as respostas celular ou humoral está diretamente relacionada com a secreção de IL-12/23, promovendo a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. Após a ativação inicial pelos peptídeos imunogênicos apresentados em associação ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) por células apresentadoras de antígenos (APC), os linfócitos *Th* podem se diferenciar em duas grandes populações de células fenotipicamente distintas, *Th1* e *Th2*. As células *Th1* produzem caracteristicamente interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), que induzem a ativação dos macrófagos e são muito efetivas no controle da infecção contra patógenos intracelulares. Os macrófagos ativados produzem IL-12, o qual consiste num fator dominante para a polarização de células *Th1*.

Em contraste, as células *Th2* secretam IL-4, IL-5 e IL-13 como citocinas chave (Mendonça et al., 2008; Biedermann et al., 2004, Fonseca et al., 2017). Portanto, apenas as células *Th1* medeiam respostas imunes que podem controlar a hanseníase (Biedermann et al., 2004).

Apenas o equilíbrio das respostas *Th1/Th2* no entanto, não pode explicar completamente a resposta imune durante a hanseníase. Outros subconjuntos de células T, como células T reguladoras e *Th17*, foram identificados como tendo papéis importantes na determinação da imunidade do hospedeiro (Fonseca et al., 2017). Células *Th17* aumenta a resposta de células *Th1* e tem sido associadas a um efeito protetor a patógenos intracelulares (Santos et al., 2017; Tarique et al., 2017).

O domínio da resposta imune celular e humoral, frente à infecção pelo bacilo pode influenciar a evolução da doença e estar associado indiretamente com as características clínicas observadas nos pacientes das formas tuberculoide e virchowiana (Mendonça et al., 2008).

Na forma tuberculoide, os pacientes apresentam forte resposta imune celular contra *M. leprae*, com poucas lesões e as mesmas bem delimitadas. Citocinas como IFN- γ , IL-2 e linfotóxina são secretadas nas lesões, resultando em atividade fagocítica. IFN- γ tem capacidade de estimular macrófagos a matar ou restringir a proliferação de micobactérias (Nathan, 1986). A IL-2 atua na defesa do hospedeiro, pois tem capacidade de induzir a expansão clonal de células T ativadas e aumentar a produção de IFN- γ (Kasahara, 1983). Linfócitos e macrófagos são influenciados por essas citocinas acarretando na formação de granuloma bem definido (Roach et al., 2002). Os linfócitos TCD4+ são encontrados majoritariamente dentro do granuloma, enquanto os TCD8+ são encontrados na superfície do mesmo (Modlin, 1994).

Na forma clínica virchowiana há pouca formação de granuloma. Ocorre proliferação do bacilo, com a ocorrência de muitas lesões e infiltrações disseminadas na pele e nos nervos. As células TCD4+ do tipo TH2 secretam citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 e aumentam a resposta humoral. Há descrito na literatura que a IL-4 diminui a expressão de TLR2 nos monócitos e que a IL-10

suprime a produção de IL-12, o que está associado à dominância de linfócitos CD8+ nas lesões virchowianas (Modlin 1994; Mendonça et al., 2008).

2.8. Sistema Complemento

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Foi descrito no final do século XIX como componente termo-sensível do plasma normal, que aumentava a opsonização e eliminação de bactérias e células infectadas. No ano de 1930, o pesquisador Jackie Stanley observou o marcante efeito opsonizante de C3b (Iturry-Yamamoto et al., 2001; Janeway et al., 2002).

É considerado um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata e também estabelece uma importante ponte com a imunidade adaptativa, atuando como um sinalizador (Abbas, 2005). Contribui para a manutenção da homeostase do organismo, atuando no estímulo da inflamação, remoção de complexos imunes e produtos da lesão inflamatória e lise por opsonização seguida de fagocitose ou pela formação do complexo membranolítico na superfície celular (Uriyama et al., 2004; Liu&Niu et al., 2009; Dunkelberger&Song et al., 2010)

O sistema complemento é composto por mais de 30 proteínas que agem em sinergia para promover inflamação e dano direto a células, a micro-organismos e a tecidos identificados como anormais por moléculas específicas. A maioria das proteínas é sintetizada no fígado; entretanto, células mieloides, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais podem produzi-las (Piccoli et al., 2011). As proteínas séricas e de membrana interagem entre si, de forma altamente regulada para gerar produtos proteicos biologicamente ativos. Ainda na fase precoce de uma infecção, o sistema complemento pode ser ativado por três vias. A via alternativa é espontânea e constantemente ativada na membrana celular, no plasma e em outros fluidos na ausência de anticorpos. A via clássica é desencadeada pela ligação ao fragmento C1q ao anticorpo ligado ao antígeno-alvo. A via das lectina é iniciada através da ligação da lectina ligadora de manose, um componente solúvel do organismo, com carboidratos

presentes na superfície do micro-organismo-alvo (Abbas, 2005; Piccoli et al.,2011) (Figura 1).

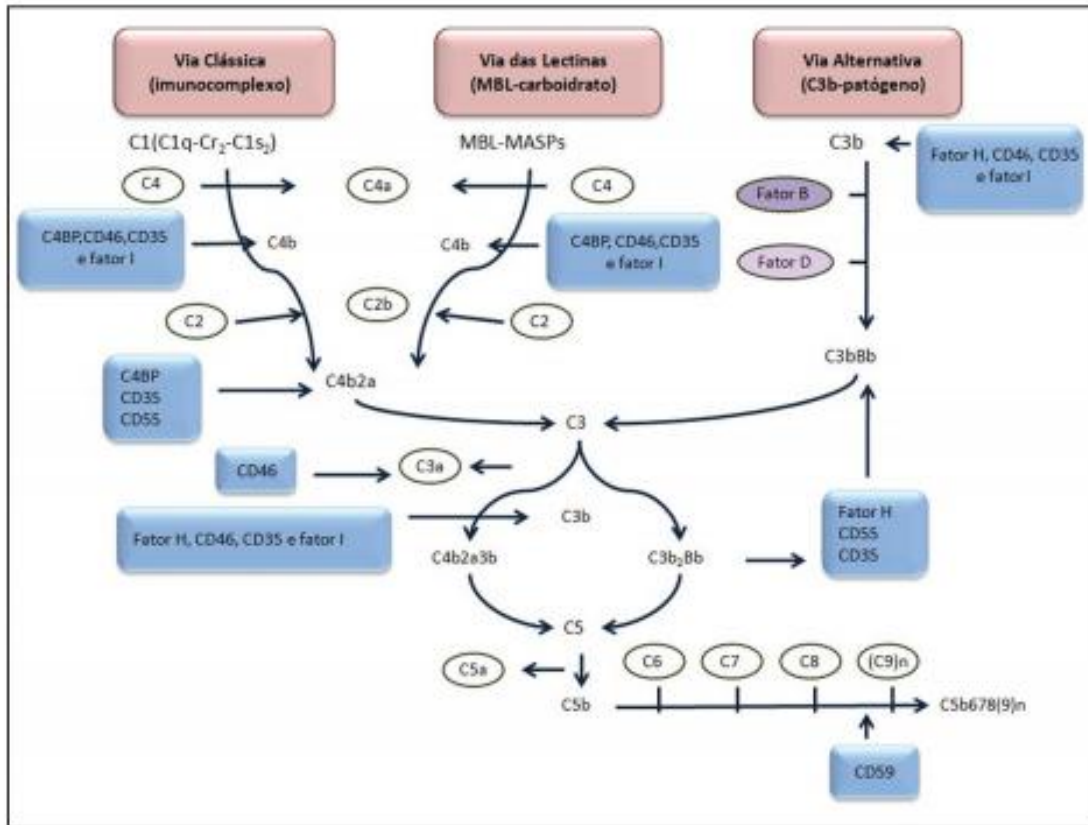


Figura 1. Representação esquemática das vias clássica, via das lectinas e via alternativa do sistema complemento. O complemento pode ser ativado através da via clássica, da via das lectinas e da via alternativa. O componente C1 é composto de C1q, C1r e C1s e reconhece o imunocomplexo ligado à membrana celular. A lectina ligante da manose (MBL) reconhece certos carboidratos na membrana de alguns patógenos específicos, e o C3b reconhece carboidratos presentes na membrana dos patógenos. Todas as vias de ativação originam a formação de C3 e C5 convertases, que geram anafilatoxinas C3a e C5a, a opsonina C3b e o MAC. O C3b também amplifica a via alternativa. Fonte: Piccoli et al.,2011.

A ativação da via clássica se inicia pela interação do componente C1q com complexos imunes (antígeno-anticorpo), embora também possa ser ativada por meio de interações de C1q com moléculas não-imunes (polissacarídeos bacterianos, DNA, RNA, fungos e vírus, entre outros). Estão envolvidos nessa via: o complexo de reconhecimento C1q associado às serina proteases C1r e C1s; os componentes C4, C2 e C3, além dos componentes

C5-C9 necessários à formação do complexo final de ataque à membrana (MAC) (Utiyama et al., 2004).

Na via alternativa, não há necessidade de ativação por anticorpos, já que ela é ativada diretamente na superfície das células microbianas, entre outras substâncias biológicas. Esta ativação implica na hidrólise de C3, que também pode ser espontânea, e na deposição dos fragmentos de C3b sobre a célula-alvo (Liu&Niu et al.,2009). Estão envolvidos nessa via: C3, fator B (FB); fator D (FD) e properdina (P), que após uma cascata de reações levarão à formação do MAC.

A via das lectinas é ativada através da ligação da lectina ligante de manose (MBL), ficolinas (FCN 1, 2 ou 3) ou colectina 11 (COLEC11) a resíduos específicos de carboidratos ou resíduos acetilados, presentes na superfície do patógeno ou de células alteradas, no caso de MBL, N-acetil-D-glucosamina, manose, glucose, frutose (Dunkelberger&Song, 2010). Esta ligação leva à autoativação de MASP-1 e à transativação de MASP-2, serino proteases acopladas às moléculas de reconhecimento, que apresentam função similar a C1r e C1s. Dessa forma, haverá a ativação de C4 e C2, levando à formação de C3 convertase e ao MAC (Dunkelberger&Song, 2010). Independente da via ativada, todas irão convergir na geração de C3 convertase, que clivará C3 em C3a (anafilatoxina) e C3b (opsonina), culminando na formação do MAC (Dunkelberger&Song et al., 2010).

As proteínas do sistema complemento podem estar envolvidas nas doenças humanas de diferentes modos. A deficiência de qualquer componente protéico pode levar a padrões anormais de ativação do sistema, já de componentes regulatórios pode levar a ativação intensa do sistema complemento no local e no momento indesejado, causando inflamação excessiva e lise celular (Abbas, 2005).

A ativação do sistema complemento é regulada por várias proteínas plasmáticas e outras ligadas à membrana celular com funções específicas, mantendo um controle rigoroso da ativação. Isso ocorre, pois a ativação descontrolada pode levar à formação do MAC no próprio tecido e a uma

formação excessiva de mediadores da inflamação. Algumas dessas proteínas incluem o CR1 (Receptor do Complemento do Tipo 1), FDA (Fator Acelerador da Decaimento), PCM (Proteína Cofatora de Membrana) (Iturry-Yamamoto, 2001).

O CR1 é o mais versátil desses inibidores, tanto nas funções receptoras quanto nas reguladoras (Java, 2015). As suas variadas funções incluem, a dissociação de C3 e C5 convertase da via clássica e da via alternativa. Pode atuar com cofator do Fator I na clivagem de C3b e C4b e pode promover a eliminação de imunocomplexos na circulação (Iturry-Yamamoto, 2001).

2.9 Receptor de Complemento tipo 1 (CR1)

Pertencente à família de reguladores da atividade do sistema complemento, o receptor humano CR1 ou CD35 é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples que interage com o C3b e o C4b para promover a fagocitose mediada por neutrófilos, monócitos, macrófagos e age como cofator para inativar o C3b e o C4b a iC3b e iC4b através do fator I. É expresso em diferentes tipos celulares, tais como eritrócitos, células mieloides e linfoides. (Fearon&Wong, 1983; Piccoli et al.,2011).

O CR1 de membrana pode variar de função, dependendo da célula onde é encontrado. Em células fagocíticas, liga-se aos fragmentos C3 e C4 (C3b/C4b) e otimiza a fagocitose de partículas opsonizadas (Boackle et al., 2004; Liu&Niu, 2009), enquanto nos linfócitos B, regula a ativação de células B e a apresentação de antígenos a células T (József et al.,2002). Também pode atuar como um regulador negativo do sistema complemento (em todas as vias), inativando as C3 e C5 convertases (Furtado *et al.*, 2008). Funciona como um cofator para a inativação de C3b e C4b, regulando a via alternativa, e também como um receptor fagocitário em leucócitos polimorfonucleares para bactérias opsonizadas com MBL-Imunoglobulina G (Ghiran *et al.*, 2000; Liu&Niu, 2009).

Em humanos, 90% do total de CR1 de membrana é encontrado nos eritrócitos, Em eritrócitos, liga-se a micro-organismos ou imunocomplexos opsonizados por C3b ou C4b, processando e transportando para o baço e

fígado para processamento pelos fagócitos (Piccoli et al.,2011).Micro-organismos como *Leishmania*, micobactérias e o HIV, ao tornarem-se revestidos por C3b, utilizam o CD35 para entrar na célula hospedeira (Piccoli et al., 2011).

O receptor CR1 também pode ser encontrado em forma solúvel (sCR1), sendo resultante de uma clivagem proteolítica na região C-terminal de CR1, em vesículas secretoras terminais ou na membrana (Danielsson *et al.*, 1994, Hamer *et al.*, 1998). Possui funções anti-inflamatórias, sendo um potente inibidor da ativação da cascata do complemento diminuindo lesão tecidual dependente de complemento nos casos de lesão isquêmica, com elevado potencial em aplicações terapêuticas (Sivasankar et al, 1999; Khera e Das, 2009). Níveis de sCR1 elevados foram encontrados na cirrose hepática, insuficiência renal terminal e algumas neoplasias hematológicas (Di Bona,1998).

A relevância clínica para as funções do CR1 foram mostradas em estudos de associações entre doenças e os níveis de expressão de CR1 na superfície de eritrócitos (Lida et al., 1982). Na hanseníase, foi visto por um estudo de Tausk e Colaboradores (1985) há muitos anos atrás em um estudo que a forma clínica virchowiana possuía uma redução na expressão de CR1 sobre os eritrócitos dos pacientes em comparação aos pacientes com a forma clínicatuberculoide e aos controles saudáveis.

Estudos sobre genes de imunidade inata sugerem que fatores genéticos podem influenciar na susceptibilidade individual à hanseníase e as variadas formas clínicas (Johnson et al., 2007).

2.10 Gene CR1

O gene *CR1* está localizado na banda 2, da região 3, do braço longo do cromossomo 1 (1q32) (Liu&Niu, 2009). A maior parte da atividade promotora do *CR1* está concentrada nos primeiros 140 pares de base (pb) (Funkhouser e Vik, 2000), embora haja um elemento regulador negativo entre 700 e 500 pb a montante do sítio de início da transcrição (Kim *et al.*, 1999). O receptor CR1 é

composto principalmente de domínios de dobra independentes, conhecidos como repetições de proteína de controle do complemento (CCP), cada uma contendo 59 a 75 aminoácidos. O gene *CR1* contém muitos polimorfismos diferentes; sua versão mais comum de *CR1* contém 30 CCPs que formam quatro repetições homólogas longas (LHR), cada uma composta de sete CCPs. Adições de domínios LHR proporcionam sítios extra de ligação a C3b (Fonseca et al., 2016; Liu&Niu, 2009). Figura 3.

Variações do *CR1* podem ocorrer por deleções e inserções (resultantes de recombinação não homóloga) ou SNPs, que podem alterar a densidade e tamanho final da molécula de *CR1* na superfície da célula (Krych Goldberg e Atkinson, 2001; Liu&iu, 2009), resultando em diferentes isoformas de *CR1*: *CR1-A* de 220 kDa (também chamado *CR1*1* ou *CR1-F*, tem maior velocidade de migração eletroforética), *CR1-B* de 250 kDa (*CR1*2* ou *CR1-S*, menor velocidade de migração eletroforética, comparado a *CR1-F*), são as mais comuns na população. A frequência de *CR1-A* é de 87% em europeus, 82% em afro-americanos, 89% em mexicanos e 91,6% em asiáticos. Já a frequência de *CR1-B* é 8,4% em indianos e asiáticos e 11% nas demais populações investigadas (Fonseca et al., 2016). As variantes de *CR1-C* de 190kDa (*CR1-F'* ou *CR1*3*) possuem frequência gênica de 1 a 3% e *CR1-D* de 280 kDa (*CR1*4*) raro (<1%) nas populações analisadas (Liu&Niu, 2009 ; Fonseca et al., 2016)..

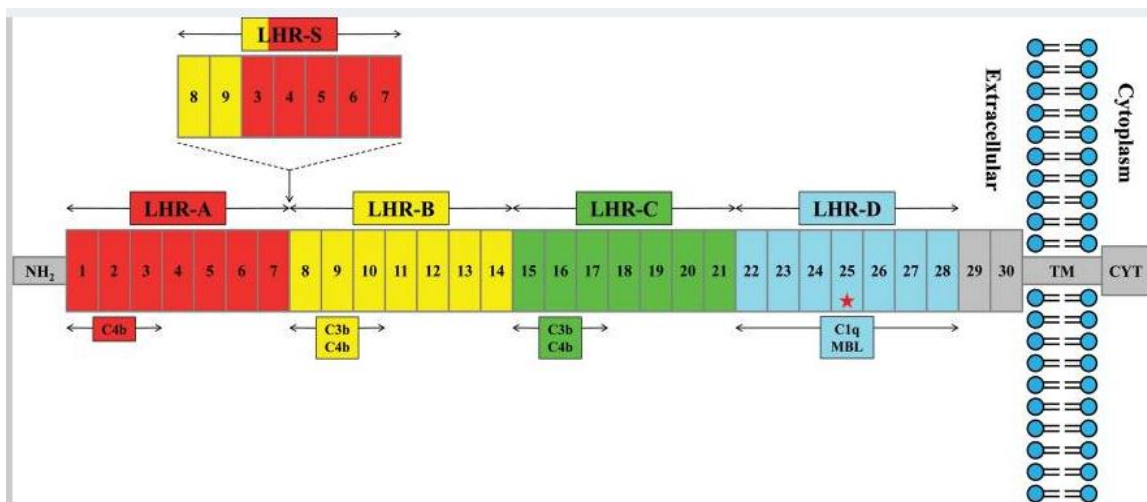


Figura 3 . Representação esquemática de CCPs, LHRs e sítios de ligação da molécula mais comum de *CR1*. A forma mais comum de *CR1*, contendo 30 CCPs, é representada. Os primeiros 28 CCPs formados por quatro domínios longos de repetição homólogos (LHR A – D) são mostrados acima da molécula de *CR1*. As áreas de cada LHR contendo os locais de ligação C4b, C3b, MBL e / ou C1q estão ilustradas abaixo da molécula. Também é mostrado acima da molécula a localização e estrutura do polimorfismo LHR-S descrito por Brouwers et al., 2012. NH₂ representa o terminal amino; TM, o domínio transmembranar; e CYT, a cauda citoplasmática. Fonte: Keenan et al, 2012.

Vários polimorfismos genéticos têm sido estudados para o receptor CR1, três tipos já foram caracterizados em humanos: aqueles que geram variantes de tamanho, aqueles que resultam em diferenças de densidade do receptor na superfície de eritrócitos e aqueles que geram os antígenos do grupo sanguíneo Knops através da alteração da proteína (Fonseca et al., 2016). O número de moléculas de CR1 na superfície de eritrócitos está correlacionado com um Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição HindIII, encontrando variações fenotípicas individuais de 100 a 1200 receptores por eritrócitos. O número de receptores segrega-se fenotipicamente em três grupos de indivíduos: homozigotos para alta ou baixa expressão, e heterozigotos (Tausk e Gigli, 1990).

Atualmente, poucos estudos de associação de variantes genéticas de CR1 com susceptibilidade a doenças inflamatórias e autoimunes têm sido feito. As descrições encontradas na literatura científica que relacionam polimorfismos de *CR1* com doenças são relacionados à doença de Alzheimer, câncer, malária, hanseníase e doença de Chagas. Um destes estudos mostrou que a variante *rs6656401* influencia a susceptibilidade a doença Alzheimer associada à presença de *CR1-S*, pois essa isoforma apresenta um sítio adicional de ligação para C3b (Zhang et al., 2010). Entretanto outro estudo ressalta que a densidade dessa isoforma é menor que a da isoforma *CR1-F* no cérebro, o que leva os autores a sugerir que o desenvolvimento da doença se daria pela ineficiência na depuração dos depósitos de placas β amiloides e não apenas pelo aumento da inflamação (Mahmoudi et al., 2015). Cockburn e colaboradores (2004) relataram que heterozigotos para o alelo de baixa expressão do SNP *rs11118133* estão significativamente protegidos de malária severa. Os autores associam esses resultados a possibilidade de que o alelo T proteja contra as formas graves de malária causadas por obstrução microvascular e lesão de eritrócitos (por meio de redução do rosetting),entretanto pode aumentar o risco a outras síndromes com diferentes mecanismos patológicos.

2.11. Metodologias para genotipagem de SNPs

As técnicas para genotipagem de SNPs têm sofrido um rápido desenvolvimento nos últimos anos. Isso pode ser explicado pelo fato que a informação gerada por esses marcadores genéticos podem ser, posteriormente, utilizada em vários níveis nas análises do DNA como: marcadores no mapeamento genético; material de estudo na identificação de SNPs funcionais e seu respectivo fenótipo; ferramenta para estudos populacionais, por comparação do genoma de indivíduos de diferentes populações (Zhang e Hewitt, 2003). A escolha da melhor tecnologia a ser utilizada para diferentes aplicações específicas dependerá dos objetivos finais, número de marcadores e do tamanho da amostra (Nascimento, 2017).

A urgência de técnicas de genotipagem de alta resolução, têm permitido um rápido desenvolvimento de programas de pesquisa, gerados a partir de projetos genoma, incluindo ferramentas de genotipagem *highthroughput* para identificar polimorfismos de único nucleotídeo (Syvanen, 2001).

Uma ampla variedade de metodologias podem ser utilizadas para a genotipagem de SNPs, tais como: *SnaPshot*[™] (Applied Biosystems), análise de curva de “melting”, *TaqMan*[®] (Applied Biosystems), MALD-TOF, PCR-RFLP e PCR- Alelo Especifico (SNAP) (Spenassatto, 2011). Entretanto as primeiras metodologias citadas são de alto custo o que demanda uma quantidade maior de recursos, e acaba impossibilitando a utilização rotineira dessas técnicas com os problemas enfrentados nos últimos anos nas instituições de pesquisa com a falta de verba disponibilizada.

3. Justificativa

A entrada de *M. leprae* no macrófago é seletivamente mediada pelos receptores do complemento, CR1 e CR3, os quais se ligam a componentes do complemento ativados sobre a superfície do *M. leprae* pelo seu antígeno específico PGL-1 (Krahenbuhl e Adams, 1994; Manetti et al., 1993). CR1 tem sido identificado como mediador da internalização de *M. leprae* em fagócitos (Schlesinger et al, 1990; Kretzschmar et al, 2018). Considerando a importância de CR1 no contexto imunológico, e o fato dos dois SNPs selecionados para este estudo serem relacionados a variantes de tamanho de CR1 (*rs6656401*) e a variantes de número de cópias deste receptor nos glóbulos vermelhos (RBC) (*rs11118133*). A expressão alterada desse receptor e/ou a alteração na especificidade dele, poderia exercer função relevante na capacidade de internalização da micobactéria e/ou na modulação da resposta imune. Assim, é crucial entender se os efeitos de tais polimorfismos estariam associados a susceptibilidade ou proteção frente a infecção por *M. leprae*. Esse estudo foi realizado estrategicamente nesta cidade, já que Campos possui um Centro de Referência a hanseníase e por representar uma área altamente endêmica para a doença.

A técnica de SNAP foi escolhida, pois é uma técnica simples de baixo custo que utiliza técnicas e reagentes convencionas de um laboratório de biologia molecular, diferente das técnicas de genotipagem de SNPs em larga escala que apesar de ter apresentado aumento na eficiência nos últimos anos, são técnicas mais caras o que impossibilita utilização rotineira dessas tecnologias. Esse fator somado ao da pesquisa que vem sofrendo uma grande queda nos recursos disponibilizados nos últimos anos, técnicas de baixo custo que permitam a genotipagem eficiente de SNPs em genes variados são de grande importância para solucionar problemas relacionados a recursos limitados.

4. Objetivos

Este estudo teve como objetivo verificar a utilização da técnica SNAP para a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único no gene *CR1* e a manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase em pacientes e indivíduos controle de Campos dos Goytacazes.

4.1 Objetivos específicos

- Recrutar pacientes portadores de hanseníase acompanhados pelo Centro de Referência da Hanseníase em Campos dos Goytacazes e indivíduos controles oriundos do banco de sangue;
- Genotipar dois SNPs do gene *CR1* (*rs6656401* e *rs11118133*) pela técnica de SNAP;
- Realizar análises estatísticas para verificar associação genética entre os SNPs *rs6656401* e *rs11118133* e as manifestações clínicas da hanseníase.

5- Material e Métodos

5.1- População estudada

Participaram deste estudo, ao todo, 300 indivíduos, 150 pacientes e 150 controles, coletados durante o período de 2014 a 2018. Foi realizado um cálculo amostral utilizando o *Web Site* Openepi (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) para verificarmos a relação entre pacientes e controles ideal para o estudo. A partir da taxa de exposição ao *M. leprae*, foi possível obter o resultado de 1:1 como ideal em estudos caso controle para hanseníase e o número amostral deveria ser maior do que 122 indivíduos. Os indivíduos participantes deste trabalho foram avaliados quanto aos parâmetros genéticos. Os mesmos foram provenientes de dois grupos caso e controles. O grupo caso inclui pacientes portadores das diferentes formas clínicas da hanseníase (virchowiana ou lepromatosa, tuberculoide, dimorfa ou *borderline* e indeterminada), oriundos do Programa Municipal de Controle da Hanseníase, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde do Município de Campos dos Goytacazes/RJ, o qual funciona como Centro de Referência Regional para diagnóstico e tratamento da doença. Os pacientes portadores da hanseníase que foram selecionados para o estudo foram diagnosticados e acompanhados pelo médico dermatologista Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Jr., colaborador neste projeto; e classificados segundo a classificação de Madri (1953). Enquanto o grupo controle, foi formado por indivíduos provenientes do Hemocentro do Hospital Ferreira Machado, o qual pertence a rede pública de saúde do município de Campos dos Goytacazes.

Todos os indivíduos diagnosticados como portadores de alguma das formas clínicas da hanseníase acima citadas que se apresentaram para consultas foram convidados a participar da pesquisa. Tomando-se como base a adesão voluntária ao projeto a resolução CNS 466/2012 e dados de prevalência da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes, todos os indivíduos voluntários no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e sobre sua forma de participação, mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O termo foi redigido segundo as

regras da resolução CNS 466/2012, exigida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos (CEP) número do CAAE 32510914.7.0000.5244.

5.2. Coleta de sangue e extração de DNA

O volume equivalente a 4 mL de sangue foi coletado à vácuo de cada indivíduo (caso e controle), em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio, e armazenado a -20 °C até o uso. O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue seguindo o protocolo determinado pelo fabricante do kit de extração e purificação de DNA genômico *Illustra blood genomicPrep*, GE Healthcare, UK™. Previamente ao ensaio, os tubos de 1,5 mL foram marcados com os códigos das amostras, o tampão de eluição (*Elution Buffer*) foi incubado a 70 °C. Nos tubos, foram adicionados 20 µL de proteinase K, 200 µL de sangue total e 400 µL de solução de lise (*Lysis Solution*). Essa mistura foi homogeneizada em agitador magnético e foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 11000 rpm por 30 segundos. Foi realizada a montagem do tubo de coleta (*Collection Tube*) e mini coluna (*Mini Column*) e 600 µL da mistura foi colocada em cada coluna. A mistura foi centrifugada a 11000 rpm por um minuto e o conteúdo do tubo de coleta (*Collection Tube*) foi descartado e acrescido de 500 µL de solução de lise (*Lysis Solution*). A coluna onde foi centrifugado a 11000 rpm. O conteúdo do tubo de coleta (*Collection Tube*) foi novamente descartado e foi adicionado 500 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) a coluna que foi centrifugado novamente a 11000 rpm por três minutos. A coluna foi colocada em tubos de 1,5 mL identificados e foi adicionado 200 µL de tampão de eluição (*Elution Buffer*) previamente aquecido a 70 °C, a mistura foi incubada por um minuto à temperatura ambiente e centrifugada por 11000 rpm por um minuto. A coluna foi descartada e os eppendorfs contendo o DNA foram armazenados à - 20 °C para posterior quantificação.

5.3 Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA extraído foi utilizado o equipamento *Thermo Scientific NanoDrop 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*). A concentração de DNA foi determinada por medição da absorbância das amostras a 260 nm, 280 nm e 230 nm. A concentração e pureza das amostras de DNA foram estimadas pelas seguintes razões: $A[260]/A[280]$ e $A[260]/A[230]$, no qual o mais puro DNA foi considerado estar próximo a 1,8 e 2,0, respectivamente. Após a quantificação as amostras foram estocadas à -20 °C.

5.4 Análise *in silico*: seleção dos SNPs e desenvolvimento dos marcadores SNAP

Os SNPs do gene CR1 foram preliminarmente selecionados a partir do alelo de menor frequência (MAF-*Minor allele frequency*) maior que 0,10, disponível no ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/info/genome/variation/index.html>). Para isso, foram utilizadas como referências as populações europeias (CEU) que são moradores de Utah, com ancestralidade europeia ocidental ou nórdica e a população africana (YRI) moradores de Ibadan, Nigéria, pertencentes à etnia lorubá devido serem os principais contribuintes genéticos da população do Norte Fluminense.

Tabela 2. Descrição dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) selecionados no gene CR1.

Gene	SNP	1000 GENOMES MAF CEU ^a	1000 GENOMES MAF YRI ^b	MAF Geral	Alelo de Referência	Consequência Funcional
CR1	rs6656401	0.24 (A)	0.013 (A)	A:0.121	G/A	intron variant
CR1	rs11118133	0,136(T)	0.259 (T)	T: 0.30	A/T/G	intron variant

^aCEU: Moradores de Utah, com ancestralidade europeia ocidental ou nórdica;

^bYRI: Moradores de Ibadan, Nigéria. Pertencentes à etnia lorubá.

Os *iniciadores* específicos para a detecção das variantes alélicas foram desenhados seguindo a metodologia desenvolvida por Drenkard et al. (2000). Para o desenho dos Polimorfismo de única base amplificado (SNAPs), cada

SNP teve a sua localização acessada diretamente no genoma de referência utilizando-se sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para a visualização das sequências e localização da posição de cada *SNP* no genoma, foi utilizado o *software SnapGene® Viewer 3.3.3*. Uma vez determinada a posição do *SNP*, foi copiado um segmento de cerca de 1000 nucleotídeos (500 nucleotídeos à montante e à jusante da localização do *SNP*) que foi submetido ao programa *PRIMER1* para desenho de *iniciadores* para os marcadores SNAP, disponível no *Web site* (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>).

O programa *PRIMER1* é capaz de produzir diferentes combinações de pares de *primers* para um mesmo *SNP*, permitindo a escolha das melhores combinações a serem utilizadas. Entretanto, apenas um par de *primers* para cada alelo do *SNP* é necessário para a genotipagem. Diante disso, as diferentes opções de *primers* foram testadas pela ferramenta *NetPrimer* (PREMIER Biosoft, 2018) para verificar o potencial de formação de grampos e autocomplementariedade. O conjunto de *primer* com as melhores condições foram selecionados.

Tabela 3. Desenho dos iniciadores para a genotipagem pelo método SNAP.

Gene	SNP	PRIMER
CR1	rs6656401	TCTCTGTCTCCATCTTCGCA Forward Allele A
		GGGGATTGTAATGGGTTGAA Reverse Allele A
		CACACACAGAGGAGAAGGCTAC Forward Allele G
		CCCAGAATATGGACGATTTTG Reverse Allele G
CR1	rs11118133	CAACTTAATGAAATAAATCA Forward Allele A
		AGTATCTTTGTGGTGTCT Reverse Allele A
		AGAACATAAATGACCTGAT Forward Allele T
		CATTCTTTTTTGTCTTAAC Reverse Allele T

5.5 Polimorfismo de Única Base Amplificado (SNAP)

A metodologia denominada SNAP (*Single Amplified Polymorphism*) considera a natureza bi-alélica do *SNP* e desenha *primers* específicos para cada um de seus alelos. Para tanto, as sequências genômicas adjacentes ao *SNP* devem ser conhecidas. A metodologia utiliza quatro sequências de

primers para a genotipagem de um *SNP*, onde um *primer* específico para o alelo 1 (F1) é desenhado com base na fita *upstream* do DNA e o seu *primer* complementar (R1), na fita *downstream*, e juntos eles formam o SNAP 1. Contrariamente, o desenho do *primer* específico para o alelo 2 (F2) é feito na fita *downstream* e o seu *primer* complementar (R2), na fita *upstream*, e juntos eles formam o SNAP 2 (Drenkard et al. 2000).

5.5.1 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As amostras de DNA de todos os indivíduos foram amplificadas para a genotipagem dos SNPs (CR1 rs6656401 e rs11118133). A amplificação foi realizada com a seguinte concentração dos reagentes para um volume final de 12,5 uL: 20 – 50 ng de DNA, 2mM MgCl; 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl; 4pM *CR1_rs6656401*, *CR1_rs11118133*. As reações foram realizadas nos termocicladores *GeneAmp® 9700* ou *Veriti® 96-Well VeriFlex* (Applied Biosystems™) sob as seguintes condições: 95 °C por 10 min; 35 ciclos à 95 °C por um minuto, 57 °C por um minuto, 72 °C por um minuto; e 72 °C por 10 minutos para o SNP *CR1_rs6656401* e 95 °C por 10min; 35 ciclos à 95°C por um minuto, 48°C por um minuto, 72°C por um minuto; e 72°C por 10 minutos para o SNP *CR1_rs11118133*.

5.5.2 Gel de agarose

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%. A agarose (Sigma) foi dissolvido em tampão TBE 1X (0,44M Tris-HCL; 0,44M H₃BO₃; 10mM EDTA) por aquecimento. Para 3 µL de amostras a serem analisadas, foi adicionado 6 µL do mix *GelRed™* e *Blue Juice* na proporção de 1:1. A voltagem foi padronizada em 10 minutos a 90V e 60 minutos a 60V. As amostras foram visualizadas utilizando o programa *ImageLab* do fotodocumentador (*BioRad*).

5.6 Análises estatísticas

As frequências alélicas e a taxa de heterozigose observada (H_O) foram calculadas com o uso do programa livre PowerStats. A heterozigose esperada

(H_E) foi estimada com a fórmula $H_E = 2pq$.

Para as análises de associação, foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se o teste qui-quadrado. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software GraphPadPrism 5.0* para *Windows, GraphPad Software, San Diego California USA*.

Genótipos do grupo controle foram usados para teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg (EHW)* para cada SNP, calculados pelo programa *GeneAIEx* e *Plink*. Desvio do equilíbrio era considerado se valores de p fossem menores que 0,05.

6. Resultados

6.1 Casuística do estudo

Ao todo, 300 indivíduos participaram desse estudo, sendo 150 casos portadores da doença e 150 controles. Dentre os pacientes, 100 são do sexo masculino, compreendendo 67% do valor total de indivíduos com a doença e 50 são do sexo feminino, compreendendo os 33% restante dos indivíduos acometidos com a doença. A média de idade encontrada entre os pacientes foi de 47,7 anos (Tabela 4). Todas as quatro formas clínicas da hanseníase foram encontradas no estudo, oito indivíduos apresentaram a forma clínica indeterminada, 29 indivíduos a forma clínica tuberculoide, 65 a forma clínica dimorfa e 48 a forma clínica virchowiana (Figura 3).

Tabela 4. Características gerais dos indivíduos participantes da pesquisa.

Variáveis	Hanseníase n (%)	Controle n (%)
Sexo		
Homens	100 (67%)	100 (67%)
Mulheres	50 (33%)	50 (33%)
Idade(anos)		
Média	47,72	35,88
Idade mínima	10	19
Idade máxima	93	66

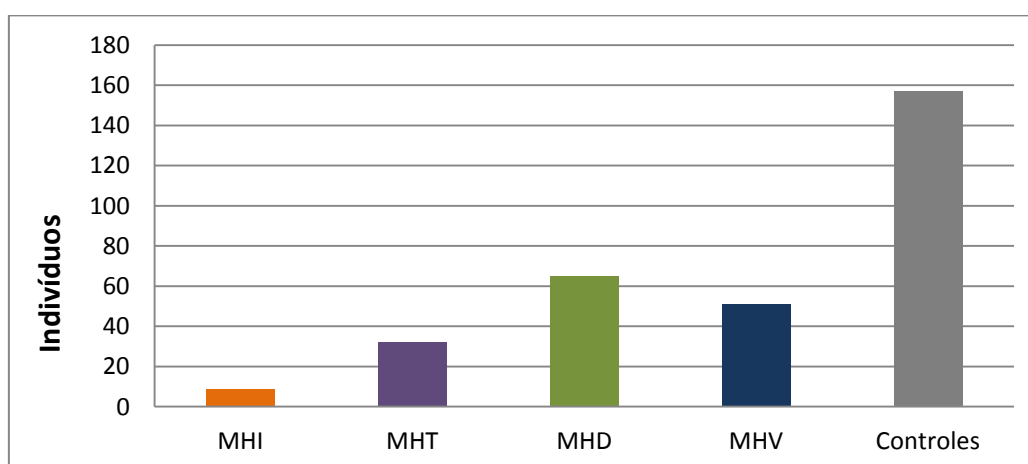


Figura 3. Distribuição numérica dos indivíduos participantes do estudo segundo a classificação de Madri, onde MHI (Indeterminada), MHT(Tuberculoide), MHD(Dimorfo), MHV(Virchowiana).

Nos indivíduos doadores de sangue, 100 amostras são do sexo masculino e 50 são do sexo feminino a média de idade dos indivíduos controle foi de 35,88 anos. A média de idade não foi pareada nos dois grupos, pois para ser doador é necessário ter idade mínima de 18 anos, ou seja é uma população adulta e o número de idosos participantes é reduzido, diferentemente dos indivíduos acometidos com a doença.

6.2 Genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)

Para esse estudo, foi realizado ensaios em uniplex, onde a cada dois tubos um individuo era genotipado, cada tubo representava um alelo dos SNPs *CR1_rs6656401* e *CR1_rs11118133* (Figura 4).

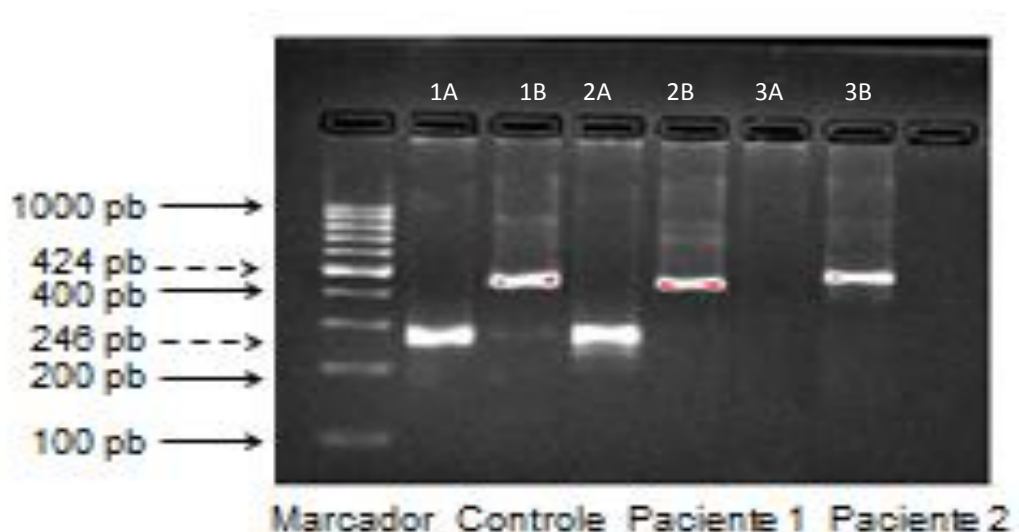


Figura 4. Gel de Agarose representativo dos perfis alélicos obtidos por SNAP do SNP *CR1_rs6656401*. Setas sólidas indicam o tamanho real da banda de acordo com o marcador de 100 pb; setas pontilhadas indicam o tamanho do produto esperado para cada alelo, 246pb corresponde o alelo A, 424pb corresponde ao alelo G. (1 A e B) A amostra controle apresenta o alelo A e o alelo G respectivamente; (2 A e B) A amostra do paciente 1 apresenta o alelo A e G, respectivamente ; (3 A e B) A amostra do paciente 2 apresenta apenas o alelo G. Os pontos vermelhos indicam alta intensidade das bandas na hora do registro.

As frequências alélicas obtidas, através da genotipagem pelo método SNAP para esses marcadores na população estudada, foram comparadas com as da população CEU, com ancestralidade europeia e da população YRI, os lorubás africanos. As duas populações foram utilizadas devido a miscigenação da população estudada (Tabela 5). Foi possível observar que para o marcador *CR1_rs6656401* o alelo G foi o mais frequente (0,53) nos indivíduos de

Campos. Este alelo é o mais frequente também na população CEU (0,75) e na população YRI (0,98).

Para o marcador *CR1_rs11118133*, o alelo A foi o mais frequente nas três populações, o qual apresentou frequência de 0,60, 0,86 e 0,74, para indivíduos de Campos dos Goytacazes, CEU e YRI, respectivamente. Foi possível observar durante a genotipagem um excesso de indivíduos heterozigotos na população estudada.

Tabela 5. Frequências alélicas para os marcadores *CR1* dos indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.

SNP	Alelos	Frequência alélica em Campos/RJ	Frequência alélica CEU	Frequência alélica YRI
<i>CR1_rs6656401</i>	A	0,462	0,24	0,013
	G	0,538	0,75	0,98
<i>CR1_rs11118133</i>	A	0,601	0,864	0,741
	T	0,399	0,136	0,259

6.2.3 Tentativa de validação da genotipagem usando SNAP pelo Sequenciamento Sanger

Após a conclusão das análises foi visto que havia um excesso de heterozigotos. A taxa de heterozigose observada para o marcador *CR1_rs6656401* foi de 0,833 (HE=0,49) no grupo caso, enquanto na amostragem controle a taxa de heterozigose observada foi de 1 (HE=0,5). Para o marcador *CR1_rs11118133* a taxa de heterozigose observada foi de 0,89 (HE=0,49) no grupo caso, enquanto na amostragem controle a taxa de heterozigose observada foi de 1 (HE=0,5). Foi também observado que as amostras estavam fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois SNPs estudados *CR1_rs6656401* ($p = 1,73 \cdot 10^{-13}$) e para o SNP *CR1_rs11118133* ($p = 2,25 \cdot 10^{-9}$). Isso pode ser ocasionado por diversos fatores, um deles erro na genotipagem. Dessa forma foram enviadas algumas amostras já genotipadas pelo método SNAP para a empresa *Helixxa - Genomics Service Provider* para validação da genotipagem. O método utilizado pela empresa é o

sequenciamento Sanger que se baseia na síntese de uma fita de DNA marcada, complementar à fita da qual se deseja determinar a sequência (Shendure & Ji, 2008).

Ao compararmos as duas genotipagens foi possível observar que o método *SNAP* estava com problemas na identificação dos homozigotos, o método estava identificando homozigotos como heterozigotos, por isso o excesso de heterozigoto na genotipagem por *SNAP*. Foi possível perceber também através da genotipagem pelo método Sanger que os homozigotos estavam sendo identificados de forma incorreta (Figuras 5 e 6). Assim, foi possível constatar que a metodologia utilizada não é uma boa ferramenta para o estudo de associação genética.

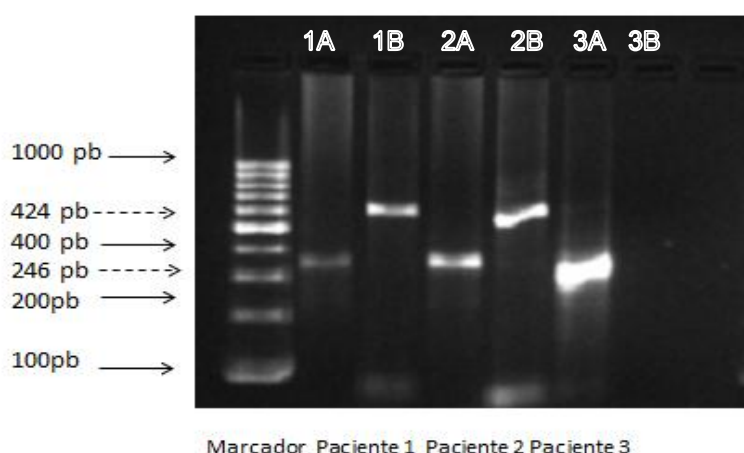


Figura 5. Gel de Agarose para validação dos perfis alélicos obtidos por *SNAP* do SNP **CR1_rs6656401**. Setas sólidas indicam o tamanho real da banda de acordo com o marcador de 100 pb; setas pontilhadas indicam o tamanho do produto esperado para cada alelo, 246pb corresponde o alelo A, 424pb corresponde ao alelo G. (1 A e B) A amostra do paciente 1 apresenta o alelo A e o alelo G respectivamente; (2 A e B) A amostra do paciente 2 apresenta o alelo A e G, respectivamente ; (3 A e B) A amostra do paciente 3 apresenta apenas o alelo A.

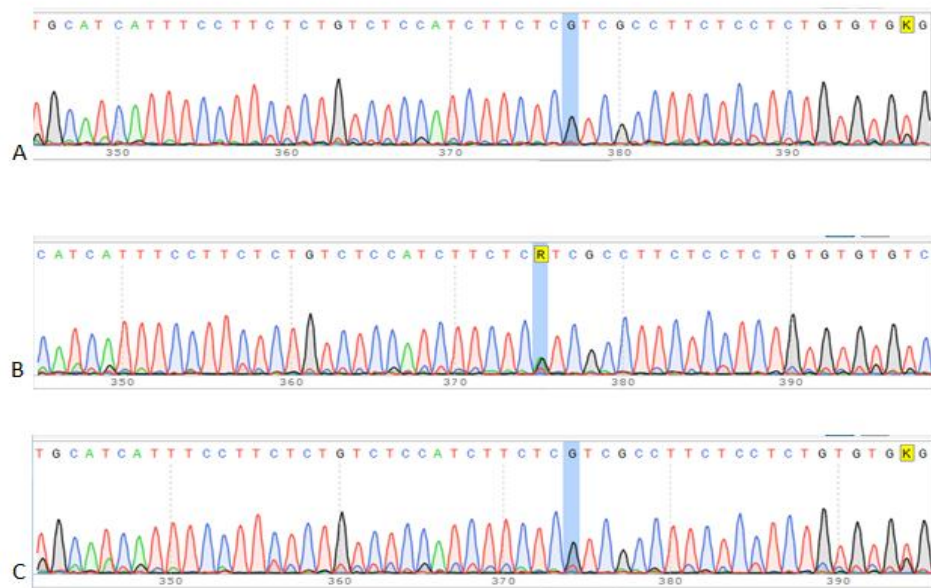


Figura 6. Sequenciamento pelo método Sanger para validação dos perfis alélicos obtidos por SNAP do SNP CR1_rs6656401. A amostra do paciente 1(A) apresenta o alelo G ; A amostra do paciente 2 (B) apresenta os alelos A e G; A amostra do paciente 3 (C) apresenta o alelo G.

7. Discussão

A genética humana tem sido mostrada como um importante determinante da susceptibilidade às doenças infecciosas (Francheschi et al., 2009). A hanseníase é uma doença multifatorial complexa, pois o desenvolvimento da resposta imune frente a infecção pelo *M. leprae* é heterogênea, sendo afetada por fatores ambientais e genéticos, próprios de cada indivíduo (Alcais et al., 2005).

O CR1 de membrana pode variar de função, dependendo da célula onde é encontrado. Nas células fagocíticas, liga-se aos fragmentos C3 e C4 (C3b/C4b) e otimiza a fagocitose de partículas opsonizadas (Boackle et al., 2004; Liu&Niu, 2009), promove o “clearance” de imunocomplexos, onde C3b/C4b opsonizados sobre antígenos são reconhecidos pelos receptores CR1 eritrocitários (ECR1) e carregados para o fígado e baço para sua degradação (Yoshida, 1986). Também pode atuar como um regulador negativo do sistema complemento (em todas as vias), inativando as C3 e C5 convertases (Furtado et al., 2008). Vários polimorfismos genéticos têm sido estudados para o receptor CR1, três tipos já foram caracterizados em humanos: aqueles que geram variantes de tamanho, aqueles que resultam em diferenças de densidade do receptor na superfície de eritrócitos e aqueles que geram os antígenos do grupo sanguíneo Knops através da alteração da proteína (Fonseca et al., 2016). Muitas doenças autoimunes e inflamatórias vêm sendo associadas ao receptor CR1, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide, diabetes mellitus insulino-dependente síndrome nefrítica e malária (Mouhoub, et al.,1996; Duru et al., 2015; Cockburn et al., 2004; Zhang et al., 2010).

A entrada do *M. leprae* no macrófago é seletivamente mediada pelos receptores do complemento, CR1 e CR3, os quais se ligam a componentes do complemento ativados na superfície do *M. leprae* pelo seu antígeno específico PGL-1 (Krahenbuhl e Adams, 1994; Manetti et al., 1993).

Neste estudo foi observada uma predominância de indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino. Esses dados corroboram com os da Organização Mundial da Saúde, onde apesar da hanseníase afetar os dois

sexos, indivíduos do sexo masculino são mais frequentemente afetados que as mulheres. Esse predomínio é explicado pela maior exposição ao bacilo e pelo menor cuidado dos indivíduos do sexo masculino com a saúde, o que retarda o diagnóstico e aumenta o risco para o desenvolvimento de incapacidades físicas (Nobre et al., 2017). A exposição frequente, como o compartilhamento de residência, também aumentam as chances de desenvolvimento da doença (Ministério da Saúde, 2018). De acordo com Wallace et al (2003), em várias populações africanas, a hanseníase é mais comum em mulheres do que em homens, já a forma mais severa da doença, a virchowiana, é mais frequente em homens. Em um Boletim Epidemiológico publicado pela OMS, foi visto que no período 2012-2016, a proporção dos casos novos com a classificação operacional multibacilar foi prevalente no sexo masculino (62,7%) essa predominância também foi vista nas formas clínicas virchowiana e dimorfa observada na população masculina (Ministérioda Saúde, 2018).

O *rs6656401* é um SNP encontrado em um segmento não-codificante do gene *CR1*, entretanto, variantes da região intrônica podem potencialmente regular a expressão gênica e, portanto, influenciar a susceptibilidade à doenças. Esse SNP foi originalmente identificado por estudos de associação genômica em larga escala (GWAS) na etiologia genética da doença de Alzheimer (Lambert et al 2009). Está associado à inclusão de um quinto domínio LHR (também referido como forma de migração lenta, S) e assim contém um sítio de ligação adicional de C3b na proteína. Existem quatro isoformas com diferentes comprimentos. As formas F (migração rápida) e S (migração lenta) são mais comuns na população (83 e 15% respectivamente) (Fonseca et al ,2016). Estudos mostraram que a variantes *rs6656401* poderiam influenciar na susceptibilidade a doença Alzheimer associado à presença de *CR1-S* (Zhang et al., 2010).

Outro marcador analisado neste estudo foi o *rs11118133* é também um SNP encontrado em um segmento não-codificante do gene *CR1*. Esse polimorfismo está associado ao número de moléculas de *CR1* nos glóbulos vermelhos, correlacionado com um polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição *HindIII* . Ele é composto pelos alelos A e T, que correspondem aos

alelos de alta expressão (H) e baixa expressão (L), respectivamente. Homozigotos para alelos de baixo número de cópias (L) podem expressar menos de 200 cópias de CR1 por RBC, enquanto aqueles homozigotos para alelos de alto número de cópias (H) expressam 3-4 vezes mais (Fonseca et al., 2016; Teeranaipong et al., 2008).

Foi observado nesse estudo que o as frequências dos SNPs não se apresentavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, isso pode ter ocorrido por diversos fatores que estão envolvidos nas premissas do equilíbrio. O Princípio de Hardy-Weinberg, descrito por Godfrey Hardy e Wilhelm Weinberg, prediz que uma população mendeliana em equilíbrio, mantém as frequências alélicas inalteradas com o decorrer do tempo. Algumas condições são necessárias para que a população se mantenha em equilíbrio como: os organismos devem ser diplóides, a população deve ser infinita, de reprodução sexuada não-preferencial, não deve haver diferenças nas taxas de nascimento, nenhum fator evolutivo (tais como deriva genética, seleção natural) e endocruzamentos (Li & Graubard, 2009; Lanchace, 2009). Além disso, alterações do Equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ocorrer por dificuldades em genotipar heterozigotos, mutações em sítios de ligação de primers de PCR e devido a polimorfismos comuns do tipo deleção. Dessa maneira, o equilíbrio de Hardy-Weinberg é comumente usado para controle de qualidade de genotipagem em larga escala e é uma das poucas maneiras de identificar erros sistemáticos de genotipagem em indivíduos não relacionados (Gomes et al., 1999 ; Hosking et al., 2004).

Como as frequências dos SNPs se apresentaram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram sequenciadas amostras aleatórias a fim de confirmar e/ou rejeitar os resultados da genotipagem pelo método *SNAP*. Foi observado que a metodologia não estava detectando de forma correta os indivíduos homozigotos, o grupo amostral apresentava um excesso de heterozigotos e essa alteração na proporção de heterozigotos e homozigotos causaram desvios no equilíbrio.

A metodologia *SNAP* é uma metodologia simples e de baixo custo utilizada para a genotipagem de *SNPs*, envolve apenas uma única PCR seguida de eletroforese em gel (Drenkard et al., 2000). O *SNAP* considera a

natureza bi-alélica do *SNP* e desenha *primers* específicos para cada um de seus alelos. Para tanto, as sequências genômicas próximas ao *SNP* devem ser conhecidas (Bohry, 2018). A metodologia utiliza quatro sequências de *primers* para a genotipagem de um *SNP*, onde um *primer* específico para o alelo 1 (F1) é desenhado com base na fita *upstream* do DNA e o seu *primer* complementar (R1), na fita *downstream*, e juntos eles formam o SNAP 1 o contrario ocorre para o alelo 2. Os *primers* alelo-específico são desenhados com sua extremidade 3' na posição exata do *SNP*, onde a extremidade de cada *primer* é correspondente ao alelo em que ele é específico e, assim, ocorre a amplificação preferencial de um alelo em relação ao outro. Para aumentar a especificidade de cada *primer* específico, um nucleotídeo incompatível é adicionado propositalmente entre as três bases próximas ao *SNP*. Desta forma, o produto da reação de PCR utilizando o *SNAP* específico para um alelo sofrerá uma diminuição insignificante, mas a amplificação do alelo não específico será reduzida drasticamente (Bohry, 2018). A metodologia é muito utilizada na área vegetal, os marcadores *SNAP* podem ser desenvolvidos e aplicados para analisar a diversidade genética e parentesco (Singh et al., 2013). Em humanos, um estudo conseguiu relatar as frequências alélicas e genotípicas das variantes *ULK1* rs12303764 (G / T) que estão relacionadas a doença de Crohn, na população do norte da Índia utilizando a metodologia *SNAP* (Randhawa et al ., 2017).

Acreditamos que essa falha na metodologia *SNAP* no nosso estudo possa estar sendo ocasionada durante a reação já que o desenho do *primer* passa por vários testes para verificar a especificidade. Dessa maneira, impossibilitando a identificação correta dos alelos quando analisados na eletroforese. A reação deve estar ocorrendo de maneira muito “simples” então os iniciadores estão pareando mesmo quando é o alelo inespecífico, isso está ocorrendo mesmo com a adição do nucleotídeo incompatível, que dificultaria o anelamento inespecífico. Drenkard e colaboradores (2000) pontuam no artigo de desenvolvimento da metodologia *SNAP* que altas concentrações de DNA poderiam gerar falsos positivos e a quantidade de ciclos devem ser entre 28 e 38 ciclos para que a reação ocorra com especificidade. Mesrian e

colaboradores também relatam algumas dificuldades durante a padronização da metodologia, em alta temperatura de anelamento baixas concentrações de primers e menores concentrações de enzima Taq, o número de bandas específicas foi menor ou ausente, enquanto em baixa temperatura de anelamento, maiores concentrações de primers e maiores concentrações de Taq houve amplificação do número de bandas inespecíficas (falso positivo) (Randhawa et al., 2017). Em um estudo publicado por Tanha e colaboradores (2015) é relatado que apesar da metodologia *SNAP* ser de baixo custo e relativamente “simples”, alguns dados publicados podem questionar a confiabilidade desse método em algumas ocasiões, além de um procedimento trabalhoso e demorado na etapa de otimização. Os autores sugerem uma nova metodologia baseada no *SNAP* mas que ocorra com mais eficiência e a padronização seja de forma mais simples. A nova metodologia foi comparada com o *SNAP* durante os experimentos. Nessa fase os autores encontraram muitas falhas durante a padronização da metodologia *SNAP* e foi relatado que nem mesmo o protocolo de PCR *touchdown* conseguiu melhorar os resultados. No final, é sugerido um novo software de desenho dos *primers* que eles criaram a partir do *PRIMER1*, onde, diferente do *SNAP*, que só tem a adição de uma base incompatível no primer específico, na metodologia proposta são adicionadas duas bases incompatíveis no primer específico e não específico além dessa mudança o software calcula de maneira diferente a temperatura de anelamento para que seja mais específica. Entretanto, os autores ressaltam que mais testes devem ser feitos para a compreensão mais abrangente dos impactos positivos e negativos dessa nova metodologia proposta (Mesrian et al., 2015).

Dessa forma, novas genotipagens utilizando outras metodologias como Taqman e sequenciamento Sanger devem ser realizadas ou então uma nova padronização da metodologia *SNAP* deve ser estabelecida a fim de verificar a associação entre os polimorfismos de nucleotídeo único *rs6656401* e *rs11118133* presentes no gene *CR1* e a manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase em pacientes e indivíduos controle de Campos dos Goytacazes.

8. Conclusão

- Foram recrutados 300 indivíduos , 150 indivíduos acompanhados pelo Centro de Referência de Hanseníase e 150 indivíduos controles oriundos do banco de sangue;
- Não foi possível verificar a associação dos SNPs presentes no gene CR1 com a manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase por meio de estudo caso controle utilizando a metodologia *SNAP*;
- A metodologia *SNAP* apesar de ser de baixo custo e de fácil abordagem demanda uma padronização muito específica para que ocorra de maneira satisfatória;
- A padronização da metodologia *SNAP* deve ser realizada a partir de amostras já genotipadas anteriormente para que a genotipagem ocorra de maneira eficiente;
- Novas genotipagens devem ser realizadas com o intuito de verificar a associação dos SNPs *rs6656401* e *rs11118133* presentes no gene *CR1* e a manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes.

9. Referências Bibliográficas

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., *Imunologia celular e molecular*; tradução Cláudia Reali. Rio de Janeiro: Elsevier, 4ª impressão. 2005.

Abulafia. J, R.A. Vignale Leprosy: pathogenesis updated *Int. J. Dermatol.*, 38 (1999), pp. 321-334

Adams AR, Waters MF. Dapsone-resistant lepromatous leprosy in England. *Br Med J.* 1966;8;2(5518):872

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

Amaral, E.P. Análise Espacial da Hanseníase na Microregião de Almenara – Minas Gerais: Relações entre a situação epidemiológica e as condições socioeconômicas. 2008.89p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

Amorim, Francianne Medeiros. Papel das células B e dos anticorpos na patogênese da hanseníase e das reações hansênicas. Tese de doutorado- Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. 2017.

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

Biedermann, T. et al. TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell Mediated Immune Responses of the Skin. *JID Symposium Proceedings*, v. 9, n. 1, p.5-14, 2004

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

Bohry Dieimes. Desenvolvimento de um atlas de marcadores snaps associados à QTLs visando a seleção assistida por marcadores em *Carica papaya L.* . Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2018,

Brasil. LEI Nº 9.010, DE 29 DE MARÇO DE 1995. Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9010.htm>. Acesso em: dezembro de 2016.

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

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002

Brasil. Ministério da Saúde.(2010). Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso,Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. - Brasília

Brasil. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso,Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. - Brasília.2010

Brasil/Ministérioda Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília.2005

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

Cockburn IA, Mackinnon MJ, O'Donnell A, et al. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;101(1):2727.

Cunha, Ana Zoé Schilling da. Hanseníase: a história de um problema de saúde pública. 1997. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 1997.

Danielsson, M. Pascual, L. French, G. Steiger, J.A. SchifferliSoluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage *J. Immunol.*, 24 (1994), pp. 2725-2731

Di Bona D, Montalto G, Clemenza L, et al. Soluble complement receptor type 1 (sCR1) in chronic liver diseases: serum levels at different stages of liver diseases. *Clin Exp Immunol*. 1998;114(1):102-5.

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

Duru KC, Noble JA, Guindo A, et al. Extensive genomic variability of knops blood group polymorphisms is associated with sickle cell disease in Africa. *Evol Bioinform Online*. 2015;11:25-33. Published 2015 Mar 9. doi:10.4137/EBO.S23132

Eidt. L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade*, v.13, n.2, p.76-88, 2004

Fearon, DT and Wong, W W. Complement ligand-receptor interactions that mediated biological responses.*Annu. Rev. Immunology*. 1:243.1983

Fonseca et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infectious Diseases of Poverty*, v.6, n.5, 2017

Fonseca MI, Chu S, Pierce AL, Brubaker WD, Hauhart RE, et al.. Analysis of the putative role of CR1 in Alzheimer's disease: genetic association, expression and function. *PLOS One* 11:e0149792.2016

Francheschi, Danilo Santana Alessio; Sacramento, Willian Sergio do; Mazini, Priscila Saamara e Visentainer, Jeane Eliete Laguila. Hanseníase no Mundo Moderno: O Que Sabemos Sobre a Influência Genética do Hospedeiro no seu Controle. *Arq Med [online]*. 2009, vol.23, n.4, pp.159-165. ISSN 0871-3413.

Friedmann PS, Williams D I. Dapsone-Resistant Leprosy. *J R Soc Med.* 66: 623-624. 1973

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

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

Gomes I, Collins A, Lonjou C, Thomas NS, Wilkinson J, Watson M, Morton N Hardy-Weinberg quality control. *Ann Hum Genet* 63:535–53810.1046/j.1469-1809.1999.6360535.x.1999

G.r. Iturry-y Amamoto, C.P. Portinho. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Rev ass med brasil* 2001; 47(1): 41-51

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

Hamer, J.P. Paccaud, D. Belin, C. Maeder, J.L. Carpentier Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain *Biochem. J.*, 329 (1998), pp. 183-190

Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis I, Xu CF Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 12:395–39910.1038/sj.ejhg.5201164. 2004.

Iida K., Mornaghi R., Nussenzweig V. Complement receptor CR1 deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 155: 1427-1438, 1982.

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

Johnson, C. M.; Lyle, E. A.; Omueti, K. O. et al. A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 178:7520–7524.2007.

Kasahara, T. et al. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *Journal of Immunology*, v.130, n.4, p.1784-1789, 1983

Keenan BT, Shulman JM, Chibnik LB, Raj T, Tran D, Sabuncu MR, et al. A coding variant in CR1 interacts with APOE-epsilon4 to influence cognitive decline. *Hum Mol Genet* 21: 2377–2388.2012.

Khera R, Das N. Complement receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol.* 2009;46:761–772.

Kretzschmar, Gabriela Canalli et al. “Complement receptor 1 (CR1, CD35) association with susceptibility to leprosy” *PLoS neglected tropical diseases* vol. 12,8 e0006705. 9 Aug. 2018, doi:10.1371/journal.pntd.0006705

Lachance J. Detecting selection-induced departures from Hardy-Weinberg proportions. *Genet Sel Evol* 2009;41:15.

Lastória, J. C. & Morgado de Abreu, M. A. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1. *An. Bras.Dermatol.* 89(2):205-218.2014

Li Y, Graubard Bi. Testing Hardy-Weinberg equilibrium and homogeneity of Hardy-Weinberg disequilibrium using complex survey data. *Biometrics* 2009;65(4):1096-104.

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

Lockwood, D. N. Leprosy – a changing picture but a continuing challenge. *Tropical Doctor*, v.35, n.2, p.65-67, 2005.

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

Mendonça, V. A. Immunology of leprosy. *An Bras Dermatol*, v. 83, n. 4, p.343-350, 2008.

Mesrian Tanha, H., Mojtabavi Naeini, M., Rahgozar, S., Rasa, S. M. M., & Vallian, S. (2015). Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(3), 156–161. doi:10.1089/gtmb.2014.0289

Ministérioda Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. - Volume 49 - N° 4 – 2018

Modlin, R. L. Th1- Th2 paradigm: insights from leprosy. *Journal Investigative Dermatology*, v.102, p.828-832, 1994.

Mouhoub A, Delibrias CC, Fischer E, Boyer V, Kazatchkine MD. Ligation of CR1 (C3b receptor, CD35) on CD4+ T lymphocytes enhances viral replication in HIV-infected cells. *Clin Exp Immunol*. 1996;106(2):297-303.

Moura, R. S. et al. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-1: revisão sistemática. *Rev Soc Bra Med Trop*, v. 41, (Supl. II): 11-18, 2008.

Nath, I. et al. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in Dermatology*, v. 33, p. 90–98, 2015.

Nathan C F. et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. *The New England Journal of Medicine*, v.315, p.6-15, 1986.

Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker MA, Nery JAC, Jerônimo SMB, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Feb;11(2):e0005364.

Piccoli, Amanda Kirchner; Alegretti, Ana Paula; Schneider Laiana; Lora, Priscila Shmidt; Xavier, Ricardo Machado. Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 na artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol* 2011;51(5):497-510

Pinto, P.G.H.R. O estigma do pecado: a lepra durante a Idade Média. *PHYSIS – Revista de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 131-144, 1995

Phairrote Teeranaipong, Jun Ohashi, Jintana Patarapotikul, Ryosuke Kimura, Pornlada Nuchnoi, Hathairad Hananantachai, Izumi Naka, Chaturong Putapornitip, Somchai Jongwutiwes, Katsushi Tokunaga; A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the CR1 Promoter Region Contributes to Protection against Cerebral Malaria, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 198, Issue 12, 15 December 2008, Pages 1880–1891

Randhawa, R., Duseja, A., & Changotra, H. A novel Tetra-primer ARMS-PCR based assay for genotyping SNP rs12303764(G/T) of human Unc-51 like kinase 1 gene. *Molecular Biology Reports*, 44(1), 1–4. doi:10.1007/s11033-016-4087-7.2016.

Ribeiro MDA, Silva JCA, Oliveira SB. Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação. *Rev Panam Salud Publica*. 2018;42:e42.

Roach, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of Mycobacterial infection. *Journal of Immunology*, v.168, p.4620-4627, 2002.

Sales, M. P. et al. Genetic diversity among *Mycobacterium bovis* isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.12, p.4558- 4562, 2001.

Santos, Fernanda Andrade; Grzyb, Karolina; Santos, Maiara Breay Alves dos; Gaio, Thais Oliveira; Sanches, Leide da Conceição. A História da Hanseníase: O Impacto Biológico e Social. ENCONTRO DE BIOÉTICA DO PARANÁ – Vulnerabilidades: pelo cuidado e defesa da vida em situações de maior vulnerabilidade. 2, 2011, Curitiba. Anais eletrônicos Curitiba: Champagnat, 2011, p. 31-41. Disponível em: <http://www.bioeticapr.org.br/>

Santos, M.B. et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.86, n.1, p.40-49, 2017.

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

Syvanen, A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.*, v.2, n.12, p.930-942, 2001.

Sivasankar, K.R. Raju, V. Anand, S. Malu, S. Padmanabhan, S.C.Tiwari, N. Das, L.M. Srivastava Levels of plasma soluble complement receptor 1 (sCR1) in normal Indian adult population *Ind. J. Clin. Biochem.*, 14 (1999), pp. 237-240

Souza VNB, Pereira AC. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. *Hansen Int*. 2007;32(1): 77-90.

Souza, CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto*, 30: 325-334, jul./set. 1997.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J Clin Invest*. 1990;85(4):1304-14.

Spenassatto, Carine. Desenvolvimento de metodologia high-throughput para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e comparação de dados de genes nucleares com dados de genes mitocondriais / Carine Spenassatto. - Botucatu, 2011

Tarique, Mohd & Saini, Chaman & Naz, Huma & Ali, Raza & Khan, Faez & Sharma, Alpana. Fate of T Cells and their Secretory Proteins During the Progression of Leprosy. *Current Protein and Peptide Science*. 18. 10.2174/1389203718666170829120729. 2017.

Tausk F., Hoffmann T., Schreiber R., Gigli I. Leprosy: Altered complement receptors in disseminated disease. *The J of Invest Dermatol*, 85: 58s-61s,1985.

Tausk, F and Gigli, I. The Human C3b receptor: function and role in human diseases. *J. Invest Dermatol*, 94: 141S-145S.1990.

Visentainerl, J. E. L. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 4, p. 739-748, 2008.

Wallace, C.; Clayton, D.; Fine, P. Estimating the relative recurrence risk ratio for leprosy in Karonga District , *Leprosy Review Malawi*. 2003.

World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. v. 92, n. 35, p.501–520, 2017

Yawalkar, S. J. *Leprosy for medical practitioners and paramedical workers*. Basle.: Novartis Foundation for Sustainable Development., 2002.

Zhang, J.T. Yu, Q.X. Zhu, W. Zhang, Z.C. Wu, D. Miao, L. Tan Complement receptor 1 polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1348 (2010), pp. 216-221

Zhang, Dx, Hewitt, Gm, Molecular DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.*, v.12, n.3, p.563-584, jun. 2003.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa intitulada:

“Determinação da densidade molecular e polimorfismos genéticos de receptores CR1 em células de indivíduos acometidos por diferentes formas clínicas da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes”.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar o problema da hanseníase é o fato de sabermos que nesta região do estado do Rio de Janeiro esta doença afeta muitas pessoas, e em muitos casos com gravidade doentes. A pesquisa se justifica porque tentando entender o que acontece no sistema imunológico das pessoas com a hanseníase e naquelas sem a hanseníase poderemos planejar melhor para lidar com esta doença, ou seja, podemos tratar os casos de forma diferente e acompanhar como estão evoluindo, por exemplo. A hanseníase pode causar incapacidades físicas irreversíveis quando o diagnóstico é tardio, pois esta doença atinge nervos. O objetivo desse projeto é avaliar a presença e quantidade de uma molécula do nosso sistema imunológico que é importante na defesa do nosso organismo, chamada CR1. Além disso, estamos nos propondo a estudar o que determina a nível genético a variação na quantidade desta molécula importante na defesa contra a *Mycobacterium leprae*, o microrganismo que causa a hanseníase. Estudando isso, poderemos no futuro ajudar aos médicos com proposta de tratamento mais eficaz no combate a hanseníase e específico para cada pessoa. O procedimento de coleta de amostras de sangue será da seguinte forma: durante sua consulta médica, no **Centro de Referência da Hanseníase, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde**, profissionais habilitados coletarão seu sangue em tubos a vácuo, como ocorre numa coleta de sangue de rotina para fazer um hemograma por exemplo. Será coletado no total 30mL de sangue, equivalente a 3 tubos. Essas amostras irão para Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) onde vão ser processadas para o estudo que explicamos acima.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Existe um desconforto e risco mínimo para você que se submeter à coleta do sangue para o estudo da hanseníase, sendo que se justifica pelo fato de que poderemos ajudar a entender porque o sistema imunológico de uma pessoa ajuda ela a não ter a doença na sua forma mais severa e de outra não.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Em caso de você ter a doença hanseníase diagnosticada clinicamente, você será acompanhado durante o período do tratamento. Você retornará ao médico dermatologista do Centro de Referência da Hanseníase de acordo como ele determinar. Além disso, assistência lhe será prestada quando você julgar necessário voltar ao dermatologista durante o período de tratamento.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores e médicos irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial da pesquisa e quaisquer outros serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma via deste consentimento informado

será arquivada no Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, visto que a coleta das amostras de sangue a serem utilizadas nesta pesquisa ocorrerão na ocasião da sua ida ao Centro de Referência da Hanseníase para consulta médica. Portanto, sua participação não acarretará custos extras pra você, mas caso você venha a ter qualquer despesa extra como consequência da sua participação nesta pesquisa, tais como transporte, alimentação e hospedagem você será ressarcido.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: Eu, _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e mudar minha decisão se assim o desejar. A professora Alba Lucinia Peixoto Rangel e Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Junior certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o Dr. Edilbert ou a Professora Alba nos telefones (22) 999839552 ou (22) 999 721 002 ou 2739 7255 ou ainda Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos situado à Avenida Alberto Torres, 111 Centro, Campos dos Goytacazes RJ (22) 2101-2929.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Ainda, fui informado que este termo foi elaborado em duas únicas vias, tendo sido uma via entregue a mim e a outra via ficado em posse dos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------