

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIUMARA TULIO

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DE *MASP2*
EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

CURITIBA

2011

SIUMARA TULIO

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DE *MASP2*
EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Área de Concentração em Imunologia, do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio R. Faucz

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional que nos capacita para vencer os desafios.

À Prof.a Iara T. Messias-Reasson, orientadora desta tese, pelo apoio e sugestões essenciais para o desenvolvimento deste trabalho

Ao Prof. Fábio R. Faucz, co-orientador desta tese, pela orientação e dedicação, fundamentais para realização deste trabalho.

Aos meus pais, por incentivarem no desenvolvimento acadêmico.

Aos estagiários e pós-graduandos do laboratório de genética da Pontifícia Universidade Católica, pelo auxílio técnico.

Aos colaboradores do Hospital de Clínicas, pelo auxílio na coleta das amostras.

Aos pacientes, que concordaram em participar deste estudo.

O princípio da sabedoria é: adquira a sabedoria; sim; com tudo o que possui, adquira o entendimento. Provérbios 4:7 (ARA)

RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) infecta aproximadamente 170 milhões de pessoas ao redor do mundo e se tornou um grave problema de saúde pública. O HCV é um microorganismo hepatotrópico e a fibrose hepática é a principal complicação da hepatite C crônica, podendo evoluir para cirrose e hepatocarcinoma. A Lectina Ligante de Manose (MBL) é uma coletina, codificada pelo gene *MBL2* podendo agir como opsonina ou ativar Serinas Proteases associadas a MBL (MASPs) para iniciar a ativação da via das lectinas do complemento. Essa via é ativada quando moléculas de MBL/ficolinas ligam-se a unidade de manose ou outros carboidratos na superfície dos microorganismos. A ativação da via das lectinas resulta na clivagem de C4 e C2, induzindo a cascata do complemento com formação do complexo de ataque à membrana e consequente destruição do patógeno. MASP-2 apresenta estrutura molecular homóloga a C1r e C1s, clivando os componentes C4 e C2 para gerar C3 convertase. A ligação de alta afinidade MASP-2/MBL é dependente de cálcio e ocorre entre os domínios de colágeno da MBL e os domínios N-terminais CUB1-EGF-CUB2 da protease. Neste estudo analisou-se o polimorfismo do gene *MASP2* em 104 pacientes Eurobrasileiros com hepatite C crônica (72 do gênero masculino e 32 do gênero feminino) e 104 controles saudáveis. Utilizou-se a técnica de PCR-SSCP e sequenciamento direto para amplificação da região codificadora do primeiro domínio (CUB1) e do quinto domínio (CCP2) do gene *MASP2*. Muitos desses pacientes (49%) eram portadores de cirrose hepática moderada ou grave e foram tratados com interferon associado à ribavirina. Foram identificados cinco polimorfismos presentes em pacientes e controles: p.R99Q (c.296G>A;rs61735600), p.D120G (c.359A>G;rs72550870), p.P126L (c.377C>T;rs56392418), p.D371Y (c.1111G>T;rs12711521) e p.V377A (c.11-30T>C;rs2273346). As frequências alélicas e genótípicas estão em equilíbrio de ligação de Hardy-Weinberg. Houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles para o marcador p.D371Y (c.1111G>T) $p=0,008$. Considerando o modelo de dominância de T para p.D371Y, os indivíduos com os genótipos G/G e G/T apresentaram maior risco de desenvolver hepatite C crônica ($p=0,003$, OR=6,33, IC=95%, 1,85-21,70). A análise *in silico* para determinação do efeito funcional, indicou que na presença do marcador p.D120G (c.359A>G) pode ocorrer dano funcional à proteína e que na posição 371 o aminoácido aspartato (D) é bastante preservado entre as espécies. A concentração sérica de MASP-2 em pacientes com hepatite C portadores da variante p.D371Y (c.1111G>T) foi maior na presença do alelo G. Em relação à resposta ao tratamento com IFN, não houve diferença estatisticamente significativa para os marcadores analisados: c.1111G>T e c.1130T>C. Não houve associação entre o grau de fibrose hepática e os marcadores analisados. Os resultados sugerem que a variante p.D371Y está associada com a susceptibilidade a hepatite C crônica e que na presença do alelo G, desse marcador, há aumento significativo da concentração sérica de MASP-2.

Palavras-chave: Via das lectinas. *MASP2*. Polimorfismo. Vírus da hepatite C. Hepatite C crônica. Fibrose hepática. IFN.

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) infects about 170 million people worldwide and has become a major public health issue. Fibrosis is the principal complication of chronic hepatitis C, which increases both morbidity and mortality due to complications such as cirrhosis or hepatocarcinoma. Mannan-binding lectin (MBL) is a collectin, encoded by the *MBL2* gene that can act directly as opsonin or activate MBL-associated serine proteases (MASPs) initiating an antibody-independent pathway of complement activation. MASP-2 forms complexes with the pattern recognition molecules MBL and ficolins (H-ficolin, L-ficolin, or M-ficolin) and is activated when one of these proteins recognizes microorganisms leading to the subsequent cleavage of C4 and C2, thus initiating the activation of complement cascade. In this study we examined the *MASP2* functional polymorphisms in 104 EuroBrazilian patients with chronic hepatitis C (72 men and 32 women), most patients were treated with conventional interferon associated with ribavirin, and 104 controls by PCR-SSCP. We using the primers set to amplify the region encoding first domain (CUB1) and fifth domain (CCP2) of this gene. We identified 5 polymorphisms (SNPs) in patients and controls: p.R99Q (c.296G>A;rs61735600), p.D120G (c.359A>G;rs72550870), p.P126L (c.377C>T;rs563-92418), p.D371Y (c.1111G>T;rs12711521), p.V377A (c.1130T>C; rs2273346). All alleles and genotype frequencies were consistent with those expected under the Hardy-Weinberg equilibrium. Upon comparison of the genotype frequency between patients and controls, only the variant p.D371Y (c.1111 G>T) reached statistical significance and was shown the presence of G allele is associated with chronic hepatitis C susceptibility, considering a dominant function of the T allele ($p=0.003$ – OR=6.33; CI 95%=1.85-21.70). The linkage disequilibrium was not detected between these five *MASP2* polymorphisms ($r^2<0.8$). Additional *in silico* analyses of these SNPs indicated that only p.D120G (c.359A>G) was predicted to provoke damage to the MASP-2 protein. We suggest that only the variant p.D371Y (c.1111 G>T), genotype G/G, possibly lead higher chronic hepatitis C susceptibility associated with high MASP-2 plasma levels in these patients. We analyzed of the response to IFN treatment into two positions c.1111G>T and c.1130T>C and no statistical significant were observed between two groups ($p=0.550$ and $p=0.489$, respectively). No association was found between allele c.1111G>T or c.1130T>C and degree of liver fibrosis. These results suggest that MASP-2 *per se* does not play an immunomodulatory role during treatment with IFN. *MASP2* polymorphisms, particularly the variant p.D371Y, may therefore be associated with development of chronic C hepatitis.

Keyword: *MASP2*. Polymorphism. Hepatitis C virus. Chronic hepatitis C. Liver fibrosis. Lectin pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO	14
FIGURA 2 - ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS.....	15
FIGURA 3 - COMPLEXO DE ATAQUE A MEMBRANA (CAM).....	16
FIGURA 4 - C1 E O COMPLEXO MBL-MASP.....	17
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DE M _A p19 E FRAGMENTO CUB1–EGF–CUB2 DE MASP-2	18
FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DE MASP-2. O CONTATO DO COMPLEXO MASP-2/MBL COM CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE LEVA A UMA MUDANÇA CONFORMACIONAL NAS SUBUNIDADES DE MBL, PERMITINDO A ATIVAÇÃO DE MASP-2.....	19
FIGURA 7 - DOMÍNIOS DE MBL E MASPs.....	20
FIGURA 8 - VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)	24
FIGURA 9 - PADRÕES DE CORRIDA DA AMPLIFICAÇÃO DO DOMÍNIO CUB 1 OBSERVADOS NO GEL	37
FIGURA 10 - PADRÕES DE CORRIDA DA AMPLIFICAÇÃO DO DOMÍNIO CCP2 OBSERVADOS NO GEL.....	38
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE <i>MASP2</i> EM SOBREPOSIÇÃO A PROTEÍNA MASP-2 OS MARCADORES IDENTIFICADOS NO ESTUDO	38
FIGURA 12 - ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS AMPLICONS	39
FIGURA 13 - PADRÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE <i>MASP2</i>	41
FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E A VARIANTE p.D371Y (c.1111 G>T).....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS DOS PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	29
TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES.....	32
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS PARA O GENE <i>MASP2</i> EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E CONTROLES....	40
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS DOS MARCADORES CARACTERIZADOS DO GENE <i>MASP2</i> EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E CONTROLES.....	40
TABELA 5 - MODELO <i>IN SILICO</i> DO EFEITO DA VARIABILIDADE DO GENE <i>MASP2</i> SOBRE A PROTEÍNA.....	42
TABELA 6 - MODELO <i>IN SILICO</i> DO EFEITO DA VARIABILIDADE DO GENE <i>MASP2</i> SOBRE A UNIDADE DE AMINOÁCIDO MUTANTE.....	43
TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E O MARCADOR p.D371Y (c.1111G>T).....	44
TABELA 8 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E O MARCADOR p.V377A (c.1130T>C).....	45
TABELA 9 - ANÁLISE DO GRAU FIBROSE EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.D371Y (c.1111G>T).....	45
TABELA 10 - ANÁLISE DO GRAU FIBROSE EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.V377A (c.1130T>C).....	46
TABELA 11 - ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.V371Y (c.1111G>T).....	46
TABELA 12 - ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.V377A (c.1130T>C).....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	- Alanina aminotransferase
CAM	- Complexo de ataque à membrana
CCP 2	- Proteína Controladora do Complemento -Domínio 2
CUB 1	- Primeiro Domínio N-terminal
DAF	- Fator de aceleração de decaimento
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- Ácido diamino tetracético
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético
EGF	- Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
FC	- Fibrose Cística
FR	- Febre Reumática
HBV	- Vírus da Hepatite B
HCV	- Vírus da Hepatite C
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human leukocyte Antigens</i>)
IFN	- Interferon
IFNpg	- Interferon peguilado
MASP	- Serina protease associada à lectina ligante de manose
MBL	- Lectina Ligante de Manose
MHC	-Complexo principal de histocompatibilidade
OR	- <i>Odds Ratio</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PCR-SSCP	- Reação em cadeia da polimerase-análise do polimorfismo conformacional de fita simples
RNA	- Ácido ribonucleico
SP	- Serina protease
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	O SISTEMA COMPLEMENTO	13
3.2	SERINA PROTEASE 2 ASSOCIADA À MBL (MASP-2).....	17
3.2.1	MASP-2 e associação com doenças	21
3.3	HEPATITE C.....	23
3.3.1	Imunopatogenia da Hepatite C	24
3.3.2	Tratamento da Hepatite C.....	25
3.4	SISTEMA COMPLEMENTO E HEPATITE C.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA	29
4.2	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE <i>MASP2</i>	30
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	30
4.4	REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)	31
4.5	IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES POR POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)	32
4.6	COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA	33
4.7	SEQUENCIAMENTO DIRETO	34
4.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2	35
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5	RESULTADOS	37
5.1	FREQUÊNCIAS DOS MARCADORES IDENTIFICADOS	37
5.2	ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	41
5.3	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	42
5.4	GENÓTIPOS DOS MARCADORES p.D371Y (c.111G>T) E p.V377A (c.1130T>C) E A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA.....	43

5.5	ANÁLISE DO GRAU DE FIBROSE EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E OS MARCADORES p.D371Y (c.111G>T) E p.V377A (c.1130T>C).....	45
5.6	ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AOS MARCADORES p.D371Y (c.111G>T) E p.V377A (c.1130T>C).....	46
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	64
	ANEXO 2 - SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA	65
	ANEXO 3 - RESULTADOS	66
	ANEXO 4- ABSTRACT - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	72

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) infecta aproximadamente 170 milhões de pessoas ao redor do mundo e se tornou um grave problema de saúde pública. O HCV é um microorganismo hepatotrópico sendo que a fibrose hepática é a principal complicação da infecção crônica pelo vírus. Estima-se que 15% dos indivíduos infectados eliminem o vírus espontaneamente e entre 60 a 80% desenvolvam hepatite C crônica, que pode evoluir progressivamente para cirrose e carcinoma hepatocelular, provocando falência hepática (EASL, 1999). O sistema complemento é um importante mecanismo da resposta inata podendo neutralizar o vírus por lise (resultando na inativação dos vírus) ou facilitar a interação com as células de defesa. Assim como os anticorpos, as proteínas do complemento se depositam na superfície dos vírus e podem interferir na sua habilidade de infectar células susceptíveis (COOPER; NEMEROW, 1984). A via das lectinas é ativada quando a MBL ou ficolinas ligam-se a unidades de manose e outros carboidratos que estão acessíveis em muitos microorganismos, induzindo a cascata do complemento. Quando o complexo MBL/ficolina liga-se à superfície do patógeno, as proteases MASP-1 e MASP-2 são ativadas. Em 2003 Stengaard-Pedersen *et al.*, descreveram pela primeira vez um caso clínico de um paciente com infecções pneumocócicas recorrentes que apresentava deficiência de MASP-2 devido a uma mutação na região codificadora do domínio CUB 1. Essa deficiência impedia a formação do complexo MBL-MASP-2 e limitava a ativação do sistema complemento. A partir dessa descoberta outras mutações começaram a ser descritas, tanto na região estrutural quanto na região promotora do gene *MASP2*. Em 2007 Thiel *et al.*, estudando o polimorfismo de *MASP2* em diferentes populações relataram a presença de seis mutações e observaram que os níveis séricos de MASP-2 estavam reduzidos nos indivíduos com o marcador p.V377A (c.1130T>C). O conhecimento do polimorfismo de *MASP2* pode contribuir para o melhor entendimento da atividade da enzima na ativação do sistema complemento e conseqüentemente contribuir para esclarecer a susceptibilidade às infecções virais, tais como pelo HCV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a variabilidade do gene *MASP2* em indivíduos com hepatite C crônica, com fibrose moderada ou grave, buscando caracterizar a relação entre os polimorfismos e a susceptibilidade à infecção crônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as mutações existentes no gene *MASP2* exons 3 e 9, que codificam os domínios CUB1 e CCP2 respectivamente, por meio da técnica PCR-SSCP e sequenciamento direto.
- Comparar as frequências alélicas e genótípicas das variantes identificadas no gene *MASP2* em pacientes com hepatite C crônica e controles saudáveis buscando avaliar a relação com a susceptibilidade à doença.
- Determinar a relação entre os polimorfismos encontrados e a concentração sérica de MASP-2 nos pacientes com hepatite C crônica.
- Avaliar a relação entre os polimorfismos encontrados e a resposta ao tratamento com IFN e o grau de fibrose hepática nos pacientes em estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é parte da resposta imunológica inata, porém também contribui para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Esse sistema foi primeiramente descrito entre 1888 e 1894 quando os patologistas Bordet, Pfeiffer e Metchnikoff demonstraram experimentalmente que o soro era capaz de lisar algumas bactérias *in vitro*. Havia no soro humano um fator lítico termolábil, destruído a 56°C, que foi denominado alexina. Posteriormente, alguns pesquisadores demonstraram que o complemento era constituído por mais de um componente. Atualmente, sabe-se que este sistema é formado por pelo menos 30 diferentes proteínas plasmáticas e de membrana que são ativadas na forma de cascata enzimática levando a sua deposição sobre a superfície de patógenos (FRANK; ATKINSON, 2001).

A ativação do complemento induz resposta inflamatória, colabora para a eliminação de patógenos, levando a sua opsonização e lise, além de permitir a remoção de imunocomplexos e células apoptóticas, geralmente sem causar danos às células do hospedeiro. No entanto, uma ativação excessiva do sistema complemento pode provocar lesão tecidual gerada direta ou indiretamente por sua ativação (FLEMING; TSOKOS, 2006).

Segundo Whitton e Oldstone (1990), as proteínas do complemento podem exercer ação antiviral por meio de quatro mecanismos: a) revestindo os vírus sensibilizados com anticorpos para impedir sua ligação aos receptores celulares; b) formando agregados de partículas virais e diminuindo o número de unidades infecciosas; c) por meio da deposição excessiva do fragmento C3b que estimula a atividade dos fagócitos e d) promovendo a lise osmótica dos vírus ao destruir sua camada lipídica.

Foram descritas três vias diferentes de ativação do complemento: via clássica, via alternativa e via das lectinas (Figura 1).

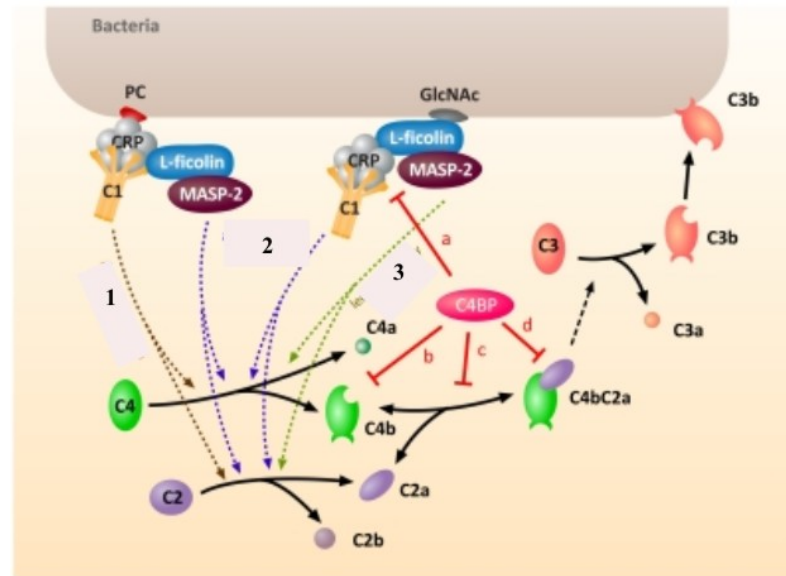


FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

FONTE: Liu *et al.* (2011)

NOTA: 1 = via clássica, 2 = via alternativa e 3 = via das lectinas.

A via clássica é iniciada pela ligação de C1, composta pelas frações C1q, C1r e C1s, ao complexo antígeno-anticorpo. A via alternativa é ativada pelo reconhecimento de componentes estruturais de certos microorganismos e a via das lectinas tem início pela ligação da MBL/ficolinas a carboidratos presentes em bactérias, fungos e vírus (STOERMER; MORRISON, 2011; DUNKELBERGER; SONG, 2010, ROSS, 1991; LEPOW; PILLEMER, 1980).

A ativação da via clássica ocorre pela ligação da fração C1q ao domínio Fc das imunoglobulinas de classe M (IgM) e G (IgG). Após a ligação de C1q, esta se liga a C1r permitindo que ocorra a clivagem de C1s. A fração C1s torna-se ativa e cliva C2 e C4 com posterior formação de C4bC2a, uma enzima proteolítica denominada C3 convertase, comum a todas as vias, responsável pela clivagem de C3 em C3a e C3b (ABBAS; LICHTMAN, 2005). C3b é uma opsonina e facilita a fagocitose de microorganismos. Pela ligação da molécula C3b à C3 convertase forma-se o complexo C4bC2aC3b, denominado C5 convertase, que cliva C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b liga-se a C6 e assim sucessivamente até C9, formando o complexo de ataque à membrana (CAM) composto por C5bC6C7C8C9 (FORTE, 2004).

A ativação da via alternativa se inicia pelo componente C3, que circula de forma inativa no plasma com o grupamento tioéster intacto. Alterações na conformação espacial de C3, por hidrólise espontânea, expõem o grupamento tioéster formando C3 ativo (C3H₂O). Essa molécula pode se ligar ao Fator B, originando a C3 convertase

e C3b. O fragmento C3b se liga ao fator B, originando um complexo C3bB. Na presença do fator D, B é clivado em Ba e Bb formando C3bBb (C3 convertase da via alternativa). O fator D é homólogo ao C1s da via clássica, o C3 ao C4 e o fator B ao C2. A proteína properdina estabiliza essa C3 convertase, a qual tem função semelhante a C4bC2a (FORTE, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A via das lectinas é ativada quando a MBL ou ficolinas ligam-se a unidades de manose e outros carboidratos que estão acessíveis em muitos microorganismos, induzindo a cascata do complemento. Quando o complexo MBL/ficolina liga-se à superfície do patógeno, as proteases MASP-1 e MASP-2 são ativadas. MASP-1 cliva C2 e MASP-2 C4 e C2, culminando com a formação da enzima C3 convertase, C4bC2a (TAKAHASHI; MICHELOW; EZEKOWITZ, 2006). Após a clivagem de C3, C3b liga-se a C4bC2b e/ou C3bBb, enzimas convertases das vias clássica e alternativa, respectivamente, para formar a enzima C5 convertase e posteriormente o CAM (Figura 2).

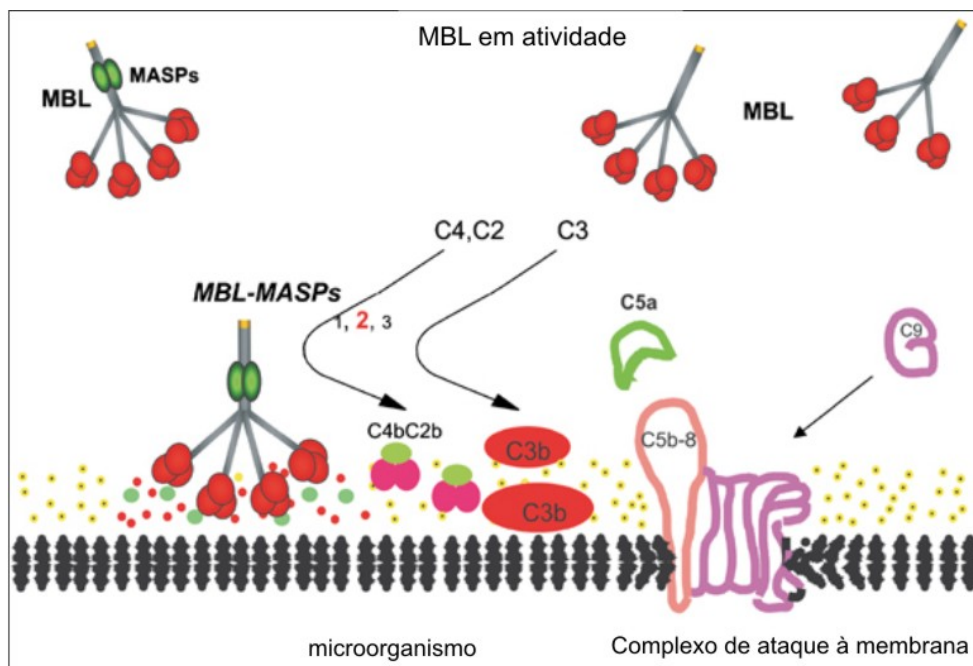


FIGURA 2 - ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS
FONTE: Adaptado de Garred *et al.* (2006)

O CAM promove uma alteração funcional dos fosfolipídios da membrana citoplasmática. A união das moléculas hidrofóbicas do CAM leva a formação de um canal hidrofílico no seu interior, permitindo a passagem de moléculas provenientes do meio externo com consequente lise osmótica (FORTE, 2004) (Figura 3).

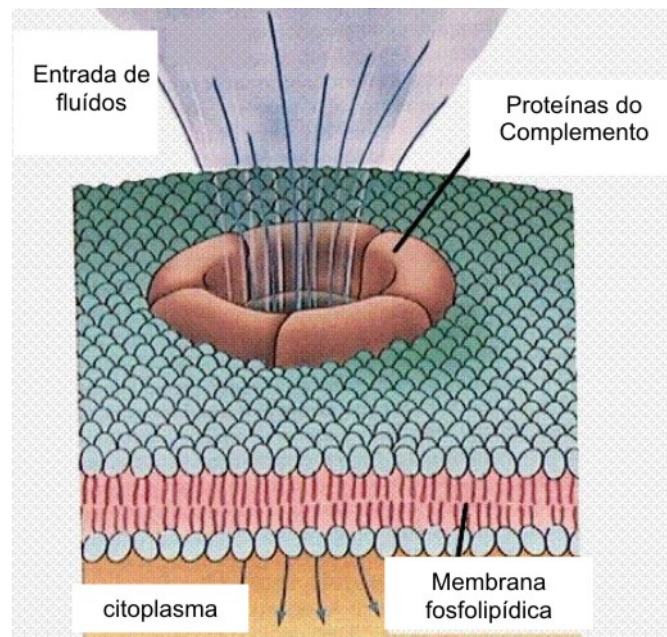


FIGURA 3 - COMPLEXO DE ATAQUE A MEMBRANA (CAM)
 FONTE: Adaptado de <http://www.rbi.fmrp.usp.br/immunobiol>

Os fragmentos solúveis menores C3a, C4a, C5a são anafilotoxinas, responsáveis pela quimiotaxia e ativação de leucócitos por meio da interação com receptores específicos presentes na superfície de monócitos, macrófagos, mastócitos e basófilos (C3aR e C5aR-CD88) (WALPORT, 2001).

A síntese da maioria das proteínas do complemento ocorre nos hepatócitos: C1r, C1s, C3, C6, C8 e C9, MBL e MASPs (SORENSEN *et al.*, 2006; FORTE, 2004). Os macrófagos sintetizam normalmente C2, C4, C5 e o Fator B. As células epiteliais intestinais sintetizam o componente C1q e as células esplênicas podem sintetizar C5 e C8 (FORTE, 2004). Há evidências de que a síntese esteja sob controle genético (COLTEN; DOWTON, 1986). Com o desenvolvimento das técnicas moleculares tem sido possível analisar os genes codificadores dessas proteínas e também conhecer a sua composição. Esse avanço permitiu melhor compreensão sobre o envolvimento do sistema complemento nas doenças infecciosas, imunodeficiências e doenças inflamatórias.

A ativação do complemento é controlada por meio de proteínas solúveis ou associadas a membrana celular. Nos fluidos corporais observa-se ação de componentes reguladores tais como, inibidor de C1 (C1-INH), a proteína ligante de C4b (C4bp), os fatores H e I, clusterina e a vitronectina. Já na superfície celular existem as proteínas reguladoras como receptor de complemento 1 (CR1, CD35), a proteína cofator de membrana (CD46), proteínas glicosilfosfatidilinositol-ancorados, fator de aceleração

de decaimento (DAF), além de CD55 e CD59 que protegem a célula do ataque do complemento homólogo (KIRSCHFINK; MOLLNES, 2003).

O sistema complemento é parte importante da resposta imune humoral neutralizando os vírus na fase precoce da infecção, juntamente com os anticorpos de baixa afinidade antigênica. É um importante mecanismo de defesa não específico da resposta imunológica, envolvido na proteção do hospedeiro contra a infecção viral (MORGAN; HARRIS, 1999). Para escapar desse sistema de defesa o vírus é capaz de expressar proteínas homólogas às do hospedeiro ou emprestar proteínas da membrana celular para regular a atividade do complemento (LUBINSKI; NAGASHUNMUGAM; FRIEDMAN, 1998). Assim como os anticorpos, as proteínas do complemento se depositam na superfície dos vírus e podem fisicamente interferir na sua habilidade de infectar uma célula susceptível (COOPER; NEMEROW, 1984).

3.2 SERINA PROTEASE 2 ASSOCIADA À MBL (MASP-2)

As serinas-proteases (MASP-1, MASP-2 e MASP-3) são necessárias para ativação da via das lectinas.

Estruturalmente as serinas-proteases são homólogas aos componentes C1r e C1s da via clássica do complemento, clivando os componentes C4 e C2 para gerar a C3 convertase (C4bC2b) (Figura 4).

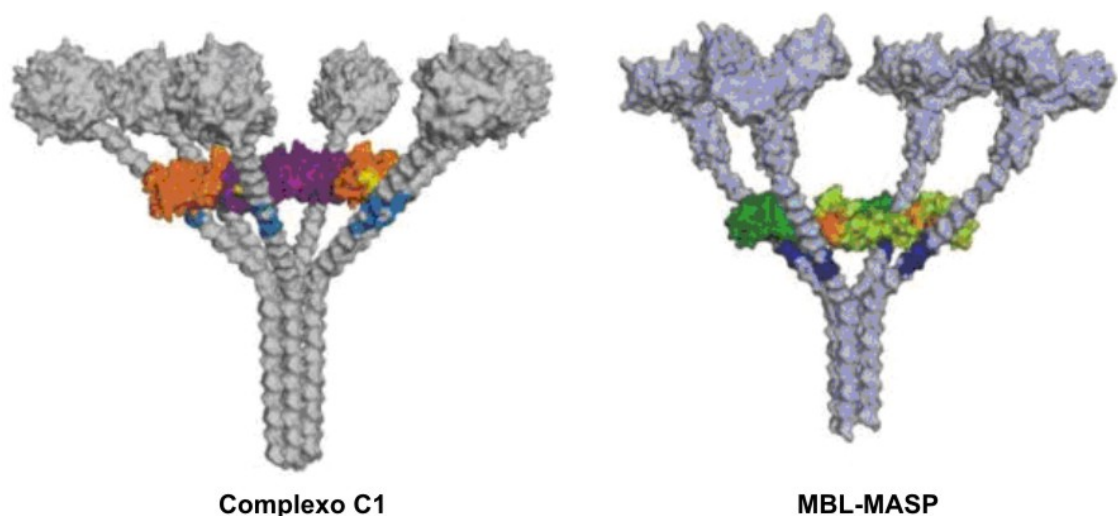


FIGURA 4 - C1 E O COMPLEXO MBL-MASP

FONTE: Adaptado de Wallis *et al.* (2010)

NOTA: Os domínios CUB1-EGF-CUB2 e C1r e C1s (púrpura e laranja) e MASP (verde). C1q (azul claro), MBL (azul escuro), C1rs (amarelo) e MASP (laranja).

No entanto, a sua ativação difere desses componentes. A ligação de alta afinidade MASP-2/MBL, dependente de cálcio, ocorre entre os domínios de colágeno da MBL e os domínios N-terminais CUB1-EGF-CUB2 da protease (THIELENS *et al.*, 2001). A interação MBL-MASP-2 ocorre por meio de ligação iônica com a unidade lisina na posição 55 da cadeia colagenosa (TEILLET *et al.*, 2007) (Figura 5).

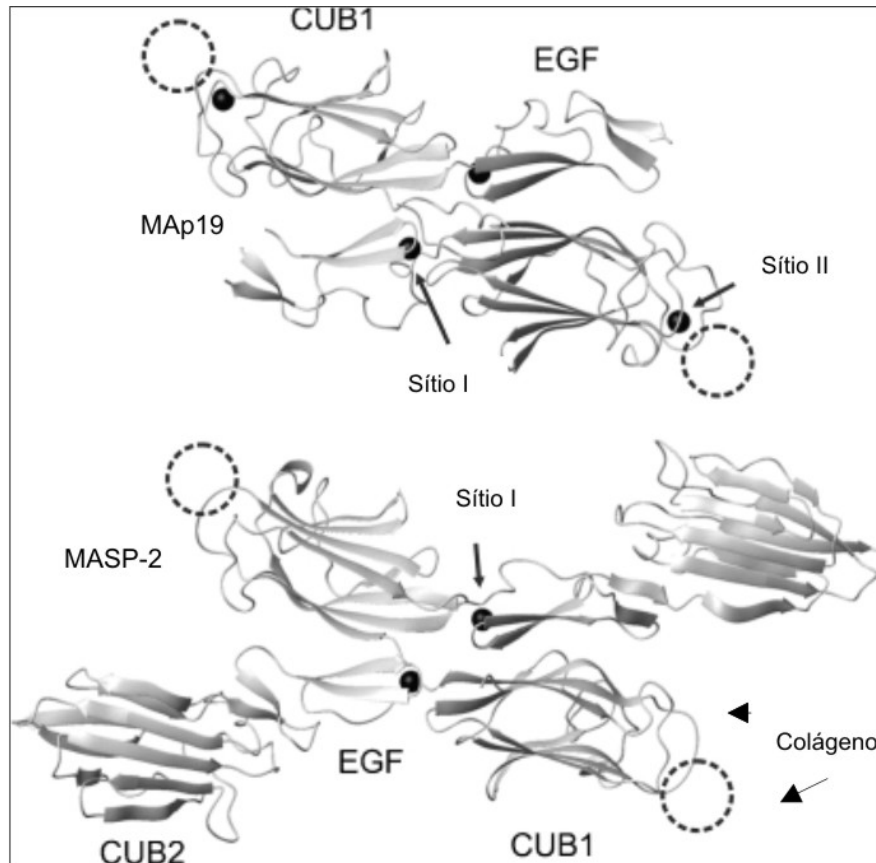


FIGURA 5 - ESTRUTURAS DE MASP-2 (acima) E FRAGMENTO CUB1-EGF-CUB2 DE MASP-2 (abaixo)

FONTE: Adaptado Wallis (2007)

NOTA: Os pontos escuros indicam a provável localização dos sítios de ligação de alta afinidade com MBL.

O mecanismo de ativação está baseado no rearranjo das subunidades de MBL no momento da ligação com a superfície ativadora. Essa interação provoca uma tensão molecular, com mudança conformacional, induzindo o reconhecimento do alvo. As mudanças conformacionais no oligômero de MBL possibilitam o alinhamento das regiões flexíveis de MASP-2, permitindo a exposição do sítio catalítico que entra em contato com a região de ligação para subsequente clivagem e ativação da cascata (WALLIS, 2007) (Figura 6).

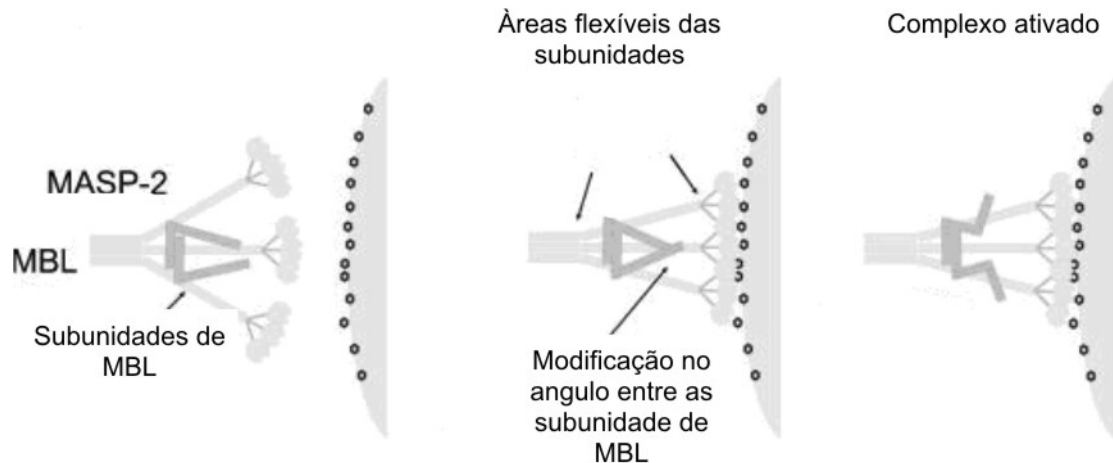


FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DE MASP-2. O CONTATO DO COMPLEXO MASP-2/MBL COM CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE LEVA A UMA MUDANÇA CONFORMACIONAL NAS SUBUNIDADES DE MBL, PERMITINDO A ATIVAÇÃO DE MASP-2

FONTE: Adaptado Wallis (2007)

Como a via das lectinas é ativada por meio da MBL ou ficolinas associadas à MASP, sugere-se que o polimorfismo e/ou a deficiência das proteases possa interferir na atividade funcional da MBL e/ou ficolinas.

As ficolinas são um grupo de proteínas contendo domínios de colágeno e fibrinogênio estruturalmente semelhantes a MBL. São conhecidos 3 tipos de ficolinas humanas L-ficolina/P35, H-ficolina e M-ficolina, sendo as duas primeiras proteínas humorais e a última presente na superfície de monócitos. Todas se associam a MASP-2 e ativam a via das lectinas (MATSUSHITA; FUJITA, 2001).

MASP-2, na presença de Ca^{2+} , forma homodímeros estáveis e se associa a MBL/ficolinas por meio dos domínios CUB-1-EGF formando o complexo MASP-2-MBL (SORENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005) (Figura 7).

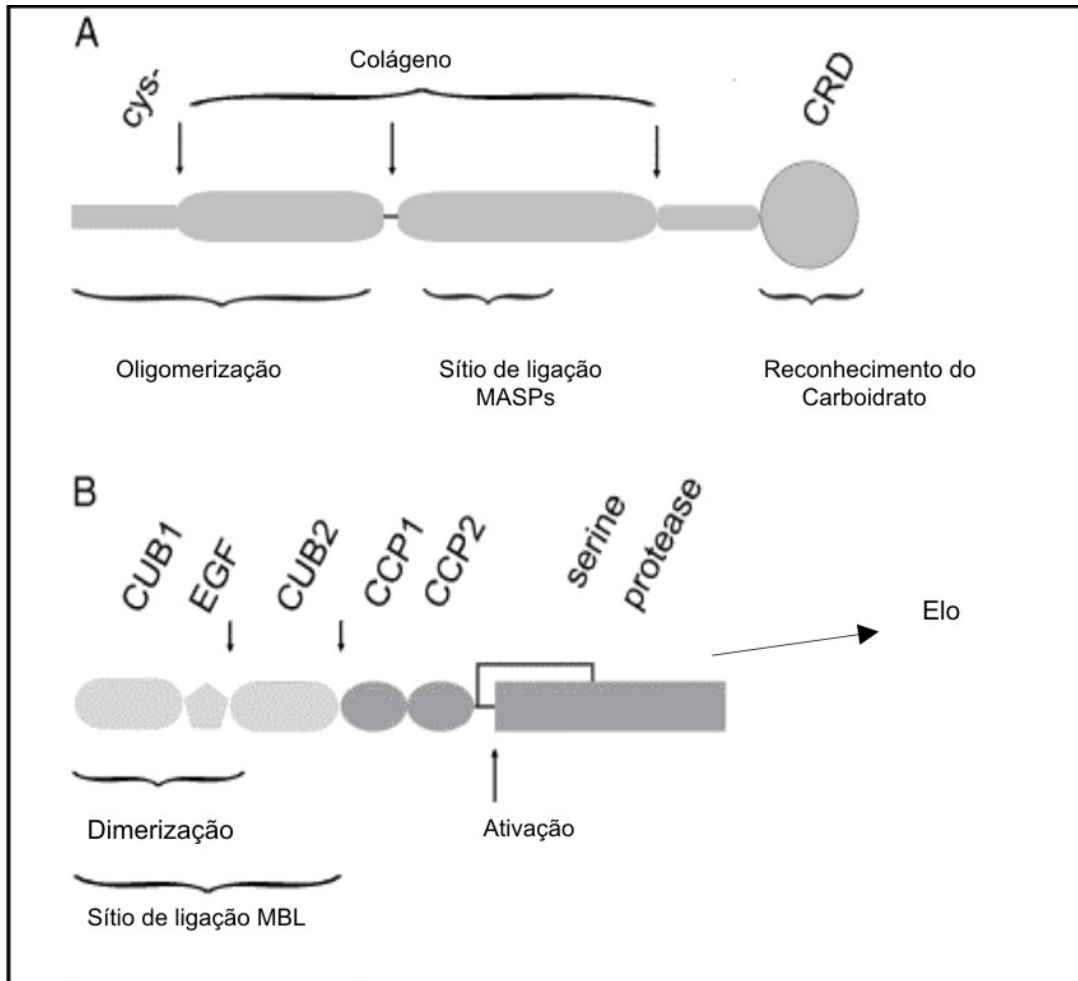


FIGURA 7 - DOMÍNIOS DE MBL E MASPs

FONTE: Adaptado Wallis (2007)

NOTA: (A) Organização estrutural da MBL; (B) Organização estrutural de MASP. As setas apontam as regiões potencialmente flexíveis.

Outro constituinte do complexo MBL/MASP é a proteína plasmática de aproximadamente 19 kDa (MAp-19) com uma sequência N-terminal idêntica a MASP-2. As proteínas MAp-19 e MASP-2 são codificadas por um único gene, no entanto, são produzidas a partir de RNAm diferentes, que são variantes de RNAm. Dos 12 éxons, 11 codificam MASP-2 e um único éxon (éxon 12) codifica a região de ligação. O éxon 5 codifica dois domínios comuns (CUB1 e EGF) e quatro aminoácidos C-terminais específicos para MAp19 (STOVER *et al.*, 1999; SORENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005).

O gene que codifica a MASP-2 está localizado na região 1p36.23-31, contém 12 éxons que codificam 6 diferentes domínios que são constituídos por dois domínios N-terminal denominados CUB (CUB1 e CUB2), separados por um domínio semelhante a EGF (fator de crescimento epidérmico) seguido por dois domínios

denominados CCP1 e CCP2 (proteína de controle do complemento) e um domínio C-terminal serina-protease (SP).

3.2.1 MASP-2 e associação com doenças

Stengaard-Pedersen *et al.* (2003), descreveram pela primeira vez o caso clínico de um paciente com infecções recorrentes e doença inflamatória crônica apresentando deficiência de MASP-2 herdada geneticamente. Nesse caso o gene codificador de MASP-2 apresentava uma mutação no domínio CUB1, causando a substituição de glicina por ácido aspártico na posição 105 (adenina por guanina), (p.D120G, c359A>G). Nos indivíduos apresentando homozigose não havia a formação do complexo MBL-MASP-2. A partir desse estudo, a análise do polimorfismo do gene *MASP2* em indivíduos com doenças infecciosas e/ou inflamatórias despertou maior interesse.

Em 2004, Cedzynski *et al.* investigaram a presença da mutação p.D120G (c359A>G) em crianças polonesas com infecções recorrentes do trato respiratório superior e observaram que tanto as crianças homozigotas como as heterozigotas para a variante apresentavam atividade reduzida da via das lectinas.

Carlsson *et al.* (2005) avaliaram o polimorfismo do gene *MBL2* e a mutação p.D120G em 112 pacientes com fibrose cística (FC) e não observaram relação clínica entre os genótipos de *MASP2* e a doença. Olesen *et al.* (2006) também estudaram pacientes com FC e não encontraram relação entre a doença e p.D120G em pacientes heterozigotos. No entanto, os autores identificaram uma paciente com doença pulmonar grave, homozigota para essa variante.

Além dessa variante outras foram descritas tanto na região estrutural, quanto na região promotora do gene *MASP2*. Lozano *et al.* (2005) identificaram três novas variantes de *MASP2* no éxon 3 (domínio CUB1) em indivíduos africanos, nas posições p.R99Q, p.R118C e p.P126L. Fenotipicamente essas variantes resultaram em significativa diminuição da concentração sérica de MASP-2 (SORENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005).

Thiel *et al.* (2007) estudando o polimorfismo de *MASP2* em diferentes populações (africanos da Zâmbia, caucasianos dinamarqueses, ameríndios brasileiros,

chineses de Hong Kong e Inuitas da Groelândia ocidental e oriental) relataram a presença das seguintes variantes: p.R99Q (c.926G>A;rs-), p.R118C (c.352C>T,rs-), p.D120G (c.359A>G;rs72550870), p.P126L (c.377G>T;rs56392418), p.V377A (c.1130T>C; rs2273346) e p.156_159 dupCHNH. Os níveis séricos de MASP-2 estavam reduzidos em indivíduos com a variante p.V377A (c.1130T>C), porém a atividade da protease estava normal. No entanto, em indivíduos homozigotos para a variante p.126L (c.377G>T) a proteína não era funcional. Exclusivamente na população chinesa os autores encontraram o marcador p.156_159dupCHNH que resulta na repetição de 4 aminoácidos e está associado a baixos níveis séricos de MASP-2.

Schafranski *et al.* (2008) não observaram relação significativa entre o polimorfismo p.D120G e a febre reumática em 148 pacientes investigados.

Thiel *et al.* (2009) a fim de analisar a atividade enzimática da protease nas mutações anteriormente descritas produziram variáveis recombinantes de *MASP2* (rMASP-2s) a partir das variantes caracterizadas: p.R99Q, p.D120G, p.P126L, p.H155R, p.156_159dupCHNH, p.V377A e p.R439H e observaram que as proteínas codificadas pelas variantes p.D120G e CHNHdup perderam a capacidade de associação à MBL e, quando na presença de C4, não foram capazes de ativar o sistema complemento.

Recentemente, Ytting *et al.* (2011), estudando pacientes com câncer colorretal não encontraram associação entre a variante p.D120G e a doença. Já Boldt, Luz & Messias-Reason (2011), estudando o polimorfismo de *MASP2* em 208 pacientes com doença de Chagas crônica observaram associação entre a variante p.D371Y e risco aumentado de cardiomiopatia nesses pacientes.

3.3 HEPATITE C

As hepatites virais são doenças inflamatórias do fígado causadas por diferentes agentes de distribuição universal, destacam-se os vírus B e C por estarem associados à significativa morbidade e mortalidade.

O HCV foi identificado e caracterizado por Choo *et al.* em 1989 (*apud* HOUGHTON, 2009), sua transmissão ocorre principalmente por via parenteral. O HCV é um vírus hepatotrópico pertencente a família Flaviviridae, seu genoma é constituído por um RNA de fita simples de polaridade positiva medindo 9,7 kilobases de comprimento (Figura 8).

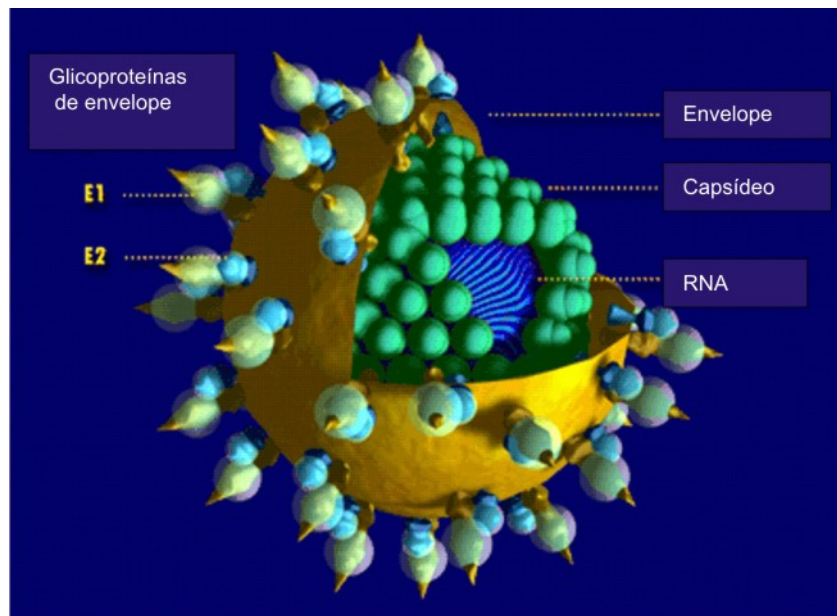


FIGURA 8 - VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)
 FONTE: Adaptado de www.bbm1.ucm.es/public_html/res/prot/virprot.html

Uma única poliproteína, após clivagem proteolítica, origina as proteínas estruturais: nucleocapsídeo (core), envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2) e as não estruturais (NS 1 a 6), essas últimas responsáveis pela replicação viral (WHITTON; OLDSTONE, 1990). As proteínas NS3 e NS5 induzem a apoptose dos hepatócitos infectados (HERZER; SPRINZL; GALL, 2007).

A análise filogenética das sequências genômicas permitiu a caracterização de 6 genótipos do HCV (1 a 6) que são subdivididos em grupos denominados por letras (a, b, c, assim por diante). Dentro de um mesmo genótipo (similaridade da

sequência de nucleotídeos igual ou maior a 70%) e subtipo (similaridade entre 75 a 80%), podemos ainda ter variações genéticas do HCV (SIMMONDS *et al.*, 2005). Essas variações são denominadas *quasispecies*. Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, resultando no surgimento de pequenas e constantes mutações. A maior ou menor diversidade das *quasispecies* parece estar relacionada com a interação vírus-hospedeiro e pode influenciar a resposta terapêutica (XIAOFENG *et al.*, 2009).

A transmissão do HCV ocorre principalmente por via parenteral. A transmissão sexual é controversa, indivíduos com hepatite C crônica apresentam risco de transmissão sexual de aproximadamente 1% quando relacionam-se com múltiplos parceiros, para indivíduos monogâmicos o risco é praticamente inexistente (0% a 0,8%) (HAHN, 2007).

3.3.1 Imunopatogenia da Hepatite C

Estima-se que aproximadamente 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV em todo o mundo. O período médio de incubação é de 8 semanas, com variação entre 2 a 12 semanas. A enzima hepática Alanina Amino Transferase (ALT) apresenta flutuações típicas durante o curso da doença (OLIVEIRA, 1994). Após o período de incubação, anticorpos e células T específicas podem ser detectados. A presença de células T HCV-específicas no fígado coincide com a diminuição da replicação viral (REHERMANN, 2009). De acordo com Brown *et al.* (2010), a MBL liga-se diretamente as glicoproteínas de envelope, resultando na neutralização das partículas virais.

Estima-se que 15% dos indivíduos infectados eliminem o vírus espontaneamente, 25% desenvolvam os sintomas da doença e entre 60 a 80% desenvolvam hepatite C crônica, podendo evoluir progressivamente para cirrose e carcinoma hepatocelular, provocando falência hepática (EASL, 1999).

Após encontrar o hospedeiro susceptível, o HCV inicia o processo de infecção. As glicoproteínas do envelope E1 e E2 ligam-se a molécula CD81 na superfície dos linfócitos T e B para a internalização viral e sua replicação (MAECKER; TODD; LEVY, 1997). Em seguida, o vírus alcança o fígado e outros tecidos como pâncreas, tireóide, glândulas adrenais, baço e medula óssea (GOWANS, 2000). A replicação viral

acontece principalmente no fígado, onde o HCV infecta aproximadamente 10% dos hepatócitos (DUSTIN; RICE, 2007).

Histologicamente a hepatite crônica pode ser classificada de acordo com: a gravidade da doença (grau de fibrose hepática), o estágio de progressão de doença e a atividade necro-inflamatória nos compartimentos portais, peri-portais e intralobulares (ISHAK *et al.*, 1995). A progressão da fibrose, na hepatite crônica, tem sido associada à diversidade das *quasispecies* do HCV (WANG *et al.*, 2007). A persistência do vírus está relacionada à quantidade de inóculo, ao alto índice de replicação viral e também à formação de variantes virais. As variantes virais escapam da resposta imunológica humoral e celular, especialmente das células T CD4+ e CD8+ (GREMION; CERNY, 2005). A resposta celular dos linfócitos T HCV-específicos é quantitativamente fraca, favorecendo a mutação viral (CHANG, 2003). Além disso, demonstrou-se que o *core* viral pode se ligar ao receptor de C1, gC1q, na superfície celular e inibir a ativação das células T (YAO *et al.*, 2004). Estudos realizados por Von Hahn *et al.* (2007) demonstraram que durante a infecção crônica ambas as respostas imunológicas, humoral (anticorpos) e celular (células T), exercem pressão seletiva sobre o HCV resultando na produção de variantes virais que por fim escapam à resposta imunológica.

3.3.2 Tratamento da Hepatite C

Os interferons (IFN) pertencem à superfamília das citocinas. Essas moléculas modulam a atividade de muitos componentes do sistema imunológico, aumentando a capacidade do organismo de combater agentes infecciosos. Os IFN do tipo I classificam-se em alfa (α), beta (β) e gama (γ), de acordo com a sequência de aminoácidos das proteínas. O interferon- α é o principal IFN produzido sistemicamente por monócitos e células B em resposta a vírus e outros antígenos (SILVA, 1995; STITES; TERR; PARSLOW, 2000). Todas as três formas de IFN do tipo I ligam-se a um único receptor de múltiplas cadeias, que é expresso em quase todos os tipos celulares. A ligação do IFN ao receptor induz ou aumenta a expressão de produtos gênicos diferentes na célula-alvo. Dentre as proteínas induzidas pode-se destacar a expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. A indução do MHC de classe I aumenta a capacidade das células infectadas

por vírus de apresentarem os antígenos virais, resultando em sua destruição por células T citotóxicas. A expressão de moléculas MHC é geralmente baixa nos hepatócitos, podendo ser aumentada na presença de IFN- α e IFN- γ (STITES; TERR; PARSLOW, 2000; SCHRÖDER *et al.*, 1995). Além disso, os IFN do tipo I podem induzir a proliferação de células T CD8⁺ (STITES; TERR; PARSLOW, 2000).

Em 1997, foi regulamentado o uso do interferon- α isolado no tratamento da hepatite C crônica. A resposta sustentada ao tratamento, ou seja, RNA viral indetectável 24 semanas após tratamento, foi variável: observou-se que 20% dos pacientes tratados não apresentavam RNA viral (KJAERGARD; KROGSGAARD; GLUUD, 2001) e em 92% deles esta ausência permaneceu por 6 anos ou mais, com regressão da fibrose (MARCELLIN *et al.*, 1997). A partir de 1998 foi instituído o uso da terapia combinada: interferon- α associado à ribavirina. Com isso, a taxa de resposta sustentada melhorou significativamente e a taxa de cura, definida como RNA viral indetectável 4 anos após o tratamento, elevou-se para 40 a 50% (KJAERGARD; KROGSGAARD; GLUUD, 2001; FOSTER, 2003).

A ribavirina é um análogo de nucleotídeo purínico com efeito virostático. Sugere-se que seu mecanismo de ação, embora não totalmente esclarecido, esteja baseado na inibição da RNA polimerase RNA-dependente e esgotamento do pool de guaninas (SILVA, 1995).

Em 2001 foram desenvolvidas novas formas de interferons para utilização no tratamento da hepatite, denominados peguilados. Os IFN peguilados (IFNpg) são metabolizados mais lentamente devido à adição de uma cadeia de polietileno glicol às suas moléculas. Há dois tipos de IFNpg com propriedades farmacológicas diferentes: um de 40 kDa alfa-2A, outro de 12 kDa, alfa-2B (FOSTER, 2003). O IFN alfa tem sido substituído pelo IFNpg devido sua superioridade farmacoterapêutica (FRIED *et al.*, 2002).

Alguns fatores influenciam a resposta ao tratamento sendo que a melhor resposta é observada em indivíduos do sexo feminino, com idade inferior a 40 anos, apresentando genótipo viral diferente de 1 e grau e fibrose 0 ou 1. Durante o tratamento, a resposta imunológica pode contribuir para o sucesso ou fracasso do mesmo (HUGLE; CERNY, 2003). Além disso, muitas proteínas virais não são inativadas pelo IFN, o que dificulta o tratamento da infecção com IFN- α (ALCAMI; KOSZINOWSKI, 2000).

Desde 11 de outubro 2007 o tratamento da hepatite C crônica está regulamentado no Brasil e a população tem este direito garantido pelo governo (BRASIL, 2000). Devido à persistência do HCV em aproximadamente 60-80% dos indivíduos infectados, a infecção é um dos maiores problemas de saúde pública mundial e muitas questões ainda precisam ser esclarecidas para evitar o estabelecimento da infecção crônica e conseqüentemente suas complicações.

3.4 SISTEMA COMPLEMENTO E HEPATITE C

O envolvimento do sistema complemento na infecção pelo HCV ainda não está totalmente elucidado e existem poucos estudos sobre o assunto. Ueda *et al.*, (1995) relataram haver associação entre a infecção por HCV e a ativação da via clássica do complemento. Outro estudo demonstrou haver relação significativa entre hipocomplementemia e crioglobulinemia em indivíduos infectados pelo HCV (ITOH; TANAKA, 1994).

Dumestre-Perard *et al.* (2002) estudaram o sistema complemento analisando C1q, C3, C4, MBL, o complexo inibidor de C1s-C1, CH50 total e a atividade hemolítica de C4 em 66 indivíduos com infecção crônica pelo vírus C e observaram uma redução estatisticamente significativa na atividade de C4. De acordo com os autores, as crioglobulinas frequentemente encontradas no soro de indivíduos infectados com HCV são capazes de ativar a via das lectinas e contribuir para a ativação de C4, promovendo a formação de C3 convertase (WEI *et al.*, 1997). Esses autores analisaram a composição das crioglobulinas em indivíduos com anticorpos anti-HCV e relataram a formação, no soro a baixa temperatura, de imunocomplexos de IgM-IgG. Esses imunocomplexos são os prováveis responsáveis pela ativação do sistema complemento a frio.

Ueda *et al.* (1993) demonstraram haver associação entre a ativação do complemento e a infecção pelo HCV. Sasaki *et al.* (2000) relataram a associação entre a mutação no códon 54 do gene *MBL2* e baixos níveis séricos da proteína na infecção crônica pelo HCV em pacientes japoneses. Ohsawa *et al.* (2001) estudando 16 portadores do HCV com glomerulonefrite e crioglobulinemia tipo II, observaram

que a concentração sérica de MBL estava relacionada ao desenvolvimento de glomerulonefrite associada com a infecção pelo vírus C.

Pedroso *et al.* (2008) analisando polimorfismos do gene *MBL2* em 102 pacientes brasileiros com hepatite C crônica, observaram que genótipos contendo os alelos mutantes X ou O, estavam associados com o desenvolvimento da hepatite C crônica, assim como, com a evolução clínica e a resposta ao tratamento com IFN e ribavirina.

Outro estudo, também realizado com pacientes brasileiros, demonstrou que baixos níveis de MBL sérica estão associados com a susceptibilidade a hepatite C crônica e que a presença do haplótipo HYO estava associada com a gravidade da fibrose nesses pacientes (HALLA *et al.*, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos no estudo 104 pacientes, eurobrasileiros, procedentes do Ambulatório de Hepatite Viral do Hospital de Clínicas da UFPR, com evolução para formas mais graves de hepatite C crônica, ou seja portadores de fibrose hepática nos graus 2, 3 ou 4 de acordo com a classificação Metavir (BEDOSSA; POYNARD, 1996), sendo 72 (69,23%) do gênero masculino e 32 (30,77%) do gênero feminino com média de idade 49 anos ($DP \pm 11,4$ anos). Todos os pacientes apresentaram teste anti-HCV positivo por Enzima Imuno-Ensaio (ELISA). A determinação qualitativa do RNA viral foi realizada utilizando o kit HCV-RNA Amplicor versão 2.0 (Roche, USA). Desses pacientes, 51 foram acompanhados durante o tratamento com IFN e ribavirina (Tabela 1).

TABELA 1- DADOS DOS PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA INCLUIDOS NO ESTUDO

PACIENTES	TRATAMENTO COM RESPOSTA	TRATAMENTO SEM RESPOSTA	FIBROSE (grau 2)	FIBROSE (grau 3)	FIBROSE (grau 4)
			n	n	n
Masculino	12	22	11	11	12
Feminino	8	9	5	6	6
Idade					
De 25-45 anos	5	8	8	2	5
Acima de 45 anos	14	20	8	13	13

Foram excluídos do estudo: usuários de álcool, indivíduos apresentando co-infecção com o vírus da hepatite B (HBV) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV) e indivíduos com outras doenças hepáticas ou sistêmicas.

O grupo controle foi constituído por 104 indivíduos saudáveis, Euro-brasileiros, doadores de sangue do Hemobanco de Curitiba com sorologia negativa para HCV, HBV, HIV, HTLV, chagas e sífilis, sendo 75 do gênero masculino (72,12%) e 29 do gênero feminino (27,88%) ($p=0,761$) e com a média de idade de 40 anos ($DP \pm 10,2$ anos).

Para a realização das análises, os indivíduos controles foram relacionados quanto à idade e gênero dos pacientes. Todos os participantes deste estudo leram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (CEP/HC 604.023/2003-02).

4.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE *MASP2*

Para determinação dos polimorfismos do gene *MASP2* foram analisados os éxons 3 e 9 que codificam o primeiro domínio N-terminal (CUB1) e o quinto domínio (CCP2), respectivamente. O domínio CUB1 é essencial para a associação de MASP-2 com a MBL e o domínio CCP2 essencial para clivagem de C4.

As regiões polimórficas analisadas foram escolhidas a partir de estudos preliminares que indicaram que mutações nos domínios CUB1 e CCP2 poderiam estar relacionadas à susceptibilidade a infecções (pneumonia pneumocócica) e doenças inflamatórias (STENGAARD-PEDERSEN *et al.*, 2003).

Para análise estatística foram selecionados, dentre os cinco marcadores identificados, aqueles observados em maior frequência ou seja, p.D371Y (c.1111G>T) e p.V377A (c.1130T>C).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue total de acordo com a metodologia modificada por Lahiri & Nurnberger (1991). A técnica consiste nas seguintes etapas: lise das células; lise dos núcleos dos linfócitos; retirada das proteínas por meio de precipitação; precipitação do DNA; lavagem do DNA e diluição em tampão Tris–EDTA (TE) (Tris 1 M e EDTA 0,1 M).

Em um tubo com capacidade para 15 ml colocou-se o creme leucocitário proveniente de 5ml de sangue coletado com EDTA e completou-se para 10ml com solução TKM1 e 125µl do detergente Nonidet P-40. Agitou-se o tubo, várias vezes, e

centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 10ml de solução TKM1, centrifugou-se novamente a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se delicadamente o sedimento com 800 μ l de solução TKM2, transferiu-se para um tubo tipo "eppendorf" com capacidade para 1,5ml e adicionou-se 50 μ l de SDS a 10%. O material foi mantido em banho-maria a 55°C durante a noite. Após esse período, retirou-se do banho-maria, adicionou-se 300 μ l de NaCl saturado (6M) e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. O material (sobrenadante contendo o DNA) foi transferido para um tubo de ensaio e adicionou-se 2 volumes de etanol gelado. O tubo foi invertido várias vezes até que ocorresse a precipitação do DNA. O DNA extraído foi lavado com etanol 70% e transferido para um tubo tipo "eppendorf" com capacidade para 1,5 ml que permaneceu a temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Ressuspendeu-se o DNA em aproximadamente 200 μ l de tampão TE. O material foi mantido a temperatura ambiente por 2 horas e depois foi acondicionado em geladeira.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)

A PCR se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA por meio da ação da enzima *Taq* polimerase (SAIKI *et al.*, 1988). O DNA extraído foi submetido ao processo de amplificação por meio da técnica de PCR e submetido a análise de polimorfismo conformacional de fita simples (PCR-SSCP), de acordo com a metodologia descrita por Orita *et al.* (1989). Esse método foi escolhido por apresentar boa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, além de possibilitar a detecção de possíveis mutações desconhecidas na região do gene analisada.

A PCR permite a amplificação de fragmentos desde aproximadamente 50pb até mais de 3.000 pb e para cada fragmento de DNA que se quer amplificar, deve-se ter em conta suas características próprias, principalmente as quantidades das diferentes bases que a molécula contém; características estas que influenciam as distintas variáveis do processo. Os reagentes e condições utilizadas para a reação foram:

- Volume final de 25 μ l: 200 μ M de dNTPs; 20pmol de cada oligonucleotídeo; 50mM de KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,3; 2mM de MgCl₂; 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1 μ l de DNA.
- Incubação 3 minutos a 96°C.
- 40 ciclos sucessivos:
 - desnaturação (15 segundos a 94°C)
 - hibridação (30 segundos a 60°C)
 - extensão (30 segundos a 72°C)
- Extensão final 10 minutos a 72°C

As sequências dos iniciadores utilizados podem ser observadas na Tabela 2.

TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES

DOMÍNIO	EXON	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ⁽¹⁾	TAMANHO DO FRAGMENTO
CUB 1	Exon 3	5'GCGAGTACGACTTCGTCAAGG3' 5'CTCGGCTGCATAGAAGGCCTC3'	354 pb
CCP2	Éxon 9	5'CCAGACCTTTGGAAAGTTAGC3' 5'GGCTCAAGTTCCAAGTATTGC3'	251pb

(1) Utilizados para PCR e Sequenciamento direto

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES POR POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)

Em condições não desnaturantes de eletroforese as fitas simples de DNA adotam uma conformação específica que é dependente da sua sequência de nucleotídeos e determina sua mobilidade eletroforética. Este fenômeno serve de base para detectar alterações de sequência em um determinado fragmento, quando este é colocado para correr em um gel de poliacrilamida não desnaturante. A mobilidade eletroforética da fita simples de DNA (ssDNA) depende do seu tamanho e da composição de nucleotídeos, o que gera uma conformação tridimensional diferenciada para cada segmento/sequência. A técnica SSCP foi utilizada para a análise de padrões de corrida em amostras de pacientes e controles. A sensibilidade da técnica para detecção de uma única base é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento de DNA, sendo superior a 80% em fragmentos com aproximadamente 300pb.

Para a análise de possíveis mutações, preparou-se uma solução contendo 10µl do produto de PCR e 12,5µl de tampão de corrida para SSCP (Formamida 95%; EDTA 20mM pH 8,0; Azul de bromofenol 0,05%; Xileno cianol FF 0,05%; NaOH 10mM). As amostras foram desnaturadas (5 minutos a 96°C), colocadas em gelo e toda a mistura foi aplicado em um gel de poliacrilamida (29:1) 10% com 5% de glicerol. O gel foi submetido a uma voltagem de 250V por um período de aproximadamente 5 horas a 4°C. Após este período, o gel foi corado com nitrato de prata e os padrões das bandas analisados por comparação com padrões previamente encontrados. O DNA dos padrões selecionados tanto do domínio CUB1 como do CCP2 foram reamplificados e analisados por sequenciamento direto para determinar a posição da mutação existente.

4.6 COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

A coloração com nitrato de prata foi baseada na técnica descrita por Dunbar *et al.* (1981).

Colocou-se o gel em um recipiente e lavou-se rapidamente com água destilada. Em seguida retirou-se a água e adicionou-se uma solução de HNO₃ a 1% (solução estoque a 65%) até cobrir o gel, que permaneceu por 3 minutos em agitação lenta. Retirou-se a solução de HNO₃ e foram realizadas duas lavagens de 15 segundos com água destilada. Retirou-se a água e adicionou-se a solução de AgNO₃ a 0,2% até cobrir o gel, que permaneceu por 20 minutos em agitação lenta. Retirou-se a solução de AgNO₃ e foram realizadas duas lavagens de 5 segundos com água destilada. Retirou-se a água e adicionou-se uma solução de 2,96% de Na₂CO₃ e 0,054% de formaldeído em quantidade suficiente para cobrir o gel e agitou-se lentamente, até a solução escurecer (aproximadamente 1 minuto). Depois de escurecida substituiu-se a solução por outra nas mesmas concentrações e agitou-se lentamente até que as bandas adquirissem a intensidade desejada. Retirou-se a solução anterior e lavou-se duas vezes por 15 segundos cada, com água destilada. Após, retirou-se a água e adicionou-se uma solução de ácido acético a 10% em quantidade suficiente para cobrir o gel, que permaneceu por um período de aproximadamente 5 minutos em agitação lenta. Retirou-se a solução de ácido acético e lavou-se duas vezes por

15 segundos cada, com água destilada. Retirou-se a água e adicionou-se uma solução de glicerol a 5% em quantidade suficiente para cobrir o gel, que permaneceu por 10 minutos em agitação lenta.

4.7 SEQUENCIAMENTO DIRETO

Após a reamplificação do DNA de pacientes e controles que apresentaram os padrões selecionados, cada produto de PCR foi purificado por meio da precipitação com acetato de amônio e etanol absoluto, seguido de centrifugação e lavagem dos produtos com etanol 70%. Em seguida, os amplicons foram submetidos à secagem e ressuspensos em tampão apropriado para o sequenciamento. Utilizou-se o Analisador automático de DNA de alto rendimento modelo MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Piscataway, USA). Cada amplicon foi sequenciado nos sentidos direto e reverso utilizando-se os respectivos iniciadores. Para a reação de sequenciamento, uma alíquota de cada amplicon foi adicionada a um mix composto pelo Kit Dinamic Et terminator (composto por enzima, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e tampões, Merck, Darmstadt, Germany) e pelo iniciador apropriado. Após a reação de sequenciamento, os produtos fluorescentes foram analisados em plataforma MegaBace 1000 de análise de DNA por eletroforese microcapilar para detecção automática de fluorescência, conforme protocolo e programas recomendados pelo fabricante. O programa "Matrix fill and pre-run", foi utilizado para preenchimento dos capilares do sequenciador com a matriz para capilar fornecida pelo fabricante. Em seguida, foi realizada uma pré-corrída a 2KV por 5 minutos para equilíbrio da matriz. Na sequência, executou-se o programa "Inject Samples and Run" cujos parâmetros de corrida foram selecionados previamente. Neste programa, as amostras foram injetadas nos capilares para iniciar corrida eletroforética. Os produtos fluorescentes da reação de sequenciamento foram lidos por sistema de detecção a laser, e os dados primários produzidos foram analisados por programas específicos para definição dos eletroferogramas.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2

A determinação sérica de MASP-2 foi realizada em 69 amostras de pacientes por meio do ensaio imunofluorométrico a tempo resolvido (TRIFMA) utilizando uma combinação de dois anticorpos anti-MASP-2. O soro foi diluído na proporção de 1:50. A sensibilidade da técnica varia de 10ng a 10µg/mL. O ensaio foi realizado em meio com alta concentração salina, contendo tampão-EDTA e determinou a concentração total de MASP-2. Nessas condições ocorre dissociação da MASP-2 complexada à MBL/ficolina.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da associação entre os genótipos e os grupos das amostras (pacientes e controles) foi utilizado o teste de Qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher, para os marcadores que permitiram análise. A análise dos alelos foi realizada pelo modelo de dominância e codominância. O valor de p utilizado nas tabelas é o resultado do melhor modelo de análise genética.

Para a comparação dos grupos em relação à idade, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes. Valores de p menores que 0,05 indicaram significância estatística. A análise multivariada, modelo de regressão logística, foi utilizada para determinar a associação da resposta ao tratamento e do grau de fibrose com o marcador analisado. O teste ANOVA e o teste LSD foram utilizados para as comparações múltiplas dos genótipos com relação a concentração sérica de MASP-2. Utilizou-se o programa Statistica v 8.0.

Foram analisadas as frequências obtidas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o programa estatístico Haploview 4.0.

Foram estimados os valores de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% para os marcadores observados com maior frequência: p.D371Y (c.111G>T) e p.V377A (c.1130T>C).

A análise *in silico* dos SNPs foi realizada utilizando o programa Polyphen: efeito funcional preditivo (<http://coot.embl.de/PolyPhen>). Para calcular o *score*, o programa

considera as propriedades termofísicas da proteína na forma selvagem e mutante e também o grau de preservação da unidade de aminoácido na posição correspondente à mutação entre as espécies.

5 RESULTADOS

5.1 FREQUÊNCIAS DOS MARCADORES IDENTIFICADOS

Foram identificados, em pacientes e controles, cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) para o gene *MASP2* sendo dois no domínio CUB1 p.R99Q (c.296G>A;rs 61735600), p.D120G (c.359A>G;rs72550870) (Figura 9) e três no domínio CCP2: p.P126L (c.377C>T;rs56392418), p.D371Y (c.1111G>T;rs12711521), p.V377A (c.1130T>C;rs2273346) (Figura 10), (Figura 11).

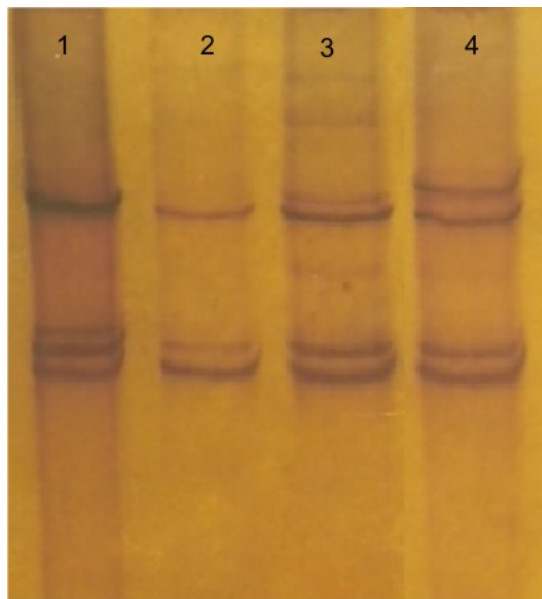


FIGURA 9 - PADRÕES DE CORRIDA DA AMPLIFICAÇÃO DO DOMÍNIO CUB 1 OBSERVADOS NO GEL
NOTA: 1 = C/T; G/G e A/A; 2 = G/G; A/A e C/C; 3 = C/C; A/A e G/A; 4 = G/A, G/G e C/C.

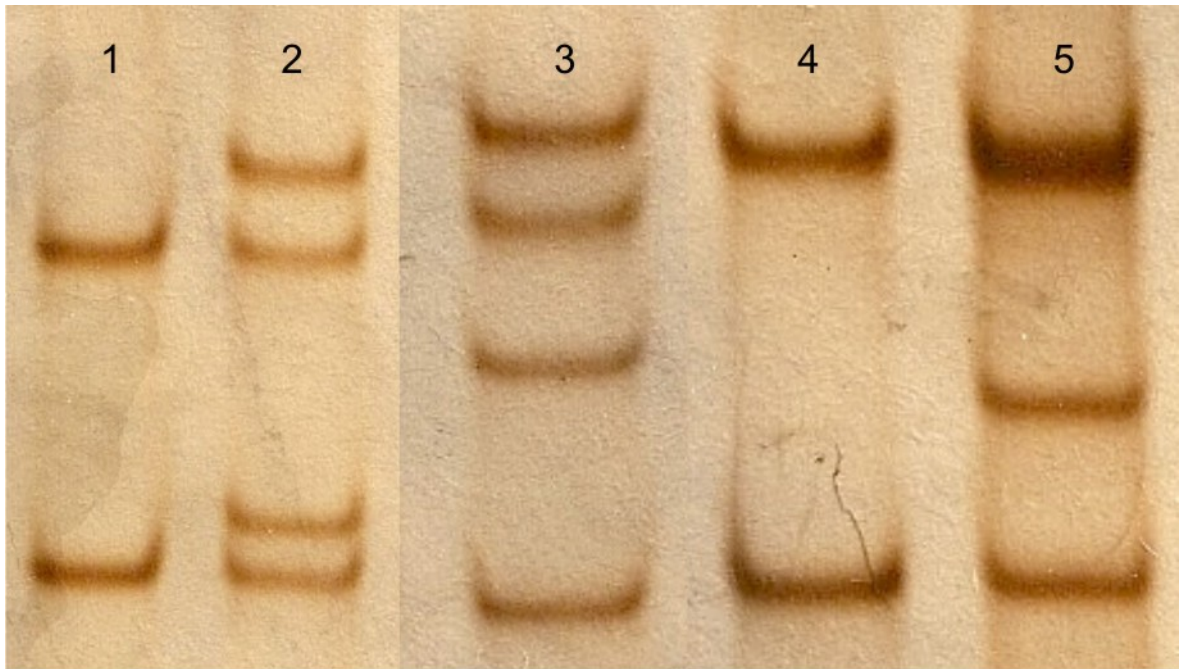


FIGURA 10 - PADRÕES DE CORRIDA DA AMPLIFICAÇÃO DO DOMÍNIO CCP2 OBSERVADOS NO GEL
 NOTA: 1=T/T e T/T; 2=G/T e T/T; 3=T/C e G/T; 4=G/G e T/T; 5=G/G e T/C.

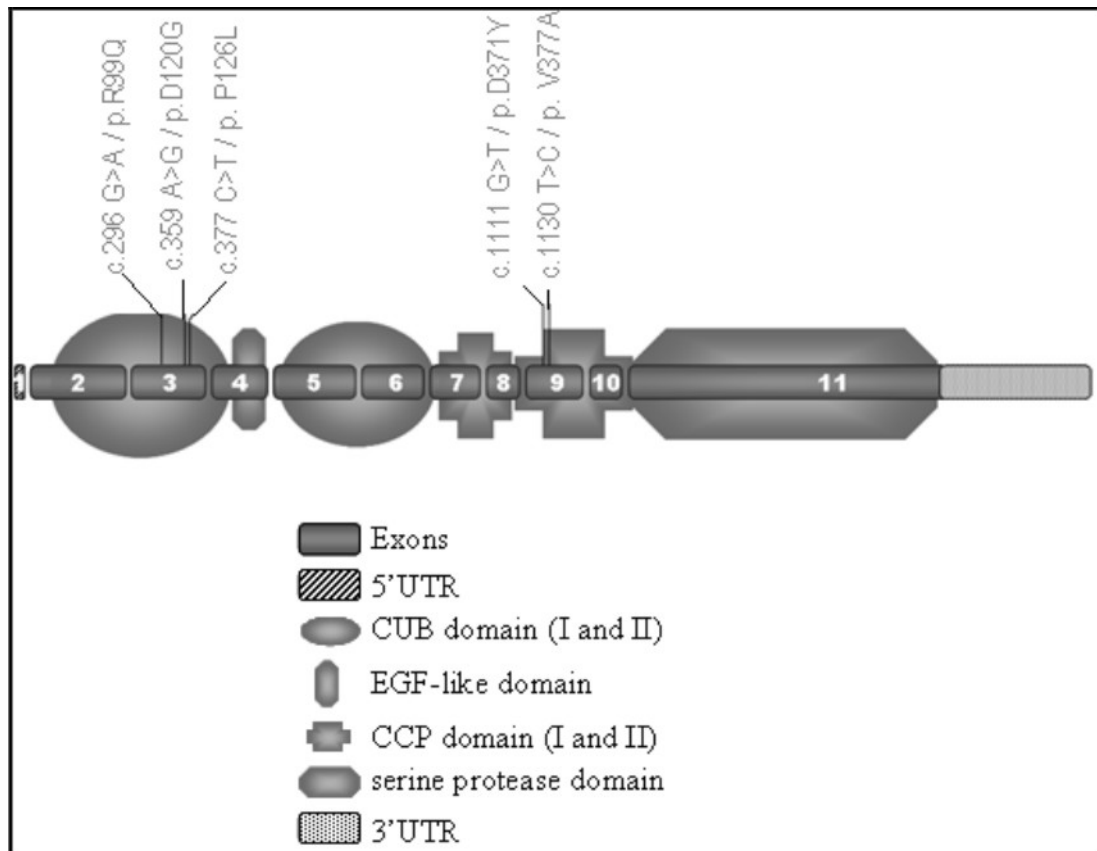


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE *MASP2* EM SOBREPOSIÇÃO A PROTEÍNA MASP-2 OS MARCADORES IDENTIFICADOS NO ESTUDO

Foram submetidas ao sequenciamento direto 3 amostras de cada padrão encontrado em pacientes e 16 amostras dos padrões encontrados em controles (Figura 12).

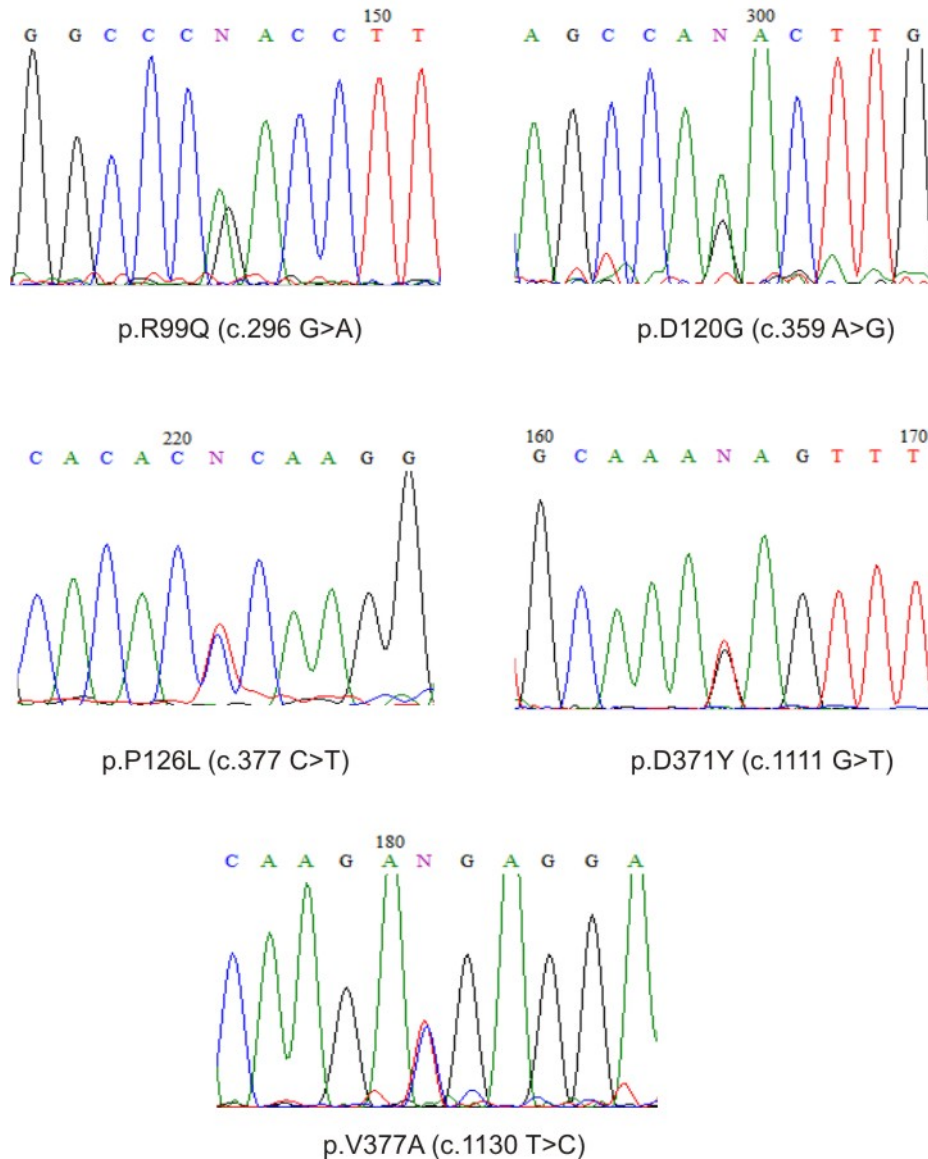


FIGURA 12 - ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS AMPLICONS
 NOTA: Variantes p.R99Q (c.296 G>A), p.D120G (c.359 A>G), p.P126L (c.377 C>T), p.D371Y (c.1111 G>T) e p.D371Y (c.1111 G>T).

Os polimorfismos e a frequência dos alelos foram determinados nos 208 indivíduos analisados, utilizando os modelos de dominância e codominância. Todos os marcadores se apresentaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Observou-se maior frequência de homozigotos e pouca variabilidade destes marcadores entre os grupos analisados. Para os marcadores p.R99Q (c.296G>A) p.D120G (c.359A>G), p.P126L (c.377C>T) e p.V377A (c.1130T>C) não houve diferença significativa entre

os genótipos analisados, tanto em pacientes como em controles ($p=1,0$; $p=1,0$; $p=0,621$ e $p=0,436$, respectivamente) (Tabela 3).

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS PARA O GENE *MASP2* EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E CONTROLES

MARCADOR	GENÓTIPO	PACIENTES		CONTROLES		p ⁽¹⁾
		n	%	n	%	
p.R99Q	GG	103	99,04	104	100,00	1,000
	GA	1	0,96	0	0,00	
	AA	0	0,00	0	0,00	
	AA + GA	1	0,96	0	0,00	
p.D120G	GG	0	0,00	0	0,00	1,000
	GA	2	1,92	2	1,92	
	AA	102	98,08	102	98,08	
	GG + AG	2	1,92	2	1,92	
p. P126L	CC	103	99,04	101	97,12	0,621
	CT	1	0,96	3	2,88	
	TT	0	0,00	0	0,00	
	TT + CT	1	0,96	3	2,88	
p.D371Y	GG	16	15,53	4	3,92	0,008
	GT	35	33,98	47	46,08	
	TT	52	50,49	51	50,00	
	TT + GT	87	84,47	98	96,08	
p. V377A	TT	97	94,17	93	91,18	0,436
	TC	6	5,83	8	7,84	
	CC	0	0,00	1	0,98	
	CC + TC	6	5,83	9	8,82	

(1) p refere-se ao valor estatístico para os genótipos agrupados.

As frequências alélicas tanto dos pacientes como dos controles encontram-se na tabela 4.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS DO GENE *MASP2* EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E CONTROLES

MARCADOR	ALELO	IdSNP	RNAm	PACIENTES		CONTROLES	
				n	%	n	%
p.R99Q	G	rs61735600	c.296 G>A	207	99,52	208	100,00
	A			1	0,48	0	0,00
p.D120G	G	rs72550870	c.359 A>G	2	0,97	2	0,97
	A			206	100,00	206	100,00
p.P126L	C	rs56392418	c.377 C>T	207	100,00	205	98,56
	T			1	0,48	3	1,46
p.D371Y	G	rs12711521	c.1111 G>T	67	32,52	55	26,96
	T			139	67,49	149	73,04
p. V377A	T	rs2273346	c.1130T>C	200	97,09	194	96,00
	C			6	2,90	10	4,90

Na análise da frequência do marcador p.D371Y(c.1111G>T) observou-se diferença significativa entre pacientes e o grupo controle, tanto no modelo considerando dominância de T ($p=0,008$) como no de codominância entre os alelos ($p=0,011$).

Observou-se que para esse marcador, considerando o modelo de dominância de *T*, os indivíduos com os genótipos *T/T* e *G/T* têm menor risco de desenvolver hepatite C crônica (OR= 0,22, IC=95%, 0,07-0,69, p=0,008) quando comparados aos com genótipo *G/G*. Na análise considerando codominância dos genótipos *T/T*, *T/G* e *G/G* desse mesmo marcador, observou-se que os indivíduos com o genótipo *G/G* têm seis vezes mais susceptibilidade à infecção que os controles (OR=6,33; CI 95%=1,85-21,70, p=0,003).

5.2 ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Após os cálculos realizados pelo programa Haploview os resultados permitiram construir um gráfico em forma de diamante para representar a diferença entre os SNPs observados (Figura 13).

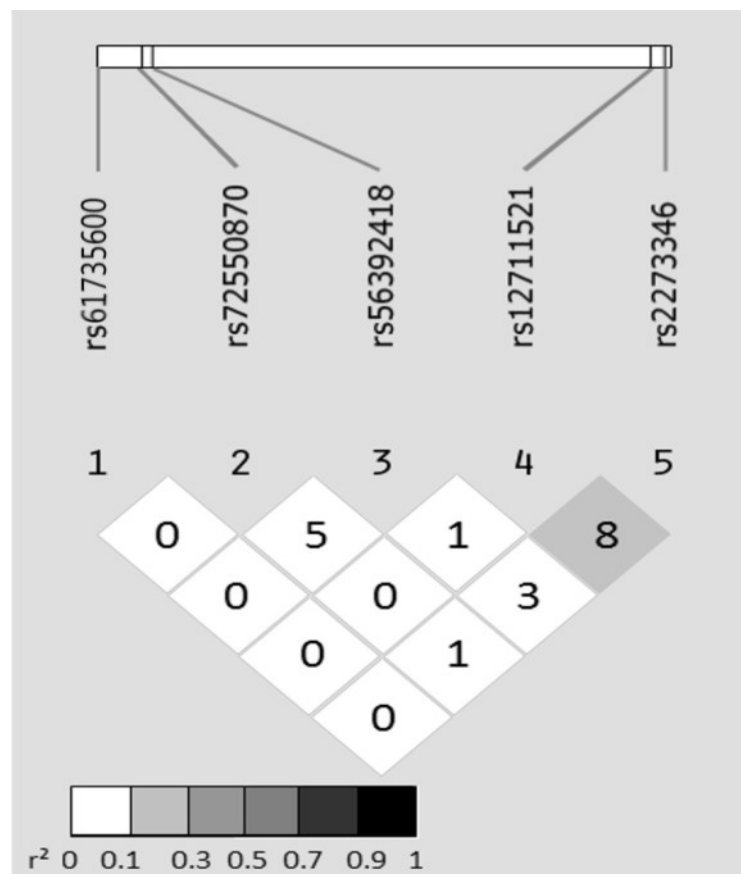


FIGURA 13 - PADRÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE *MASP2*

Os polimorfismos analisados apresentaram r^2 com valor máximo de 0,1. Os quadrados na figura indicam o desequilíbrio de ligação entre o marcador que está à esquerda e o da direita. As tonalidades representam o grau de desequilíbrio, quanto mais escuro maior é o desequilíbrio. Embora haja proximidade entre os alelos não há desvio na frequência alélica esperada, demonstrando a ausência de desequilíbrio de ligação entre eles.

5.3 ANÁLISE *IN SILICO*

Para avaliar uma possível disfunção funcional da proteína MASP-2 provocadas pelas mutações realizou-se uma análise *in silico* dos SNPs, observados utilizando o programa Polyphen (Tabela 5).

TABELA 5 - MODELO *IN SILICO* DO EFEITO DA VARIABILIDADE DO GENE *MASP2* SOBRE A PROTEÍNA

MUTAÇÃO NO GENE <i>MASP2</i>	MARCADOR	DOMÍNIO DA PROTEÍNA	MODELO <i>IN SILICO</i>	
			Previsão	score ⁽¹⁾
c.296G>A	p.R99Q	CUB 1	Benigna	0,30
c.359A>G	p.D120G	CUB 1	Provavelmente danosa	2,82
c.377C>T	p.P126L	CUB 1	Benigna	1,19
c.1111G>T	p.D371Y	CCP2	Benigna	1,37
c.1130T>C	p.V377A	CCP2	Benigna	1,30

(1) Quanto maior o score maior a probabilidade de causar dano funcional à proteína, sendo o valor de corte 1,5.

Observou-se também que há preservação do aminoácido aspartato entre as espécies. Analisando o marcador p.D371Y (c.1111G>T), observou-se também que há grande preservação da unidade de aminoácido aspartato (D) entre as espécies, porém neste marcador houve variação na espécie *Cyprinus carpio* (carpa) na qual, observa-se a alteração da do aminoácido aspartato (D) para glutamato (E).

De acordo com esta análise, apenas o marcador p.D120G (c.359A>G) provocaria um dano funcional à MASP-2 (score 2,82). Embora o score obtido (1,37) não demonstre claramente que a mutação possa causar dano a funcional à proteína, considerando-se que o score acima de 1,5 sugere dano funcional, não se pode

desconsiderar esta possibilidade em condições fisiológicas devido a proximidade do score ao valor de corte 1,5 (Tabela 6).

TABELA 6 - MODELO *IN SILICO* DO EFEITO DA VARIABILIDADE DO GENE *MASP2* SOBRE A UNIDADE DE AMINOÁCIDO MUTANTE

MUTAÇÃO	MARCADOR	SCORE ⁽¹⁾	ALINHAMENTO ENTRE ESPÉCIES			
			<i>Rattus novergicus</i>	<i>Galus galus</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>Cyprinus carpio</i>
c.296G>A	p.R99Q	0,31	R	E	K	D
c.359A>G	p.D120G	2,82	D	D	D	D
c.377C>T	p.P126L	1,19	P	P	E	R
c.1111G>T	p.D371Y	1,37	D	D	D	E
c.1130T>C	p.V377A	1,30	V	I	Y	M

(1) Quanto maior o valor do score maior o dano funcional à proteína

R (Arg) = arginina; E (Glu) = glutamato; K (Lis) = lisina; D (Asp) = aspartato; P (Pro) = prolina;

V (Val) = valina; I (Ile) = isoleucina; Y (Tir) = tirosina; M (Met) = metionina.

5.4 GENÓTIPOS DOS MARCADORES p.D371Y (C.1111G>T) E p.V377A (c.1130T>C) E A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA

A determinação da concentração sérica de MASP-2 foi realizada em 69 pacientes e apresentou valor médio de 316,5ng/mL (82,0ng/mL a 886,0ng/mL).

Devido à baixa variabilidade genotípica observada em alguns dos marcadores identificados só foi possível realizar os cálculos estatísticos para os marcadores p.D371Y (c.1111G>T) e p.V377A (c.1130T>C). Para fins estatísticos foram considerados apenas os genótipos *T/T* e *G/T* para o marcador p.D371Y (c.1111G>T), devido ao número reduzido de indivíduos com o genótipo *GG* e para o marcador p.V377A (c.1130T>C) os genótipos *T/T* e *T/C* devido a ausência de indivíduos com o genótipo *C/C*. Na análise da concentração sérica de MASP-2 realizada em 69 pacientes com hepatite C portadores da variante p.D371Y (c.1111G>T) observou-se uma concentração significativamente menor da proteína nos pacientes com o genótipo *T/T* ($p < 0,001$) em relação a *G/T* (Tabela 7), (Figura 14).

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E O MARCADOR p.D371Y (c.1111G>T)

GENÓTIPO DE MASP2 p.D371Y	PACIENTES		CONCENTRAÇÃO DE MASP-2 ng/mL
	n	%	
T/T	38	55,07	228,63±74,97
G/T	27	39,13	341,56±127,18
G/G	4	5,8	357,0±369,70

NOTA: $p < 0,001$ (Teste T de Student, quando comparados genótipos T/T e G/T em relação à concentração sérica de MASP-2).

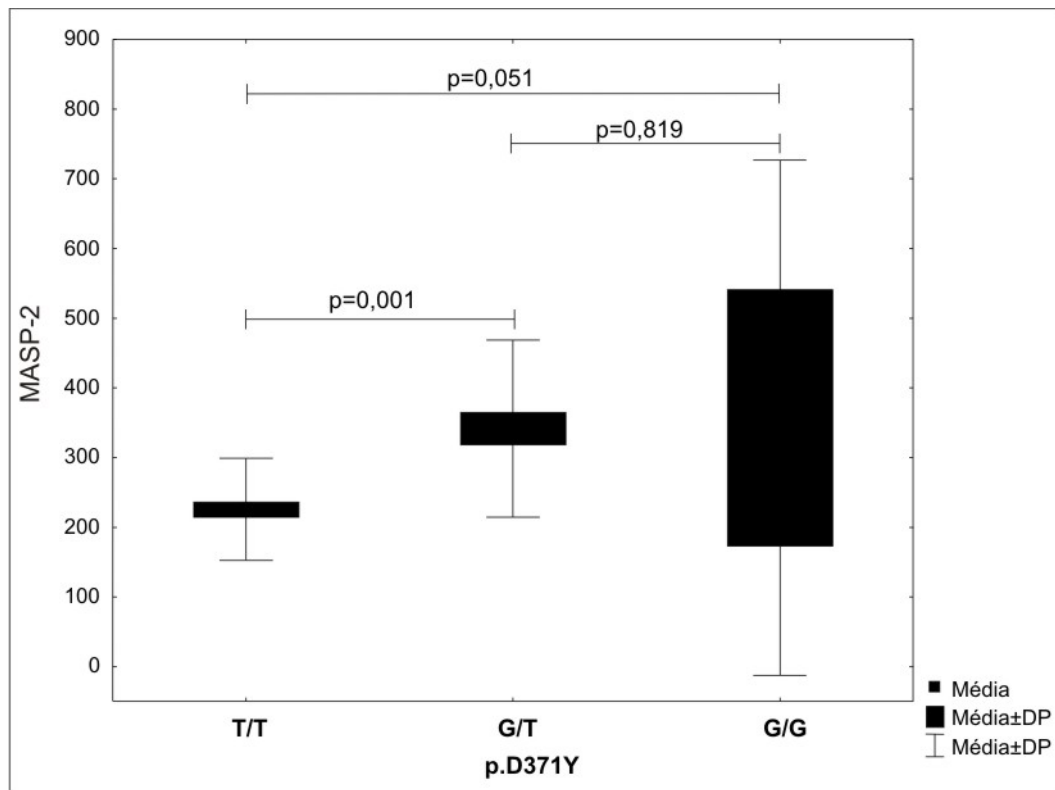


FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E A VARIANTE p.D371Y (c.1111 G>T)

NOTA: Teste T de Student, sendo $p < 0,001$ quando comparados genótipos T/T e G/T, $p = 0,819$ quando comparados G/G e G/T e $p = 0,051$ quando comparados G/G e T/T em relação a concentração sérica de MASP-2.

Com relação a variante p.V377A (c.1130T>C) não houve diferença significativa entre os genótipos T/T e T/C ($p = 0,266$). O genótipo C/C não foi observado na população analisada (Tabela 8).

TABELA 8 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E O MARCADOR p.V377A (c.1130T>C)

GENÓTIPO DE MASP2 p.D371Y	PACIENTES		CONCENTRAÇÃO DE MASP-2 ng/mL
	n	%	
T/T	62	93,94	272,32±115,09
T/C	4	6,06	319,75±68,02
C/C	0	0,00	0 (0,00)

NOTA: $p=0,266$ (Teste T de Student, quando comparados genótipos T/T e T/C em relação a concentração sérica de MASP-2).

5.5 ANÁLISE DO GRAU DE FIBROSE EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E OS MARCADORES p.D371Y (c.111G>T) E p.V377A (c.1130T>C)

Nem todos os marcadores puderam ser analisados estatisticamente devido à baixa frequência encontrada. O grau de fibrose foi analisado apenas nos pacientes em relação aos marcadores p.D371Y (c.1111G>T) e p.V377 (c.1130T>C). Foram avaliados 69 pacientes com fibrose, sendo 20 (28,9%) com fibrose grau 2, 23 (33,4%) com fibrose grau 3 e 26 (37,7%) com fibrose grau 4. Para fins estatísticos, foram considerados apenas os genótipos T/T e G/T para o marcador p.D371Y (c.1111G>T); T/T e T/C para o marcador p.V377A (c.1130T>C). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grau de fibrose e a presença dos polimorfismos de p.D371Y (c.1111G>T) ($p=0,087$) (Tabela 9) e p.V377A (c.1130T>C), $p=0,070$ (Tabela 10).

TABELA 9 - ANÁLISE DO GRAU FIBROSE EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.D371Y (c.1111G>T)

GENÓTIPO DE MASP2	FIBROSE GRAU 2		FIBROSE GRAU 3		FIBROSE GRAU 4	
	n	% genótipo	n	% genótipo	n	% genótipo
T/T	10	27,2	9	24,2	18	48,6
G/T	6	25,0	12	50,0	6	25,0
G/G	4	50,0	2	25,0	2	25,0

NOTA: Teste χ^2 , $p=0,087$ para os genótipos T/T e G/T; $p=0,135$ para os genótipos T/T e G/T e G/G em relação ao grau de fibrose.

TABELA 10 - ANÁLISE DO GRAU FIBROSE EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.V377A (c.1130T>C)

GENÓTIPO DE MASP2	FIBROSE GRAU 2		FIBROSE GRAU 3		FIBROSE GRAU 4	
	n	% genótipo	n	% genótipo	n	% genótipo
T/T	17	26,2	22	33,8	26	40,0
T/C	3	75,0	1	25,0	0	0,00
C/C	0	0,00	0	0,00	0	0,00

NOTA: Teste exato de Fisher $p=0,070$ agrupando os graus 3 e 4 de fibrose em relação aos genótipos T/T e T/C.

5.6 ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AOS MARCADORES p.D371Y (c.1111G>T) E p.V377A (c.1130T>C)

A resposta ao tratamento com IFN pôde ser estatisticamente analisada em 51 pacientes para os marcadores p.D371Y (c.1111G>T) genótipos T/T e G/T (Tabela 11) e para p.V377A (c.1130T>C) (Tabela 12), considerando os genótipos T/T e T/C.

Observou-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os genótipos analisados e a resposta ao tratamento com IFN nesses pacientes ($p=0,565$ e $p=0,489$, respectivamente).

TABELA 11 - ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.V371Y (c.1111G>T)

GENÓTIPO DE MASP2	RESPOSTA AO TRATAMENTO		AUSÊNCIA DE RESPOSTA	
	n	% genótipo	n	% genótipo
T/T	13	43,4	17	56,6
G/T	6	35,3	11	64,7
G/G	2	50,0	2	50,0

NOTA: Teste exato de Fisher, $p= 0,565$ para os genótipos T/T e G/T em relação a resposta ao tratamento com IFN.

TABELA 12 - ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IFN EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR p.V377A (c.1130T>C)

GENÓTIPO DE <i>MASP2</i>	RESPOSTA AO TRATAMENTO		AUSÊNCIA DE RESPOSTA	
	n	% genótipo	n	% genótipo
<i>T/T</i>	20	40,0	30	60,0
<i>T/C</i>	0	0,0	1	100,0
<i>C/C</i>	0	0,0	0	0,0

NOTA: Teste exato de Fisher, $p=0,489$ para os genótipos *T/T* e *T/C* em relação ao tratamento com IFN.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados para aprimorar a compreensão sobre a estrutura molecular e a capacidade funcional da proteína MASP-2 na ativação do sistema complemento e sua participação em doenças inflamatórias e infecciosas como a hepatite C. Recentemente Brown *et al.* (2010) ao realizarem estudo *in vitro* relataram que a MBL pode neutralizar o vírus da hepatite C ao se ligar as glicoproteínas E1/E2 presentes no envelope viral e essa interação MBL-HCV resultaria na ativação da via das lectinas. No entanto, até o momento, a relação entre os polimorfismos do gene *MASP2* e a hepatite C crônica ainda não havia sido estudado.

Neste trabalho observou-se pela primeira vez uma associação entre as variantes do gene *MASP2* e a hepatite C crônica. Foram caracterizados cinco polimorfismos do gene *MASP2*, p.R99Q (c.296G>A), p.D120G (c.359A>G), p.P126L (c.377C>T), p.D371Y (c.1111G>T) e p.V377A (c.1130). Esses polimorfismos têm sido amplamente descritos em diferentes populações e representam variações genéticas comumente encontradas. Neste estudo, não foi observada nenhuma mutação nova, tanto em pacientes com hepatite C crônica, como em controles saudáveis. Embora a técnica PCR-SSP apresente boa sensibilidade, algumas mutações podem não ter sido detectadas nas análises do amplicon com mais de 300pb.

A frequência genotípica dos marcadores analisados corrobora os resultados relatados anteriormente em populações europeias (THIEL *et al.*, 2007; SCHAFRANSKI *et al.*, 2008). Observou-se diferença significativa para o marcador p.D371Y (c.1111G>T) ($p=0,008$) que faz parte do domínio CCP2. Embora esse estudo tenha analisado apenas 103 indivíduos, o poder da amostra para este marcador foi de 73,23%.

Apesar de Thiel *et al.* (2007) não terem observado alteração funcional em mutações ocorridas no domínio CCP2, suas conclusões estão baseadas apenas em resultados obtidos por experimentos realizados com mutagênese sítio dirigida e provavelmente o DNA original não apresentava a mutação p.D371Y. Portanto, seria necessário realizar outros estudos para comprovar essa hipótese. De acordo com os autores, a troca entre o aminoácido aspartato (D) para tirosina (Y), que ocorre na espécie humana para p.D371Y (c.1111G>T), não afetaria a estrutura da proteína e,

portanto, não haveria razão para justificar uma alteração funcional. No entanto, há uma diferença estrutural entre os aminoácidos aspartato e tirosina. O aspartato pertence ao grupo de aminoácidos carregados negativamente e a tirosina, ao grupo dos polares não carregados isto é, eles interagem com água de forma diferente em pH fisiológico.

No presente estudo, realizou-se a análise *in silico* para verificação de efeito da mutação sobre a proteína MASP-2 e observou-se *score* elevado tanto para o marcador p.D120G (c.359A>G), *score*=2,82, como para o p.D371Y (c.1111G>T), *score*=1,37. Embora os resultados dessa análise permitam inferir que a mutação p.D371Y (c.1111G>T) não cause danos estruturais à proteína ao ponto de impedir sua ligação a MBL/ficolinas, pode-se sugerir que esse *score*, por estar próximo ao valor 1,5, indique que a presença dessa mutação possa ser funcionalmente importante. No entanto, é necessário a realização de estudos complementares e/ou análises *in vitro* para confirmar essa hipótese.

Além disso, a variante D na posição 371 é bastante preservada em quase todas as espécies analisadas: *Rattus norvegicus*, *Galus galus*, *Xenopus tropicalis*. Com exceção da espécie *Cyprinus carpio*, que apresentou o aminoácido glutamato (E) nessa posição, todas as outras apresentaram o aminoácido aspartato (D) na posição equivalente a 371 em humanos. A preservação do aminoácido indica que essa região é estruturalmente importante para a atividade funcional da proteína. Tanto o glutamato como o aspartato tem características muito semelhantes, dentre elas pode-se destacar: presença de grupos R carregados negativamente (caráter ácido) e comportamento ácido-base. Esta semelhança no comportamento ácido-base deve-se aos valores pK (D: pK=2,09, E: pK=2,19). Isto quer dizer que, apresentam semelhança de sinal e de intensidade de cargas elétricas líquidas em um dado valor de pH, corroborando a importância da similaridade nessa posição para manter a atividade funcional da proteína. É provável que estas pequenas diferenças químicas entre os aminoácidos possam gerar alteração no sítio catalítico de MASP-2 no momento da interação com MBL/ficolinas e que isso interfira na ativação do sistema complemento. No entanto, salienta-se que esta alteração funcional parece depender do genótipo desse marcador.

A relação entre a presença das variantes do gene *MASP2* e possíveis alterações funcionais da proteína têm sido objetivo de muitos estudos (THIEL *et al.*, 2007; SORENSEN *et al.*, 2006; SEGAT *et al.*, 2008; SCHAFRANSKI *et al.*, 2008;

VALLÈS *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dos artigos tem responsabilizado apenas as mutações que ocorrem no domínio CUB1, principalmente p.D120G (c.359A>G), pelas alterações funcionais da proteína (STENGAARD-PEDERSEN *et al.*, 2003; THIEL *et al.*, 2007; THIEL *et al.*, 2009). De acordo com Thiel *et al.* (2009), a mutação p.D120G (c.359A>G) no domínio CUB1 impede a associação de MASP-2 com MBL/ficolinas e pode prejudicar a ativação de C4 pela via das lectinas.

Não há estudos anteriores relacionando polimorfismos de *MASP2* e a hepatite C crônica. SEGAT *et al.* (2008), estudando os polimorfismos p.D120G (c. 359A>G) e p.D371Y (c.1111G>T) em pacientes com carcinoma hepatocelular, não encontraram associação entre os genótipos analisados e a doença, embora nesse caso nem todos os indivíduos estivessem infectados com o HCV.

No presente estudo, não foi observado diferença estatisticamente significativa para p.D120G (c.359A>G) entre pacientes e controles ($p=1,000$) (Tabela 3).

Analisando os genótipos do marcador p.D371Y (c.1111G>T) e sua relação com a susceptibilidade à doença, observou-se que indivíduos apresentando o genótipo G/G apresentam um risco aumentado em seis vezes associado a susceptibilidade à hepatite C crônica quando comparado aos controles (OR=6,33; CI 95%=1,85-21,7; $p=0,003$), considerando codominância dos genótipos T/T, T/G e G/G. Portanto, o genótipo G/G se apresenta como um fator de risco associado ao desenvolvimento da hepatite c crônica.

A inexistência do desequilíbrio de ligação entre os cinco polimorfismos investigados no presente estudo ($r^2 = \text{máximo } 0,1$), reforça a importância da mutação p.D371Y (c.1111G>T) para a proteína MASP-2.

Na análise estatística da concentração sérica de MASP-2 em relação aos marcadores p.D371Y(c.1111G>T) e p.V377A (c.1130T>C) nos pacientes, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os genótipos T/T e G/T ($p<0,001$) de p.D371Y(c.1111G>T). Os pacientes com o genótipo T/T, apresentaram valor médio mais baixo de MASP-2 sérica (228,63 ng/mL) em relação aos pacientes com os genótipos G/T e G/G (341,5 e 357,0 ng/mL, respectivamente, (Tabela 7). Portanto, a presença do genótipo G/G pode estar relacionada a uma atividade pró-inflamatória nesses pacientes podendo aumentar a susceptibilidade à hepatite C crônica.

A protease MASP-2 se associa com alta afinidade à molécula de MBL por meio dos domínios CUB-EGF e por isso é encontrada em ínfimas concentrações no plasma (nanogramas).

O aumento da sua concentração não está diretamente relacionado a uma maior ativação da MBL/ficolinas (THIELENS *et al.*, 2001), corroborando a hipótese do dano funcional à MASP-2 na presença do marcador p.D371Y.

Em um estudo relacionando o polimorfismo do gene *MASP2* e a concentração sérica da proteína, relatou-se que tanto a concentração sérica como a atividade funcional de MASP-2 são predominantemente influenciadas pelo genótipo. Deste modo, a concentração sérica de MASP-2 não está diretamente relacionada à atividade da proteína, no entanto, a variação genética pode influenciar a susceptibilidade às infecções (SORENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005).

Thiel *et al.* (2007) analisaram indivíduos saudáveis de diferentes etnias para p.D371Y(c.1111G>T) e não observaram diferença entre a concentração sérica da proteína e esse marcador nas populações estudadas. No entanto, os níveis séricos de MASP-2 estavam reduzidos em indivíduos com o marcador p.V377A (c.1130T>C).

Em relação à fibrose, estudos anteriores demonstraram que a ativação do sistema complemento, especialmente de MBL/MASP1 e C5, poderia estar associado ao desenvolvimento da fibrose hepática. No entanto, nesses estudos não foi encontrado relação entre MASP-2 e a fibrose hepática (QIN; GAO, 2006; HILLEBRANDT *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2007).

Corroborando esses resultados, no presente trabalho, não foi possível relacionar o grau de fibrose hepática à presença dos marcadores p.D371Y (c.1111G>T) ou p.V377A (c.1130T>C) ($p=0,135$ e $0,070$, respectivamente). Portanto, o polimorfismo de *MASP2* parece não influenciar o desenvolvimento da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

Analisando-se a resposta ao tratamento com IFN e ribavirina em 51 pacientes acompanhados, observou-se que a presença do marcador p.D371Y (c.1111G>T), independente do genótipo analisado, não interferiu na resposta positiva ao tratamento ($p=0,565$). Embora o número de pacientes acompanhados seja pequeno e não haja estudos relacionando polimorfismo de *MASP2* e o tratamento para hepatite C crônica, pode-se sugerir que a resposta ao tratamento não depende de MASP-2.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam um papel imunomodulador do gene *MASP2*, influenciado pela variação genotípica, no desenvolvimento da hepatite C crônica e abrem novas perspectivas para que outros estudos sejam realizados com o objetivo de investigar a relação entre as mutações de *MASP2* e susceptibilidade à doenças. É interessante salientar que a análise do polimorfismo

gênico permite identificar prováveis defeitos funcionais e/ou estruturais da proteína. Estes dados são necessários para entender melhor a participação dos componentes da via das lectinas nas doenças infecciosas.

7 CONCLUSÕES

- Foi observada diferença estatisticamente significativa para o genótipo G/G do marcador p.D371Y (c.1111G>T) entre pacientes com hepatite C crônica e controles $p < 0,008$. Esse genótipo está associado ao aumento de risco para o desenvolvimento da hepatite C crônica ($p = 0,003$ -OR=6,33; CI 95%= 1,85-21,70).
- Houve associação entre a concentração sérica de MASP-2 e p.D371Y (c.1111G>T) nos pacientes com hepatite c crônica, $p < 0,001$, pacientes com o genótipo G/G apresentaram maior concentração de MASP-2 sérica.
- Não houve associação entre o grau de fibrose hepática, o tratamento com IFN e ribavirina e os polimorfismos de p.D371Y(c.1111G>T) e p.V377A (c.1130T>C) de *MASP2*.
- A técnica de PCR-SSCP apresentou bom desempenho na identificação de mutações gênicas e permitiu caracterizar cinco mutações do gene *MASP2*: três no éxon 3 (domínio CUB1 da proteína) sendo p.R99Q (c.296G>A; rs61735600), p.D120G (c.359A>G;rs72550870), p.P126L (c.377C>T; rs56392418) e duas no éxon 9 (no domínio CCP2 da proteína) sendo p.D371Y (c.1111G>T;rs1271152) e p.V377A (c.1130T>C;rs2273346).
- Os resultados indicam um papel imunomodulador do gene *MASP2*, influenciado pela variação genotípica, no desenvolvimento da hepatite C crônica.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ALCAMI, A.; KOSZINOWSKI, U. H. Viral mechanisms of immune evasion. **Immunol Today**, v.21, p.447-455, 2000.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v.24, n.2, p.289-293, 1996.

BOLDT, A. B.; LUZ, P. R.; MESSIAS-REASON, I. J. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **Clin Immunol**, v.140, p.63-70, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 639. Anexo I: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da hepatite viral crônica tipo C. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.34, 26 jun. 2000.

BROWN, K. S.; KEOGH, M. J.; OWSIANKA, A. M.; ADAIR, R.; ARNOLD, J. N.; SIM, R. B.; TARR, A. W.; HICKLING, T. P. Specific interaction of hepatitis C virus glycoproteins with mannan binding lectin inhibits virus entry. **Protein Cell**, v.1, p.664-674, 2010.

BROWN, K. S.; KEOGH, M. J.; TAGIURI, N.; GRAINGE, M. J.; PRESANIS, J. S.; RYDER, S. D.; IRVING, W. L.; BALL, J. K.; SIM, R. B.; HICKLING, T. P.; Severe fibrosis in hepatitis C virus-infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex. **Clin Exp Immunol**, v.147, suppl 1, p.90-98, 2007.

CARLSSON, M.; SJÖHOLM, A. G.; ERIKSSON, L.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C.; SEGELMARK, M.; TRUEDSSON, L. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. **Clin Exp Immunol**, v.139, suppl 2, p.306-313, 2005.

CEDZYNSKI, M.; SZEMRAJ, J.; SWIERZKO, A. S.; BAK-ROMANISZYN, L.; BANASIK, M.; ZEMAN, K.; KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. **Clin Exp Immunol**, v.136, suppl 2, p.304-311, 2004.

CHANG, K. M. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin Liver Dis**, v.7, suppl 1, p.89-105, 2003.

COLTEN, H. R.; DOWTON, S. B. Regulation of complement gene expression. **Biochem Soc Symp**, v.51, p.37-46, 1986.

COMPLEXO de ataque à membrana. Disponível em: <<http://www.rbi.fmrp.usp.br/immunobiol>>. Acesso em: 14 abr. 2011.

COOPER, N. R.; NEMEROW, G. R. The role of antibody and complement in the control of viral infections. **J Invest Dermatol**, v.83, suppl1, p.121s-127s, 1984.

DUMESTRE-PERARD, C.; PONARD, D.; DROUET, C.; LEROY, V.; J-P ZARSKI, J. P.; DUTERTRE, N.; COLOMB, N. G; Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. **Clin Exp Immunol**, v.127, p.131-136, 2002.

DUNBAR, B. S.; LIU, C.; SAMMONS, D. W. Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucidae by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular, fluid, and ovarian cell proteins. **Biol Reprod**, v.24, n.5, p.1111-1124, 1981.

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

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu Rev Immunol**, v.25, p.71-99, 2007.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C: Paris 26-28, 1999. **J Hepatol**, v.30, n.5, p.956-961, 1999.

FLEMING, S. D.; TSOKOS, G. C. Complement, natural antibodies, autoantibodies and tissue injury. **Autoimmun Rev**, v.5, suppl 2, p.89-92, 2006.

FORTE, W. N. **Imunologia básica e aplicada**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FOSTER, G. R. Pegylated interferon with ribavirin therapy for chronic infection with the hepatitis C virus. **Exper T Opin Pharmacother**, v.4, p.685-691, 2003.

FRANK, M. M.; ATKINSON, J. P. Complement System. In: AUSTEN, K. F.; FRANK, M. M.; ATKINSON, J. P.; CANTOR, H. I. **Samter's Immunologic Disease**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.349-358. v.1.

FRIED, M. W.; SHIFFMAN, M. L.; REDDY, K. R.; SMITH, C.; MARINOS, G.; GONÇALES, F. L. JR.; HÄUSSINGER, D.; DIAGO, M.; CAROSI, G.; DHUMEAUX, D.; CRAXI, A.; LIN, A.; HOFFMA, J.; YU, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.347, p.975-982, 2002.

GARRED, P.; LARSEN, F.; SEYFARTH, J. R.; FUJITA, R.; MADSEN, H. O. Mannose-binding lectin and its genetic variants. **Genes and Immunity**, v.7, p.85-94, 2006.

GOWANS, E. L.; Distribution of markers of hepatitis C infection throughout the body. **Semin Liver Dis**, v.20, p.85-102, 2000.

GREMION, C.; CERNY, A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. **Rev Med Virol**, v.15, suppl 4, p.235-268, 2005.

HAHN, J. A. Sex, drugs and hepatitis C virus. **J Infect Dis**, v.1, p.1556-59, 2007.

HALLA, M. C.; DO CARMO, R. F.; SILVA, V. L. R.; DE SIQUEIRA, E. R.; PEREIRA, L. M.; MENDONÇA, C. M. S. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. **Hum Immunol**, v.71, suppl 9, p.883-7, 2010.

HERZER, K.; SPRINZL, M. F.; GALLE, P. R. Hepatitis viruses: live and let die. **Liver Int**, v.27, suppl 3, p.293-301, 2007.

HILLEBRANDT, S.; WASMUTH, H. E.; WEISKIRCHEN, R.; HELLERBRAND, C.; KEPPELER, H.; WERTH, A.; SCHIRIN-SOKHAN, R.; WILKENS, G.; GEIER, A.; LORENZEN, J.; KÖHL, J.; GRESSNER, A. M.; MATERN, S.; LAMMERT, F. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. **Nat Genet**, v.37, suppl 8, p.835-843, 2005.

HOUGHTON, M. Discovery of the hepatitis C virus. **Liver Int**, v.29, suppl 1, p.82-88, 2009.

HÜGLE, T.; CERNY, A. Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. **Rev Med Virol**, v.13, suppl 6, p.361-371, 2003.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R. N. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Hepatology**, v.22, n.6, p.696-699, 1995.

ITOH, K.; TANAKA, H. Hypocomplementemia associated with hepatitis C viremia in sera from voluntary blood donors. **Am J Gastroenterol**, v.89, p.2019-2024, 1994.

KIRSCHFINK, M.; MOLLNES, T. E. Modern complement analysis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.10, n.6, p.982-989, 2003.

KJAERGARD, L.; KROGSGAARD, K.; GLUUD, C. Interferon alpha with or without ribavirin for chronic hepatitis C: systematic re view of randomized trials. **BMJ**, v.323, p.1151-5, 2001.

LAHIRI, D. K.; NURBERGER, J. I. JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v.11, n.19, p.5444, 1991.

LEPOW, I. H.; PILLEMER, L. Properdin, and scientific controversy. **J Immunol**, v.125, p.471-475, 1980.

LIU, B.; ZHANG, J.; TAN, P. Y.; HSU, D.; BLOM, A. M.; LEONG, B.; SETHI, S.; HO, B.; DING, J. L.; THIAGARAJAN, P. S. A computational and experimental study of the regulatory mechanisms of the complement system. **PLoS Comput Biol**, v.20, n.7, p.e10101059, 2011.

LOZANO, F.; SUAREZ, B.; MUNOZ, A.; JENSENIUS, J. C.; MENSA, J.; VIVES, J.; HORCAJADA, J. P. Novel MASP-2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. **Tissue antigens**, v.66, p.131-135, 2005.

LUBINSKI, J.; NAGASHUNMUGAM, T.; FRIEDMAN, H. M. Viral interference with antibody and complement. **Semin Cell Dev Biol**, v.9, p.329-337, 1998.

MAECKER, H. T.; TODD, S. C.; LEVY, S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. **FASEB J**, v.11, n.6, p.428-42, 1997.

MARCELLIN, P.; BOYER, N.; GER VAIS, A.; MAR TINOT, M.; POUTEAU, M.; CASTELNAU, C.; KILANI, A.; AREIAS, J.; AUPERIN, A.; BENHAMOU, J. P.; DEGOTT, C.; ERLINGER, S. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. **Ann Intern Med**, v.127, p.875-881, 1997.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Ficolins and the lectin complement pathway. **Immunol Rev**, v.180, p.78-85, 2001.

MORGAN, B. P.; HARRIS, C. L. Complement regulators and micro-organisms. In: _____. **Complement regulatory proteins**. San Diego: Academic Press, 1999. p.207-225.

OHSAWA, I.; OHI, H.; TAMANO, M.; ENDO, M.; FUJITA, T.; SATOMURA, A.; HIDAKA, M.; FUKE, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Cryoprecipitate of patients with cryoglobulinemic glomerulonephritis contains molecules of lectin complement pathway. **Clin Immunol**, v.101, p.59-66, 2001.

OLESEN, H. V.; JENSENIUS, J. C.; STEFFENSEN, R.; THIEL, S.; SCHIOTZ, P. O. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis-dysfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2). **Clin Immunol**, v.121, n.3, p.324-331, 2006.

OLIVEIRA, L. O. S. **Virologia humana**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. p.299-300.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. DNA sequence polymorphisms in Alu repeats. **Genomics**, v.5, p.874-79, 1989.

PEDROSO, A. M. L.; BOLDT, A. B. W.; PEREIRA-FERRARI, L.; STEFFENSEN R.; STRAUSS, E.; JENSENIUS, J. C.; IOSHII, S. O.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin *MBL2* gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. **Clin Exp Immunol**, v.152, p.258-264, 2008.

QIN, X.; GAO, B. The complement system in liver diseases. **Cell Mol Immunol**, v.3, n.5, p.333-340, 2006.

REHERMANN, B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. **J Clin Invest**, v.119, n.7, p.1745-1754, 2009.

ROSS, G. D. Introduction and history of complement research. **Clin Microb Rev**, v.4, p.359-395, 1991.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.29, n.239, p.487-491, 1988.

SASAKI, K.; TSUTSUMI, A.; WAKAMIYA, N.; OHTANI, K.; SUZUKI, Y.; WATANABE, Y.; NAKAYAMA, N.; KOIKE, T. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. **Scand J Gastroenterol**, v.35, p.960-965, 2000.

SCHAFRANSKI, M. D.; PERREIRA, F. L.; TORRES, R.; MESSIAS-REASON, I. J. Functional MASP2 gene polymorphism in patients with history of rheumatic fever. **Hum Immunol**, v.69, n.1, p.41-44, 2008.

SCHRÖDER, A. J.; BLAHETA, R. A.; SCHOLZ, M.; KRONENBERGER, B.; ENCKE, A.; MARKUS, B. H. Effects of proinflammatory cytokines on cultivated primary human hepatocytes. Fluorometric measurement of intercellular adhesion molecule-1 and human leukocyte antigen-A, -B, -C, and -DR expression. **Transplantation**, v.59, p.1023-1028, 1995.

SEGAT, L.; FABRIS, A.; PADOVAN, L.; MILANESE, M.; PIRULLI, D.; LUPO, F.; SALIZZONI, M.; AMOROSO, A.; CROVELLA, S. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. **J Viral Hepat**, v.15, n.5, p.387-391, 2008.

SILVA, L. C. Drogas utilizadas no tratamento das hepatites crônicas: alguns aspectos farmacológicos. In: _____. **Hepatites agudas e crônicas**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p.273-281.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D. G.; OKAMOTO, H.; PAWLITSKY, J. M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L. J.; THIEL, H. J.; VIAZOV, S.; WEINER, A. J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v.42, n.4, p.962-973, 2005.

SORENSEN, C. M.; HANSEN, T.K.; STEFFENSEN, R.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. **Clin Exp Immunol**, v.145, suppl 1, p.173-182, 2006.

SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. **Springer Semin Immun**, v.27, p.299-319, 2005.

STENGAARD-PEDERSEN, K.; THIEL, S.; GADJEVA, M.; MOLLER-KRISTENSEN, M.; SORENSEN, R.; JUNSEN, L.; SJÖHOLM, A.; FUGGER, L.; JENSENIUS, J. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease-2. **N Engl J Med**, v.349, p.554-560, 2003.

STITES, P. D.; TERR, I. A.; PARSLOW, T. G. **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p.122-124.

STOERMER, K. A.; MORRISON, T. E. Complement and viral pathogenesis. **Virology**, v.15, p.362-373, 2011.

STOVER, M. C.; THIEL, S.; THELEN, M.; LYNCH, N. J.; VORUP-JENSEN, T.; JENSENIUS, J. C.; SCHWAEBLE, W. J. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **J Immunol**, v.162, p.3481-3490, 1999.

TAKAHASHI, K. I. P. W. E.; MICHELOW, I. C.; EZEKOWITZ, R. A. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. **Curr Opin Immunol**, v.18, n.1, p.16-23, 2006.

TEILLET, F.; LACROIX, M.; THIEL, S.; WEILGUNY, D.; AGGER, T.; ARLAUD, G. J.; THIELENS, N. M. Identification of the site of human mannan-binding lectin involved in the interaction with its partner serine proteases: the essential role of Lys55. **J Immunol**, v.178, n.9, p.5710-5716, 2007.

THIEL, S.; KOLEV, M.; DEGN, S.; STEFFENSEN, R.; HANSEN, A. G.; RUSEVA, M.; JENSENIUS, J. C. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. **J Immunol**, v.182, n.5, p.2939-2947, 2009.

THIEL, S.; STEFFENSEN, R.; CHRISTENSEN, I. J. I. P. W. K.; LAU, Y. L.; REASON, I. J.; EIBERG, H.; GADJEVA, M.; RUSEVA, M.; JENSENIUS, J. C. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes Immun**, v.8, n.2, p.154-163, 2007.

THIELENS, N. M.; CSEH, S.; THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; ROSSI, V.; JENSENIUS, J. C.; ARLAUD, G. J. Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL. **J Immunol**, v.166, n.8, p.5068-5077, 2001.

UEDA, K.; NAKAJIMA, H.; NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, A. The association between hepatitis C virus infection and in vitro activation of the complement system. **Ann Clin Biochem**, v.30, p.565-9, 1993.

UEDA, K.; NAKAJIMA, H.; NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, A. The association of complement activation at a low temperature with hepatitis C virus infection in comparison with cryoglobulin. **Clin Exp Immunol**, v.101, p.284-287, 1995.

VALLÈS, X.; SARRIAS, M. R.; CASALS, F.; FARNÓS, M.; PIÑER, R.; SUÁREZ, B.; MORAIS, L.; MANDOMANDO, I.; SIGAÚQUE, B.; ROCA, A.; ALONSO, P. L.; TORRES, A.; THIELENS, N. M.; LOZANO, F. Genetic and structural analysis of MBL2 and MASP2 polymorphisms in south-eastern African children. **Tissue Antigens**, v.74, n.4, p.298-307, 2009.

VÍRUS DA HEPATITE C. Disponível em: <www.bbm1.ucm.es/public_html/res/prot/virprot.html>. Acesso em: 14 abr. 2011.

VON HAHN, T.; YOON, J. C.; ALTER, H.; RICE, C. M.; REHERMANN, B.; BALFE, P.; MCKEATING, J. A. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. **Gastroenterology**, v.132, n.2, p.667-678, 2007.

WALLIS, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. **Immunobiology**, v.212, n.4-5, p.289-299, 2007.

WALLIS, R.; MITCHELL, D.A.; SCHMID, R.; SCHWAEBLE, W. J.; KEEBLE, A. H. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. **Immunobiology**, v.215, n.1, p.1-11, 2010.

WALPORT, M. Complement-First of two parts. **N Engl J Med**, v.344, n.14, p.1058-1065, 2001.

WANG, H.; NETSKI, D. M.; ASTEMBORSKI, J.; MEHTA, S. H.; TORBENSON, M. S.; THOMAS, D. L.; RAY, S. C. Progression of fibrosis during chronic hepatitis C is associated with rapid virus evolution. **J Virol**, v.81, n.12 p.6513-6522, 2007.

WEI, G.; YANO, S.; KUROIWA, T.; HIROMURA, K.; MAEZAWA, A. Hepatitis C virus (HCV)-induced IgG-IgM rheumatoid factor (RF) complex may be the main causal factor for cold-dependent activation of complement in patients with rheumatic disease. **Clin Exp Immunol**, v.107, p.83-88, 1997.

WHITTON, J. L.; OLDSTONE, M. B. A .Virus-induced Immune Response Interactions, Principles of Immunity and Immunopathology. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HANOCK, J. J.; HIRSCH, M. S.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B. **Virology**. 2.ed. New York: Reven Press, 1990. v.1. p.377-78.

XIAOFENG, F.; QING, M.; DONGHUI, Z.; YANG, L.; JIANWEI, X.; YANJUAN, X. U.; STUART, C. R.; ADRIAN, M. DI B. High Diversity of Hepatitis C Viral Quasispecies is Associated with Early Virological Response in Patientsundergoing Antiviral Therapy. **Hepatology**, v.50, n.6, p.1765-1772, 2009.

YAO, Z. Q.; EISEN-VANDERVELDE, A.; WAGGONER, S. N.; CALE, E. M.; HAHN, Y. S. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. **J Virol**, v.78, n.12, p.6409-6419, 2004.

YTTING, H.; CHRISTENSEN, I. J.; STEFFENSEN, R.; ALSNER, J.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C.; HANSEN, U.; NIELSEN, H. J. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer. **Scand J Immunol**, v.73, n.2, p.122-127, 2011.

Site consultado:

<http://coot.embl.de/PolyPhen>

ANEXOS

ANEXO 2
SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA

TKM1		
Tris-HCl pH 7.6	1,0M	5,0 ml
KCl (Merck)	1,0M	5,0 ml
MgCl ₂ (Merck)	1,0M	5,0 ml
EDTA (Merck)	0,1M	10,0 ml
H ₂ O bidestilada q.s.p 500 ml		

TKM2		
Tris HCl pH 7.6	1,0M	0,5 ml
KCl	1,0M	0,5 ml
MgCl ₂	1,0M	0,5 ml
EDTA	0,1M	1,0 ml
NaCl	1,0M	20,0 ml
H ₂ O bidestilada q.s.p 50ml		

ANEXO 3

RESULTADOS

continua

SEXO	IDADE	CONTROLE/ PACIENTE	POSIÇÃO 296 (G/A)		POSIÇÃO 359 (A/G)		POSIÇÃO 377 (C/T)		POSIÇÃO 1111 (G/T)		POSIÇÃO 1130 (T/C)	
M	44	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	27	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	30	controle	G	G	A	G	C	C	G	T	T	T
M	45	controle	G	G	A	G	C	T	G	T	T	C
F	52	controle	G	G	A	A	C	T	G	T	T	T
F	36	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	43	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	35	controle	G	G	A	A	C	C	G	G	G	G
M	48	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	35	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	37	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	37	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	52	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	49	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	47	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	43	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	49	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	60	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	52	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	53	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	40	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	48	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	42	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	63	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	48	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	41	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	48	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	52	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	41	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	49	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	47	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	46	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	53	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	48	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	46	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	36	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	36	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	39	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	45	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	35	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	48	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	36	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	55	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	41	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	43	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	52	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	57	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	40	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	36	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	40	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	61	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	54	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	49	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	33	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	41	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	39	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	47	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	63	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	46	controle	G	G	A	A	C	C	G	G	T	C
F	41	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	53	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	35	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	47	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	42	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	30	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	33	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	42	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	19	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T

conclusão

SEXO	IDADE	CONTROLE/ PACIENTE	POSIÇÃO 296 (G/A)		POSIÇÃO 359 (A/G)		POSIÇÃO 377 (C/T)		POSIÇÃO 1111 (G/T)		POSIÇÃO 1130 (T/C)	
M	45	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	27	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	42	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	34	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	53	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	29	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	22	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	27	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	26	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	34	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	36	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	29	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	31	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	41	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	31	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	21	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	36	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	39	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	35	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	45	controle	G	G	A	A	C	T	ND	ND	ND	ND
M	47	controle	G	G	A	A	C	C	ND	ND	ND	ND
M	30	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	47	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	23	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	37	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	29	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	33	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	26	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	21	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	30	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	22	controle	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	30	controle	G	G	A	A	C	C	G	G	T	C
M	29	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	20	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	30	controle	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	23	controle	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T

continua

SEXO	IDADE	CONTROLE/ PACIENTE	POSIÇÃO 296 (G/A)		POSIÇÃO 359 (A/G)		POSIÇÃO 377 (C/T)		POSIÇÃO 1111 (G/T)		POSIÇÃO 1130 (T/C)	
M	45	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	44	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	34	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	33	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	29	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	37	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	39	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	50	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	43	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	48	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
F	57	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	36	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	65	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	55	paciente	G	G	A	A	C	T	T	T	T	T
M	53	paciente	G	G	A	G	C	C	T	T	T	T
M	45	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	37	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	39	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	64	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	50	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	62	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	48	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	46	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	52	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	44	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	32	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	42	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	52	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	50	paciente	G	G	A	G	C	C	T	T	T	T
F	49	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	56	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	45	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
F	47	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	50	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	49	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	50	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	45	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
F	54	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	50	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	53	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	55	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	53	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	48	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
F	54	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	45	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	60	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	54	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	55	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	63	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	55	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	46	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	55	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	67	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	67	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	69	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	65	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	67	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
F	56	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	69	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	67	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	58	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	39	paciente	G	A	A	A	C	C	G	T	T	T
M	66	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	58	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	63	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	55	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	66	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	54	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	56	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	62	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	63	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	34	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	C
M	23	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	46	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	25	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	C
M	36	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	48	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T

conclusão

SEXO	IDADE	CONTROLE/ PACIENTE	POSIÇÃO 296 (G/A)		POSIÇÃO 359 (A/G)		POSIÇÃO 377 (C/T)		POSIÇÃO 1111 (G/T)		POSIÇÃO 1130 (T/C)	
M	29	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	45	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	36	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	52	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	25	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	25	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	24	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
F	26	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	43	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	39	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	41	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	C
M	44	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
M	28	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	41	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	53	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	53	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
F	57	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
F	51	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	C
M	55	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	55	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	53	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	43	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	54	paciente	G	G	A	A	C	C	T	T	T	T
M	50	paciente	G	G	A	A	C	C	G	G	T	T
M	69	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	57	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T
F	53	paciente	G	G	A	A	C	C	G	T	T	T

continua

SEXO	IDADE	CONTROLE/ PACIENTE	HAPLOTYPES	FIBROSE	RESP. GERAL	MASP SERUM
M	45	paciente	LYPB/LYQA	4	não	ND
M	44	paciente	LYPB/LXPA	2	não	ND
M	34	paciente	LYQA/HYPA	2	sim	166
M	33	paciente	LYQA/HYPA	4	não	ND
M	29	paciente	LXPA/HYPA	4	não	329
M	37	paciente	LYPB/LYPB	3	não	193
M	39	paciente	LXPA/HYPD	2	não	234
F	50	paciente	LXPA/LYQA	2	ND	224
M	43	paciente	LYPB/HYPA	4	ND	ND
M	48	paciente	HYPB/LYPA	3	não	24
F	57	paciente	HYPD/LXPA	3	não	282
F	36	paciente	LYQA/HYPA	2	ND	886
M	65	paciente	LYPB/LXPA	2	não	378
M	55	paciente	HYPB/HYPA	2	não	ND
M	53	paciente	ND	3	sim	91
M	45	paciente	LYQA/PYPA	3	ND	ND
M	37	paciente	ND	2	sim	229
M	39	paciente	LYPB/LXPA	3	sim	ND
M	64	paciente	ND	4	não	223
M	50	paciente	LYPB/LYPA	4	ND	ND
M	62	paciente	ND	4	ND	ND
M	48	paciente	ND	4	ND	283
M	46	paciente	ND	2	não	ND
F	52	paciente	LYPB/HYPA	3	sim	295
M	44	paciente	LXPA/HYPA	3	sim	422
M	32	paciente	HYPB/HYPA	3	ND	221
M	42	paciente	ND	4	sim	245
M	52	paciente	HYPB/HYPA	3	não	509
M	50	paciente	ND	2	ND	130
F	49	paciente	LXPA/HYPA	3	não	315
M	56	paciente	LYPB/HYPA	3	sim	ND
M	45	paciente	HYPB/HYPA	2	sim	ND
F	47	paciente	LXPA/HYPA	3	ND	430
M	50	paciente	LYPB/LYPA	4	não	259
M	49	paciente	HYPB/LYQA	4	sim	399
M	50	paciente	LXPA/LYQA	4	não	193
F	45	paciente	ND	3	não	279
F	54	paciente	HYPB/LYPA	2	sim	193
F	50	paciente	ND	2	sim	297
M	53	paciente	LYPB/LYQA	2	ND	405
M	55	paciente	LYPB/LYQA	4	ND	300
M	53	paciente	ND	4	ND	213
F	48	paciente	ND	3	ND	265
F	54	paciente	ND	4	não	ND
M	45	paciente	ND	3	ND	275
M	60	paciente	ND	4	sim	182
F	54	paciente	ND	2	sim	229
M	55	paciente	LXPA/LYQA	3	ND	431
M	63	paciente	ND	4	não	128
M	55	paciente	ND	3	não	247
F	46	paciente	LXPA/LXPA	2	sim	116
F	55	paciente	ND	2	ND	274
M	67	paciente	LYPB/HYPA	3	sim	ND
M	67	paciente	LXPA/LXPA	3	ND	198
M	69	paciente	LYPB/HYPA	4	não	463
F	65	paciente	HYPD/LYPA	4	sim	377
F	67	paciente	LXPA/LXPA	4	ND	ND
F	56	paciente	ND	3	sim	ND
F	69	paciente	ND	3	não	188
F	67	paciente	ND	4	ND	274
M	58	paciente	LYQA/LYQA	3	ND	360
F	39	paciente	LYPB/HYPA	4	não	458
M	66	paciente	LYPB/HYPA	3	não	153
F	58	paciente	ND	2	não	ND
F	63	paciente	LYPB/HYPA	4	sim	82
F	55	paciente	ND	4	não	368
M	66	paciente	LYQC/LXPA	4	sim	179
M	54	paciente	ND	4	ND	301
F	56	paciente	HYPD/LYPB	4	não	176
M	62	paciente	ND	2	ND	ND
M	63	paciente	ND	2	ND	277
M	34	paciente	ND	2	ND	342
M	23	paciente	ND	3	ND	290
F	46	paciente	LYQA/LYQA	2	ND	107
M	25	paciente	ND	2	ND	ND
M	36	paciente	ND	2	ND	266
M	48	paciente	ND	4	ND	474

conclusão

SEXO	IDADE	CONTROLE/ PACIENTE	HAPLOTYPES	FIBROSE	RESP. GERAL	MASP SERUM
M	29	paciente	HYP A/HYP A	3	ND	393
M	45	paciente	LXP A/HYP A	3	ND	178
M	36	paciente	ND	4	ND	497
M	52	paciente	HYP A/LYQA	4	ND	183
F	25	paciente	ND	3	ND	607
M	25	paciente	ND	3	ND	209
M	24	paciente	HYP A/HYP A	2	ND	ND
F	26	paciente	ND	2	ND	224
M	43	paciente	ND	4	ND	ND
M	39	paciente	ND	2	ND	ND
M	41	paciente	ND	4	ND	253
M	44	paciente	ND	4	ND	86
M	28	paciente	ND	4	ND	235
M	41	paciente	ND	2	ND	ND
M	53	paciente	ND	2	ND	ND
F	53	paciente	ND	2	ND	ND
F	57	paciente	ND	2	ND	ND
F	51	paciente	ND	2	ND	ND
M	55	paciente	ND	2	ND	ND
M	55	paciente	ND	2	ND	ND
M	53	paciente	ND	2	ND	ND
M	43	paciente	ND	2	ND	ND
M	54	paciente	ND	2	ND	ND
M	50	paciente	ND	2	ND	ND
M	69	paciente	ND	2	ND	ND
F	57	paciente	ND	2	ND	ND
F	53	paciente	ND	2	ND	ND

Hum Immun 2011 [Epub ahead of print]

MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection.

Tulio S, Faucz FR, Werneck RI, Olandoski M, Alexandre RB, Boldt AB, Pedroso ML, de Messias-Reason IJ.

Source

Immunopathology Laboratory, Department of Medical Pathology, Hospital de Clinicas, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil; Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Center for Biological and Health Sciences, Pontificia Universidade Catolica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) has become a major public health issue and is prevalent in most countries. We examined several MASP2 functional polymorphisms in 104 Brazilian patients with moderate and severe chronic hepatitis C using the primers set to amplify the region encoding the first domain (CUB1), a critical region for the formation of functional mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine proteases (MASP)-2 complexes, and the fifth domain (CCP2), which is essential for C4 cleavage of the MASP2 gene. We identified five single nucleotide polymorphisms in patients and controls: p. R99Q, p. D120G, p.P126L, p.D371Y, and p.V377A. Our results show that the p.D371Y variant (c.1111 G > T) is associated with susceptibility to HCV infection ($p = 0.003$, odds ratio = 6.33, 95% confidence interval = 1.85-21.70). Considered as a dominant function for the T allele, this variant is associated with high plasma levels of the MASP-2 in hepatitis C patients ($p < 0.001$). However, further functional investigations are necessary to understand the degree of involvement between MASP2 and the HCV susceptibility.

Copyright © 2011. Published by Elsevier Inc.