

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA ALVES DA SILVA

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PROTEÍNA
MASP-2 NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HCV

CURITIBA
2014

AMANDA ALVES DA SILVA

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PROTEÍNA
MASP-2 NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HCV

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara José de Messias-Reason
Coorientadora: Dr^a Marcia Holsbach Beltrame

CURITIBA
2014

Silva, Amanda Alves da

Polimorfismos do gene *MASP2* e concentração sérica da proteína MASP-2 na susceptibilidade à infecção pelo HCV / Amanda Alves da Silva – Curitiba, 2014.
112 f. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Messias-Reason

Coorientadora: Dra. Marcia Holsbach Beltrame

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Hepatite C. 2. HCV. 3. MASP-2. 4. Sistema complemento. 5. Polimorfismo gênico. I. Messias-Reason, Iara José de. II. Beltrame, Marcia Holsbach. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.3623

TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA ALVES DA SILVA

**Título: "POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* E
CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PROTEÍNA *MASP-2* NA
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HCV"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



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



Prof^ª. Dr^ª. Maria Lucia Alves Pedroso
Universidade Federal do Paraná



Prof^ª. Dr^ª. Márcia Regina Pincerati
Universidade Positivo

Curitiba, 30 de abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Durante esta trajetória tive a oportunidade de conhecer e de contar com a ajuda de muitas pessoas cuja participação facilitou enormemente o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço primeiramente a minha orientadora Prof^a Dr^a Iara José de Messias-Reason por ter me dado a oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Imunopatologia Molecular e obrigada também pelas palavras de fé e incentivo, que sempre acalmam nos momentos de angústia.

À minha coorientadora Dr^a Marcia Holsbach Beltrame, pela paciência em ouvir minhas inquietações, pela dedicação em me ajudar no que foi preciso, pela amizade e atenção. Sou imensamente grata por sua presença sempre tão afetuosa e incentivadora.

À ajuda imensurável da Prof^a Dr^a Angélica Boldt, a conclusão desta dissertação não teria sido possível sem seus conhecimentos e a sua paciência.

À todas as cientistas do laboratório de Imunopatologia Molecular, em especial a Sandra J. S. Catarino, sem sua imensa ajuda nada disso seria possível. Pela apoio em todo o trabalho e outros tantos momentos de lazer e partilha de vida, obrigada!

As minhas amigas, Marina e Karla, pelos momentos divididos juntos e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês.

Ao apoio do Serviço Ambulatorial Médico de Hepatites Virais (SAM 5), em especial a Dr^a Maria Lucia Alves Pedroso, Rosineide Neves de Oliveira e Lucineia Aparecida Veloso que fazem do atendimento aos pacientes algo maravilhoso.

Obrigada aos meus pais, Paulo e Elsa, pelo amor incondicional e dedicação sem os quais eu não teria chegado até aqui. Aos meus irmãos, Renato e Bruno, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e me incentivaram em tudo que fiz. Às minhas cunhadas Eloá e Luciene, que me deram os presentes mais preciosos que possuo, meus sobrinhos Maurício e Gabriely.

À meu noivo Nilton Jr, pela compreensão, por ser tão importante na minha vida. Pelo apoio e paciência nos momentos de inquietação e cansaço. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

À família França por sempre estarem presentes em minhas conquistas, me animando e incentivando e especialmente por serem a minha segunda família.

À CAPES, pela bolsa, que me proporcionou o auxílio financeiro para execução do mestrado e desta dissertação.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e a todos os professores que ministraram as disciplinas cursadas durante o Mestrado.

Com vocês, divido a alegria desta experiência.

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece, como eu mergulhei. Pergunte, sem querer, a resposta, como estou perguntando. Não se preocupe em ‘entender’. Viver ultrapassa todo o entendimento”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

A Hepatite pelo virus C (HCV) afeta aproximadamente 170 milhões de pessoas no mundo, sendo que 80% dos indivíduos apresentam a forma crônica da doença, caracterizada pelo acometimento hepático, levando a fibrose e cirrose. O sistema complemento tem importante papel na opsonização e neutralização de vírus e é um dos principais componentes do sistema imune inato. MBL/ficolinas e a serina protease 2 associada a MBL (MASP-2) fazem parte da via das lectinas do complemento, a qual é ativada pelo HCV, pela ligação de MBL/ficolinas às proteínas estruturais E1 e E2. Polimorfismos e concentrações séricas de MBL foram associados com o desenvolvimento, forma clínica e resposta ao tratamento da hepatite C crônica. As concentrações séricas de MASP-2 estão associadas a polimorfismos do gene *MASP2*. No presente estudo foram investigadas as concentrações séricas e os polimorfismos de *MASP2* e sua associação com aspectos clínicos da doença. Foram analisados 11 polimorfismos do gene *MASP2*: (*g.4847C>A*) no promotor, nos exons 3 (*p.R99Q*, *p.D120G*, *p.P126L*), 10 (*p.D371Y*, *p.V377A*) e 12 (*p.R439H*), intron 4 (*g.7164A>G*), intron 5 (*g.7441G>A*) e intron 9 (*g.21081C>T*), através de PCR-SSP em 203 pacientes com hepatite C crônica e 220 controles. As concentrações séricas de MASP-2 foram quantificadas por meio de ELISA. As associações de haplótipos vs. concentrações de MASP-2 encontradas neste estudo, estão de acordo com a literatura. A presença do haplótipo *ARDPAGCYVRT* se mostrou associada com a proteção contra a infecção pelo HCV (OR=0,70 [IC95%=0,496-0,996] P=0,047), assim como altas concentrações de MASP-2 (OR=5,54 [IC95%=0,007-0,15] P=0,008). Indivíduos com genótipos virais 1 e 4 (que respondem menos ao tratamento) apresentaram menores concentrações de MASP-2 (P=0,018). Os resultados obtidos permitem-nos sugerir que polimorfismos do gene *MASP2* estão envolvidos na susceptibilidade diferencial a infecção pelo HCV.

Palavras-chave: Hepatite C. HCV. MASP-2. Sistema Complemento. Polimorfismo gênico.

ABSTRACT

There are approximately 170 million people infected with hepatitis C (HCV) in the world. Around 80% of the infected individuals progress to chronic disease, which is characterized by liver injury, fibrosis and cirrhosis. The complement system acts in the opsonization and neutralization of viruses, being one of the main components of the innate immune system. MBL and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) are components of the lectin pathway of complement activation, which are activated by HCV through the binding of MBL/ficolins to the structural proteins E1 and E2. MBL polymorphisms and serum levels were associated to the development of chronic hepatitis C, clinical evolution and response to treatment. MASP-2 serum levels are influenced by *MASP2* gene polymorphisms. Here we aimed to investigate *MASP2* polymorphisms and serum levels and the association with hepatitis C infection and progression. We investigated 11 polymorphisms in the promoter (*g.4847C>A*) and exon 3 (*p.R99Q*, *p.D120G*, *p.P126L*), 10 (*p.D371Y*, *p.V377A*) and 12 (*p.R439H*), intron 4 (*g.7164A>G*), intron 5 (*g.7441G>A*) and intron 9 (*g.21081C>T*) of *MASP2* gene by PCR-SSP in 203 patients with HCV and 220 controls. MASP-2 serum levels were measured by ELISA. The same associations between haplotypes and MASP-2 serum levels described in the literature were found here. Haplotype *ARDPAGCYVRT* carriers (OR=0,70 [IC95%=0,496-0,996] P=0,047), as well as high MASP-2 serum levels (OR=5,54 P=0,008) were associated with protection against HCV infection. Patients infected with HCV genotypes 1 or 4 (poor responders to treatment) had lower MASP-2 serum levels when compared to HCV genotypes 2 or 3 (P=0,018). Based on these results, we suggest that *MASP2* polymorphisms may play a role in differential susceptibility to HCV infection.

Palavras-chave: Hepatitis C. HCV. MASP-2. Complement System. Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	PREVALÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE C ENTRE ADULTOS E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HCV	21
FIGURA 2 -	FLUXOGRAMA DA INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA HEPATITE C	24
FIGURA 3 -	CICLO DE VIDA DO VÍRUS DA HEPATITE C	32
FIGURA 4 -	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HCV	34
FIGURA 5 -	SISTEMA COMPLEMENTO	39
FIGURA 6 -	ESTRUTURA DA MBL E FICOLINAS.....	42
FIGURA 7 -	MODELO PROPOSTO DE ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS	44
FIGURA 8 -	ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA MASP-2	46
FIGURA 9 -	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>MASP2</i> E ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS MASP-2 E MAP19.....	48
FIGURA 10 -	ESTRUTURA GÊNICA E POLIMORFISMOS DO GENE <i>MASP2</i> E RELAÇÃO COM OS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS MASP-2 E MAP19....	50
FIGURA 11 -	NOMENCLATURA FILOGENÉTICA DE <i>MASP2</i>	51
FIGURA 12 –	MECANISMOS DE RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS VIRAIS POR PROTEÍNAS INATAS HUMORAIS QUE RESULTAM NA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	54
FIGURA 13 –	EXEMPLO DA EVASÃO VIRAL DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	55
FIGURA 14 –	PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS PCRs-SSP PARA <i>MASP2</i>	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	INTERPRETAÇÃO DO MARCADOR SOROLÓGICO PARA HCV.....	24
TABELA 2 -	MECANISMO DE ESCAPE DO HCV DO SISTEMA IMUNE	35
TABELA 3 -	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM HEPATITE C.....	57
TABELA 4 -	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES EM ESTUDO	57
TABELA 5 -	SEQUÊNCIAS DE INICIADORES PARA A GENOTIPAGEM DE <i>MASP2</i>	63
TABELA 6 -	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HCV	71
TABELA 7 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE <i>MASP2</i> EM PACIENTES INFECTADOS PELO HCV+ E CONTROLES	73
TABELA 8 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (% \pm DESVIO PADRÃO) DO PROMOTOR – EXON 3 DA <i>MASP2</i> EM PACIENTES E CONTROLES	76
TABELA 9 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (% \pm DESVIO PADRÃO) DO INTRON 4 E INTRON 5 DA <i>MASP2</i> EM PACIENTES E CONTROLES	77
TABELA 10 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (% \pm DESVIO PADRÃO) DO INTRON 9 E EXON 12 DA <i>MASP2</i> EM PACIENTES E CONTROLES	78

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES HCV+ E CONTROLES.	80
GRÁFICO 2 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES INFECTADOS PELO HCV E CONTROLES COM DIFERENTES HAPLÓTIPOS CLASSIFICADOS DE ACORDO COM SEUS EFEITOS NA CONCENTRAÇÃO DE MASP-2.	81
GRÁFICO 3 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPOS DA <i>MASP2</i> INTRON 4 (G.7164A>G) E 5 (G.7441G>A) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.	82
GRÁFICO 4 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM O HAPLÓTIPO <i>ARDP</i> DA <i>MASP2</i> EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.	83
GRÁFICO 5 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPOS DA <i>MASP2</i> REGIÃO PROMOTORA (G.4847A>C) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.	84
GRÁFICO 6 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPOS DA <i>MASP2</i> INTRON 9 (G.21081C>T) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.	85
GRÁFICO 7 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPO <i>MASP2</i> *Y371D EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS PELO HCV.	87
GRÁFICO 8 -	COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO VIRAL DO HCV.	88

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AFP	- Alfa fetoproteína
ALT/ TGP	- Alanina aminotransferase/ Transaminase glutâmico pirúvica
Arg-Ile	- Arginina-Isoleucina
Asn	- Asparagina
Asp	- Ácido Aspartico
AST/TGO	-Aspartato aminotransferase/Transaminase glutâmico oxalacética
CCP	- Proteína de controle do complemento
CCR	- Câncer colorretal
CDC	- <u>C</u> enter <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol
CLDN	- Claudina
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidratos
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfatado
DP	- Desvio Padrão
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	- <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor/ Fator de crescimento epidérmico
EGFR	- <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor/ Receptor de fator de crescimento epidérmico
ELISA	- <u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>a</u> dsorbent <u>A</u> ssay / Ensaio de adsorbância imunoenzimático
EphA2	- Epinefrina A2
FCN	- Ficolina
GGT	- Gamaglutamiltranspeptidase
GlcNac	- N-acetilglucosamina
Gln	- Glutamina
Glu	- Ácido Glutâmico
HAV	- Vírus da Hepatite A
HBV	- Vírus da Hepatite B
HC	- Hospital de Clínicas
HCC	- Carcinoma Hepatocelular
HCV	- Vírus da Hepatite C
HDV	- Vírus da Hepatite D
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	- Vírus Linfotrópico da célula Humana
IFNAR	- Receptor de Interferon alfa
IMC	- Índice de massa corporal
INF	- Interferon
INFc	- Interferon convencional
IRES	- <u>I</u> nternal <u>R</u> ibosome <u>E</u> ntry <u>S</u> itel/ Sítio interno de entrada no ribossomo
IRF	- <u>I</u> nterferon <u>R</u> egulatory <u>F</u> actor/ Fator regulador de Interferon
ISG	- <u>I</u> nterferon <u>S</u> timulated <u>G</u> ene/ Gene estimulado por interferon

Kb	- Quilobases
kDa	- Quilodaltons
LDL	- <u>Low Density Lipoprotein</u> / Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	- <u>Low Density Lipoprotein Receptor</u> / Receptor de lipoproteína de baixa densidade
MAC	- <u>Membrane Attack Complex</u> / Complexo de ataque à membrana
MAp	- <u>MBL-associated protein</u> / Proteína associada à MBL
MASP	- <u>MBL-Associated Serine Protease</u> / Serina protease associada à MBL
MBL	- <u>Mannan Binding Lectin</u> / Lectina ligante de manose
MBL2	- Gene codificador da proteína ligante de manose 2
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
mM	- Milimolar
NK	- Célula <u>Natural Killer</u>
NPC1L	- <u>Niemann-Pick C1-Like 1</u>
NS	- Não estrutural
OCN	- Ocludina
OR	- <u>Odds Ratio</u>
PAMP	- <u>Pathogen-Associated Molecular Pattern</u> / Padrões moleculares associados à patógenos
Pb	- Pares de base
PCR	- <u>Polymerase Chain Reaction</u> / Reação em cadeia da polimerase
PEG	- Peguilado
Phe	- Fenilalanina
Prom	- Promotor
PRRs	- Receptores de reconhecimento de patógenos
PT	- Tempo de protrombina
r.p.m	- Rotações por minuto
RBV	- Ribavarina
RER	- Retículo endoplasmático rugoso
RIG I	- Gene estimulado por ácido retinóico
RMP	- Monofosfato de Ribavarina
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNA _m	- RNA mensageiro
RTP	- Trifosfato de Ribavarina
RVS	- Resposta Viroológica Sustentada
SCRs	- <u>Short Consensus Repeats</u> / Repetições de consenso curto
sMap	- <u>Small MBL-associated protein</u> / Pequenas proteínas associadas à MBL
SNP	- <u>Single Nucleotide Polymorphism</u> / Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	- Serina Protease
SR-BI	- <u>Scavenger Receptor-class B member I</u> / Receptor de scavenger de classe B membro I
S-S	- Dissulfeto
SSP	- <u>Sequence Specific Primer</u> / Iniciador sequência específico
Th	- Célula T auxiliar
TNF α	- <u>Tumor Necrosis Factor α</u> / Fator de necrose tumoral α

Tyr
UTR
WHO

- Tirosina
- Untranslated Region/ Região não traduzida
- World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 HEPATITE C	20
3.1.1 Manifestações Clínicas	22
3.1.2 Diagnóstico e Avaliação da Atividade da Doença	23
3.1.3 Tratamento	24
3.1.4 O vírus da hepatite C (HCV)	27
3.1.5 Genótipos do HCV	28
3.1.6 Fatores de Patogenicidade do HCV	29
3.1.7 Transmissão do HCV	30
3.1.8 Ciclo de vida	31
3.2 SISTEMA IMUNE INATO	35
3.2.1 Sistema Complemento	36
3.2.1.1 Via das lectinas	37
3.2.1.2 MBL	40
3.2.1.3 FICOLINAS	41
3.3 SERINA PROTEASE ASSOCIADA À MBL – MASP-2	45
3.3.1 Estruturas e Funções	45
3.3.2 Gene <i>MASP2</i> e seus polimorfismos	48
3.3.3 MASP-2 e Associação com Doenças	51
3.3.4 Interação do HCV e complemento	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA	56
4.2 CASUÍSTICA	56
4.3 METODOLOGIA	58
4.3.1 Obtenção de amostras	58
4.3.2 Extração de DNA de sangue total	58
4.3.3 Critérios de seleção dos polimorfismos de <i>MASP-2</i>	59
4.3.4 Genotipagem da <i>MASP2</i> por PCR-SSP	61
4.3.5 Quantificação das concentrações séricas de MASP-2	67
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Caracterização dos pacientes em estudo	69
5.2 Polimorfismos de <i>MASP2</i> e associação com hepatite C crônica	71
5.3 Análise em Blocos	75
5.3.1 Concentração sérica de MASP-2 e associação com HCV	79
5.3.2 Concentração sérica de MASP-2 e haplótipos do gene	80
5.3.3 Concentração sérica de MASP-2 em relação à associação genética com o bloco <i>ARDP</i>	82
5.3.4 Concentração sérica de MASP-2 em relação ao intron 9 e exon 10	84
5.3.5 Concentração sérica de MASP-2 e genótipos virais	87
5.3.6 Concentração sérica de MASP-2 e características clínicas do HCV	88
6. CONCLUSÕES	90

REFERÊNCIAS	91
ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

A Hepatite C (HCV) afeta aproximadamente 170 milhões de pessoas no mundo, sendo que 80% dos indivíduos apresentam a forma crônica da doença (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012) e 184 milhões de pessoas apresentam anticorpos anti-HCV (HANAFIAH, K. M., *et al.*, 2012). A prevalência da hepatite C na população brasileira é de 1,38% (10 a 69 anos) nas capitais e no DF. A maior prevalência foi encontrada na região Norte (2,1%), seguida pelas regiões Centro-Oeste e Sudeste (ambas com 1,3%), Sul (1,2%) e Nordeste (0,7%) (BRASIL, 2012).

A maioria dos indivíduos infectados pelo HCV são portadores assintomáticos (VENEGAS, M. *et al.*, 2011). Conseqüentemente, a hepatite C é frequentemente diagnosticada em estádios clínicos avançados ou quando portadores assintomáticos apresentam-se como candidatos a doadores de sangue (CAMPIOTTO, S. *et al.*, 2005). Na maioria dos indivíduos infectados pelo HCV (70-80%) há persistência do vírus, e cerca de 30% dos indivíduos com infecção persistente desenvolvem doenças crônicas do fígado, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular (VENEGAS, M. *et al.*, 2011). Como resultado, a hepatite C é a principal causa de transplante de fígado no mundo (FUKUHARA, T. *et al.*, 2010).

Tanto fatores virais, como genótipo do HCV, quanto do hospedeiro como idade, índice de massa corporal e resistência a insulina, tem sido associados com a resposta a terapêutica combinada com interferon (IFN) e ribavarina (RBV) (FRIED, M. W. *et al.*, 2011). Além disso, 30 a 40% dos pacientes apresentam aumento de ferro hepático, que tem sido associado a fibrose hepática e atividade inflamatória, além de baixa resposta a monoterapia com IFN (OGUZ, A. *et al.*, 2013).

Embora fatores epidemiológicos, virais e do hospedeiro tenham sido associados com a resolução da hepatite C aguda, o papel da variabilidade gênica do vírus na depuração espontânea durante a infecção crônica permanece incerto (NATTERMANN, J. *et al.*, 2011). No entanto sabe-se que história natural da hepatite C decorre da interação do HCV com a resposta imune do hospedeiro (VANILLOTO, A. C. R. *et al.*, 2009).

O sistema complemento constitui um dos principais elementos da resposta imune inata, atuando como primeira linha de defesa contra patógenos invasores. A lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas (L, H e M) são importantes elementos da resposta imune inata, atuando como moléculas de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) (THIEL, S. *et al.*, 2006). As ficolina L e H são encontradas no plasma e a ficolina M em leucócitos e no pulmão (LIU, Y. *et al.*, 2005). Após o reconhecimento de um alvo adequado pelas ficolinas ou MBL, o complemento é ativado, com subsequente opsonização e fagocitose dos microrganismos alvos, bem como com a formação do complexo de ataque a membrana que causa a lise celular (WALLIS, R. *et al.*, 2007).

As serinas proteases associadas a MBL, MASP-1 e -2, além de outras proteínas relacionadas (MASP-3, MAp44, e MAp19) formam complexos com MBL e ficolinas e conjuntamente atuam no reconhecimento de patógenos, levando a ativação da via das lectinas do complemento. MASP-1 e MASP-2 fornecem resposta rápida e vigorosa contra patógenos invasores ou estruturas alteradas através da iniciação da via das lectinas (HÉJA, D. *et al.*, 2012).

O envolvimento do complemento na hepatite C foi demonstrado por diferentes autores. Estudos iniciais demonstraram associação dos polimorfismos do gene *MBL2* com a resposta ao tratamento (MATSUSHITA, M. *et al.*, 1998) e progressão da doença (SASAKI, K. *et al.*, 2000). Concentração reduzida de C4 foi observada na infecção crônica e maior atividade de C4 foi associada com melhor resposta ao tratamento com INF α 2b e RBV (DUMESTRE-PERARD, C. *et al.*, 2001). Já evidências recentes demonstraram que MBL se liga as glicoproteínas E1 e E2 na superfície do HCV, ativando a via das lectinas e neutralizando a entrada do HCV em células (BROWN, K. S. *et al.*, 2011), e que o HCV incorpora CD59 nas partículas virais possivelmente como um mecanismo de escape a lise pelo complemento (AMET, T. *et al.*, 2012). Entretanto a contribuição do complemento na lise direta de virions do HCV, ainda não foi demonstrada. Outros autores relacionaram aumento de MBL e MASP-1 plasmáticas com a patogenese da hepatite C (BROWN, K. S. *et al.*, 2007b).

São raros os trabalhos sobre *MASP2* na hepatite C. Formas variantes de *MASP2*, que diferem na habilidade de ativar a via das lectinas, podem ter implicações na susceptibilidade a infecções (THIEL, S. *et al.* 2009).

No presente estudo, foram analisados de maneira pioneira polimorfismos do gene *MASP2* responsáveis por mudanças de aminoácidos na proteína MASP-2 (*R99Q*, *P126L*, *D371Y*, *V377A* e *R439H*), polimorfismos nos introns 4, 5 e 9 e o polimorfismo funcional (*D120G*) em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C acompanhados no ambulatório de hepatites virais do Hospital de Clínicas do Paraná – UFPR.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar polimorfismos do gene *MASP2* e concentrações séricas de MASP-2 em pacientes portadores de hepatite C crônica e em indivíduos controles de Curitiba, Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências genótípicas e haplotípicas dos polimorfismos *g.4847A>C* (rs7548659), *p.R99Q* (rs61735600), *p.D120G* (rs72550870), *p.P126L* (rs56392418), *g.7164A>G* (rs2273344), *g.7441G>A* (rs9430347), *g.21081C>T* (rs17409276), *p.D371Y* (rs12711521), *p.V377A* (rs2273346), *p.R439H* (rs12085877) e *g.24762T>C* (rs1782455) do gene *MASP2* em pacientes portadores de hepatite C crônica e indivíduos controle com sorologia negativa para hepatites virais;
- Determinar as concentrações séricas de MASP-2 em pacientes e controles, buscando possível associação entre estas e o polimorfismo do gene *MASP2* com a doença em nossa população;
- Relacionar genótipos e haplótipos do gene *MASP2* nos pacientes e controles;
- Estabelecer possíveis associações entre as variantes genéticas de *MASP2* e concentrações séricas de MASP-2 com:
 - manifestações clínicas e aspectos demográficos (sexo, idade e ancestralidade) dos pacientes;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HEPATITE C

A infecção pelo HCV recebeu muitos nomes, incluindo “epidemia silenciosa” e “a doença do novo milênio” (NADEEM, A. *et al.*, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com o HCV e estima-se que mais de 350 mil pessoas irão morrer a cada ano de doenças do fígado causadas pelo HCV (FIGURA 1). Nos países da América Latina e Caribe aproximadamente 7 a 9 milhões de adultos são anti-HCV positivos, indicando que estes foram expostos ao HCV e podem evoluir para a infecção crônica (WHO, 2012). Segundo o último Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, no Brasil a prevalência é estimada em 1,38%, considerada endemicidade baixa. Em 2010, foram notificados 10.321 novos casos de hepatite C (BRASIL, 2012).

O HCV tem uma alta variabilidade genética e é classificado em seis genótipos principais e mais de 100 subtipos que variam quanto à sua distribuição geográfica, fatores de risco associados à infecção e resposta ao tratamento (SIMMONDS, P., 2004). No Brasil, os genótipos 1 e 3 são os mais frequentes (PARABONI, M. L. R., *et al.*, 2012). No sul do Brasil observou-se que quase metade dos pacientes estavam infectados com HCV genótipo 1 ou 3 (DA SILVA, C. M. D. *et al.*, 2007).

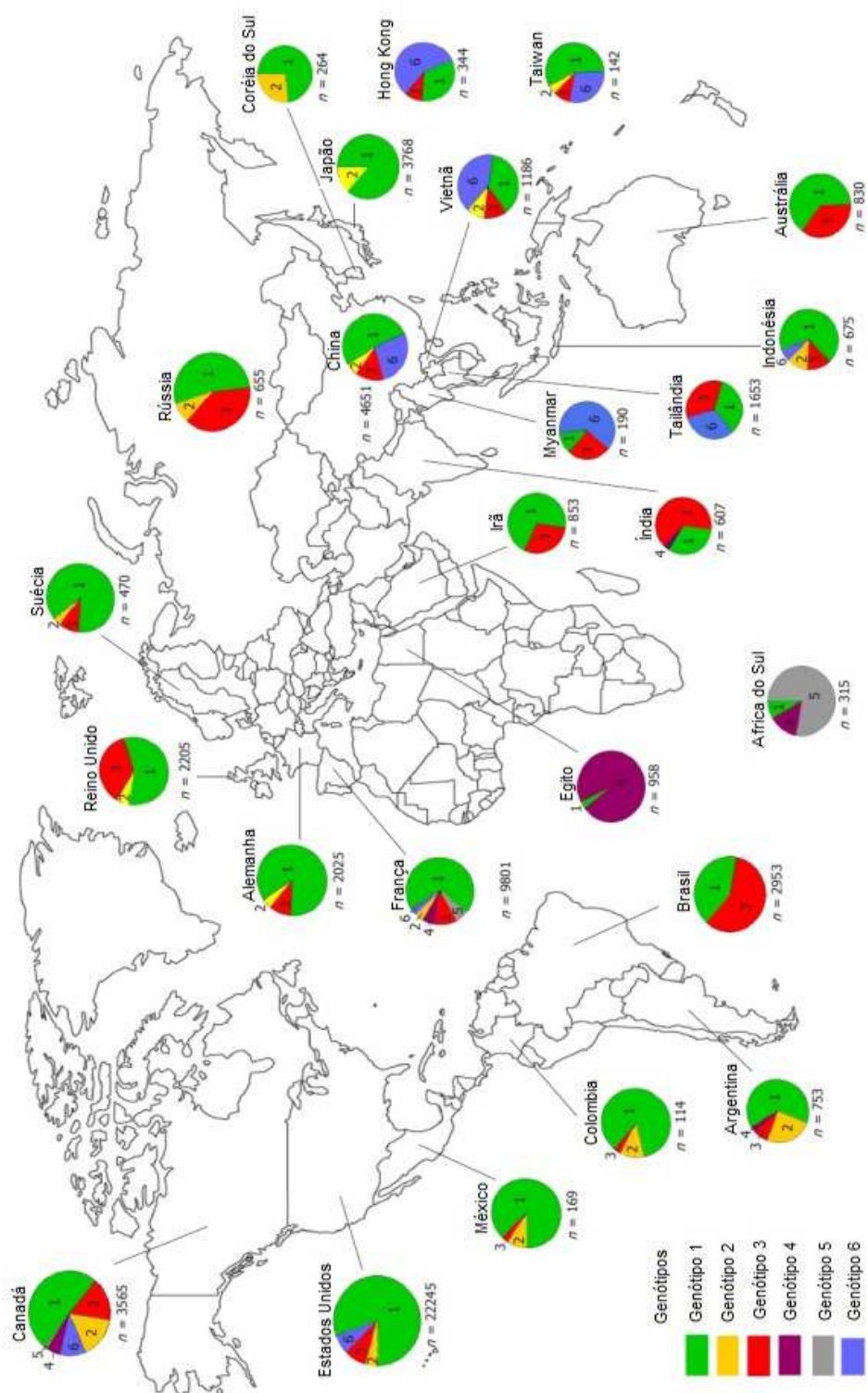


FIGURA 1 – PREVALÊNCIA MUNDIAL DO VÍRUS DA HEPATITE C ENTRE ADULTOS E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HCV (FONTE: THONG, V. D. *et al.*, 2014).

NOTA: n= número de indivíduos.

3.1.1 Manifestações Clínicas

A hepatite crônica é assintomática ou oligossintomática na grande maioria dos casos. De modo geral, as manifestações clínicas aparecem apenas em fases adiantadas de acometimento hepático. Muitas vezes o diagnóstico é feito ao acaso, a partir de alterações esporádicas de exames de avaliação de rotina ou da triagem em bancos de sangue. O diagnóstico etiológico só é possível por meio de exames sorológicos e/ou de biologia molecular (BRASIL, 2008).

Pelo menos 25% dos pacientes com hepatite C crônica desenvolvem complicações de fígado na fase final da doença, incluindo insuficiência hepática, hipertensão portal e carcinoma hepatocelular. A hepatite C crônica representa uma das principais indicações de transplante de fígado (GRAMENZI, A. *et al.*, 2001). Infelizmente, transplante de fígado não cura receptores infectados pelo HCV e ocorre re-infecção. Como consequência, a progressão da doença é acelerada em comparação com a população de não transplantados, resultando em pior prognóstico (AKAMATSU, N.; SUGAWARA, Y., 2013).

Além das complicações hepáticas, 1% a 2% dos pacientes com infecção crônica pelo HCV desenvolvem manifestações extra-hepáticas, afetando múltiplos órgãos, incluindo sistema renal, dermatológico, hematológico e reumatológico. A condição extra-hepática mais comum é a presença de crioglobulinemia mista (CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. 2006), que é uma desordem mediada por precipitação reversível de imunocomplexos a baixas temperaturas e caracterizada por uma tríade clínica clássica que consiste em púrpura, artralgia, fraqueza e por envolvimento de vários órgãos levando à alterações hepáticas, glomerulonefrite, neuropatia periférica e vasculite generalizada (CARAMEZ, C. *et al.*, 2010). Crioglobulinas são encontradas em 50% dos pacientes com hepatite C crônica, porém apenas 25%-30% deles desenvolvem sintomas clínicos (CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. 2006).

A infecção persistente pelo HCV frequentemente provoca necrose dos hepatócitos pelos linfócitos T citotóxicos, além de deposição de matriz extracelular, que leva a fibrose hepática pela conversão da arquitetura normal em nódulos estruturalmente anormais, e, finalmente, a cirrose do fígado (NAITO, M. *et al.*, 2005). A cirrose hepática

é diagnosticada através de biópsia, exames laboratoriais e em alguns casos através de ecografia abdominal. Os indicadores do avanço da doença são a fibrose, esteatose e siderose. O escore de *Child-Pugh* (também conhecido como Escore de *Child-Turcotte-Pugh*) é usado para avaliar o prognóstico da doença hepática crônica, principalmente cirrose (MENG, F. *et al.*, 2013).

3.1.2 Diagnóstico e Avaliação da Atividade da Doença

A infecção aguda muitas vezes não é diagnosticada porque a maioria das pessoas infectadas não apresentam sintomas. Os métodos comuns de detecção de anticorpos não conseguem diferenciar entre infecção aguda e crônica (WHO, 2013). São indicados como testes de triagem na suspeita de infecção pelo HCV, para diagnóstico sorológico inicial, os testes de detecção de anticorpo ou testes de detecção combinada de antígeno e anticorpo do HCV, em que o anti-HCV é considerado o principal marcador (TABELA 1). A presença de anti-HCV não define isoladamente a presença de infecção ativa e deve ser interpretada como contato prévio com o HCV. O resultado reagente desse marcador deverá ser confirmado por testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos do HCV. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos, denominados HCV-RNA, permitem detectar o RNA viral de todos os genótipos e subtipos descritos do HCV. Esses testes podem ser qualitativos, quando apenas detectam a presença do RNA viral, ou quantitativos, quando quantificam o RNA viral. O exame de genotipagem do HCV utiliza testes moleculares baseados em amplificação do RNA viral, capazes de identificar os diversos genótipos, subtipos e populações mistas do HCV (FIGURA 2). A caracterização genotípica complementa a avaliação clinicolaboratorial na definição da estratégia de tratamento da hepatite crônica. A biópsia hepática é um procedimento invasivo, que na maior parte das situações é essencial para determinar o estadiamento da hepatite crônica e para a definição da necessidade de tratamento. Outros exames complementares: Aminotransferases/ Transaminases (AST/ ALT), Bilirrubinas, Proteínas Séricas, Fosfatase Alcalina, Gama-glutamiltransferase (GGT), Atividade de protrombina, Alfafetoproteína e Hemograma (BRASIL, 2012).

TABELA 1 - INTERPRETAÇÃO DO MARCADOR SOROLÓGICO PARA HCV

MARCADOR	SIGNIFICADO
Anti - HCV	A presença de anti-HCV não define isoladamente a presença de infecção ativa e deve ser interpretada como contato prévio com o HCV, não define se infecção aguda, ou progressa e curada espontaneamente, ou se houve cronificação da doença. O resultado reagente desse marcador deverá ser confirmado por testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos do HCV

FONTE: BRASIL (2010).

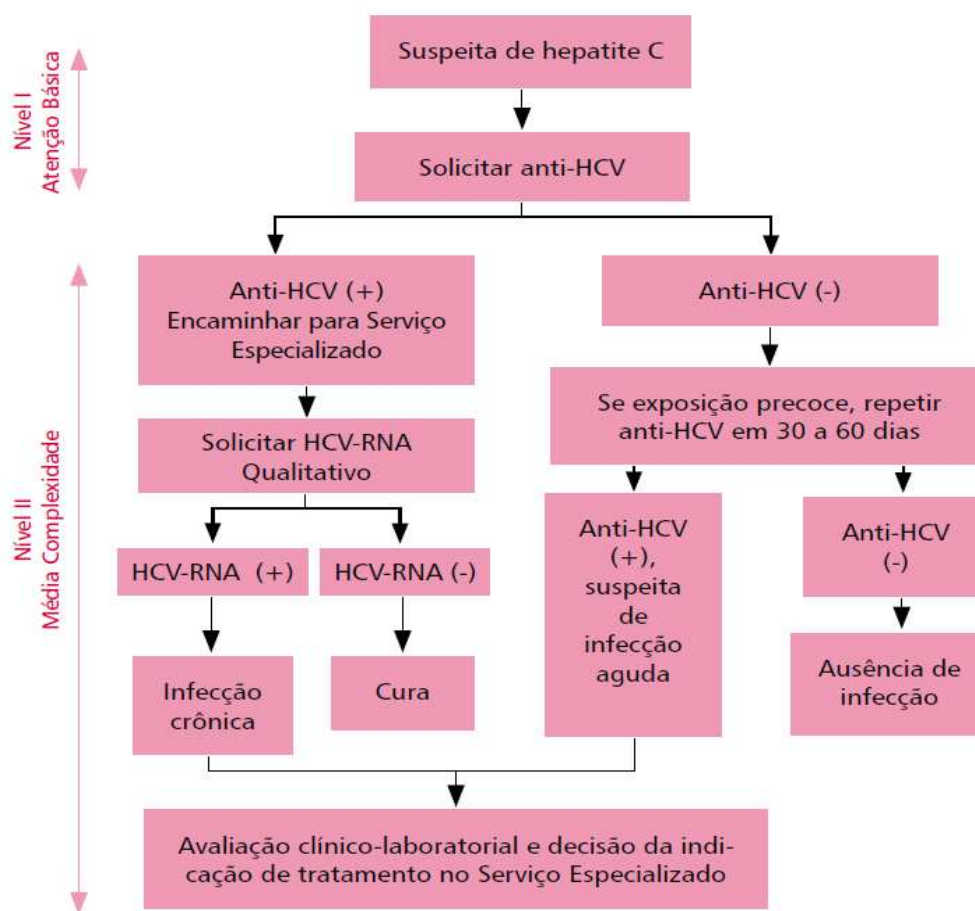


FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DA INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA HEPATITE C

FONTE: BRASIL (2008).

3.1.3 Tratamento

Em geral usa-se a combinação de interferon (alfa-2a ou alfa-2b) peguilado (INF PEG) e ribavirina (RBV) como tratamento para HCV crônica, administração por via oral durante 24 ou 48 semanas, dependendo do genótipo do HCV com o objetivo de atingir

uma resposta virológica sustentada (RVS). A RVS é definida como HCV-RNA indetectável 24 semanas após o término do tratamento. Pacientes que atingem a depuração viral rápida têm maior taxa de resposta virológica sustentada (LEE, S. S. *et al.*, 2012). Os inibidores de protease foram recentemente aprovados para tratamento da hepatite C crônica nos países em desenvolvimento genótipo 1, utilizado no tratamento tríplice com IFN PEG subcutâneamente em combinação com a ribavirina. No entanto, o tratamento com INF PEG/ RBV é caro e está associado a efeitos adversos significativos (RAMOS, A. J. *et al.*, 2012). A RBV por sua vez possui conhecido efeito teratogênico e não deve ser usada durante a gravidez (ARSHAD, M.; KAMARY, S. S.; JHAVERI, R., 2011).

Alguns fatores do paciente podem se associar com a resposta ao tratamento, sendo sexo e ancestralidade os fatores mais importantes. Homens respondem menos à terapia do que as mulheres. Idade, obesidade e grau de fibrose hepática também afetam o resultado do tratamento. Embora estes fatores têm sido consistentemente identificados em vários estudos, o mecanismo pelo qual os mesmos afetam o resultado do tratamento permanece desconhecido (FELD, J. J. *et al.*, 2007).

Os IFNs constituem uma família de citocinas pleiotrópicas que apresentam atividade antiviral potente, além de antiproliferativa, de apoptose e imunoregulatória (MAHER, S. G. *et al.*, 2008). Os IFNs do tipo I ou IFN- $\alpha\beta$, descritos há 50 anos, exercem atividade antiviral, atuando tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo. O IFN- $\alpha\beta$ ativa a capacidade citotóxica de células NK e confere estado antiviral em células adjacentes não infectadas (ANK, N. *et al.*, 2008). As células NK são importantes componentes da imunidade inata, controlando infecções virais diretamente pela citotoxicidade ou pela produção de citocinas imunorreguladoras, particularmente INF γ e TNF α , que modula a imunidade adaptativa e pode inibir diretamente a replicação viral (MONDELLI, M. U. *et al.*, 2012).

Descoberta em 1972 por Witkowski e colaboradores, a RBV é um análogo de guanosina que produz atividade de amplo espectro contra vários vírus RNA e DNA. Embora originalmente aprovada apenas para o tratamento de infecção por vírus respiratórios graves em crianças, tem sido utilizada no tratamento da infecção pelo vírus da febre de Lassa, influenza A e B, entre outros. No início dos anos 90, a RBV passou a

ser utilizada no tratamento da hepatite C (TE, H. S.; RANDALL, G.; JENSEN, D. M, 2007).

A capacidade antiviral da RBV tem sido postulada como resultado de quatro vias: (1) inibição direta da replicação do HCV, (2) inibição da enzima inosina-monofosfato desidrogenase no hospedeiro (IMPDH), (3) mutagênese através da indução do vírus a se replicar rapidamente além do limiar de erro de catástrofe, e (4) imunomodulação, através da indução de resposta imune do tipo Th1. Esses mecanismos não são mutuamente exclusivos. Não se sabe qual o mecanismo predominante, particularmente durante a ação sinérgica da RBV com IFN- α (TE, H. S.; RANDALL, G.; JENSEN, D. M, 2007).

Avanços recentes no tratamento da hepatite C têm-se centrado no desenvolvimento de agentes terapêuticos que têm como alvo vários estágios do ciclo de vida do HCV, incluindo os passos iniciais da infecção (entrada e fusão), tradução e processamento da poliproteína do RNA, replicação e nas etapas mais tardias do ciclo de vida do HCV. Estudos recentes, utilizando o HCV NS3/4A serina (boceprevir ou telaprevir) em combinação com INF-PEG/RBV, demonstraram melhoras substanciais nas taxas de RVS (CHEVALIEZ, S. 2011).

Os inibidores de protease NS3/4A são altamente potentes, mas têm uma baixa barreira de resistência. Estudos iniciais com a monoterapia mostraram supressão imediata do vírus, porém rápido aparecimento de resistência. Por isso precisam ser administrados juntamente com uma "espinha dorsal" de INF PEG/ RBV a fim de evitar resistência viral (NAGGIE, S., 2012/ 2013).

A proteína NS5A é parte do complexo de replicação citoplasmática do HCV, porém não tem atividade enzimática conhecida. Embora sua função permaneça obscura, inibidores dessa proteína são inibidores altamente potentes da replicação viral. Estratégias futuras de tratamento podem envolver o uso de um nucleosídeo análogo ao NS5B em combinação com outro agente de alta potência com diferentes mecanismos de ação. Idealmente, os esquemas futuros terão eficácia em todos os genótipos do HCV. A primeira geração de inibidores de NS3/4A, boceprevir e telaprevir, são principalmente ativos contra o genótipo 1, mostrando alguma atividade contra os

genótipos 2 e 4, e pouca ou nenhuma atividade contra o genótipo 3 (NAGGIE, S., 2012/2013).

3.1.4 O vírus da hepatite C (HCV)

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus*, um dos quatro gêneros na família *Flaviviridae*. Seu genoma tem 9,6 Kb de comprimento, constituído por RNA de cadeia simples, sentido positivo e codifica para uma poliproteína precursora de cerca de 3000 aminoácidos, os quais são co-traducionalmente processados no núcleo, gerando proteínas do envelope 1 (E1), E2, p7 e proteínas não estruturais 2 (NS2), NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. As proteínas do núcleo ligam-se ao RNA viral para formar o nucleocapsídeo viral (KANG, J.; KWON, Y. C.; AHN, B. Y., 2012).

As glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, medeiam à entrada do vírus através de co-receptores celulares, incluindo CD81, claudina-1, ocludina. E1 e E2, por estarem localizadas na superfície das partículas virais, são os potenciais alvos de anticorpos neutralizantes. Até o momento, não existe uma vacina disponível contra o HCV, sendo a prevenção a melhor profilaxia no combate ao vírus. A atividade de anticorpos neutralizante é detectável no soro de pacientes infectados pelo HCV durante infecções agudas e crônicas, e títulos elevados desses anticorpos relacionam-se com resolução natural da hepatite C crônica. Ainda, anticorpos policlonais contra E2 impedem ou retardam o aparecimento de infecção por HCV em chimpanzés quando administrados antes da exposição ao vírus. A capacidade do HCV persistir no hospedeiro, apesar da presença de anticorpos neutralizantes, permanece ainda sem explicação (SHIMIZU, Y. K. *et al.*, 2013).

A origem da infecção pelo HCV em seres humanos permanece desconhecida, pois vírus homólogos ao HCV em animais não foram identificados. Recentemente, um genoma de RNA *Flaviviridae* foi isolado de cães domésticos com doença respiratória, sendo esse vírus conhecido como *Hepacivirus canino* (CHV), o mais intimamente relacionado com o HCV. As descobertas do CHV podem elucidar a origem do HCV e servir como novo modelo para se estudar este vírus. Embora a descoberta da

homologia estreita entre CHV e HCV seja intrigante, existem barreiras que impedem a transmissão viral entre as espécies (PARERA, M. *et al.*, 2012).

3.1.5 Genótipos do HCV

Os genótipos do HCV são indicadores primários da resposta à terapia com IFN (KEMMER, N; NEFF, G. W. 2007). Até o momento, foram identificados seis genótipos distintos (1, 2, 3, 4, 5 e 6), porém relacionados, além de múltiplos subtipos: 1a, 1b, 2a e 2b (ARAÚJO, A. R. *et al.*, 2011). Em indivíduos infectados, o HCV circula como uma população de diversas variantes, que são geradas continuamente durante a replicação viral como resultado de erros cometidos pela RNA polimerase viral RNA dependente, a qual carece de atividade de revisão, durante a replicação rápida (JARDIM, A. C. G. *et al.*, 2013). A variabilidade genética dos vírus circulantes pode afetar o tratamento e persistência do vírus, e representa grande desafio para o desenvolvimento de vacinas. Entretanto, poucos estudos têm mostrado a presença de mutações de resistência primária na população brasileira (HOFFMANN, L. *et al.*, 2013).

A determinação do genótipo do HCV é importante por apresentar valor preditivo de resposta à terapia antiviral, com melhor resposta associada aos genótipos 2 e 3 do que ao genótipo 1 (ARAÚJO, A. R. *et al.*, 2011). O genótipo viral 1 é o mais frequente tanto no sexo feminino (54,2%) como masculino (76,1%) (ARAÚJO, A. R. *et al.*, 2011).

Os genótipos 1, 2, e 3 são distribuídos globalmente, o genótipo 4 está confinado ao Oriente Médio e África Central, o genótipo 5 é predominantemente encontrado na África do Sul e o genótipo 6, o mais divergente, é amplamente encontrado no sudeste da Ásia (NG, K. T. *et al.*, 2013).

A distribuição dos diferentes genótipos de HCV também varia de acordo com a população estudada, transmissão viral e fatores de risco. Estudos demonstram que na Espanha há uma predominância de genótipos 1a e 1b, enquanto em outras regiões europeias o genótipo 2 é geralmente o mais prevalente. O genótipo 1 predomina na América Central. Em países latino-americanos, como a Argentina e Venezuela os genótipos 1 e 2 representam 90% dos casos. No Brasil, os genótipos 1 e 3 são os mais

frequentes, porém quase metade dos pacientes do sul do Brasil foram infectados por genótipos 2 ou 3 (PARABONI, M. L. R. *et al.*, 2012).

Campiotto e colaboradores 2005, demonstraram que a frequência do genótipo 3 varia entre as diferentes regiões brasileiras, com maior prevalência nos estados de Santa Catarina (50%), Paraná (41,7%), Goiás (37,1%) e Pernambuco (36,9%) (ARAÚJO, A. R. *et al.*, 2011).

O HCV evolui rapidamente e a diversidade de sequência é extremamente elevada, com divergência de 31-33% entre genótipos e 20-25% entre subtipos. O genótipo 6 é o que mais apresenta diversidade genética, com 23 subtipos atualmente conhecidos. Novas estirpes continuam a ser identificadas, com os subtipos 6v e 6w recentemente descritos na China e Taiwan, respectivamente (DUNFORD, L. *et al.*, 2012).

Apesar do desenvolvimento de novos agentes antivirais, tais como inibidores de protease, os quais têm melhor resposta para alguns genótipos de HCV, infelizmente o genótipo 4 tem emergido como um genótipo resistente ao tratamento com essas novas estratégias. Tanto para o melhor atendimento ao paciente como por aspectos econômicos, é necessário melhorar a previsão de resposta ao tratamento padrão com INF PEG/RBV (DERBALA, M. *et al.*, 2012).

3.1.6 Fatores de Patogenicidade do HCV

Proteínas e ácidos nucleicos virais são detectados pelos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) e atuam como PAMPs. Subsequentemente, há transdução de sinal para produção de interferon (IFN) tipo I e de outras citocinas. O IFN tipo I, em seguida, aumenta a expressão de vários genes estimulantes de IFN (ISGs) e subverte a replicação do vírus através de uma variedade de mecanismos. O IFN orchestra um grande número de genes desta resposta antiviral. No entanto, muitos vírus usam uma contramedida anti-IFN, no caso do HCV essa atividade é exercida principalmente pela proteína NS3/4A (RAYCHOUDHURI, A. *et al.*, 2011).

A expressão da serina protease NS3/4A do HCV foi associada com diminuição de fosforilação e translocação nuclear do fator regulador de IFN 3 (IRF3), levando à redução da expressão do gene indutivo de IFN. Foi mostrado que NS3/4A é utilizado

para evadir a resposta imune inicial pela ruptura da via de sinalização do gene induzível de ácido retinóico I (RIG I). Normalmente, esta via é induzida por vírus, resultando na ativação de IFN tipo I, por fosforilação e ativação de fatores de transcrição preexistentes tais como NF-B e IRF3. Em geral, a sequência de aminoácidos da proteína NS3 é altamente conservada. No sistema de replicação do HCV, várias mutações foram detectadas no gene NS3, que melhoram a eficiência da replicação (WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W. P.; SARRAZIN, C., 2007).

Mutações em uma região chamada determinante de sensibilidade ao IFN- α (ISDR), que compreende 40 aminoácidos na parte carboxi-terminal da proteína NS5A se mostraram significativamente relacionadas com a resposta ao tratamento com IFN- α , especialmente em pacientes infectados com o genótipo 1b (WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W. P.; SARRAZIN, C., 2007). NS5A é uma fosfoproteína associada à membrana envolvida em duas funções críticas, replicação do RNA viral e a montagem do virion. Nas células infectadas, NS5A se localiza no retículo endoplasmático (CAMUS, G. *et al.*, 2013).

Devido as altas taxas de mutações no genoma do HCV distintas populações do vírus, porém intimamente relacionadas, são geradas num único indivíduo, denominadas quasispecies virais. Dada a natureza diversa do HCV, tem-se sugerido que as variações do HCV nas infecções permitem escape a resposta imune do hospedeiro mantendo a infecção persistente (BLACKARD, J. T. 2008). Evidências crescentes sugerem um papel importante para as células TCD8 + na infecção pelo HCV. O início da resposta específica de TCD8 + no sangue periférico e fígado relacionam-se com o controle da viremia na fase aguda e a depleção por anticorpos anti-TCD8 + prolonga a replicação viral em chimpanzés (DAZERT, E. *et al.*, 2009).

3.1.7 Transmissão do HCV

A triagem inadequada de sangue transfundido e a exposição ao vírus através de hemoderivados contaminados continuam a ser as principais causas de transmissão de HCV nos países em desenvolvimento (ARSHAD, M. *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos, cerca de 4,1 milhões de pessoas estão infectados com o vírus do HCV, dos quais

aproximadamente 3,2 milhões vivem com a infecção. Novas infecções continuam a ser reportadas particularmente entre pessoas que utilizam drogas injetáveis e que estão expostas a sangue contaminado (CDC, 2013). Já em outros países desenvolvidos, a transmissão vertical é a principal via de infecção pelo HCV (ARSHAD, M. *et al.*, 2011).

Há uma forte associação entre os vírus da hepatite B (HBV), HCV e da imunodeficiência humana (HIV). As três infecções são transmitidas através do uso de drogas intravenosas ou contato sexual, embora a última via não seja a maneira usual de transmissão do HCV. No entanto, há poucas informações sobre os fatores de risco associados a essas co-infecções e sua prevalência nas diferentes populações (MIR-NASSERI, M. M. *et al.*, 2011).

A infecção pelo HCV é uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes em estágio final de doença renal. Apesar da introdução de exames de rotina para detecção de anti-HCV em doadores de sangue no início dos anos 90, a prevalência de infecção pelo HCV entre os pacientes com doença renal é mais elevada do que na população em geral. O aumento dessas infecções nesses pacientes está também associado a práticas de higiene inadequadas, incluindo injeções intravenosas por agulhas não descartáveis (LANINI, S. *et al.*, 2010).

O diagnóstico precoce pode prevenir problemas de saúde que podem resultar da infecção e evitar a transmissão para familiares e outros contatos próximos. Alguns países recomendam a triagem de pessoas que podem estar sob risco de adquirir a infecção (WHO, 2013).

3.1.8 Ciclo de vida

A replicação do HCV é extremamente robusta, produzindo uma estimativa de 10 trilhões de partículas virais por dia (BLACKARD, J. T. *et al.*, 2008). A entrada do HCV em hepatócitos requer tetraspaninas (CD81), o receptor scavenger de classe B tipo I, e a junção das proteínas claudina e ocludina. O HCV também se liga a outras moléculas, como os glicosaminoglicanos, o receptor de LDL, e as lectinas DC-SIGN e L-SIGN, porém estes não são fatores essenciais a sua entrada e não conferem a especificidade do tecido (FIGURA 3).

A entrada do vírus na célula hospedeira envolve uma série de interações complexas, incluindo ligação, entrada e fusão. Após a ligação dos fatores de entrada, o HCV é internalizado nas células-alvo através de uma endocitose pH-dependente e mediada por clatrina. Após a entrada na célula-alvo por meio de endocitose mediada por receptores, as partículas de HCV são submetidas a fusão da membrana dependente do pH dentro de um compartimento endossomal ácido para liberar o seu genoma de RNA no citoplasma.

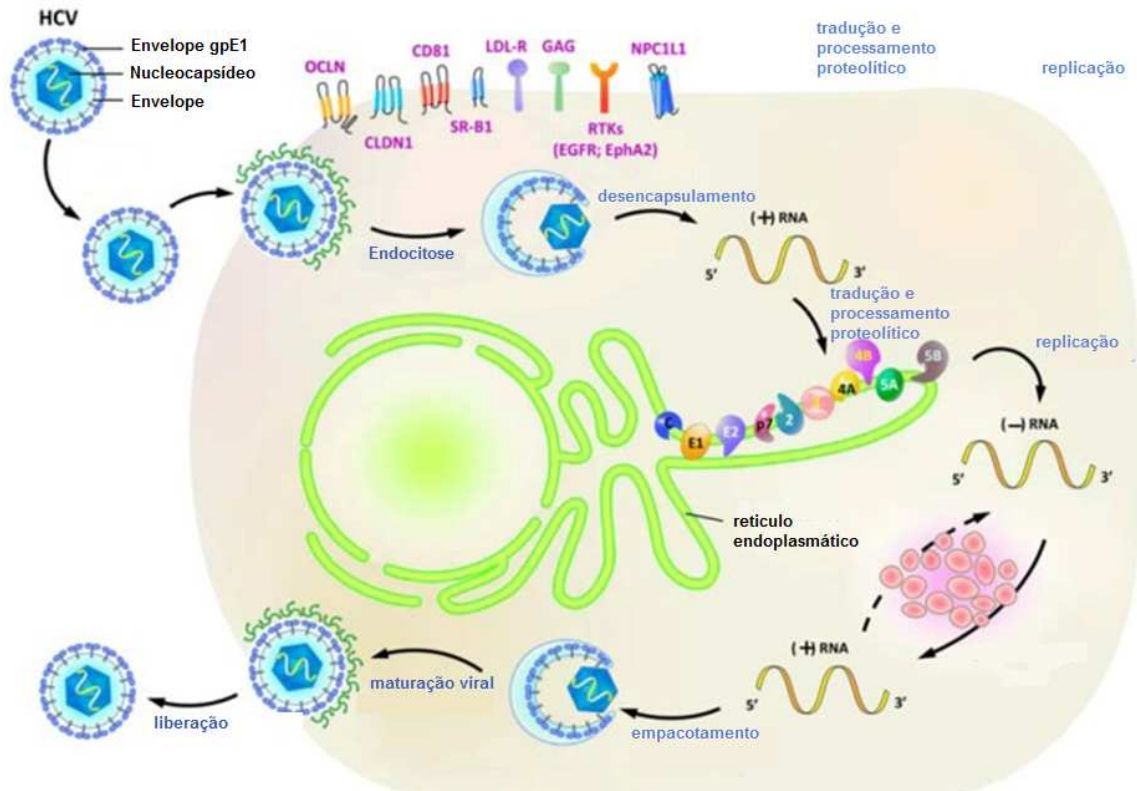


FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DO VÍRUS DA HEPATITE C

FONTE: CHEN, S. S. L.; KE, P. Y. (2012).

NOTA: Representação esquemática do ciclo de vida do HCV. As partículas virais associadas com lipoproteínas entram nas células hospedeiras por meio de ligações a (co) receptores e endocitose mediada pela clatrina. Os (co) receptores envolvidos na entrada do vírus na célula são: tetraspaninas CD81, scavenger de classe B membro I (SR-BI), Claudina 1 (CLDN1), Ocludina (OCLN), glicosaminoglicanos (GAG), receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor efrina A2 (EphA2), e de Niemann-Pick C1-como L1 (NPC1L1). Após o processo de desencapsulamento, o RNA de cadeia positiva viral é liberado, traduzido e processado em diferentes proteínas virais. As proteínas virais NS medeiam a replicação de RNA de cadeia positiva dentro de uma estrutura membranosa, chamada teia membranosa. As partículas virais infecciosas contendo RNA recém-sintetizados e proteínas estruturais virais são montadas e egressas através da via secretora.

A poliproteína do HCV é traduzida no retículo endoplasmático rugoso (RER) com a cadeia de RNA positivo como modelo, com a tradução iniciada de forma independente através do sítio de entrada no ribossomo (IRES) no sentido 5' da região não traduzida (UTR). A tradução do HCV é posteriormente processada por proteases celulares (por exemplo, peptidases de sinal) e proteases virais (NS2, NS3/4A) para gerar 10 proteínas virais individuais, incluindo núcleo e o envelope de glicoproteínas E1 e E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (FIGURA 4) (KIM, C. W.; KYONG, M. C., 2013). Seguindo a síntese e maturação, as proteínas não estruturais formam a membrana viral associada a complexos de replicação e transcrição que catalisam a fitas intermediárias de RNA a partir do qual, por sua vez, são geradas moléculas de RNA de cadeia positiva. Proteínas do capsídeo e RNA genômico se reúnem para formar um nucleocapsídeo, que brotam através de membranas intracelulares para as vesículas citoplasmáticas. Vírions maduros e envelopados deixam a célula através da via secretora (REHERMANN, B. 2009). *In vivo*, os virions de HCV em circulação estão associados a lipoproteínas e formam partículas de baixa densidade (BADIA-MARTINEZ, D. *et al.*, 2012).

O HCV se replica principalmente no fígado. Alguns RNAs são encontrados em células dendríticas, é indicativo de replicação intracelular. Mesmo após depuração espontânea ou após o tratamento do vírus na circulação, alguns RNAs virais persistem no fígado, semelhante ao que ocorre com o HBV (WARD, S. *et al.*, 2002).

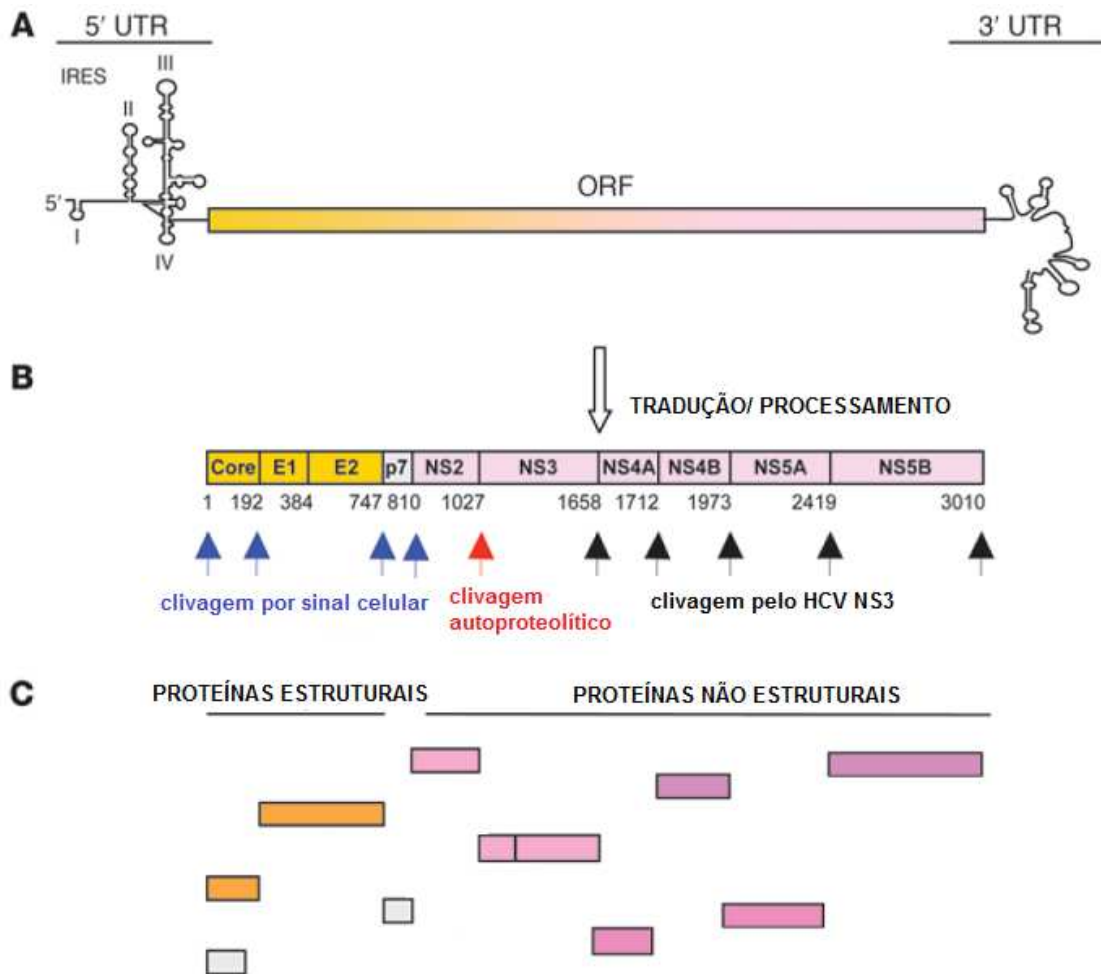


FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HCV

FONTE: REHERMANN, B. (2009).

NOTA: (A) RNA de cadeia simples. (B) A poliproteína traduzida é processada por proteases celulares e virais. (C) Resultando em 10 proteínas estruturais e não estruturais.

A ativação do complemento foi observada na infecção crônica do HCV. A região do core do HCV e proteínas NS5A causam redução na produção de C4 pela inibição da transcrição de seu mRNA. Maior atividade de C4 na infecção por HCV foi associada com melhor resposta ao tratamento padrão. Isto implica o complemento na resolução da infecção (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012).

Estes estudos indicam que o complemento tem um papel na proteção contra a infecção por HCV. Um estudo sugeriu que o HCV pode integrar CD59, molécula protetora contra lise autóloga, em partículas virais. O CD59 desempenha um papel essencial na prevenção da lise mediada pelo complemento em células hospedeiras.

Presente na superfície da maioria das células, o CD59 se liga ao complexo C5b678, impedindo a polimerização de moléculas de C9 que formam o complexo de ataque à membrana. É plausível que partículas lipo-virais de HCV incorporaram CD59 como um mecanismo para prevenir a lise mediada pelo complemento (SPEAR, G. T. *et al.*, 1995).

O HCV utiliza uma série de mecanismos para evadir as defesas do hospedeiro, incluindo elementos do sistema imune inato e humoral (TABELA 2). A maioria dos vírions circula no sangue associado com lipoproteínas, formando uma partícula lipo-viral (ANDRÉ, P. *et al.*, 2002). Estas associações são mediadas pelas glicoproteínas codificadas pelo HCV e estão intimamente relacionadas com a resistência à neutralização por anticorpos. Os vírions do HCV são também extensivamente glicosilados, o que reduz a capacidade de desencadear uma resposta imune e contribui para a evasão de reconhecimento por anticorpos neutralizantes. Apesar destes mecanismos de evasão, a imunidade inata permanece conservada; os motivos de glicosilação que são essenciais para a biogênese do HCV representam um alvo para as moléculas de reconhecimento de PAPMPs, como MBL e ficolinas. Se estas proteínas têm um efeito neutralizante sobre a replicação do vírus, seria esperado que os mutantes que escapam desse reconhecimento sejam preferencialmente selecionados (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012).

TABELA 2 - MECANISMO DE ESCAPE DO HCV DO SISTEMA IMUNE

COMPONENTES	FUNÇÕES	MECANISMO DE ESCAPE DO HCV
C4 (complemento)	Mediador da opsonização, lise direta e inflamação	Proteínas do core e NS5a inibem a transcrição de C4
C5 – C9 (complemento)	Produção do complexo de ataque à membrana	Incorporação de CD59 dentro dos vírions de HCV
Proteínas de reconhecimento de PAMPs (MBL e Ficolinas)	Reconhecimento de glicoproteínas	Diferentes padrões de glicosilação do HCV, associados com lipoproteínas podem bloquear o acesso a MBL e ficolinas

FONTE: ADAPTADO DE TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K. (2012).

3.2 SISTEMA IMUNE INATO

O sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas responsáveis por manter a homeostase do organismo, combatendo as

agressões em geral. A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S., 2012).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infecções, caracterizada por uma resposta inespecífica que compreende três processos: a identificação de patógenos e a ativação das respostas humoral e celular, destruição e eliminação dos patógenos, e ativação do sistema imune adaptativo (EVANS-OSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M., 2013).

O sistema complemento é parte do sistema imune inato e também desempenha um papel importante na ativação de células B e T, fazendo uma interface entre o sistema imune inato e adaptativo (DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W-C., 2010). A ativação do sistema complemento procede através de três vias diferentes que convergem na ativação de C3 (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005), molécula central da cascata.

3.2.1 Sistema Complemento

O sistema complemento constitui um dos principais braços efetores da resposta imune inata, atuando como primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Também desempenha um importante papel no desenvolvimento e na modulação da resposta imune adaptativa. O complemento é composto por mais de 35 proteínas, incluindo proteínas solúveis do plasma e componentes de ligação na superfície celular (GÁL, P. *et al.*, 2007). O sistema imune inato reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou células hospedeiras alteradas (padrões moleculares associados a danos) através de moléculas solúveis ou de superfície celular. O complemento pode ser ativado por três vias principais: via clássica, via alternativa e via das lectinas. Cada via utiliza moléculas de reconhecimento específico para identificar diferentes estruturas de carboidratos e compostos acetilados sobre a superfície dos patógenos (YONGQING, T. *et al.*, 2012).

3.2.1.1 Via das lectinas

A via das lectinas é uma área relativamente nova, uma vez que foi descoberta cerca de 20 anos atrás (GÁL, P. *et al.*, 2007). A ativação da via das lectinas foi observada pela primeira vez na ativação de MBL dependente de C4. Mais tarde, outro grupo de proteínas denominadas de ficolinas, foram descritas por reconhecer estruturas de superfície em bactérias, fungos e vírus e ativar a via das lectinas (YONGQING, T. *et al.*, 2012). A ativação da via das lectinas inicia-se pela ligação de MBL/ficolinas a estruturas moleculares apropriadas (GÁL, P. *et al.*, 2007). MBL/ficolinas estão complexadas a serina proteases que induzem a clivagem de C4 e C2. A enzima que inicia a via das lectinas foi descrita em 1992 e denominada de serina protease associada à MBL (MASP), sendo distinta de C1r e C1s (SCHWAEBLE, W. *et al.*, 2002). A MASP, no entanto, apesar da semelhança com a bem caracterizada via clássica e apesar de pesquisas intensas, há muitas questões em discussão sobre a estrutura, função e relevância fisiológica dos componentes individuais e de toda a via das lectinas (GÁL, P. *et al.*, 2007).

No soro, as ficolinas e a MBL circulam em complexo com as serinas proteases MASP-1, MASP-2, MASP-3 ou com as proteínas não enzimáticas MAp19 e MAp44 (WEISS, G.; MADSEN, H. O.; GARRED, P., 2007). As serina proteases estão presentes como pró-enzimas (zimogênios) e tornam-se ativas quando as moléculas de reconhecimento se ligam ao alvo (HEJÁ, D. *et al.*, 2012). Após a ligação da MBL/ficolinas aos seus ligantes, as MASPs são ativadas gerando dois polipeptídeos ligados por uma ponte dissulfeto, adquirindo assim atividades proteolíticas (MATSUSHITA, M. *et al.*, 2000). MASP-1 e MASP-2 clivam os componentes C2 e C4. O fragmento C4b se liga a superfície do patógeno e associado com C2a forma a C3 convertase (C4b2a, semelhante à C3 convertase da via clássica). Uma vez C3 é clivado, o fragmento C3b pode ligar-se à superfície do patógeno ativando a via alternativa, ou pode se ligar ao C4b2a (C3 convertase da via clássica ou da via das lectinas) para formar a C5 convertase (C4b2a3b). C3b também pode se ligar a C3 convertase da via alternativa, C3bBb, e formar a C5 convertase C3bBb3b. Uma vez formada C5 convertase, esta cliva C5 em C5a e C5b. C5b se liga a superfície do

patógeno formando uma âncora juntamente com C6, C7 e C8, para formação do complexo de ataque à membrana (MAC) pela polimerização de 10-16 moléculas de C9 (EVANS-OSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M., 2013) (FIGURA 5).

Embora a concentração de MASP-2 no plasma humano seja relativamente baixa (0,5 µg/ml), especialmente em comparação com a concentração das proteases iniciadoras da via clássica C1r e C1s (50 µg/ml), MASP-2 pode desencadear eficientemente a cascata do complemento. Na ausência de MASP-2 a via das lectinas não é funcional, como foi demonstrado pela depleção de MASP-2 em soro humano e por camundongos nocaute para MASP-2 (HÉJA, D. *et al.*, 2012).

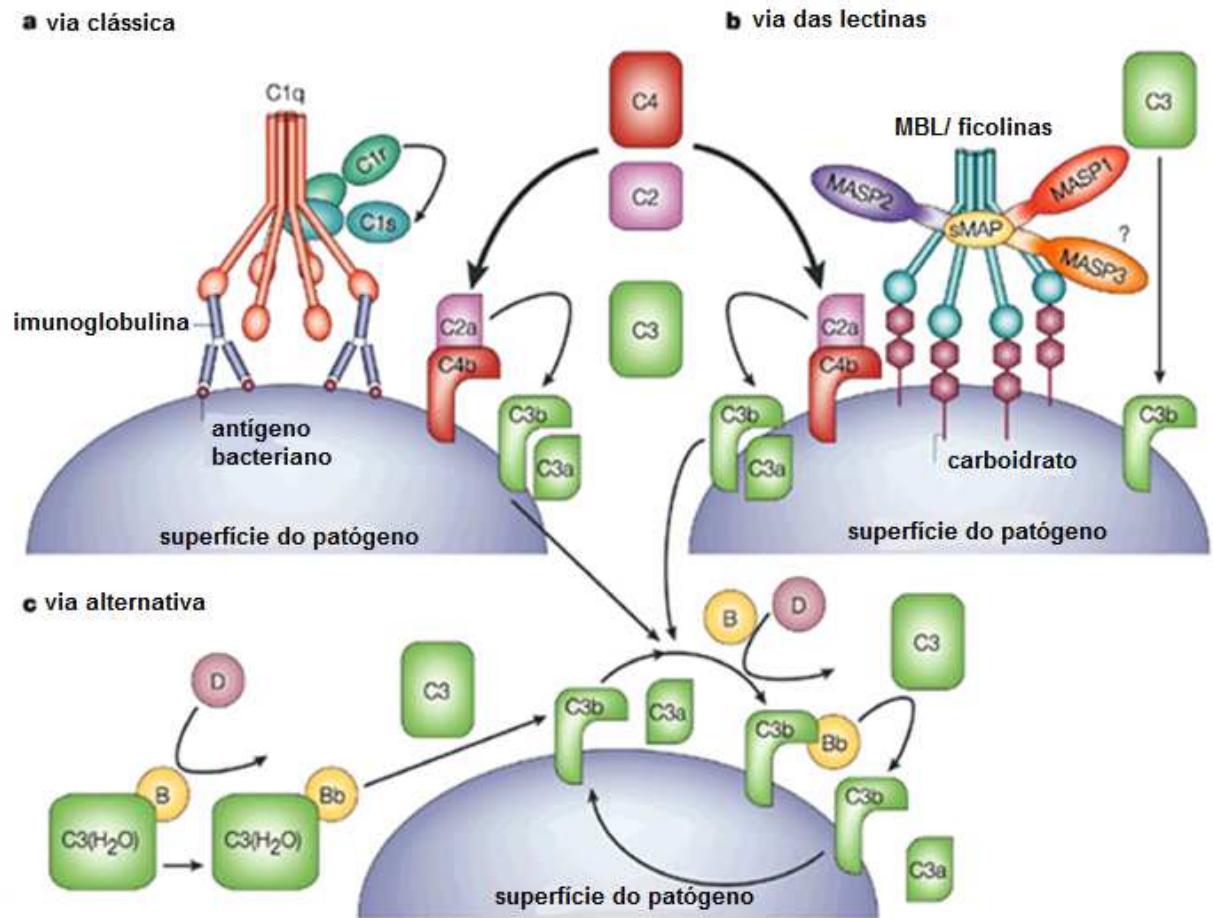


FIGURA 5 - SISTEMA COMPLEMENTO

FONTE: FUJITA, T. (2002).

NOTA: a) A via clássica é iniciada pela ligação do complexo C1 a anticorpos que se ligam aos antígenos sobre a superfície das bactérias. O complexo C1 é composto por C1q e duas moléculas de cada C1r e C1s. A ligação de reconhecimento com o subcomponente C1q com porção Fc das imunoglobulinas resulta na autoativação da serina protease C1r. Então C1r cliva e ativa C1s, o que converte a ativação do complexo C1 para a ativação do complemento através da clivagem de C4 e C2 para formar um complexo enzimático C4bC2a. C4bC2a atua como uma C3 convertase e cliva C3, o que resulta em produtos que se ligam e provocam a destruição de bactérias invasoras. b) A via das lectinas é iniciada pela ligação tanto de lectina ligadora de manose (MBL) quanto ficolina - associada com serina protease 1 associada à MBL (MASP-1), MASP-2, MASP-3 e pequenas proteínas associadas à MBL (sMAP) - para uma série de grupos de carboidratos na superfície de uma célula bacteriana. Semelhante à C1s, MASP-2 é responsável pela ativação de C4 e C2, o que leva à geração da mesma C3 convertase (C4bC2a) como na via clássica. MASP-1 é capaz de clivar directamente C3. c) A via alternativa é iniciada pela ativação de baixo grau de C3 por hidrólise de C3 (C3 (H₂O)) e ativado pelo fator B (Bb). O C3b ativado se liga ao factor B (B), que é depois clivado em Bb pelo factor D (D) para formar a C3 convertase da via alternativa, C3bBb. Uma vez que o C3b está ligado à superfície celular, o ciclo de amplificação consiste em componentes da via alternativa, e a enzima C3 convertase cliva muitas moléculas de C3 a C3b, que se ligam covalentemente ao redor do local de ativação do complemento.

3.2.1.2 MBL

A lectina ligante de manose (MBL) tem um importante papel na defesa do organismo contra infecções, devido à sua capacidade em ativar o complemento e induzir a fagocitose. A MBL reconhece N-acetilglucosamina e resíduos de manose na superfície de muitos microorganismos incluindo vírus e bactérias. A glicoproteína E2 do envelope do HCV tem 11 sítios de N glicosilação e grande parte dos oligossacarídeos de superfície expressam resíduos de manose, permitindo o reconhecimento do HCV por MBL (SEGAT, L. *et al.*, 2007).

A MBL é uma proteína plasmática de origem hepática, e pertence a família de proteínas conhecidas como colectinas. Colectinas são oligômeros constituídos por cadeias de polipeptídeos, caracterizados por um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) ligado a uma região semelhante ao colágeno (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

A MBL tem uma estrutura que lembra um *bouquet* e é semelhante a proteína iniciadora da via clássica C1q (EVANS-OSSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M., 2013). A MBL humana é codificada pelo gene *MBL2*, enquanto *MBL1* é um pseudogene. A transcrição, a recomposição e tradução do gene *MBL2* geram uma cadeia polipeptídica de 24 kDa. Devido à modificações pós-traducionais, a proteína MBL tem um peso molecular de 32 kDa (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005). A MBL forma estruturas oligoméricas que variam de dímeros a hexâmeros. A proteína é caracterizada pela lectina CRD, uma região de pescoço hidrofóbico, uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína. Cada domínio se liga a um íon Ca^{2+} e coordena a interação com o grupo 3- e 4-hidroxila específicos de açúcares, tais como GlcNAc, manose, N-acetil manosamina, fucose, e de glucose (EVANS-OSSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M., 2013).

A sigla MBL, lectina ligante de manose, indica uma seletividade especial para manose, porém a MBL não é específica para esse açúcar em particular. O principal determinante na seletividade de distintos carboidratos é a presença de grupos hidroxila horizontais nas posições 3' e 4' no anel de piranose (como, por exemplo, D-manose, N-acetil-D-glucosamina, D-glucose e L-fucose), ao passo que a MBL não se liga a D-

galactose com o grupo hidroxila vertical na posição 4' (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

Dependendo do genótipo viral, E1 and E2 possuem 13 a 15 sítios de glicosilação que representam alvos de ligação para MBL, onde foi observado associações de genótipo e concentrações de MBL2 e a hepatite C. Concentração reduzida de C4 foi observada na infecção crônica (DUMESTRE-PERARD, C. *et al.*, 2001). E maior atividade de C4 foi associada com melhor resposta ao tratamento com interferon alfa 2b e ribavarina (DUMESTRE-PERARD, C. *et al.*, 2001). Ainda, polimorfismos do gene *MBL2* foram associados com a resposta ao tratamento (MATSUSHITA, M. *et al.*, 1998) A expressão gênica da MBL é diferente nas diversas populações mundialmente estudadas, a variante B é mais freqüente entre caucasianos europeus (29%) e em populações japonesas (37%); a variante C é característica das populações africanas do sub-Sahara, com frequência de 50 a 60% e a mutação D alcança frequências baixas em todas as populações (SASAKI, K. *et al.*, 2000). Esses dados indicam um papel do complemento na infecção pelo HCV.

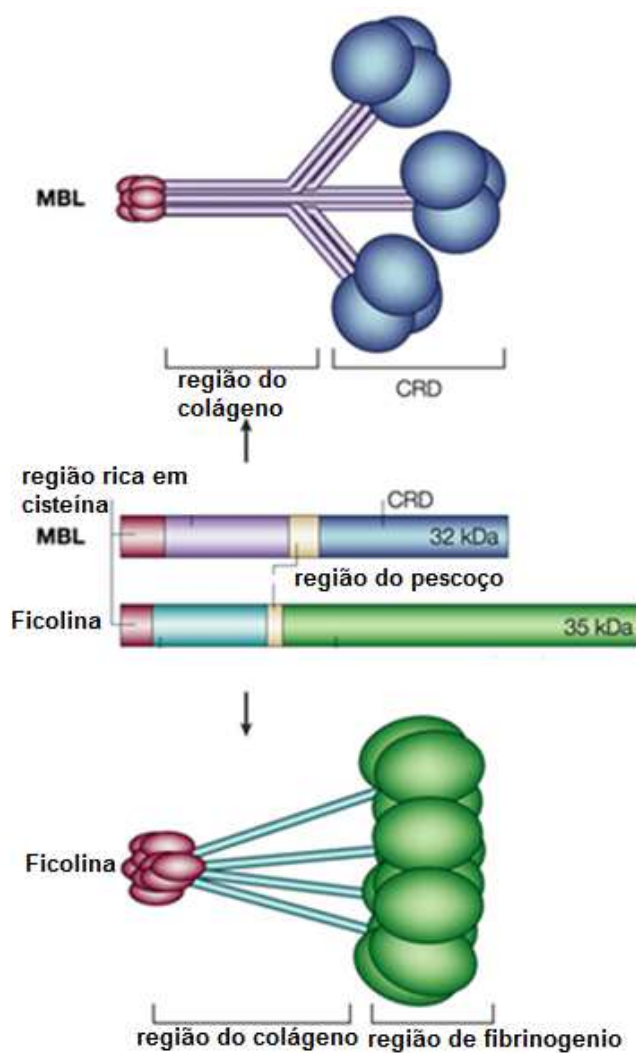
3.2.1.3 Ficolinas

Três ficolinas foram descritas em seres humanos, a ficolina L (ou ficolina 2), ficolina H (ou ficolina 3) e ficolina M (ou ficolina 1). Não há similaridade significativa entre a sequência das ficolinas e de MBL (além da região semelhante ao colágeno), porém as estruturas nativas mostram formas notavelmente semelhantes (FIGURA 6) (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

As ficolinas são compostas por uma região N-terminal curta com um ou dois resíduos de cisteína, seguida por um domínio semelhante a colágeno, uma pequena região de vínculo e um domínio subsequente semelhante ao fibrinogenio. As ficolinas formam subunidades trimericas através da ligação de um domínio semelhante ao colágeno. Estas subunidades, por sua vez, organizam oligômeros ativos através da ligação de quatro subunidades via pontes dissulfeto nas regiões N-terminais. Através do domínio C-terminal semelhante ao fibrinogénio, as ficolinas reconhecem carboidratos acetilados tais como GlcNAc, que estão amplamente presentes em uma variedade de

patógenos mas não em células humanas (EVANS-OSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M., 2013).

As ficolinas L e H são proteínas plasmáticas sintetizadas pelos hepatócitos. A ficolina H também foi observada no fluído brônquico alveolar e na bilis, enquanto que a ficolina M está restrita à superfície de monócitos de sangue periférico (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).



Nature Reviews | Immunology

FIGURA 6 - ESTRUTURA DA MBL E FICOLINAS
 FONTE: FUJITA, T. (2002)

3.1.1.1.3 SERINA PROTEASES ASSOCIADAS À MBL – MASPs

As MASPs interagem com MBL/ficolinas através das regiões colagênicas de oligômeros maiores de MBL e ficolinas (BROWN, K. S. *et al.*, 2007a). Cinco proteínas associadas a MBL foram até agora identificadas, incluindo três enzimas, denominadas MASP-1/-2/-3, uma proteína não enzimática, MAp19 (ou sMAP), também codificada pelo gene *MASP2* e outra proteína não catalítica, MAp44 (ou MAP1), que, assim como MASP-1 e MASP-3, é codificada pelo gene *MASP1* (YONGQING, T. *et al.*, 2012).

As mais abundantes proteases da via das lectinas são a MASP-1 e MASP- 2, porém a MASP-3 está presente em concentrações surpreendentemente altas no soro humano (SKJOEDT, M-O. *et al.*, 2010). A MASP-3 inibe a ativação do complemento mediada por MBL e a interação entre MASP-3 e FCN-3 pode ter um efeito inibitório na ativação do complemento mediada pela FCN-3. Embora ainda não se conheça o verdadeiro substrato biológico de MASP-3, o complexo FCN-3/MASP-3 deve ser um importante mediador biológico (SKJOEDT, M-O. *et al.*, 2010).

Existe um consenso que MASP-2 pode se autoativar e clivar C4 e C2, mas a especificidade do substrato e o papel fisiológico de MASP-1 e MASP-3 ainda não são conhecidos (GÁL, P. *et al.*, 2007). HÉJA *et al.* (2012) demonstraram que a MASP-1 é capaz de clivar C2 e aumentar a capacidade de MASP-2 e gerar C4b2a, entretanto a MASP-1 cliva C2 de uma forma menos eficiente que MASP-2 mesmo estando em maiores concentrações (FIGURA 7).

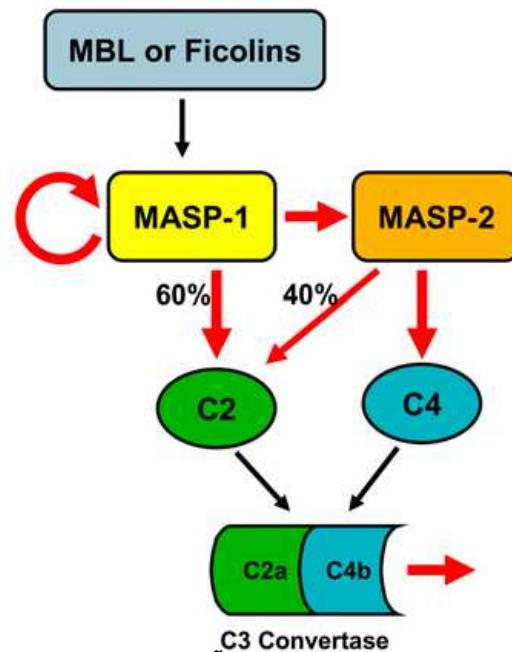


FIGURA 7 - MODELO PROPOSTO DE ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS
 FONTE: HÉJA, D. *et al.*, (2012).

NOTA: O modelo indica que a MASP-1 controla todo o processo de ativação. MASP-1 autoativa e cliva a MASP-2. A MASP-2 ativa cliva C4 e o C4b depositado se liga a C2, que é então clivado principalmente (60%) pela MASP-1 e, em menor grau (40%) por MASP-2. Isto resulta na formação do complexo C4b2a. As setas vermelhas indicam clivagem proteolítica.

As MASPS são serina proteases solúveis presentes no soro humano. MASP-1, MASP-2, e MASP-3 são sintetizadas como pró-enzimas com pesos moleculares aparentes de 90 kDa, 74 kDa, e 94 kDa, respectivamente. O alinhamento das sequências das MASPs e C1r/C1s revelou que estas proteínas são membros da mesma família MASP/C1r/C1s. Esses membros possuem uma tríade catalítica conservada His / Ser / Asp (YONGQING, T. *et al.*, 2012). C1r, C1s, MASP-1, MASP-2 e MASP-3 formam a família de serina proteases (SPs) que possuem organização idêntica de domínios e estrutura semelhante (GÁL, P. *et al.*, 2007).

3.3 SERINA PROTEASE ASSOCIADA À MBL – MASP-2

3.3.1 Estruturas e Funções

MASP-2 e MAp19 (proteína associada a MBL de 19 kDa, também denominado pequena proteína associada à MBL ou sMAP) são codificadas pelo gene *MASP2* (STOVER, C. M. *et al.*, 1999). A MAp19 é um produto truncado de 19 kDa, originado por splicing alternativo e poliadenilação do transcrito primário de RNA do gene *MASP2* (YONGQING, T. *et al.*, 2012). A MAp19 é constituída pelo primeiro domínio CUB e o domínio EGF, com uma pequena cauda C-terminal adicional de quatro resíduos de aminoácidos únicos (EQSL). Estes quatro resíduos de aminoácidos são codificados pelo exon 5 do gene *MASP2*, que também abriga a região 3' não traduzida (UTR) (DEGN, S. E. *et al.*, 2011). O exon 5 é exclusivo de Map19 e contém um códon de término e um sinal de poliadenilação alternativo (TAKAHASHI, M. *et al.*, 1999). Foi sugerido que a MAp19 atua como um inibidor do crescimento de cristais de oxalato de cálcio na urina humana (KANG, I. *et al.*, 1999). Mais recentemente, foi relatado que MAp19 compete com MASP-2 para a ligação a MBL, conduzindo à atenuação da atividade de clivagem de C4 e, portanto, a regulação negativa da ativação do complemento (IWAKI, D. *et al.*, 2006). Sequências de junção de splicing no gene *MASP2* sugerem que um mecanismo de splicing/ poliadenilação alternativa leve à formação de dois transcritos de RNAm que codificam duas proteínas diferentes do mesmo gene, MASP-2 e MAp19. Os locais de splicing podem ser reforçados por certos nucleotídeos ao redor das junções: citosinas nas posições 9, 14 e 15 a partir do primeiro local de splicing 5', na sequência de ramificação na posição -72 a partir do primeiro sítio acceptor 3' e polipirimidinas precedendo os três sítios aceptores. Essas sequências se concentram em torno da primeira junção de splicing a 5' e a 3', o que pode torná-las, assim como o sinal de poliadenilação (AATAAA) na posição 133 a partir do primeiro sítio acpetor a 3', mais eficiente no processo de união de exons, se sobrepondo a outros sinais de processamento a jusante. Para comparação, o sinal de poliadenilação usado na geração da cauda poli (A) da MASP-2, CATAAA, é bastante fraco. Em experimentos *in vitro*, esta sequência diminuiu significativamente a eficiência

da poliadenilação e da clivagem (STOVER, C. M. *et al.*, 2001). O mRNA da Map19 só foi encontrado no fígado (STOVER, C. M. *et al.*, 2004). A MASP-2 é uma proteína do soro predominantemente sintetizada pelo fígado com um tamanho de ~75kDa e é constituída por três domínios N-terminal não catalíticos (CUB1-EGF-CUB2) e três domínios catalíticos (FIGURA 8) (CCP1-CCP2-SP) (YONGQING, T. *et al.*, 2012).

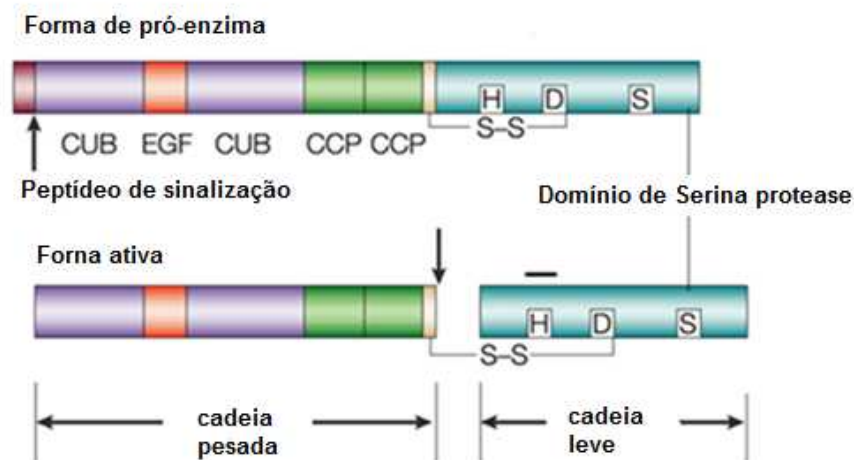


FIGURA 8 - ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA MASP-2

FONTE: FUJITA, T. (2002).

NOTA: Lectina ligante de manose (MBL) associada à serina protease 1 (MASP-1), MASP-2, MASP-3, complementam o componente 1r (C1r) e C1s composto por seis domínios: CUB 1 (domínios C1r, C1s, Uegf e domínio ósseo morfogenético), EGF (fator de crescimento epidérmico), CUB 2, CCP 1 (proteína de controle do complemento), CCP 2 ou domínios de repetições de consenso curtas (SCRs), e um domínio de serina protease (SP). Resíduos de Histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S), são essenciais para a formação do centro ativo no domínio da serina protease. Apenas MASP-1 tem dois resíduos de cisteína adicionais na cadeia leve, que formam um loop de histidina e ponte dissulfeto (S-S), como é encontrado na tripsina e quimotripsina. Na ligação da MBL e ficolinas com carboidratos sobre a superfície de patógenos, a forma de pró-enzima da MASP é clivada entre o segundo CCP e o domínio de protease, o que resulta na forma ativa que consiste em dois polipeptídeos - cadeias pesada e leve (também conhecido como cadeias A e B).

O domínio CUB N-terminal é seguido por um domínio de fator de crescimento epidérmico (EGF), o segundo domínio CUB e um módulo de repetição em tandem de módulos da proteína de controle do complemento (CCP) (FIGURA 9). Estas enzimas são sintetizadas por uma cadeia de pró-enzimas e tornam-se ativas quando a ligação argenina- isoleucina (Arg - Ile) é clivada entre o peptídeo de ativação e o domínio SP,

resultando em duas cadeias (cadeia A e cadeia B) unidas por uma ponte dissulfeto. As cadeias A tem um comprimento 20-440 aminoácidos, enquanto que a cadeia B da MASP-3 (280 aminoácidos) é mais longa do que os domínios SP e do que outras quatro proteases (242 aminoácidos para C1r e MASP-2, e 251 aminoácidos para C1 e MASP-1). MASP-2 não tem modificações pós-translacionais enquanto a cadeia A das outras quatro proteases são N – glicosilados (dois sítios de glicosilação para a C1r e C1s, e quatro locais de glicosilação de MASP-1/3) (GÁL, P. *et al.*, 2007).

O domínio CUB tem cerca de 110 resíduos de aminoácidos e é encontrado em muitas proteínas diferentes. O alinhamento da sequência de aminoácidos revelou que o módulo CUB1 da MASP em humanos (bem como em C1r e C1s) carece das primeiras duas fitas β paralelas presentes nas estruturas CUB previamente determinadas e também a primeira das duas pontes dissulfeto (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

O domínio EGF é encontrado em muitas proteínas e é conhecido por mediar as interações proteína-proteína. Este domínio tem cerca de 50 resíduos de aminoácidos e é dobrado em uma estrutura alongada com dupla cadeia de folhas β antiparalelas ligadas por cinco loops. Um subgrupo de domínios EGF, incluindo aqueles de MASP, C1r e C1s, ligam Ca^{2+} por meio de uma sequência consenso de cinco aminoácidos: Asp/ Asn, Gln/ Glu, Asp*/ *Asn, Tyr/ Phe, onde o asterisco denota hidroxilação β pós-traducional (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

As MASPs (incluindo a MAP19) formam homodímeros. Cada homodímero associa-se individualmente com MBL e ficolinas principalmente através do domínio N-terminal do CUB1-EGF de modo dependente de Ca^{2+} embora o CUB2 também contribui para estas interações (EVANS-OSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M., 2013).

A função de MAP19 ainda não é totalmente compreendida, mas devido à sua capacidade de se ligar a MBL e ficolinas, supõe-se que MAP19 compete com as MASPs inibindo a ativação da via das lectinas. Para que isso seja eficaz, no entanto, as concentrações das MASPs e MAP19 teriam que ser maiores do que o número total de sítios de ligação a MBL e ficolinas no sangue o que é pouco provável, uma vez que MBL e ficolinas estão presentes em quantidades excessivas na circulação (YONGQING, T. *et al.*, 2012).

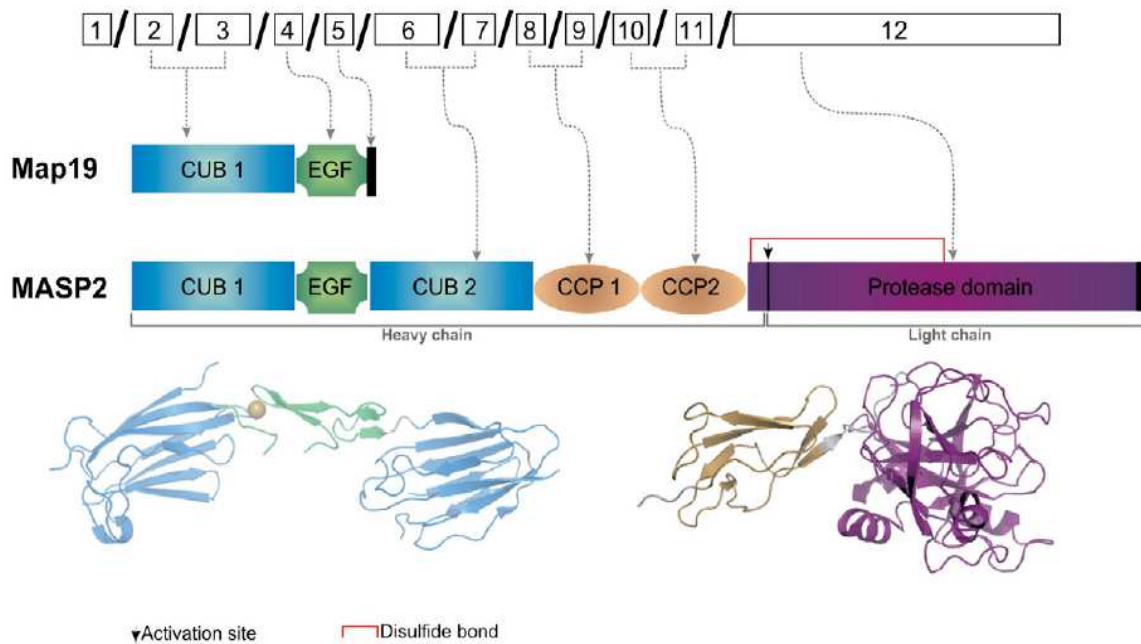


FIGURA 9 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *MASP2* E ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS MASP-2 E Map19

FONTE: YONGQING, T. *et al.* (2012).

NOTA: No topo, a estrutura de exons e introns do gene *MASP2*. Map19 contém os exons que codificam para o domínio CUB1 e EGF. A seta indica o vínculo Arg/ Ile e a linha vermelha indica a ligação dissulfeto segurando as duas cadeias juntas. Resumindo, as estruturas cristalinas humanas de MASP-2 CUB1-EGF-CUB2 e a região catalítica de MASP-2 são mostradas como diagramas de fita com os domínios de cor da mesma forma que nos esquemas de domínio acima. O íon de cálcio na interface dos domínios EGF CUB1 é mostrado como uma esfera bege.

3.3.2 Gene *MASP2* e seus polimorfismos

O gene *MASP2* está situado no cromossomo 1p36.23-31 (STOVER, C. *et al.*, 2001). A MASP-2 e a Map19 são produtos de mRNA gerados por recomposição alternativa de um único transcrito primário de RNA. O gene *MASP2* humano abrange 12 exons e o mRNA é codificado por 11 destes exons, dos quais um único codifica a região de ligação e o domínio de serina protease. O exon 5 permite a produção de mRNA da Map19 englobando os dois primeiros domínios comuns e quatro aminoácidos adicionais na região C terminal de Map19. O fígado é o único tecido onde MASP-2 e mRNAs da Map19 foram detectados (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

Deficiência de MASP-2 foi descrita como resultado de uma mutação que causa a troca de ácido aspártico por glicina na posição 105 no primeiro domínio CUB1, envolvido na ligação de cálcio. Esta mutação impede a ligação de MASP-2 a MBL e ficolinas, e bloqueia sua atividade funcional. O defeito funcional da MASP-2 mutante pode ser explicado pela perda de capacidade de ligação ao cálcio, essencial na associação e estabilidade de complexos MBL /MASP (WEISS, G.; MADSEN, H. O.; GARRED, P., 2007). No estudo de Olesen e colaboradores (2006) foi encontrado um paciente homocigoto para o polimorfismo *p.D120G, c.359A>G* causando a deficiência de MASP-2. Este paciente tinha um grau extremamente grave de doença pulmonar, assim, foi sugerido que a principal causa foi a deficiência de MASP-2. Entretanto, as concentrações séricas de MASP-2 são menores em indivíduos heterocigotos para este alelo do que em pessoas homocigotas (OLESEN, H. *et al.*, 2006). A deficiência homocigótica (*G/G*) de MASP-2 poderia ter um papel maior na susceptibilidade e gravidade da pneumonia adquirida na comunidade (PAC), porque a L-ficolina se liga a *S aureus*, *S. pneumoniae*, e aos ácidos lipoteicóico de bactérias gram-positivas, e a L- e H-ficolina participam do depuramento de células em apoptose (GARCIA-LAORDEN, M. I. *et al.*, 2008). No entanto, no estudo de Garcia-Laorden e colaboradores (2008) foram relatados apenas 2 indivíduos saudáveis com deficiência de MASP-2, e um terceiro doador saudável deficiente de MASP-2 foi identificado relacionado a homocigose *G/G*, mostrando que a penetrância clínica da deficiência de MASP-2 pode ser também muito baixa.

Vários polimorfismos do gene *MASP2* (FIGURA 10) foram descritos em diferentes populações, dentre os quais os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): *g.4847A>C* (rs7548659), *p.R99Q* (rs61735600), *p.D120G* (rs72550870), *p.P126L* (rs56392418), *g.7164A>G* (rs2273344), *g.7441G>A* (rs9430347), *g.21081C>T* (rs17409276), *p.D371Y* (rs12711521), *p.V377A* (rs2273346), *p.R439H* (rs12085877) e *g.24762T>C* (rs1782455). Alguns desses polimorfismos interferem na expressão do gene. Estudos relataram uma redução de concentrações da MASP-2 em indivíduos com alelo C na posição *g.21389C>T* (*p.V377A*). Mais recentemente, o mesmo grupo observou que, quando ambos *p.D120G* estava presente, a proteína era deformada e portanto, incapaz de se associar com MBL (THIEL, S. *et al.*, 2009).

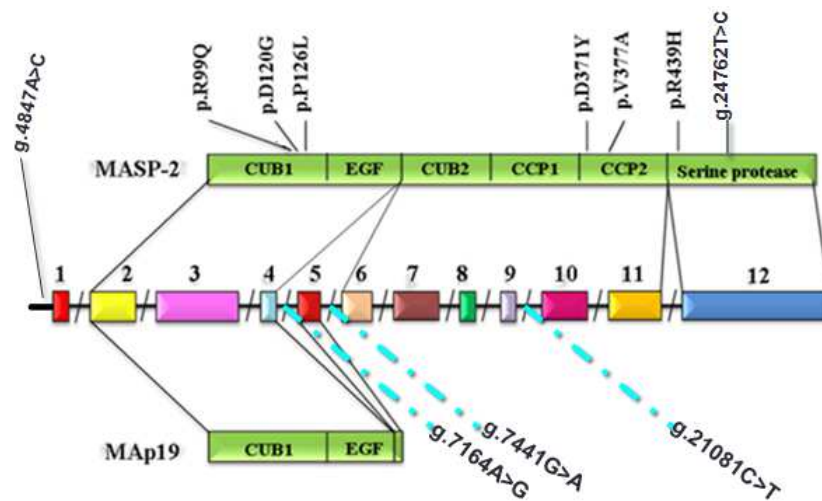


FIGURA 10 - ESTRUTURA GÊNICA E POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* E RELAÇÃO COM OS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS *MASP-2* E *Map19*
 FONTE: BOLDT *et al.*, (2012).

A nomenclatura filogenética para *MASP2* foi sugerida a partir de dois clados, cada um com 5 haplótipos que surgiram da sequência hipotética mais antiga CRDPCDVRC. O clado *1 é representado por CRDPCDVRC e todos os outros haplótipos com *g.24762C* no exon 12. O clado *2 é representado por CRDPCDVRT e os outros quatro haplótipos com *g.24762T* (FIGURA 11). O clado *1B tem o *g.21081T* do intron 9 em comum. No mesmo estudo foi encontrada uma associação entre estas variantes e concentrações altas de *MASP-2* no soro (BOLDT, A. *et al.*, 2011a). O clado *1C é representado por dois haplótipos associados com baixas concentrações de *MASP-2*, apresentando *p.126L* ligada a *p.439R* ou *p.439H*. Os haplótipos do clado *2A compartilham a *p.371D* e as variantes *g.24762T* no exon 12. A variante *p.377A* ocorre neste contexto e está associada com baixas concentrações de *MASP-2* (haplótipo *2A2-*l*). Os haplótipos do clado *2B têm a variante *p.371Y* em comum. O haplótipo *2B1 tem a variante *g.4847C* do promotor, enquanto que os haplótipo *2B2 compartilham a variante *g.4847A*, com o alelo *p.120G* (*2B2B-*l*) (BOLDT, A. *et al.*, 2011a).

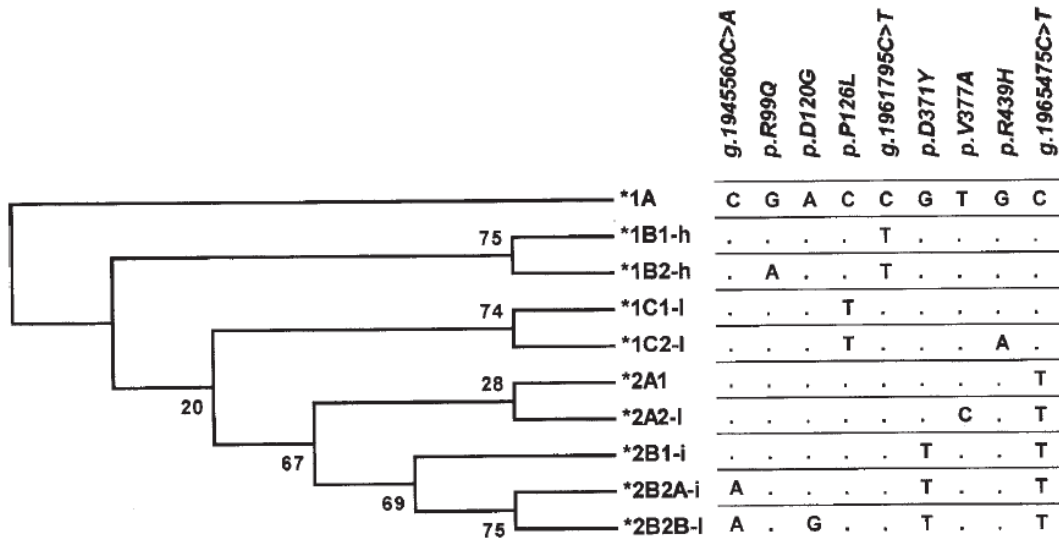


FIGURA 11 - NOMENCLATURA FILOGENÉTICA DE MASP2

FONTE: BOLDT, A. *et al.*, (2011a).

NOTA: Árvore filogenética dos haplótipos de MASP2 com as posições correspondentes ao SNPs (GenBank: NT_021937.18, CAB50735). Onde as terminações “h”, “i” e “l” se referem aos haplótipos de MASP2 descritos como alto (≥600 ng/mL), intermediário (200-600 ng/mL) e baixo (<200 ng/mL) produtores de proteína.

3.3.3 MASP-2 e Associação com Doenças

A via das lectinas desempenha um papel importante no sistema imune inato, especialmente durante a primeira infância, quando o sistema imune adaptativo ainda está em desenvolvimento, ou quando a imunidade adaptativa está comprometida em adultos. Evidências crescentes têm demonstrado que deficiência de MBL e MASP-2 determinadas geneticamente estão associadas com a susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes (SCHAFRANSKI, M. D. *et al.*, 2008) indicando a importância dessas proteínas na defesa do organismo. Inversamente, concentrações elevadas de MBL foram associadas com doença inflamatória crônica e infecções por microrganismos intracelulares, indicando um papel pró-inflamatório para MBL nestas condições (SCHAFRANSKI, M. D. *et al.*, 2008).

Em 2005, foi identificada pela primeira vez deficiência de MASP-2 em um paciente com repetidas infecções e manifestações autoimunes, propondo a deficiência de MASP-2 como uma nova imunodeficiência congênita. Uma vez que MASP-2 está envolvida na atividade biológica de MBL e ficolinas, suspeita-se que a deficiência de

MASP-2 tenha consequências mais amplas do que a deficiência de MBL (SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C., 2005).

Os efeitos clínicos da deficiência de MASP-2 permanecem controversos. Embora homozigose para a mutação de ponto no exon 3 que resulta em troca de aminoácido D105G (D120G se o peptídeo de sinal for contado), próxima à extremidade C-terminal no domínio CUB1, foi associada a infecções recorrentes e manifestações de doença autoimune (YONGQING, T. *et al.*, 2012). A mutação D105G tem sido encontrada com uma frequência relativamente alta em certas populações (isto é, um em 1000 na população dinamarquesa). Alguns autores têm sugerido que enquanto a deficiência de MASP-2 em si não causa normalmente doenças graves, quando combinada com outras doenças ou estados de imunossupressão, como a fibrose cística ou transplante, pode ter consequências mais graves (YONGQING, T. *et al.*, 2012).

Uma área de estudo em crescimento é a investigação do papel da MASP-2 em vários tipos de câncer, sobretudo no câncer colorretal (CCR), o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo industrializado. As concentrações séricas de MASP-2 e atividade funcional estão aumentados em pacientes com CCR em comparação com controles saudáveis (YONGQING, T. *et al.*, 2012). Aumento da concentração de MASP-2 também tem sido detectado em pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC). Em estudo com pacientes pediátricos com neoplasias hematológicas, alta concentração de MASP-2 no soro estava associada a maior sobrevida livre de eventos. Surpreendentemente, também pode haver uma relação entre o aumento da atividade de MASP-2 e esquizofrenia. Alguns estudos têm mostrado pacientes com esquizofrenia apresentam aumento na atividade de MBL ligada a MASP-2 (YONGQING, T. *et al.*, 2012).

Haplótipos de *MBL2* têm sido associados à progressão da doença e a resposta ao tratamento da hepatite C, no entanto, o impacto de polimorfismos de *MASP2* na susceptibilidade à infecção por HCV foi pouco investigado.

3.3.4 Interação do HCV e complemento

A ativação do complemento pela infecção do HCV ocorre por cinco mecanismos distintos (FIGURA 12). Primeiro, ocorre o reconhecimento através de anticorpos das glicoproteínas do envelope viral E1 e E2 seguida por uma deposição da proteína de reconhecimento multimérica C1q. C1q então recruta as serina proteases C1r e C1s, que catalisam a clivagem da proteína C4 nas subunidades C4a e C4b. O segundo mecanismo de ação é a ligação direta de C1q na superfície viral, na ausência de imunoglobulina. Em terceiro lugar, o complemento é ativado pela via das lectinas. Ficolinas e MBL ambos se ligam as glicoproteínas, recrutando as serina proteases associadas a MBL (MASP) para a superfície do patógeno, que posteriormente fazem a clivagem da proteína C4. O quarto mecanismo de ativação é a deposição espontânea de C3b em partículas virais, isto é independente do reconhecimento de patógenos por PRRs. O C3b age como uma potente opsonina, recrutando células apresentadoras de antígenos para o antígeno viral. Ele também pode neutralizar a infectividade do vírus através da agregação de partículas virais. Além disso, em complexo com o C3b ou C4b2a, ou factor Bb forma o complexo C5 convertase. Isto leva à deposição de C5b, C6, C7, C8, C9 e proteínas sobre a membrana do vírus (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012). Outros componentes do complemento tem propriedades pró-inflamatórias. Os produtos de clivagem solúveis C3a e C5a também iniciam a inflamação, resultando no recrutamento de monócitos e neutrófilos. A cascata do complemento é estreitamente regulada em cada etapa de ativação, para evitar a ação não específica dos componentes do complemento, protegendo as células hospedeiras da lise e ataque auto-imune. O principal regulador do complemento é Fator H, que atua como um co-fator para a C3bBb. Dados indiretos também suportam a hipótese de que o complemento tem um papel na proteção contra a infecção por HCV (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012). A ação do complemento é modulada por receptores que se ligam a C1q. O receptor de gC1q-R é uma proteína de ligação expressa na superfície de monócitos e macrófagos. A proteína gC1q-R tem especificidade para a cabeça globular da molécula de C1q. A região do core do HCV interage diretamente com a proteína de gC1q-R, que resulta na ativação reduzida de

células T. As proteínas da região do core mimetizam a estrutura da proteína de C1q, de modo que anticorpos com atividade cruzada são produzidos durante a infecção. Isto implica que o core sequestra componentes do complemento e atua na prevenção da ativação (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012).

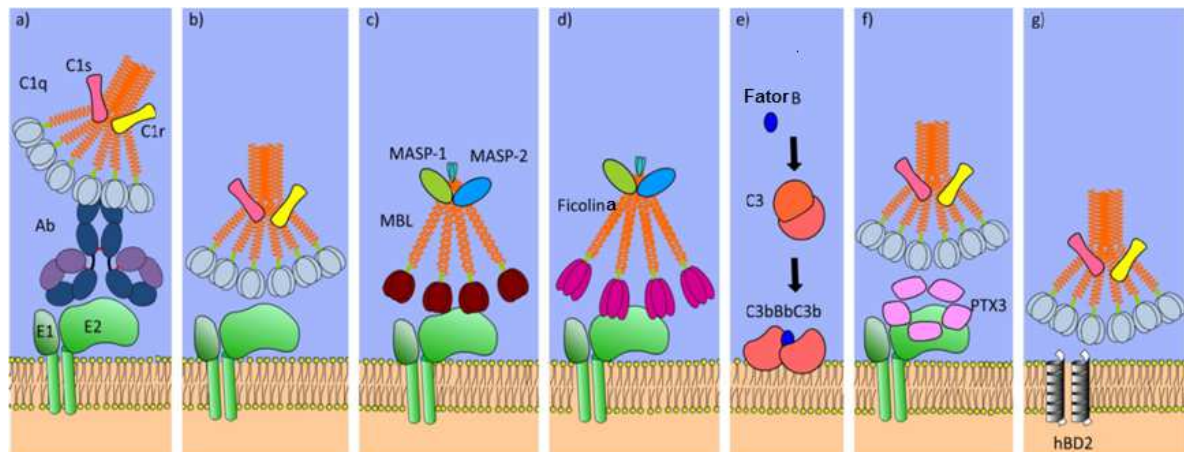


FIGURA 12 – MECANISMOS DE RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS VIRAIS POR PROTEÍNAS INATAS HUMERAIS QUE RESULTAM NA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.

FONTE: TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012

NOTA: Os caminhos de ativação do complemento incluem reconhecimento de glicoproteínas virais (no caso do HCV, glicoproteínas E1 e E2) por: (a) a ligação do anticorpo (Ab) seguida pela ligação de C1q; (b) ligação direta do C1q; (c) reconhecimento através de lectina ligante de manose (MBL) e serina proteases associadas a MBL (MASPs); (d) bem como ficolinas; (e) deposição direta de C3b à superfície do vírus ou células infectadas por vírus após a ativação pelo Fator B. Mecanismos adicionais para ativação do complemento por vírus são (f) pentraxina (PTX3); e (g) ligação de C1q para o HBD-defensina-2 inserido dentro de uma membrana.

Um estudo recente sugere que o HCV pode incorporar CD59 em partículas virais. O CD59 desempenha um papel essencial na prevenção da lise mediada pelo complemento das células hospedeiras. Presentes na maioria das superfícies das células, o CD59 liga-se ao complexo C5b678, impedindo o acúmulo de proteínas C9, que formam o complexo de ataque à membrana. Outros vírus podem incorporar o CD59 nas suas partículas virais, incluindo o HIV, HTLV e Vírus Vaccinia. É plausível que partículas lipo-virais de HCV possam incorporar CD59 como um mecanismo para prevenir a lise mediada pelo complemento de viriões de HCV. A contribuição do complemento à lise direta do vírus da hepatite C, no entanto, ainda não foi totalmente esclarecida (TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K., 2012).

Os *Flavivirus* codificam uma proteína que antagoniza o sistema do complemento, apesar da ausência de qualquer homologia de sequência com reguladores conhecidos do sistema complemento. Células com NS1 associada à superfície reduziram a deposição de C3b e o complexo de ataque a membrana C5b-C9 na superfície das células. O NS1 de *Flavivirus* também se liga ao C4 e C1s (FIGURA 13). Essas atividades aumentam a clivagem de C4 a C4b e resultam em uma redução da atividade da C3 convertase clássica (C4b2a) e redução da deposição de C4b e C3b na superfície das células, fornecendo um mecanismo adicional pelo qual o *Flavivirus* pode escapar da neutralização dependente de complemento (STOERMER, K. A.; MORRISON, T. E. 2011).

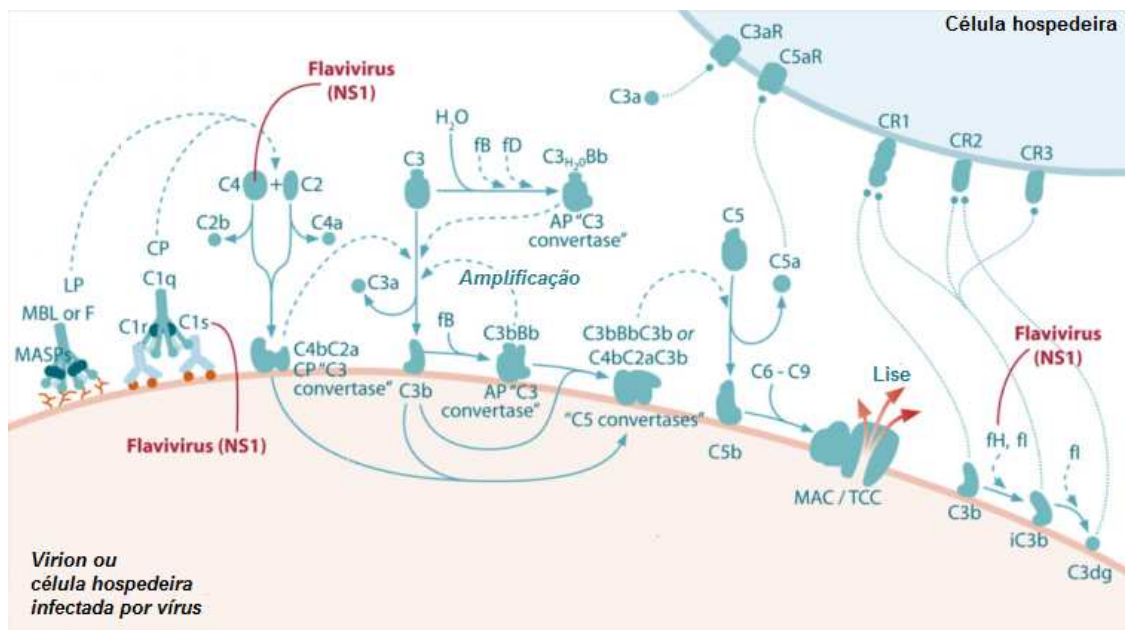


FIGURA 13 – EXEMPLO DA EVASÃO VIRAL DO SISTEMA COMPLEMENTO.

FONTE: STOERMER, K. A.; MORRISON, T. E. (2011).

NOTA: A proteína não estrutural 1 (NS1) dos *Flavivirus* se liga a C4 e C1s, levando a um aumento da clivagem de C4 a C4b, bem como o factor H (FH), levando a um aumento da atividade do fator I para clivagem mediada de C3b em iC3b.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constitui uma investigação de caráter epidemiológico e de associação genética, realizado no Laboratório de Imunopatologia Molecular (LIPM) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas (CEP/ HC 2467.074/2011-04) (ANEXO 1).

Todos os participantes deste estudo leram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

4.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo transversal.

4.2 CASUÍSTICA

Foram analisados 103 pacientes, sendo eles 90 eurodescendentes, 4 afrodescendentes e 9 ameríndios, procedentes do Ambulatório de Gastroenterologia e Hepatites Virais (SAM 5) do Hospital de Clínicas de Curitiba, cujas amostras foram coletadas entre março de 2012 e agosto de 2013. Os pacientes foram categorizados, através da análise de seus respectivos prontuários, quanto ao estágio de evolução clínica da doença, à progressão da doença e aspectos laboratoriais (TABELA 3), sendo 58 (56,3%) do gênero masculino e 45 (43,7%) do gênero feminino, com média de idade 56 anos ($DP \pm 11,7$ anos) (TABELA 4). 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).

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM HEPATITE C

PACIENTES	RVS	SEM RVS	FIBROSE grau 2	FIBROSE grau 3	FIBROSE grau 4
Masculino	12	15	8	10	11
Feminino	6	11	8	3	6
Idade					
De 25-45 anos	2	3	5	1	2
Acima de 45 anos	16	23	11	12	15

FONTE: O autor (2014).

NOTA: RVS - resposta virológica sustentada.

TABELA 4 - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES EM ESTUDO

Grupo	Idade (média, mín-máx)	Ancestralidade	% Mulheres
Pacientes (N=103)	56 (31-80)	Eurodescendentes: 90/103 ou 87,4%	45 (43,7%)
		Afrodescendentes: 4/103 ou 3,9%	
		Ameríndios: 9/103 ou 8,7%	
Controles (N=220)	52 (22-89)	Eurodescendentes: 202/220 ou 91,8%	91 (41,4%)
		Afrodescendentes: 9/220 ou 4,1%	
		Ameríndios: 9/220 ou 4,1%	

FONTE: O autor (2014).

Foram excluídos 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 220 indivíduos, sendo eles 202 eurodescendentes, 9 afrodescendentes e 9 ameríndios, doadores de sangue do Hemobanco do Hospital de Clínicas de Curitiba e do centro de Hemoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR), com sorologia negativa para HCV, HBV, HIV, HTLV, Chagas e sífilis, sendo 129 do gênero masculino (58,6%) e 91 do gênero feminino (41,4%) e com a média de idade de 52 anos (TABELA 4).

Por meio da revisão de prontuários, foram levantados dados referentes à presença de manifestações hepáticas (fibrose, esteatose, siderose e cirrose), resposta ao tratamento e ao genótipo viral.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Obtenção de amostras

Após prévio esclarecimento e consentimento de todos os indivíduos incluídos no estudo, aproximadamente 8 ml de sangue venoso (4ml em frasco contendo etilenodiamino tetra-acético – EDTA; e 4ml em frasco sem anticoagulante) foram coletados. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.500 rpm (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburg, Alemanha). Em seguida, as amostras de soro foram armazenadas à temperatura de -80°C, até serem utilizadas. As amostras com EDTA foram subdivididas em plasma e camada leuco-plaquetária (buffy coat). A alíquota de plasma também foi armazenada à temperatura de -80°C, e a alíquota de buffy coat foi armazenada à temperatura de -20°C até o momento da extração de DNA. A coleta de sangue foi realizada no Ambulatório de Gastroenterologia e Hepatites Virais (SAM 5) do Hospital das Clínicas de Curitiba e as análises sorológicas e moleculares foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia (LIPM) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.3.2 Extração de DNA de sangue total

O DNA genômico foi extraído do sangue total a partir da alíquota de camada leuco-plaquetária utilizando-se o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wiscosin – Estados Unidos). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante, seguindo as etapas de lise dos eritrócitos, lise nuclear dos linfócitos, precipitação de proteínas, precipitação e reidratação do DNA.

Em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 µL, adicionou-se 150 µL de buffy coat proveniente de 5 mL de sangue coletado com EDTA e 600 µL de *Cell Lysis Solution*. A solução foi homogeneizada 40 vezes por meio de pipetagens. Em seguida, adicionou-se 12µL de proteinase K e o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos (o tubo foi invertido duas vezes durante a incubação). A amostra foi centrifugada a 13.000 r.p.m. (rotações por minuto) por 2 minutos a

temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e descartado o máximo possível sem agitar o sedimento. O tubo foi colocado sobre o agitador Vortex por alguns segundos para que o sedimento fosse re-suspenso. Foi adicionado 300 µl de *Nuclei Lysis Solution* no tubo que continha as células re-suspensas, a solução foi homogeneizada por meio de pipetagens sucessivas para lisar as células. O tubo foi incubado a 37°C em banho seco por 5 minutos. Foi adicionado 1,5 µl de *RNase solution* na parede do tubo e adicionado 100 µl de *Protein Precipitation Solution* ao lisado nuclear e foi incubado novamente a solução a 37°C em banho seco por 5 minutos. O tubo foi agitado vigorosamente no agitador Vortex® durante 10 a 20 segundos. O tubo foi centrifugado a 13.000 r.p.m. por 3 minutos a temperatura ambiente. Um sedimento de proteína marrom escuro pode então ser visto. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga (eppendorf®) de 1,5 µL, limpo, previamente preenchido com 300 µL de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada suavemente até que se formassem fios de DNA visíveis. Foi centrifugada a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos à temperatura ambiente. O DNA se torna visível como uma pequena massa no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado etanol 70% a temperatura ambiente. O tubo foi invertido 4 vezes para lavar o precipitado de DNA e foi centrifugado a 13.000 r.p.m. por 3 minutos a temperatura ambiente. O etanol foi descartado, o tubo foi invertido sobre papel absorvente e esperou que todo etanol evaporasse. O tubo foi incubado a 37°C por 5 minutos para que todo etanol evaporasse. Foi adicionado 50 µL de *DNA Rehydration Solution* no tubo para re-hidratar o DNA. A solução foi incubada *over-night* a 4°C por 24 horas. O DNA foi armazenado a uma temperatura de 2 a 8°C. O DNA foi diluído para que todas as amostras ficassem a uma concentração final de 20 ng.

4.3.3 Critérios de seleção dos polimorfismos de *MASP-2*

Para a haplotipagem de *MASP2*, nós analisamos 5 variantes previamente publicadas que foram determinados sendo associados com diferentes concentrações de *MASP-2*: *p.R99Q* (rs61735600), *p.D120G* (rs72550870), *p.P126L* (rs56392418), *p.V377A* (rs2273346), e *p.R439H* (rs12085877). Incluímos também *g.4847C>A*

(rs7548659) um SNP comum no promotor *MASP2*, local de reconhecimento por proteínas reguladoras. Além disso, avaliou-se outros cinco SNPs, um no intron 4 (*g.7164C>A*), um no intron 5 (*g.7441A>G*) que flanqueiam o exon 5 – exclusivo de MAp19, um no intron 9 (*g.21081C>T*) que está em grande desequilíbrio de ligação com os polimorfismos presentes no exon 10, um no exon 10 (*p.D371Y*) e um SNP sinônimo no exon 12 (*g.24762C>T*).

Quanto ao polimorfismo do promotor *g.4847C>A* (rs7548659), a ligação de STAT3 no sítio promotor de *MASP2* permite que a atividade de transcrição ocorra normalmente, sendo que mutações nesse sítio diminuem em até cinco vezes a taxa de transcrição de *MASP2* (UNTERBERGER, C. *et al.*, 2007).

Polimorfismos no exon 3 (*R99Q*, *D120G* e *P126L*) podem ser funcionalmente relevantes porque o exon 3 codifica o primeiro domínio N-terminal (CUB1). O domínio CUB1 é essencial para a associação de MASP-2 com a MBL. As regiões polimórficas analisadas foram escolhidas a partir de estudos preliminares que indicaram que mutações no domínio CUB1 poderiam estar relacionadas à susceptibilidade a infecções e doenças inflamatórias (STENGAARD-PEDERSEN *et al.*, 2003). No polimorfismo *p.R99Q* ocorre uma transição *G>A* e assim a troca do aminoácido arginina (R) por glutamina (Q). Este SNP do domínio CUB1 é mais frequente em populações africanas e indígenas (LOZANO, F. *et al.*, 2005, THIEL, S. *et al.*, 2007). O polimorfismo *p.D120G* é também um polimorfismo não sinônimo, no qual a troca dos alelos *A>G* leva à substituição de ácido aspártico (D) por glicina (G). Este SNP é encontrado em europeus (THIEL, S. *et al.*, 2007) e está relacionado a concentrações séricas muito baixas (STENGAARD-PEDERSEN. K. *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a MASP-2 com a substituição do alelo *G* não consegue se ligar a MBL e, assim, não pode ativar a via do complemento (THIEL, S. *et al.*, 2009). No polimorfismo *p.P126L* ocorre a troca do aminoácido prolina (P) por leucina (L) devido a transição *C>T*. Este SNP está localizado no domínio CUB1 e o alelo *L* é geralmente encontrado em populações africanas e indígenas (LOZANO, F. *et al.*, 2005). Este polimorfismo também tem sido associado a doença de Crohn com concentrações reduzidas de MASP-2 e também foi associado com cardiomiopatia chagásica (BOLDT, A. B. W. *et al.*, 2011b).

Foram analisados polimorfismos nos introns 4 (*g.7164*), 5 (*g.7441*) e 9 (*g.21081*). O exon 5 é exclusivo para MAp19 devido ao splicing alternativo e a poliadenilação do transcrito primário. Ele codifica os quatro aminoácidos C-terminais de MAp19 não presentes em MASP-2 (BOLDT, A. B. W. *et al.*, 2011a). Assim foram incluídos dois polimorfismos comuns que flanqueiam o exon 5 alternativo: a variante *g.7164G* no intron 4 e *g.7441A* no intron 5 foram fortemente associados com a geração de altas concentrações de MASP-2 e baixas concentrações de MAp19, como também o polimorfismo *g.21081T* no intron 9. A associação com a variante *g.21081T* é, muito provavelmente, um efeito carona, já que todas as três variantes intrônicas estão fortemente ligadas (BOLDT, A. B. W. *et al.*, 2011b).

Também foram analisados polimorfismos no exon 10 (*D371Y* e *V377A*), que codifica o domínio catalítico de proteínas de controle do complemento (CCP2). A variante *p.D371Y* em que ocorre a troca do aminoácido ácido aspártico (D) por tirosina (Y) devido a mudança do alelo *G>T*, foi associada com a susceptibilidade à infecção pelo vírus da hepatite C (TÚLIO, S. *et al.*, 2011). O polimorfismo *p.V377A* foi associado por BOLDT *et al.* (2011a) com a doença de Crohn e com a cardiomiopatia chagásica, e tem uma atividade enzimática normal e pode clivar C4 (THIEL, S. *et al.*, 2007). Este polimorfismo consiste em uma transição *T>C* fazendo com que haja uma troca de aminoácido valina (V) por alanina (A).

No exon 12 foi analisado o polimorfismo *R439H*, que codifica parte do domínio de serina protease. Esta variante é comum em africanos subsaarianos com uma frequência de 10%, liga-se normalmente a MBL, mas é deficiente na atividade enzimática (THIEL, S. *et al.*, 2009).

4.3.4 Genotipagem da *MASP2* por PCR-SSP

A genotipagem de *MASP2* foi realizada em 103 pacientes com HCV e 220 controles. Para a haplotipagem da *MASP2* foram determinadas 6 variantes não sinônimas, no exon 3: *p.R99Q* (SNP database: rs61735600), *p.D120G* (rs72550870), *p.P126L* (rs56392418); exon 10: *p.V377A* (rs2273346), (*p.D371Y* rs12711521) e exon 12 *p.R439H* (rs12085877), um SNP do promotor, *g.4847C>A* (rs7548659) e três outros

SNPs, no intron 4 (*g.7164A>G* rs2273344), no intron 5 (*g.7441G>A* rs9430347), no intron 9 (*g.21081C>T* rs17409276) e no exon 10. Foi utilizada a técnica de PCR-SSP (BOLDT, PETZL-ERLER, 2002; BOLDT *et al.*, 2002).

A reação em cadeia da polimerase com primers de sequência específica (em inglês *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primer*– PCR-SSP) se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA (um alelo específico de um gene) 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.

Na PCR os oligonucleotídeos iniciadores (ou primers) de 18 a 22 nucleotídeos são projetados para finalizar no nucleotídeo variante da fita-molde. A tipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementariedade perfeita entre o último nucleotídeo (3') do iniciador e da fita molde, não há amplificação da sequência desejada. Dessa forma, cada iniciador é desenhado de maneira que o último nucleotídeo 3', seja complementar aos nucleotídeos variantes de interesse, o que permite a tipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene candidato (*MASP-2*) na população a ser estudada. Além disso, os iniciadores da SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação.

A PCR-SSP pode ser dividida em dois tipos: simples ou multiplex, sendo que ambas podem ser classificadas como uniespecífica e biespecífica. A estratégia de PCR-SSP convencional permite a tipagem dos SNPs da região estudada em duas reações por amostra. Para o gene *MASP2*, as tipagens foram realizadas através da PCR-SSP multiplex biespecífica, capaz de amplificar simultaneamente vários fragmentos de DNA (em geral, mais de dois), de forma a gastar menos DNA, tempo, material e reagentes de PCR.

Quatro reações de PCR-SSP previamente padronizadas foram utilizadas para a tipagem dos SNPs de *MASP2* (BOLDT *et al.*, 2011a). As reações Multiplex I e II foram compostas por 5 e 6 pares, respectivamente, de iniciadores capazes de gerar fragmentos alelo específicos, sem contar com os controles. Já a reação *p.D120G* contou com um total de 4 iniciadores capazes de gerar até dois fragmentos específicos

por reação (TABELA 5). E 5 pares de iniciadores também foram utilizados na reação para o intron 4 e 5.

TABELA 5 - SEQUÊNCIAS DE INICIADORES PARA A GENOTIPAGEM DE *MASP2*

Identificação SNP	Iniciador	Sequência 5' – 3'	Fragmento (pb)
PCR SIMPLES D120G			
rs72550870	MASP2 Ex3_120Dr	5' GCTTCTCGTTGGAGTAGT 3'	695
	MASP2 Ex3_120Gr	5' GCTTCTCGTTGGAGTAGC 3'	
rs17039495	MASP2 Promf	5' CAGGTCACTGGACAAACAGATCA 3'	399-470
	FCN1 Prom_-399Gf	5' AGATGAGGCAAGGAAGCG 3'	
rs10858293	FCN1 Prom_-399Af	5' AGATGAGGCAAGGAAGCA 3'	399-470
	FCN1 Ex1_+33Gr	5' ACTAGCAGGACAGCGAGC 3'	
CONTROLE	FCN1 Ex1_+33Tr	5' ACTAGCAGGACAGCGAGA 3'	1059
	MBL2 Promf	5' ATGGGGCTAGGCTGCTGAG 3'	
	MBL2 Ex1r	5' CCAACACGTACCTGGTTCCC 3'	
PCR SIMPLES INTRON 4 E 5			
rs2273344	MASP2 Intr4_rs2273344Gf	5' GTTCCCTGCACTGTGGGACG 3'	316
	MASP2 Intr4_rs2273344Af	5' GTTCCCTGCACTGTGGGACA 3'	
rs9430347	MASP2 Intr5_rs9430347Ar	5' CTCCCACCCAGAGACACGT 3'	316
	MASP2 Intr5_rs9430347Gr	5' CTCCCACCCAGAGACACGC 3'	
rs3124952	FCN2 Prom -986Af	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCA 3'	1022
	FCN2 Prom -986Gf	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCG 3'	
rs17514136	FCN2 Prom -4Ar	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCT 3'	1022
	FCN2 Prom -4Gr	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCC 3'	
CONTROLE	HGHf	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	431
	HGr	5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'	
PCR MULTIPLEX I			
rs61735600	MASP2 Ex3_99Rf	5' GAGCACAGACACGGAGCG 3'	117-118
	MASP2 Ex3_99Qf	5' AGAGCACAGACACGGAGCA 3'	
rs56392418	MASP2 Ex3_126Pr	5' CCTCGAACCCCGTGAACG 3'	117-118
	MASP2 Ex3_126Lr	5' GCCTCGAACCCCGTGAACA 3'	
rs17409276	MASP2 Intr9_+16060Cf	5' CAGCACACCTCTTCCTCC 3'	344
	MASP2 Intr9_+16060Tf	5' CAGCACACCTCTTCCTCT 3'	
rs2273346	MASP2 Ex10_377Vr	5' GGACCTGTGATGTACTCCA 3'	344
	MASP2 Ex10_377Ar	5' GACCTGTGATGTACTCCG 3'	
rs2989727	FCN1 Prom_-1981Gf	5' CCCATGAGCCTGGTTATCG 3'	729
	FCN1 Prom_-1981Af	5' CCCATGAGCCTGGTTATCA 3'	
	FCN1 Promr	5' ACCTCCTCTTCCTTGCAACA 3'	
CONTROLE	FCN2 Ex8f	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'	500
	FCN2 Ex8r	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3'	

continua

continuação

Identificação SNP	Iniciador	Sequência 5' – 3'	Fragmento (pb)
PCR MULTIPLEX II			
rs7548659	MASP2 Prom_-175Cf	5' TCCGACTCCTGGCTCCC 3'	827-828
	MASP2 Prom_-175Af	5' GTCCGACTCCTGGCTCCA 3'	
rs56392418	MASP2 Ex3_126Pr	5' CCTCGAACCCCGTGAACG 3'	827-828
	MASP2 Ex3_126Lr	5' GCCTCGAACCCCGTGAACA 3'	
rs17409276	MASP2 Intr9_+16060Cf	5' CAGCACACCTCTTCCTCC 3'	384
	MASP2 Intr9_+16060Tf	5' CAGCACACCTCTTCCTCT 3'	
rs12711521	MASP2 Ex10_371Yr	5' TCGGCCACTGGGTAGATA 3'	384
	MASP2 Ex10_371Dr	5' TCGGCCACTGGGTAGATC 3'	
rs12085877	MASP2 Ex12_439Rf	5' TGTGGACTATCAGCCCG 3'	197
	MASP2 Ex12_439Hf	5' TGTGGACTATCAGCCCA 3'	
rs1782455	MASP2 Ex12_493Cr	5' ATTCGAATGTCCAGGGCG 3'	197
	MASP2 Ex12_493Tr	5' ATTCGAATGTCCAGGGCA 3'	
CONTROLE	FCN2 Ex8f	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'	500
	FCN2 Ex8r	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3'	

FONTE: BOLDT, A. B. W. *et al.* (2011a).

NOTA: Prom – promotor; Ex – exon; Intr- intron; f – forward/ direta; r – reverse/ reversa.

As PCRs foram realizadas a partir de 20 ng de DNA genômico e 0,1 a 0,3 µM de cada oligonucleotídeo iniciador específico na presença de 1X de tampão coral, 1,5% de glicerol, 1,5 a 2,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) e 0,5 a 2 unidades de *Taq* polimerase. Todas as amplificações são iniciadas pela desnaturação por 2 minutos a 96°C e terminam pela extensão por 5 minutos a 72°C por 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores é dependente de cada primer utilizado, sendo dividida em três estágios: temperatura alta nos 10 primeiros ciclos, intermediária nos 10 ciclos seguintes e baixa nos 10 últimos ciclos, garantindo especificidade e quantidade de produto. As temperaturas de acoplamento utilizadas para cada reação foram:

- Multiplex I: 60°C - 56°C - 52°C;
- Multiplex II: 62°C - 58°C - 54°C;
- p.D120G: 58°C - 57°C - 56°C;
- Intron 4 e Intron 5: 69°C - 67°C - 65°C;

Além do controle endógeno, cada PCR é acompanhada de um controle negativo, que é uma solução de reação completa, porém sem o DNA, com água ultra pura tipo 1 como amostra. Na reação multiplex I foram ainda adicionados iniciadores para a identificação de um SNP do gene *FCN1*, não descrito no presente estudo. O resultado é observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe (Invitrogen), fluorescente sob luz azul. Em todos os casos, a genotipagem é rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados. Esta estratégia oferece rápida resolução haplotípica (FIGURA 14).

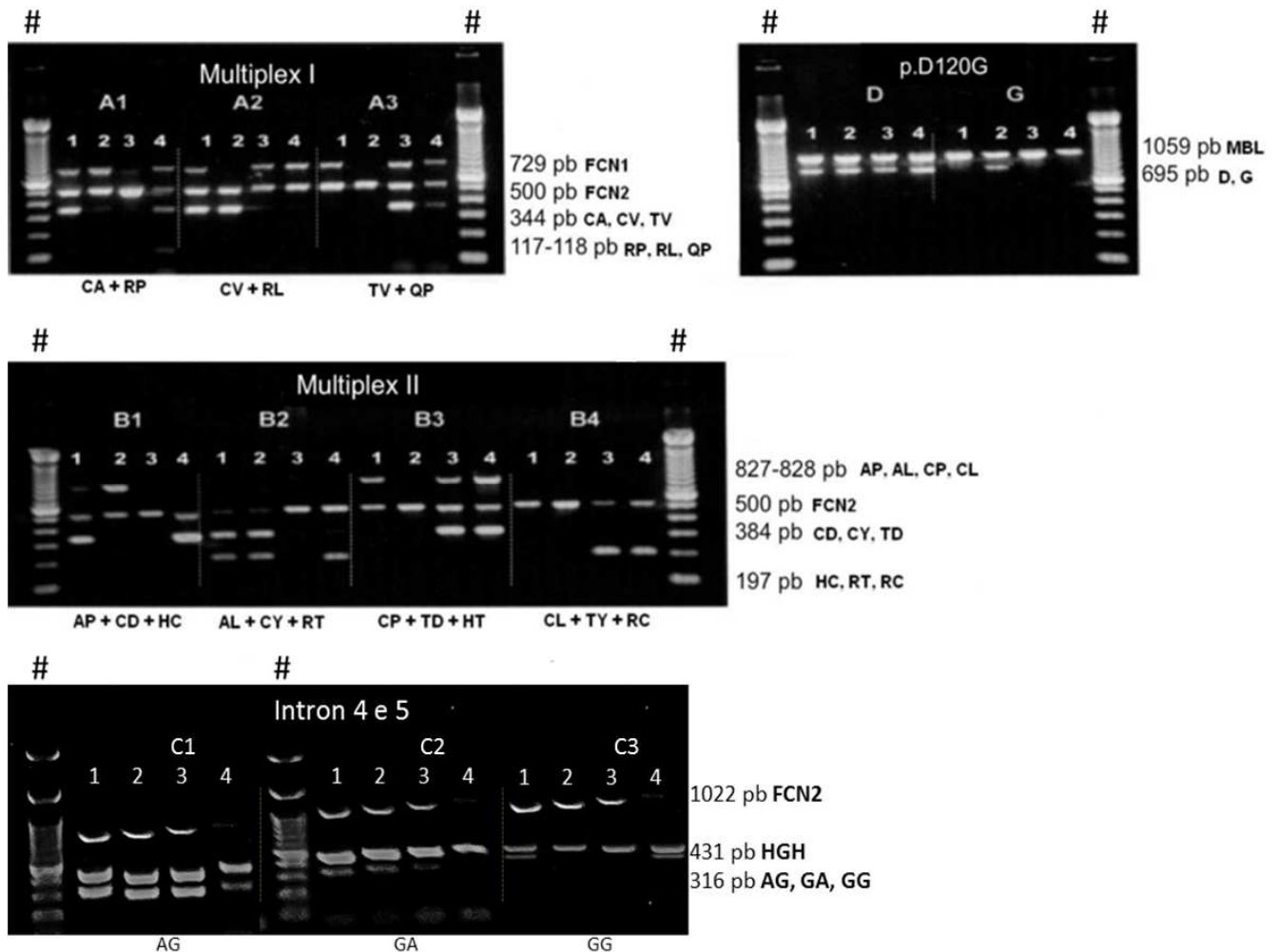


FIGURA 14 – PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS PCRs-SSP PARA *MASP2*

FONTE: Adaptado de BOLDT *et al.* (2011a).

LEGENDA: # marcador de pares de base (ladder - Invitrogen®)

NOTA: Os meios de reação foram compostos dos seguintes iniciadores: Multiplex I - Af, Cf, Ar, Rf e Pr (A1); Af, Cf, Vr, Rf e Lr (A2); Gf, Tf, Vr e Qf (A3); *p.D120G* - Dr, *MASP2* Promf, MBL Promf e rev+270 (D); Gr, *MASP2* Promf, MBL Promf e rev+270 (G); Multiplex II - Af, Pr, Cf, Dr, Hf e Cr (B1); Af, Lr, Cf, Yr, Rf, e Tr (B2); Cf, Pr, Tf, Dr, Hf e Tr (B3); Cf, Lr, Tf, Yr, Rf, e Cr; Intron 4 e 5 – Af e Gr (C1); Gf e Ar (C2); Gf e Gr (C3). O iniciador FCN1 Promr foi incluído em todos os meios A. Os iniciadores FCN2 ex8f e FCN2 ex8r foram incluídos em todos os meios A e B. Os iniciadores FCN2 -986, FCN2 -4 e HGHf/r foram incluídos em todos os meios C.

As amostras (5µl de produto de PCR e um controle de peso molecular) foram aplicadas em gel de agarose a 1,5% contendo 7 µL de SYBR® Safe (Invitrogen), em tampão Tris/ Borato/ EDTA (TBE) 0,5X, e submetidas à eletroforese de alta voltagem (110V, 95mA, 10W), durante quarenta e cinco minutos. A leitura é efetuada pela visualização das bandas referentes a cada fragmento amplificado na PCR.

4.3.5 Quantificação das concentrações séricas de MASP-2

A quantificação sérica de MASP-2 foi avaliada em 82 controles e 68 pacientes infectados com HCV, grupo definido a partir dos haplótipos do gene *MASP2*. As concentrações séricas foram avaliadas pela técnica de imunoadsorância enzimática (ELISA), através do kit *HK326* (Hycult Biotechnology, Uden, Países Baixos), cuja sensibilidade é de 170 ng/mL. As amostras foram diluídas 1:40 em tampão de diluição fornecido pelo fabricante, em seguida foram aplicadas 100 µL de amostras e padrões nos poços de poliestireno sensibilizados com anticorpo anti-MASP-2. Procedeu-se a incubação por 60min a 25°C. Em seguida a placa foi lavada 5x utilizando-se 200 µL/poço de tampão de lavagem. Foi adicionado 100 µL de solução *tracer* (anticorpo biotilado anti-MASP-2) em cada poço e a placa foi incubada por uma hora à 25°C. Em seguida a lavagem foi repetida por 5x. Foi aplicado 100 µL de solução estreptavidina peroxidase em cada poço e a placa foi incubada por 60min à 25°C. A placa foi lavada novamente 5x e adicionado 100 µL/poço de substrato para a peroxidase tetrametilbenzidina (TBM). A placa foi incubada por 30min, no escuro, à 25°C. A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de solução de ácido oxálico. Foi realizada a leitura a 450nm no equipamento *BioTek Elix800®*.

As concentrações de MASP-2 foram calculadas a partir da curva gerada pelos padrões de concentração conhecida fornecidos pelo fabricante e aplicados concomitantemente com as amostras.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram organizados em tabelas e gráficos e ao término das análises foram associados aos dados clínicos e demográficos dos pacientes, para fazer a correlação clínico-laboratorial dos dados.

As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram determinadas através de contagem direta. A hipótese de equilíbrio de Hardy Weinberg foi utilizada para verificar a distribuição das frequências genotípicas, nos diferentes grupos, descrita por Guo e Thomson em 1992. A frequência da distribuição dos alelos nas populações de

pacientes e controles e de outras populações de ascendência europeia foram comparadas através da aplicação do teste exato de diferenciação populacional de Raymond e Rousset. Ambas as análises foram realizadas utilizando o pacote de software Arlequin versão 3.1. Os testes de independência entre pacientes e controles, foram realizados utilizando o teste exato de Fisher. As concentrações séricas de MASP-2 foram comparadas entre os grupos por meio de testes de Mann-Whitney/ Kruskal-Wallis (ANOVA ou se os dados passaram por testes de normalidade). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para comparação entre concentrações séricas de MASP-2 e dados clínicos. Os valores de p bicaudal $<0,05$ foram considerados significativos. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Modelos de regressão logística foram usados para ajustar os resultados por idade, sexo e ancestralidade, usando o programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos pacientes em estudo

Na amostra do presente estudo houve uma maior frequência de pacientes do sexo masculino (56,3%) e a média de idade encontrada foi de 56,0 anos (TABELA 6), semelhante a dados observados num estudo da população de São Paulo (NARCISO-SCHIAVON, J. L. *et al.*, 2010) e de Seul, Coréia do Sul (LEE, C. H. *et al.* 2013). A maior frequência de infecção pelo HCV no sexo masculino pode ser devido a maior exposição desses indivíduos ao vírus, como histórico de abuso de bebidas alcoólicas e uso de drogas intravenosas (NARCISO-SCHIAVON, J. L. *et al.*, 2010). A presença da infecção pelo HCV é mais frequente em pessoas acima de 40 anos, devido a maior exposição ao risco de transmissão parenteral, durante período que não eram adotadas medidas preventivas contra a transmissão de hepatite, tais como triagem sorológica em bancos de sangue, uso de material descartável em procedimentos invasivos, compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas intravenosas (SILVEIRA, L. *et al.*, 2011). Foi observada maior prevalência dos genótipos virais 1 (48,5%) e 3 (25,2%), dados que estão de acordo com LAMPEA *et al.* (2010).

Os genótipos virais 1 e 3 provavelmente começaram a circular no país a partir de 1940 com diminuição de propagação desde 1980-1995. Informações epidemiológicas relatam um declínio da infecção pelo HCV em usuários de drogas intravenosas no Brasil entre 1994 e 2001 (LAMPEA, E. *et al.*, 2010).

A biópsia hepática foi realizada em 50,5% dos pacientes, a biópsia é utilizada para determinação da gravidade da lesão hepática, classificada de acordo o grau de fibrose. É recomendada para pacientes infectados com o genótipo viral 1. Porém se houver alguma contra indicação, o clínico deverá avaliar o caso. A biópsia hepática é contra indicada em alguns casos como na obesidade mórbida e coagulopatia grave, entre outros. Em algumas situações a biópsia é facultativa como em pacientes co-infectados com o HIV, em portadores dos genótipos 2, 3, 4 ou 5 e pacientes com sinais clínicos e achados ecográficos de cirrose hepática. Procedimento (BRASIL, 2011).

A infecção pelo vírus do HCV pode causar fibrose irreversível do fígado. As proteínas virais parecem modular a apoptose e a esteatose, levando à ativação de células estreladas hepáticas, fibrose e aumento do risco de carcinoma hepatocelular (UFEARO, H. *et al.*, 2010). Neste estudo, 18,9% dos pacientes apresentaram grau 2 de fibrose e 16,7%, grau 4. O estágio 2 de fibrose é um nível intermediário de comprometimento hepático, já o grau 4 de fibrose indica cirrose instalada. O estudo de KIRK *et al.* (2013) observou que o grau de fibrose está associado com idade mais avançada e quantificação sérica de RNA viral. Neste estudo foi observado que pacientes com grau 3 de fibrose tinham média de idade de 67,7 anos, enquanto que pacientes com grau de fibrose 1 a média de idade foi de 50,4 anos, estando de acordo com estudo prévios. A fibrose 2 e 4 que foram as mais frequentes (16,5% cada), tiveram uma média de idade de 52,5 e 53,25 anos, respectivamente.

A análise dos dados clínicos sobre esteatose, ou seja acúmulo de gordura no fígado, mostrou baixa frequência da mesma nos pacientes sob investigação, sendo de 18,4% para o grau 0 e 20,4% para o grau 1. Em geral, a esteatose hepática, está presente em até 50% dos pacientes com hepatite C crônica, acelerando a progressão da fibrose e reduzindo a taxa de resposta à terapia anti-viral especialmente no genótipo 3 (ARENDR, B. M. *et al.*, 2009). No caso do genótipo 3, a esteatose é mais comumente induzida pelo vírus, enquanto no caso de outros genótipos, é principalmente associado ao IMC e adiposidade central (IMRAN, M. *et al.*, 2013).

O grau histológico de siderose (deposição de ferro no fígado) foi leve em 43 (41,7%), moderada em 6 (5,8%) e grave em 3 (2,9%) indivíduos. Na hepatite C ocorre aumento na concentração de ferro, ferritina e na saturação da transferrina no plasma, embora a ocorrência da siderose seja menos frequente. Quando a ferritina sérica e as concentrações de ferro hepático estão elevadas, o tratamento com INF- α não é tão eficaz. Não se sabe, contudo, se a infecção conduz a um excesso de ferro hepático ou se a siderose preexistente aumenta os efeitos nocivos do vírus (BULAJ, Z. J. *et al.*, 2000). FARAH *et al.* (2007) observaram maior prevalência da siderose em células de Kupfer e nos hepatócitos de pacientes infectados pelo HCV.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HCV

		Total	
Feminino		45 (43,7%)	
Total		103	
Idade (média, desvio padrão)		(56 ± 11,7)	
Total		103	
Genótipo Viral 1	50 (48,5%)	Fibrose Grau 1	12 (11,6%)
Genótipo Viral 2	1 (0,97%)	Fibrose Grau 2	17 (16,5%)
Genótipo Viral 3	26 (25,2%)	Fibrose Grau 3	13 (12,6%)
Genótipo Viral 4	1 (0,97%)	Fibrose Grau 4	17 (16,5%)
Sem genotipagem	25 (24,3%)	Sem Dados	44 (42,7%)
Total	103	Total	103
Tratamento:		Esteatose 0	19 (18,4%)
Não Respondedor	28 (27,2%)	Esteatose 1	21 (20,4%)
RVS	21 (20,4%)	Esteatose 2	8 (7,7%)
Sem Tratamento	45 (43,7%)	Esteatose 3	4 (3,9%)
Suspendeu Tratamento	9 (8,7%)	Sem Dados	51 (49,5%)
Total	103	Total	103
		Siderose 0	43 (41,7%)
		Siderose 1	6 (5,8%)
		Siderose 2	3 (2,9%)
		Sem Dados	51 (49,5%)
		Total	103

FONTE: O autor (2014).

5.2 Polimorfismos de *MASP2* e associação com hepatite C crônica

Foi realizado o teste de homogeneidade entre os grupos de ancestralidade predominantemente europeia e outros e foi observado que os grupos permaneceram homogêneos, permitindo assim uma análise com o grupo total sem a necessidade de se avaliar os grupos separados.

Foi utilizada a técnica de PCR multiplex, que eficientemente haplotipou onze SNPs distribuídos a partir do promotor até o último exon do gene *MASP2*, com uma redução de reagentes, materiais e o consumo de energia. Com essa técnica foi possível genotipar 5 SNPs de uma só vez usando PCR-SSP multiplex I e seis SNPs de uma só vez usando a multiplex PCR-SSP II, diminuindo o tempo gasto na bancada. A PCR-SSP para o polimorfismo *p.D120G* não pode ser incluído nestas reações múltiplas, devido à

necessidade de uma maior especificidade. Esta nova estratégia permitiu uma identificação rápida e de baixo custo de onze polimorfismos relevantes de *MASP2*. Outras técnicas de identificação de SNPs é necessário utilizar técnicas com algoritmos estatísticos para haplotipagem, gerando haplótipos inferidos estatisticamente. A PCR-SSP tem a vantagem de amplificação separada de ambos os cromossomos de indivíduos heterozigotos e, portanto, permitiu-nos identificar, simultaneamente, a fase entre promotor, exon e intron das variantes, assim não sendo necessário o uso de algoritmos de haplotipagem (BOLDT, A. B. W. *et al.*, 2011a).

Devido ao grande desequilíbrio de ligação encontrada entre os SNPs, a fase entre os SNPs situados distantemente poderia ser deduzida devido ao forte desequilíbrio de ligação entre as variantes. No presente trabalho os polimorfismos foram também analisados em blocos de acordo com o desequilíbrio de ligação.

A distribuição das frequências haplotípicas de *MASP2* em pacientes e controles são apresentadas na tabela 7. O teste exato de Guo e Thompson utilizado para verificar se a distribuição genotípica dos haplótipos se dá em conformidade com a hipótese de equilíbrio de Hardy e Weinberg, revelou equilíbrio tanto em pacientes ($P=0,14369$) quanto em controles ($P=0,39068$). No teste exato de diferenciação populacional de Raymond e Rousset, houve diferenças significativas entre as frequências haplotípicas de pacientes e controles ($P=0,03 \pm 0,0069$).

Treze haplótipos foram identificados nos pacientes e quinze no grupo controle. O haplótipo *ARDPAGCYVRT* (*2B2A-*i*[AG]) foi o mais frequente tanto em pacientes (62,1% - 128/ 206) quanto em controles (69,8% - 311/ 440). De acordo com estudos prévios, este haplótipo é provavelmente o mais comum em todo o mundo, incluindo populações europeias, africanas e asiáticas. De acordo com BOLDT *et al.* (2013), este haplótipo é o mais comum tanto na população brasileira quanto na população dinamarquesa, com uma frequência de 60-70%. O haplótipo *ADPCYV* (parte do haplótipo *ARDPAGCYVRT*) foi encontrado com uma frequência de 65,5% em uma população do sul do Brasil (BOLDT, A. *et al.*, 2011b). O segundo haplótipo mais comum, *CRDPGATDVRC* *1B1-*h*[GA], foi encontrado com uma frequência de 14,4% em uma população do sul do Brasil e 15,39% em dinamarqueses (BOLDT, A. *et al.*, 2011a). O mesmo grupo observou uma frequência de 15,6% para *CDPTDV* em

pacientes chagásicos (BOLDT, A. *et al.*, 2011b) e de 11-14% em pacientes com hanseníase (BOLDT, A. *et al.*, 2013).

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE *MASP2* EM PACIENTES INFECTADOS PELO HCV+ E CONTROLES

Haplótipos de <i>MASP2</i>	Nomenclatura Filogenética	Pacientes N=103		Controles N=220	
		Freq.(%)	DP	Freq.(%)	DP
<i>ARDPAGCYVRT</i> ^a	*2B2A-i [AG]	128 (62,1%)	3%	307 (69,8%)	0,2%
<i>CRDPGATDVRC</i>	*1B1-h [GA]	30 (14,6%)	2%	55 (12,5%)	1,6%
<i>CRDPAGCYVRT</i>	*2B1-i [AG]	15 (7,3%)	2%	20 (4,5%)	0,9%
<i>CRDPAGTDVRC</i>	*1B1-h [AG]	7 (3,4%)	1%	3 (0,7%)	0,4%
<i>ARGPAGCYVRT</i>	*2B2B-I [AG]	5 (2,4%)	1%	5 (1,1%)	0,5%
<i>CRDPAGCDVRC</i>	*1A [AG]	5 (2,4%)	1%	14 (3,2%)	0,8%
<i>CRDPAGCDART</i>	*2A2-I [AG]	4 (1,9%)	0%	13 (3,0%)	0,8%
<i>ARDPAGTDVRC</i>	*2B2A-i.1B1-h [AG]	3 (1,4%)	0,8%	1 (0,23%)	0,2%
<i>CRDPGACDVRC</i>	*1A [GA]	2 (1%)	0,7%	7 (1,6%)	0,6%
<i>CRDPGACYVRT</i>	*2B1-i [GA]	2 (1%)	0,7%	5 (1,1%)	0,5%
<i>CRDPAGCDVRT</i>	*2A1 [AG]	2 (1%)	0,7%	0 (0%)	0%
<i>ARDPGGCYVRT</i>	*2B2A-i [GG]	2 (1%)	0,7%	0 (0%)	0%
<i>ARDPGACYVRT</i>	*2B2A-i [GA]	1 (0,5%)	0,5%	3 (0,7%)	0,4%
<i>CRDLAGCDVHC</i>	*1C2-I [AG]	0 (0%)	0%	1 (0,23%)	0,2%
<i>CRDLAGCDVRC</i>	*1C1-I [AG]	0 (0%)	0%	2 (0,45%)	0,3%
<i>CRDPGACDVRT</i>	*2A1 [GA]	0 (0%)	0%	1 (0,23%)	0,2%
<i>CQDPGATDVRC</i>	*1B2-h [GA]	0 (0%)	0%	3 (0,7%)	0,4%

FONTE: O autor (2014).

LEGENDA: N= números de indivíduos, DP= desvio padrão, ^a= haplótipo associado a proteção contra a infecção pelo HCV P=0,019 OR=0,45 [IC95%=0,23-0,88].

Os haplótipos *CRDPAGCDVRT* - *2A1[AG] e *ARDPGGCYVRT* - *2B2A-i[GG] foram encontrados apenas nos pacientes (2/206 ou 0,97% para cada haplótipo). Os haplótipos *CRDLAGCDVRC* - *1C1-I[AG], *CQDPGATDVRC* - *1B2-h[GA], *CRDLAGCDVHC* - *1C2-I[AG] e *CRDPGACDVRT* - *2A1[GA] foram encontrados somente no grupo controle (2/440 ou 0,45% para cada um dos dois primeiros e 1/440 ou 0,23% para cada um dos dois últimos). No estudo de BOLDT *et al.* (2011a) os haplótipos *1C1-I, *1C2-I e *2A1 não foram observados na população dinamarquesa e o haplótipo *1B2-h foi encontrado em apenas 1,3% da população do sul do Brasil. Em outro estudo do mesmo grupo foi observada uma frequência de 1,3% do haplótipo *CDLCDV* e 6,7% do haplótipo *CDPCDV* na mesma população (BOLDT, A. *et al.*, 2011b).

Para o haplótipo **1B2-h*, a frequência encontrada reflete a do alelo *A* (*p.R99Q, g.5557G>A*), observado por THIEL *et al.* (2007) em apenas um indivíduo africano da Zâmbia. BOLDT *et al.* (2013) observaram uma frequência de 1-2,5% em uma população do sul do Brasil e de 0,15% em uma população dinamarquesa (BOLDT, A. *et al.*, 2011a). A baixa frequência do haplótipo **1C1-l* reflete a frequência do alelo *T* (*p.P126L, g.5638C>T*), sendo sua maior frequência (4%) observada por LOZANO *et al.* (2005) em africanos do norte da Arábia. THIEL *et al.* (2007), observaram o genótipo *TT* em 6 indivíduos africanos da Zâmbia e em uma população do sul do Brasil essa frequência foi de 0,6-2% (BOLDT, A. *et al.*, 2011a).

O haplótipo mais frequente *ARDPAGCYVRT*, (**2B2A-i*), apresentou uma associação negativa, ou seja, proteção contra infecção pelo HCV (OR=0,70 [IC95%=0,496-0,996] P=0,047 para portadores do haplótipo). Essa associação foi encontrada principalmente nos genótipos contendo o haplótipo anteriormente mencionado e os haplótipos ***CRDPCDVRC*** (**1A*), ***CRDPCDART*** (**2A2-l*) e ***CRDPCDVRT*** (**2A1*) (OR=0,28 [IC95%=0,08-0,98] P=0,04), (AG ou GA), ou seja, os genótipos **2B2A-i* /**1A*, **2B2A-i* /**2A2-l* e **2B2A-i* /**2A1*.

Na nomenclatura filogenética dos haplótipos, as terminações *l*, *i* e *h* indicam concentrações baixa, intermediária e alta, respectivamente, da proteína MASP-2. Dentre os haplótipos citados acima, presentes nos genótipos associados, **1A* e **2A1* não estão claramente relacionados com concentrações séricas de MASP-2, já **2A2-l* está associado com concentrações baixas e **2B2A-i* produz concentrações intermediárias. Homozigotos de **2B2A-i* foram associados com concentrações séricas intermediárias de MASP-2 (200-600 ng/mL) (BOLDT, A. *et al.*, 2013).

THIEL *et al.* (2009) observaram que dois polimorfismos, *R99Q* e *P126L*, encontrados no domínio CUB1, mantiveram a atividade de ligação de MASP-2 a MBL e clivagem de C4 com uma atividade comparável com os alelos mais comuns. Contudo, *R99Q* está associado com concentrações mais elevadas, e *P126L* com concentrações mais baixas da proteína no soro.

5.3 Análise em blocos de desequilíbrio de ligação

Posteriormente separamos os haplótipos em 3 blocos, baseados no desequilíbrio de ligação entre as variantes. O bloco 1 compreende os polimorfismos *g.4847C>A*, *R99Q*, *D120G* e *P126L*; o bloco 2 compreende os polimorfismos *g.7164G>A* e *g.7441A>G* e por fim, o bloco 3 que compreende os polimorfismos *g.21081C>T*, *Y371D*, *V377A*, *R439H* e *g.24762C>T*. Estes blocos foram separados baseados no desequilíbrio de ligação.

Analisando-se as frequências dos haplótipos do bloco 1 (promotor e exon 3 da *MASP2*) que compreende os polimorfismos *g.4847C>A*, *R99Q*, *D120G* e *P126L*, o haplótipo *ARDP* foi o mais comum. A frequência encontrada nos pacientes foi de 65% (119/180) e nos controles 70,7% (287/402) (OR=0,45 [IC95%=0,23-0,88] P=0,019, TABELA 8), corrigido pela idade (P=0,002), único fator demográfico associado. Portanto, o haplótipo *ARDP* está negativamente associado à doença, reforçando a associação encontrada na análise do haplótipo completo. Devido ao grande desequilíbrio de ligação dentro deste bloco, não é possível relacionar essa associação a somente um polimorfismo, assim sugerimos que o bloco completo esteja relacionado à proteção contra a infecção pelo HCV.

Não houve diferença significativa entre pacientes e controles para as outras variantes estudadas.

Alguns estudos analisaram polimorfismos individualmente, onde se observaram frequências alélicas semelhantes às encontradas no presente estudo. LOZANO *et al.* (2005) observaram que a variante *p.99Q* está presente em africanos subsaarianos, e THIEL *et al.* (2007) observaram que a variante alternativa *p.99R* está presente em 90-100% de várias populações. TÚLIO *et al.* (2011) observaram uma frequência de 99,04% da variante R em pacientes portadores do HCV. No presente estudo a frequência variante R foi de 100% nos pacientes e de 99,6% nos controles.

Para o polimorfismo *D120G (g.5620A>G)*, no estudo de THIEL *et al.* (2007) o genótipo AA apareceu numa frequência de 100% em africanos e europeus. Já o genótipo AG foi encontrado apenas em europeus com uma frequência de 3,9%. A variante G foi observada com uma frequência de 0,25% em espanhóis (GARCIA-

LAORDEN, M. I. *et al.*, 2008), e apenas 0,01% em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular (SEGAT, L. *et al.*, 2008). Também foi observada uma frequência de 0,2% do genótipo GG em pacientes com câncer colorretal (YTTING, H. *et al.*, 2011) e de 0,3-0,8% em pacientes com hanseníase (BOLDT *et al.* 2013). A presença do aminoácido glicina está associada com concentrações muito baixas da proteína MASP-2 no soro (STENGAARD-PEDERSEN, K. *et al.* 2003). Um paciente com fibrose cística portador de mutação homozigota GG para *D120G* apresentou doença pulmonar grave (OLESEN H. V. *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram que a proteína produzida pela variante G em *D120G* não pode ligar-se a MBL e portanto, não pode ativar a via alternativa do complemento (THIEL, S. *et al.* 2009). Na amostra em estudo foi observada uma frequência de 2,4% do alelo G em pacientes e 1,1% nos controles.

Em relação ao polimorfismo *p.126L*, o alelo L foi observado somente em ameríndios e afro descendentes (THIEL *et al.* 2007). Indivíduos homozigotos para o polimorfismo *p.126L* apresentaram falta de atividade de MASP-2 e baixas concentrações de MASP-2 (THIEL, S. *et al.*, 2007), enquanto que a proteína isolada tinha capacidade de clivar eficientemente C4 (THIEL, S. *et al.*, 2009). A variante L também tem sido associada a doença de Crohn com redução das concentrações de MASP-2, cardiomiopatia chagásica (BOLDT, A. *et al.*, 2011b), e associada com proteção contra o desenvolvimento de hanseníase (BOLDT, A. *et al.*, 2013). No presente estudo foi observado que a variante L foi menos frequente, encontrada somente nos controles, com uma frequência de 0,7%.

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (% ± DESVIO PADRÃO) DO PROMOTOR – EXON 3 DA MASP2 EM PACIENTES E CONTROLES

Bloco 1	Pacientes N=103		Controles N=220	
	Freq.(%)	DP	Freq.(%)	DP
ARDP^a	65%	3,3%	70,7%	2,2%
CRDP	32,5%	3,2%	26,8%	2,1%
ARGP	2,4%	1%	1,1%	0,5%
CQDP	0%	0%	0,7%	0,4%
CRDL	0%	0%	0,7%	0,4%

FONTE: O autor (2014).

LEGENDA: N= números de indivíduos, DP= desvio padrão, ^a= haplótipo associado a proteção contra a infecção pelo HCV P=0,037 OR=0,48 [IC95%=0,24-0,95].

O bloco 2 compreende os polimorfismos *g.7164G>A* (intron 4) e *g.7441A>G* (intron 5). Foi observada uma frequência muito próxima do genótipo AG em pacientes (83,2%) e em controles (82%), seguido pelo haplótipo GA 16,8% em pacientes e 16,9% nos controles (TABELA 9). As variantes no intron 4 (*g.7164G*) e no intron 5 (*g.7441A*) foram fortemente associadas com altas concentrações de MASP-2 e concentrações baixas de MAp19, assim como o polimorfismo no intron 9 (*g.21081T*) (BOLDT *et al.* 2011a). Porém no presente estudo, não foi encontrada nenhuma associação destas variantes com a hepatite C.

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (% ± DESVIO PADRÃO) DO INTRON 4 E INTRON 5 DA MASP2 EM PACIENTES E CONTROLES

Bloco 2	Pacientes N=103		Controles N=220	
	Freq.(%)	DP	Freq.(%)	DP
AG	83,2%	1,8%	82%	2,7%
GA	16,8%	1,8%	16,9%	2,6%
GG	0%	0%	0,9%	0,6%

FONTE: O autor (2014).

LEGENDA: N= números de indivíduos, DP= desvio padrão.

Analisando o bloco 3 que compreende o intron 9 e o exon 12 no qual se encontram os polimorfismos *g.21081C>T*, *Y371D*, *V377A*, *R439H* e *g.24762C>T*, foi observada uma frequência similar do haplótipo *CYVRT* entre pacientes e controles (TABELA 10). Coelho *et al.* (2013) observaram que o alelo G do polimorfismo *Y371D* (*g.21370T<G*) foi mais frequente em indivíduos infectados com HTLV-1 do que em controles. No estudo de SEGAT *et al.* (2008), o genótipo *TT* foi observado em 67% de pacientes com carcinoma hepático, porém não houve associação com a doença. TÚLIO *et al.* (2011) encontraram o genótipo *GG* em 15,5% (16/103) dos indivíduos infectados pelo HCV e em 3,92% (4/104) dos controles, caracterizando uma associação entre o genótipo *GG* e a susceptibilidade a hepatite C. Porém no presente estudo foi observada uma frequência similar para o alelo G nos pacientes infectados pelo HCV (25,7%, 157/201) e de nos indivíduos controles (22,6%, 68/90), não foi observado associação. Esta diferença pode ser devido ao número amostral (103 pacientes e 220 controles enquanto no estudo de Túlio e colaboradores (2011) foram 104 pacientes e 104 controles, e interpretação da técnica PCR-SSCP (Polimorfismo de conformação de filamento único), já que as duas

populações são da mesma região e nos dois estudos os pacientes foram pareados por sexo, idade e ancestralidade com os controles. Esta associação encontrada por Túlio e colaboradores (2011) pode ser devido a um forte desequilíbrio de ligação entre o intron 9 e exon 10, já que o intron 9 não foi analisado no estudo de Túlio. Então esta associação encontrada na verdade pode ter se dado por um efeito “carona” entre esses polimorfismos próximos.

Os polimorfismos *p.V377A* e *p.P126L*, podem estar relacionados com concentrações reduzidas de MASP-2. Este polimorfismo está associado a doença de Crohn e a cardiomiopatia chagásica (BOLDT, A. *et al.*, 2011b), possui uma atividade enzimática normal e pode clivar C4 (THIEL, S. *et al.*, 2007).

O polimorfismo *p.439H* (rs12085877) parece estar ausente em populações europeias e asiáticas, mas com frequência de 9-15% na África Subsaariana (THIEL *et al.* 2009). No estudo de HOLMBERG *et al.* (2012) *MASP2*439H* foi observado em 27% de mulheres que contraíram a malária. Esta variante se liga normalmente a MBL mas é deficiente na sua atividade enzimática (THIEL, S. *et al.*, 2009). Na amostra em estudo o alelo *H* não foi encontrado nos pacientes e nos controles apresentou frequência de apenas 0,2%.

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (% ± DESVIO PADRÃO) DO INTRON 9 E EXON 12 DA *MASP2* EM PACIENTES E CONTROLES

Bloco 3	Pacientes N=103		Controles N=220	
	Freq.(%)	DP	Freq.(%)	DP
CYVRT	74,3%	3%	77,3%	2%
TDVRC	19,4%	2,7%	14%	1,6%
CDVRC	3,4%	1,2%	5,2%	1%
CDART	1,9%	0,9%	3%	0,8%
CDVRT	1%	0,7%	0,2%	0,2%
CDVHC	0%	0%	0,2%	0,2%

FONTE: O autor (2014).

LEGENDA: N= números de indivíduos, DP= desvio padrão.

Não foi observada associação entre os haplótipo de *MASP2* e as formas clínicas do HCV (fibrose, siderose, esteatose e cirrose).

5.3.1 Concentração sérica de MASP-2 e associação com HCV

As concentrações séricas de MASP-2 variaram entre 70,8 ng/mL e 1634,2 ng/mL nos pacientes HCV e 43,2 ng/mL e 1237,5 ng/mL nos controles. Foi observada uma diferença significativa entre pacientes (mediana 206,7 ng/mL em 67 indivíduos) e controles (mediana 349,5 ng/mL em 77 indivíduos, Mann-Whitney, $P < 0,0001$ e na regressão logística com correção pelo sexo $OR = 5,54$, $P = 0,008$). Para esta análise foram excluídos dois *outliers* nos pacientes (1634,2 ng/mL e 1180,1 ng/mL) (GRÁFICO 1). As associações encontradas com as concentrações de MASP-2 e com a presença do haplótipo *ARDPAGCYVRT* (**2A2B-i*) são independentes (permaneceram associadas quando analisadas no modelo reduzido de regressão logística), com $OR = 0,03$ [$IC_{95\%} = 0,007-0,15$] $P < 0,001$ e $OR = 0,24$ [$IC_{95\%} = 0,09-0,64$] $P = 0,005$, respectivamente. Indivíduos com concentração inferior a 200 ng/mL são considerados deficientes na produção da proteína MASP-2 (SCHLAPBACH, L. J. *et al.*, 2007). A deficiência foi mais frequente nos pacientes (52,2% - 36/69) do que nos controles (22,1% - 17/77) ($OR = 3,85$ [$IC_{95\%} = 1,88-7,88$] $P = 0,0003$). No estudo de MOLLER-KRISTENSEN, M *et al.* (2003) foi observado uma concentração sérica de 534 ng/mL para indivíduos saudáveis dinamarqueses. YTTING, H. *et al.* (2008) observaram altas concentrações de MASP-2 associadas com pior sobrevida e recorrência de câncer colorretal. De acordo com DENG *et al.* (2011) a expressão do RNAm da MASP-2 é restrito ao fígado, e análise imunohistoquímica demonstrou que tanto MASP-2 quanto Map19 são produzidas pelos hepatócitos. O HCV se replica no citoplasma dos hepatócitos (CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. 2006), e no presente estudo foi possível observar que pacientes infectados pelo HCV possuem uma deficiência na produção de MASP-2 em comparação com os controles. A diminuição na produção desta proteína pode ser devida a grande injúria sofrida pelos hepatócitos durante a infecção e replicação do vírus do HCV, já que a MASP-2 é produzida exclusivamente por este órgão.

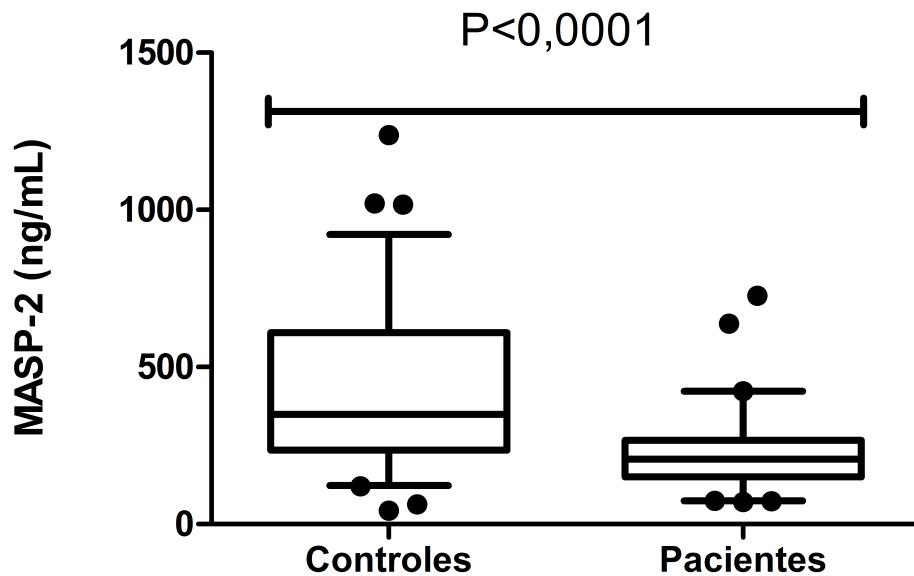


GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES HCV+ E CONTROLES.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada mediana e interquartil.

5.3.2 Concentração sérica de MASP-2 e haplótipos do gene

No estudo de BOLDT *et al.* (2011a) foi observada uma diferença significativa nas concentrações de MASP-2 entre os diferentes genótipos. Os haplótipos **2B2B-I* e **2A2-I* estavam relacionados com baixa produção (<200 ng/mL) e **1B1-h* com altas concentrações de MASP-2 (600 ng/mL). Não foi observada diferença entre os genótipos **2B2A-i/*2B2A-i*, **2B2A-i/*1A*, **2B1-i/*1A*, e os genótipos **2B2A-i/*2B1-i* foram associados com concentrações intermediárias de MASP-2 (mediana de 390 ng/mL) (BOLDT, A. *et al.*, 2011a). No GRÁFICO 2, observa-se que a amostra em estudo manteve a relação genótipo vs. fenótipo descrito anteriormente (BOLDT, A. *et al.*, 2011a). Tanto nos pacientes como nos controles observou-se que genótipos homocigotos *I/I* e heterocigotos *I/i* são baixos produtores da proteína (mediana 136,8 ng/mL para pacientes, mediana 117,1 ng/mL para controles), homocigotos *i/i* são produtores intermediários (mediana 188,1 ng/mL para pacientes, mediana 335,2 ng/mL

para controles) e genótipo homozigoto h/h e heterozigotos h/i estão associados com altas concentrações de MASP-2 (mediana 225,6 ng/mL para pacientes, mediana 502,9 ng/mL para controles). Mesmo entre os pacientes infectados pelo HCV, que apresentam concentração geral de MASP-2 reduzida, observa-se uma diferença significativa ($P=0,0198$) entre baixa, intermediária e altas concentrações de MASP-2. Nesta análise os introns 4 (*g.7164*) e 5 (*g.7441*) não foram incluídos nos haplótipos relacionados a concentração.

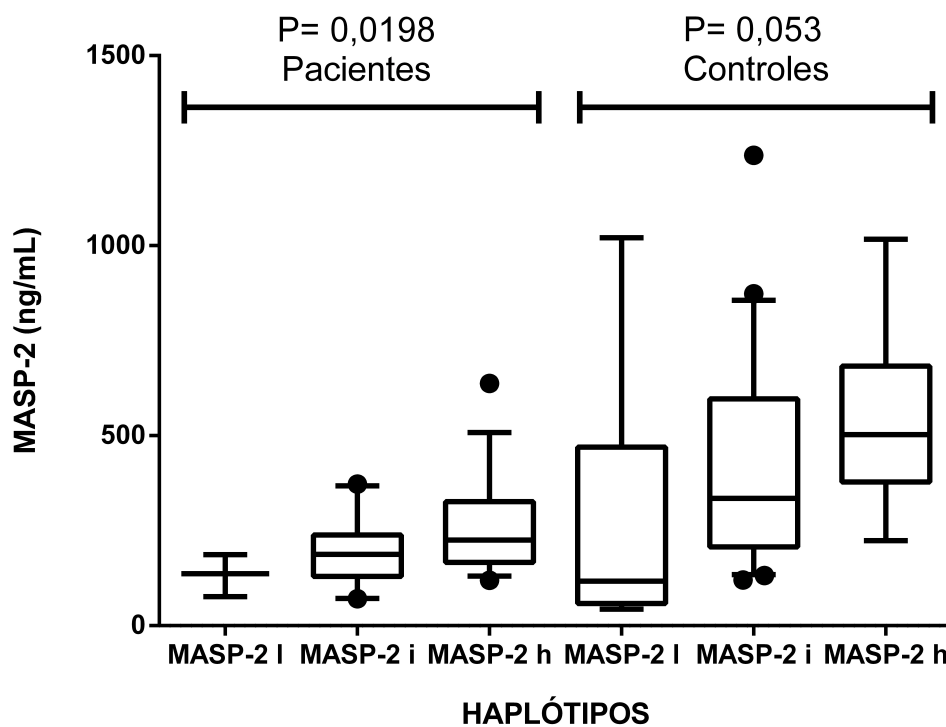


GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM PACIENTES INFECTADOS PELO HCV E CONTROLES COM DIFERENTES HAPLÓTIPOS CLASSIFICADOS DE ACORDO COM SEUS EFEITOS NA CONCENTRAÇÃO DE MASP-2.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Kruskal Wallis; a distribuição das concentrações está representada em mediana e intervalo 5% e 95%. (I: haplótipos de baixa produção de MASP-2, incluindo os genótipos I/I e I/i; i: haplótipos de produção intermediária de MASP-2; h: haplótipos de alta produção de MASP-2, incluindo genótipos h/h e h/i).

Quando analisado os polimorfismos do intron 4 e intron 5 em relação à concentração de MASP-2 foi observado uma diferença significativa entre os diferentes genótipos ($P=0,0071$ para controles e $P=0,0038$ para pacientes) (GRÁFICO 3). Esta associação apresentou um padrão observado com os haplótipos completos, onde o genótipo AG/AG se manteve como um baixo produtor de MASP-2, o genótipo transitório AG/GA apresentou uma concentração intermediária de MASP-2 e o genótipo homocigoto GA obteve uma concentração mais elevada de MASP-2. Assim propõe-se que se faça uma análise dos haplótipos completos levando em consideração a possível interferência destes genótipos na concentração final de MASP-2. Neste estudo não foi possível realizar tal análise devido ao pequeno número amostral quando se realiza a separação dos grupos.

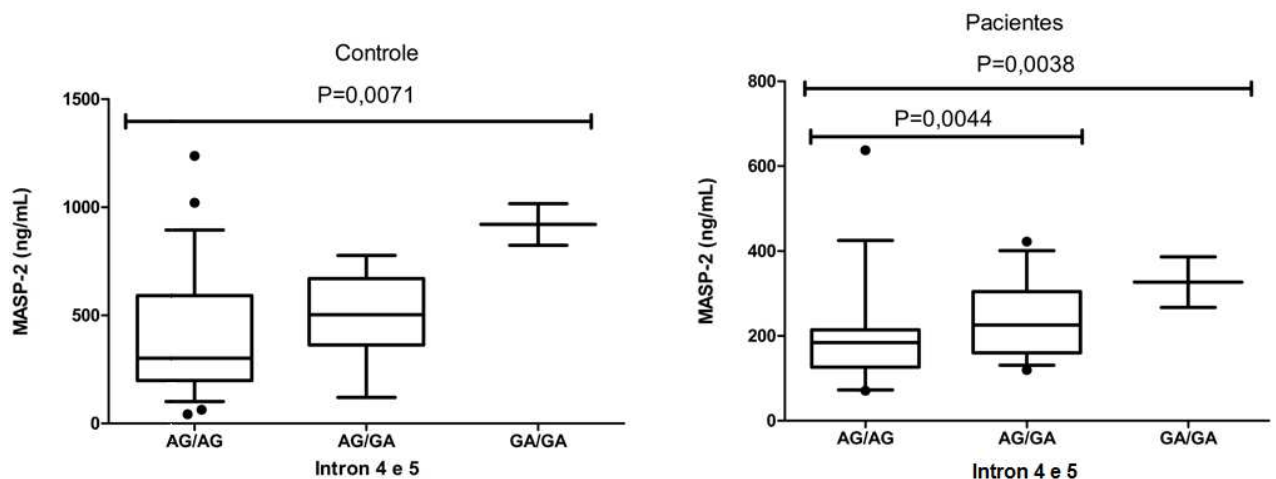


GRÁFICO 3 – COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPOS DA MASP2 INTRON 4 (*g.7164*) E 5 (*g.7441*) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV. FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Kruskal Wallis; a distribuição das concentrações está representada em mediana e intervalo 5% e 95%.

5.3.3 Concentração sérica de MASP-2 e o bloco *ARDP*

Devido à associação genética encontrada com o bloco *ARDP*, foi realizada uma comparação entre concentrações de MASP-2 em relação ao bloco. Assim foi observada uma tendência nos controles ($P=0,049$), onde se observa que controles sem a presença

do bloco *ARDP* possuem concentrações mais elevadas de MASP-2 (GRÁFICO 4). É possível observar que controles homozigotos possuem uma concentração mais baixa, controles heterozigotos possuem concentrações intermediárias de MASP-2 e os que não apresentam o haplótipo *ARDP* possuem uma concentração mais elevada de MASP-2. Quando observado os pacientes não se obteve uma diferença significativa ($P=0,16$), porém também se observa que pacientes homozigotos para o *ARDP* possuem uma concentração de MASP-2 mais baixa, seguido por concentrações intermediárias em heterozigotos e apenas nos pacientes sem *ARDP* não se observa a mesma tendência de elevação na concentração de MASP-2, o que pode ser devido ao pequeno número amostral nesta categoria.

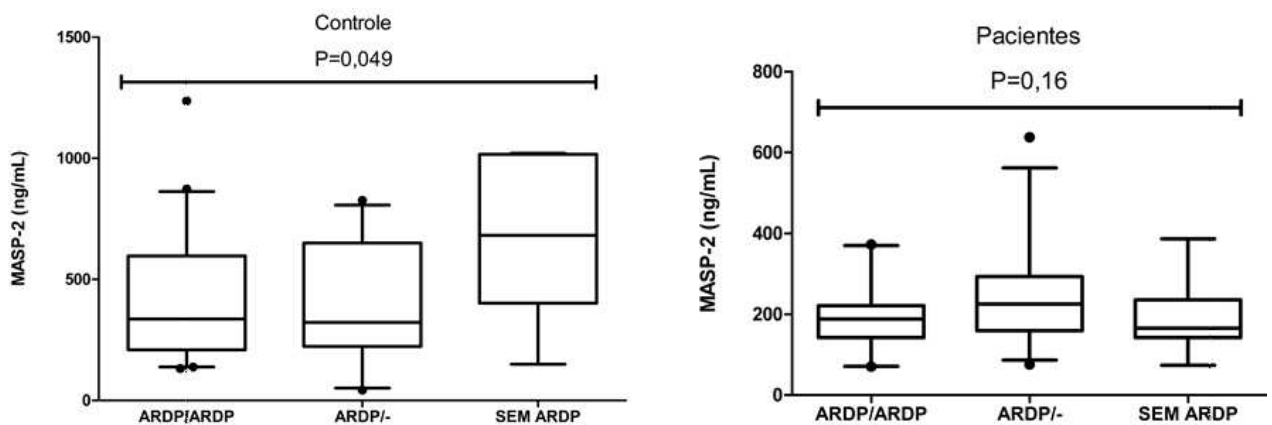


GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM O HAPLÓTIPO *ARDP* DA *MASP2* EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Kruskal Wallis; a distribuição das concentrações está representada em mediana e intervalo 5% e 95%.

A hipótese mais provável para a associação genética encontrada com o bloco *ARDP* está relacionada ao alelo *A* do promotor em combinação com o *D* do polimorfismo *p.D120G*, sendo que o segundo polimorfismo está descrito na literatura como sendo um dos causadores da deficiência de MASP-2. Assim foi realizada uma comparação das concentrações de MASP-2 em relação ao polimorfismo *g.4847C>A* do promotor, e foi observado uma diferença significativa nos controles ($P=0,030$) porém não nos pacientes ($P=0,34$) (GRÁFICO 5). Tanto em controles quanto em pacientes foi

observado uma tendência em relação aos genótipos *versus* concentração onde o genótipo homocigoto *A/A* se observou uma concentração menor de MASP-2, o genótipo de transição *A/C* se obteve uma concentração intermediária de MASP-2 e para o genótipo *C/C* foi observado uma concentração de MASP-2 mais elevada. Assim para maior esclarecimento da região promotora foi realizado um teste *in silico* para analisar a presença ou não de fatores de transcrição presentes nesta região. Utilizando o programa *Searching Transcription Factor Binding Sites (TFSEARCH)* (versão 1.3) foi possível observar que existem dois fatores de transcrição de se ligam próximo ao SNP que foi analisado. O fator de transcrição de linfócitos (LyF-1) se liga em uma região que inclui o SNP em estudo, o que pode interferir nas variações de concentração de MASP-2 encontrados. O outro fator de transcrição, STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição) se liga a aproximadamente 14 pb do SNP que foi analisado, provavelmente não interferindo na análise do SNP em questão.

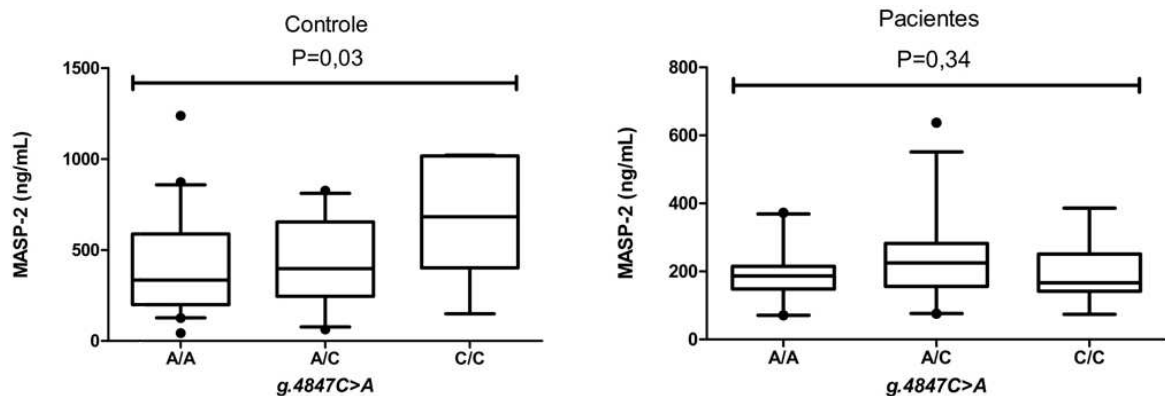


GRÁFICO 5 – COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPOS DA MASP2 REGIÃO PROMOTORA (*g.4847C>A*) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Kruskal Wallis; a distribuição das concentrações está representada em mediana e intervalo 5% e 95%.

5.3.4 Concentração sérica de MASP-2 em relação ao intron 9 e exon 10

A análise das concentrações de MASP-2 associadas à variante *C* ou *T* do intron 9 (*g.21081C>T*) demonstrou que a variante *T* está associada com concentrações elevadas de MASP-2 quando comparadas com homocigotos *C/C* tanto em pacientes

(medianas 169,9 ng/mL em 32 pacientes homocigotos *C/C* e 224,9 ng/ml em 33 pacientes portadores da variante *T*, Mann-Whitney, $P=0,006$), quanto em controles (medianas 308,2 ng/ml em 59 controles homocigotos *C/C* e 502,9 ng/ml em 18 controles portadores da variante *T*, Mann-Whitney, $P=0,004$) (GRÁFICO 6). Assim como na análise anterior, foram excluídos dois *outliers* nos pacientes, um no grupo homocigoto *C/C* (1634,2 ng/mL) e outro com a variação *T* (heterocigotos ou homocigotos com *T*, 1180,0 ng/mL). No estudo de BOLDT *et al.* (2011a) foi observado que a variante *T* do intron 9 estava associada com altas concentrações (600 ng/mL) de MASP-2 e baixas concentrações (inferior a 200 ng/mL) de Map19. A associação com a variante *g.21081T* é provavelmente, um efeito de desequilíbrio de ligação com alguma variante próxima, já que todas as três variantes intrônicas (intron 4, 5 e 9) estão fortemente ligadas (BOLDT, A. *et al.*, 2013). Esta variante *T* foi relatada com uma frequência em torno de 10-16% em africanos, europeus e asiáticos (BOLDT, A. *et al.*, 2011a).

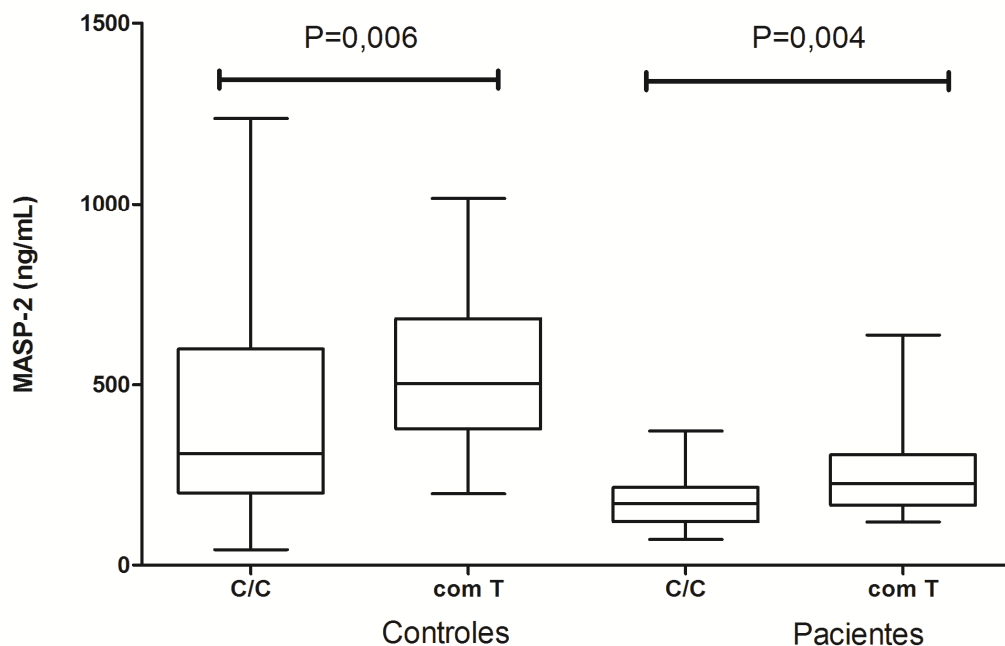


GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPOS DA MASP2 INTRON 9 (*g.21081C>T*) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS COM HCV.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana e interquartil.

No gráfico 7 foi realizada uma comparação entre concentrações de MASP-2 e genótipo para o polimorfismo *Y371D. BOLDT *et al.* (2011b) observou que o polimorfismo *p.D371Y* foi associado com diferentes concentrações de MASP-2 na doença de Chagas crônica. BRONKHORST *et al.* (2013) observaram que indivíduos com genótipo *DD* tinham maior risco para o desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), a qual ocorreu em 79% dos pacientes homocigotos *DD*. Além disso, pacientes com genótipo *DD* tiveram risco significativamente aumentado de choque séptico. O polimorfismo *Y371D* foi associado com o aumento do risco de complicações infecciosas após transplante de fígado (DE ROOIJ, B. J. *et al.*, 2011). No estudo de TULLIO *et al.* (2011) o polimorfismo *p.D371Y* (g.21370G>T) estava associado com a susceptibilidade à infecção pelo HCV, com a variante T associada com concentrações elevadas de MASP-2. A análise dos genótipos compreendendo *MASP2*Y371D* no exon 10 em comparação às concentrações séricas da MASP-2 (GRÁFICO 7), revelou uma diferença significativa entre controles com genótipos contendo a variante “D” (mediana 444,0 ng/mL em 29 controles) e controles homocigotos Y/Y (mediana 322,2 ng/mL em 48 controles, Mann-Whitney, P=0,045). A mesma tendência foi observada em pacientes, com maior concentração de MASP-2 em pacientes com genótipos contendo a variante “D” (mediana 205,2 ng/mL em 41 pacientes), em comparação a pacientes homocigotos Y/Y (mediana 186,6 ng/mL em 26 pacientes, Mann-Whitney, P= 0,17). Para esta análise foram excluídos dois *outliers* nestes pacientes, um no grupo homocigoto Y/Y (3076,0 ng/mL) e outro com o alelo “D” (heterocigotos ou homocigotos com D, 2221,2 ng/mL).

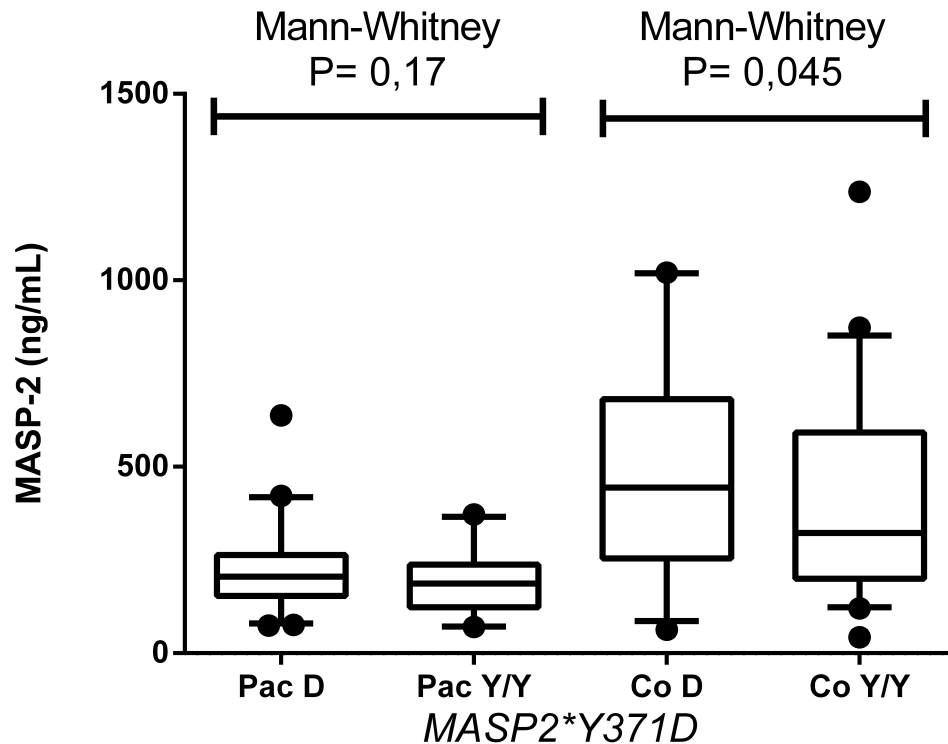


GRÁFICO 7 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 COM GENÓTIPO MASP2*Y371D (exon 10) EM CONTROLES E PACIENTES INFECTADOS PELO HCV. FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana e intervalo 5% e 95%.

5.3.5 Concentração sérica de MASP-2 e genótipos virais

A comparação entre as concentrações séricas de MASP-2 e os genótipos virais do HCV mostrou que indivíduos com o genótipo viral 1 ou 4 apresentam concentrações inferiores de MASP-2 (mediana 166,5 ng/ml em 33 pacientes), comparados a indivíduos com o genótipo 3 (mediana 210,9 ng/ml em 18 pacientes, Mann-Whitney, $P=0,029$) (GRÁFICO 8). Os mesmos *outliers* excluídos nos primeiros testes também o foram aqui. Na regressão logística binária modelo reduzido a associação se manteve ($P= 0,018$) e provavelmente indica que o fígado está mais conservado e os hepatócitos podem sintetizar a proteína MASP-2. O tratamento com INFpeg e RBV durante 48 a 72 semanas em pacientes infectados com o genótipo 1 (VENEGAS, M. *et al.*, 2011), produz uma RVS em apenas 40-50% dos pacientes portadores dos genótipos 1 e 4,

respectivamente (VENEGAS, M. *et al.*, 2011). Já para os genótipos 2 e 3 tratamento por 24 semanas produz RVS em cerca de 70% a 85% dos pacientes (SHERMAN, K. E., 2012). Assim, esta variação de tempo na resposta ao tratamento pode estar relacionada, em parte, a resposta imunológica produzida pela ligação MASP-2/MBL aos vírus, uma vez que pacientes com genótipo viral 3 possuem concentrações mais elevadas de MASP-2 e uma ativação do sistema complemento mais efetiva, e dessa forma em combinação com a terapia medicamentosa, corrobora para uma depuração viral mais rápida.

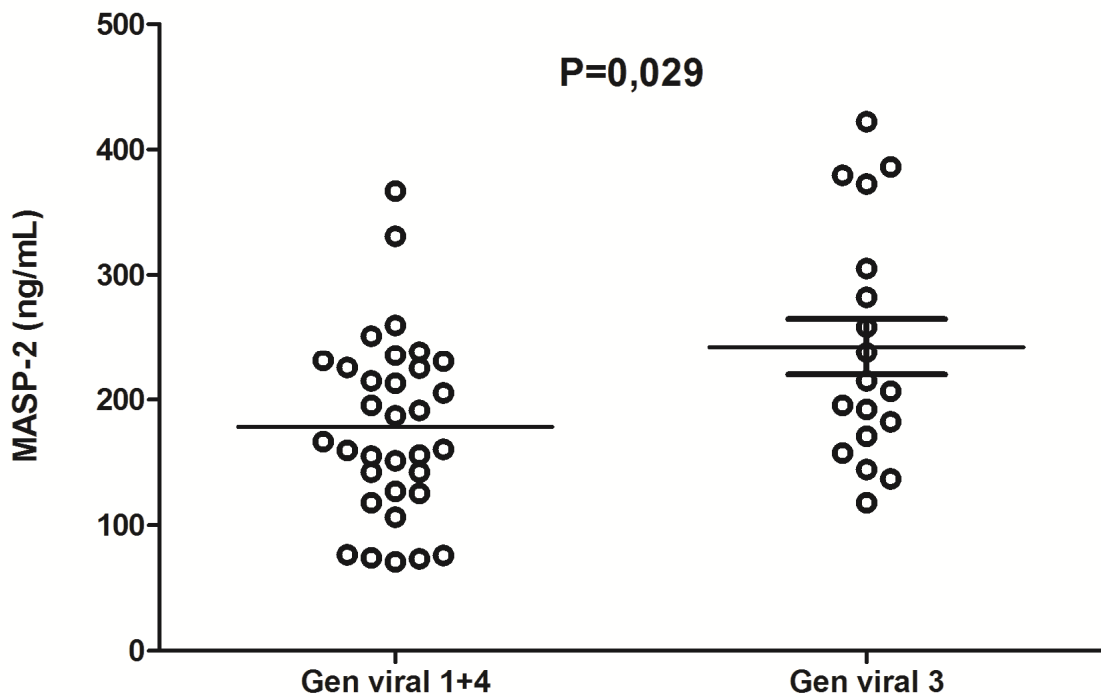


GRÁFICO 8 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-2 EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO VIRAL DO HCV

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana e interquartil.

5.3.6 Concentração sérica de MASP-2 e características clínicas do HCV

A fibrose hepática é a principal complicação da doença hepática crônica. O papel da cascata de coagulação no desenvolvimento de fibrose é de extrema importância. A ativação da coagulação depende da clivagem da protrombina em trombina e

subsequente conversão do fibrinogenio em fibrina. O acúmulo de fibrina no fígado é encontrado durante a lesão hepática aguda e crônica. Com o avanço da fibrose para cirrose os hepatócitos produzem cada vez menos MASP-2, ficando deficientes.

No estudo de EL SAADANY, S. *et al.* (2011) foi observado que os níveis séricos de MBL e do complexo MBL/MASP-1 foram superiores em pacientes com doença hepática crônica em comparação com indivíduos saudáveis, sendo a atividade do complexo MBL/MASP-1 se relacionou com a gravidade da fibrose. O complexo MBL/MASP-1 foi associado de forma mais significativa com fibrose grave em comparação com a concentração de MBL. Não foi observada associação entre os diferentes graus de fibrose e as concentrações séricas de MASP-2.

6. CONCLUSÕES

A análise dos dados do presente estudo levou às seguintes conclusões:

O haplótipo *ARDPAGCYVRT* (*2B2A-1), mais especificamente o bloco ARDP, está associado com proteção contra a infecção pelo HCV;

Os haplótipos de *MASP2*, formados pela combinação dos 11 polimorfismos analisados, estão associados com as concentrações séricas de MASP-2 assim como relatado na literatura;

Portadores da variante T (intron 9, *g.21081C>T*) apresentaram maiores concentrações de MASP-2 do que indivíduos com genótipo CC;

Pacientes infectados pelo HCV apresentaram menores concentrações séricas de MASP-2 do que em controles;

Pacientes infectados pelo HCV apresentaram maior frequência de deficiência (<200 ng/mL) de MASP-2 do que em controles;

Pacientes com o genótipo viral 1 ou 4 (não respondedores) apresentaram concentrações séricas de MASP-2 menores do que pacientes com o genótipo viral 2 ou 3;

Não foi encontrada associação entre polimorfismos de *MASP2* ou as concentrações séricas da proteína com fibrose hepática.

Os resultados obtidos permitem sugerir que polimorfismos do gene *MASP2* estão relacionados com proteção contra a infecção pelo HCV, e que o dano hepático pode influenciar na produção diminuída da proteína MASP-2 nos pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2012.

AKAMATSU, N.; SUGAWARA, Y. Review Article Living-Donor Liver Transplantation and Hepatitis C. **HPB Surgery**, 2013.

AKUTA, N. *et al.* Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. **Journal of Hepatology**, v.46, p.403-410, 2007.

ALBERTI, A.; NEGRO, F. The Global Health Burden of Hepatitis C Virus Infection. **Liver International**, v.31, 2011.

ALVAREZ-URIA, G. *et al.* Authors' reply: Serum Albumin for Tuberculosis in HIV Infected Patients Eligible for Antiretroviral Therapy. **BiolImpacts**, v.3, n.4, p.201-202, 2013.

AMET, T. *et al.* CD59 incorporation protects hepatitis C virus against complement-mediated destruction. **Hepatology**, v.55, p.354-363, 2012.

ANDRÉ, P. *et al.* Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. **Journal of Virology**, v.76, n.14, p.6919-6928, 2002.

ANK, N. *et al.* An Important Role for Type III Interferon (IFN- λ /IL28) in TRL-Induced Antiviral Activity. **The Journal of Immunology**, p. 2474-2485, 2008.

ARAÚJO, A. R. *et al.* Caracterização do Vírus da Hepatite C em Pacientes com Hepatite Crônica: Genótipos no Estado do Amazonas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p.638-640, 2011.

ARENDR, B. M. *et al.* Hepatic Fatty Acid Composition Differs between Chronic Hepatitis C Patients with and without Steatosis. **American Society for Nutrition**, v.139, n.4, p.691-5, 2009.

ARSHAD, M.; KAMARY, S. S.; JHAVERI, R. Hepatitis C Virus Infection During Pregnancy and the Newborn Period – Are They Opportunities for Treatment **Journal of Viral Hepatitis**. v.18, p.229-236, 2011.

ARTICO, S. *et al.* The effectiveness of retreatment with peginterferon alfa and ribavirin in patients with chronic viral hepatitis C genotype 2 and 3: a prospective cohort study in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v.12, 2012.

BADIA-MARTINEZ, D. *et al.* Three-Dimensional Visualization of Forming Hepatitis C Virus – Like Particles by Electron Tomography. **Virology**, v.430, p.120-126, 2012.

BARRIT, A. S. Management of Anemia in Patients Receiving Triple Therapy for Hepatitis C. **Gastroenterology & Hepatology**, p.314-316, 2013.

BELLEST, L. *et al.* A Modified International Normalized Ratio as na Effective Way of Prothrombin Time Standardization in Hepatology. **Hepatology**, v.46, n.2, p.528-534, 2007.

BLACKARD, J. T. *et al.* Acute Hepatitis C Virus Infection: A Chronic Problem. **Hepatology**, v.46 p.321-331, 2008.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Leprosy Association with Low MASP-2 Levels Generated by MAp19 Exon 5 MASP2 Haplotypes and Polymorphisms Flanking. **Plos One**, v.8, 2013.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MAp19 serum levels. **Human Immunology**, v.72, p.753-760, 2011a.

BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. **Advances in Clinical Chemistry**, v.56, p. 105-37, 2012.

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

BOLDT, A. B. W.; PETZL-ERLER, M. L. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. **Human Mutation**, v.19, p. 296-306, 2002.

BOURLIÈRE, M. Peripheral blood cytopenia before treatment in HCV patients: is it a limitation for HCV treatment in the era of DAA? **Liver International**, v.32, p.1033-1036, 2012.

BRASIL. ABCDE Das Hepatites Virais para Cirurgiões Dentistas, **Ministério da Saúde**, 2010. Disponível em <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/manual_abcde_28_09_a2.pdf>. Acesso em 22/03/2012.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, ano III, nº1, 2012.

BRASIL. **Hepatites Virais: O Brasil está Atento**, 3ª edição. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRONKHORST, M. W. G. A. *et al.* Risk of infection and sepsis in severely injured patients related to single nucleotide polymorphisms in the lectin pathway. **British Journal of Surgery**, p.1818–1826, 2013.

BROWN, K. S. *et al.* Mannan binding lectin and viral hepatitis. **Immunology Letters**, v.108, p.34-44, 2007a.

BROWN, K. S. *et al.* 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. **Clinical & Experimental Immunology**, v.147, p.90–98, 2007b.

BROWN, K. S. *et al.* Specific interaction of hepatitis C virus glycoproteins with mannan binding lectin inhibits virus entry. **Protein Cell**, v.7, p.664–674, 2011.

BUCCOLIERO, G. *et al.* Romiplostim for severe thrombocytopenia in the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a new option for clinicians? **New Microbiologica**, v.37, p. 97-101, 2014.

BULAJ, Z. J. *et al.* Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. **Blood**, v.95, n.5, p.1565-71, 2000.

CAMPIOTTO, S. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.1, p.41-49, 2005.

CAMUS, G. *et al.* Diacylglycerol Glycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.14, p.9915-9923, 2013.

CARAMEZ, C. *et al.* Alterações dermatológicas na hepatite C. **Revista Brasileira Clinica Medica**, v.8, p.53-58, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2013. Disponível em <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6218a5.htm>>. Acesso em 12/09/2013.

CHEN, S. S. L.; MORGAN, T. R. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. **International Journal of Medical Sciences**, v.3, p.47-52, 2006.

CHEVALIEZ, S. Antiviral Activity of the New DAAs for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection: Virology and Resistance. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v.35, p.46-51, 2011.

COELHO, A. V. C *et al.* Mannose binding lectin and mannose binding lectin-associated serine protease-2 genes polymorphisms in human T-lymphotropic virus infection. **Journal of Medical Virology**, v.85, n.10, p.1829-1835, 2013.

DA SILVA, C. M. D. *et al.* High Proportion of Hepatitis C Virus Genotypes 1 and 3 in a Large Cohort of Patients from Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7 p.867-870, 2007.

DANIELSSON, J. *et al.* Individual and Joint Impacts of Ethanol Use, BMI, Age and Gender on Serum Gamma-Glutamyltransferase Levels in Healthy Volunteers. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.11929-11941, 2013.

DAZERT, E. *et al.* Loss of Viral Fitness and Cross-Recognition by CD8+ T Cells Limit HCV Escape From a Protective HLA-B27 Restricted Human Immune Response. **The Journal Of Clinical Investigation**, v.119, n.2, p.376-386, 2009.

DE ROOIJ, B. J. *et al.* Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re) infection after orthotopic liver transplantation. **Journal of Hepatology**, v.55, n.4, p.800-807, 2011.

DEGN, S. E. *et al.* MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene. **Journal of Immunological Methods**, v.373, p.89-101, 2011.

DEGN, S. E. *et al.* MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. **The Journal of Immunology**, v.183, n.11, p.7371-7378, 2009.

DERBALA, M. *et al.* Interleukin-28 and hepatitis C virus genotype-4: Treatment induced clearance and liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, v.18, p.7003-7008, 2012.

DHINGRA, K. K. *et al.* Transient bone marrow aplasia associated with non-A, non-B hepatitis. **American Journal of Hematology**, v.29, p.168-171, 1988.

DUMESTRE-PERARD, C. *et al.* Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. **Clinical & Experimental Immunology**, v.127, p.131-136, 2002.

DUNFORD, L. *et al.* Hepatitis C Virus in Vietnam: High Prevalence of Infection in Dialysis and Multi-Transfused Patients Involving Diverse and Novel Virus Variants. **Plos One**, v.7, 2012.

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

EL SAADANY, S. *et al.* Fibrosis severity and mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex in HCV-infected patients. **Arab Journal of Gastroenterology**, v.12, p.68-73, 2011.

EVANS-OSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ M. The Emerging Role of Complement Lectin Pathway in Trypanosomatids: Molecular Bases in Activation, Genetic Deficiencies, Susceptibility to Infection, and Complement System-Based Therapeutics. **The Scientific World Journal**, 2013.

FABRIZI, F. *et al.* Hepatitis C Virus Infection and Kidney Disease: A Meta-Analysis. **Clinical Journal of the American Society Nephrology**, v.7, n.4, p.549-557, 2012.

FARAH, K. P. *et al.* Hepatitis C, HCV genotypes and hepatic siderosis in patients with chronic renal failure on haemodialysis in Brazil. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.22, p.2027–2031, 2007.

FELD, J. J. *et al.* Hepatic gene Expression During treatment with Peginterferon and Ribavirin: Identifying Molecular Pathways for Treatment Response. **Hepatology**, v.46, p.1548-1563, 2007.

FRIED, M. W. *et al.* Rapid virological response is the most important predictor of sustained virological response across genotypes in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v.55, p.69-75, 2011.

FUJITA, T. Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, p.346-353, 2002.

FUKUHARA, T. *et al.* Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. **Gastroenterology**, v.139, n.5, p.1577-1585, 2010.

GÁL, P. *et al.* Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences. **Immunobiology**. v.212, p.267-277, 2007.

GARCIA-LAORDEN, M. I. *et al.* Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.122, p.368-374, 2008.

GONÇALES JR, F. L. *et al.* A clinical, epidemiological, laboratorial, histological and ultrasonographical evaluation of anti-HCV EIA-2 positive blood donors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.3, p.147-152, 2000.

GRAMENZI, A. *et al.* Impact of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus related cirrhosis. **Gut**, v.48, p.843-848, 2001.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-72, 1992.

HALLA, M. C. *et al.* Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variant alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. **Human Immunology**, v.71, p.883–887, 2010.

HAMMES, G. G.; BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S. Flexibility, Diversity, and Cooperativity: Pillars of Enzyme Catalysis. **Biochemistry**, v.50, n.48, p.10422-10430, 2011.

HANAFIAH, K. M. *et al.* Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age-Specific Antibody to HCV Seroprevalence. **Hepatology**, v.57, n.4, p.1333-1342, 2013.

HAYASHI, H. *et al.* Management of thrombocytopenia due to liver cirrhosis: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.10. p. 2595-2605, 2014.

HECK, J. A. *et al.* Effects of Mutagenic and Chain-Terminating Nucleotide Analogs on Enzymes Isolated from Hepatitis C Virus Strains of Various Genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.6, p.1901-1011, 2008.

HEIM, M. H. HCV Innate Immune Responses. **Viruses**, p.1073-1088, 2009.

HÉJA, D. *et al.* Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proceedings**

of the National Academy Sciences of the United States of America, v.109, n.26, p.10498-10503, 2012.

HISANO, S. *et al.* Activation of the lectin complement pathway in post-streptococcal acute glomerulonephritis. **Pathology International**, v.57, n.6, p.351-357, 2007.

HOFFMANN, L. *et al.* Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. **Virology Journal**, v.10, 2013.

HOLMBERG, V. *et al.* Mutations of complement lectin pathway genes MBL2 and MASP2 associated with placental malaria. **Malaria Journal**, v.11, 2012.

IJAZ, C. B. *et al.* Association of laboratory parameters with viral factors in patients with hepatitis C. **Virology Journal**, v.8, 2011.

IMRAN, M. *et al.* Role of viral and host factors in interferon based therapy of hepatitis C virus infection. **Virology Journal**, v.10, 2013.

JARDIM, A. C. G. *et al.* Analysis of HCV quasispecies dynamic under selective pressure of combined therapy. **BMC Infectious Diseases**, v.13, 2013.

KANG, J.; KWON, Y. C.; AHN, B. Y. Modulation of the Type I Interferon Pathways by Culture-Adaptative hepatitis C Virus Core Mutants. **FEBS Letters**, v.586, p.1272-1278, 2012.

KARASAWA, T. *et al.* Metabolome Analysis of Erythrocytes from Patients with Chronic Hepatitis C Reveals the Etiology of Ribavirin-Induced Hemolysis. **International Journal of Medical Sciences**, v.10, n.11, p.1575-1577, 2013.

KE, P-Y.; CHEN, S. S. L. Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Disease. **Viruses**, v.10, p.2251-2290, 2012.

KEMMER, N.; NEFF, G. W. Managing Chronic Hepatitis C in the Difficult to Treat Patient. **Liver International**, v.27, p.1297-1310, 2007.

KIM, C. W.; CHANG, K-M. Hepatitis C virus: virology and life cycle. **Clinical and Molecular Hepatology**, v.19, p.17-25, 2013.

KIM, J. S. *et al.* The Impact of Inosine Triphosphatase Variants on Hemoglobin Level and Sustained Virologic Response of Chronic Hepatitis C in Korean. **Journal of Korean Medical Sciences**, v.28, p.1213-1219, 2013.

KIM, S.; KANG, S. Serum Albumin Levels: A Simple Answer to a Complex Problem? Are We on the Right Track of Assessing Metabolic Syndrome? **Endocrinology and Metabolism**, v.28, p.17-19, 2013.

KIRK, G. D. *et al.* HIV, Age, and the Severity of Hepatitis C Virus–Related Liver Disease: A Cohort Study. **Annals of Internal Medicine**, v.158, n.9, p.658-666, 2013.

KRARUP, A. *et al.* L-ficolin Is a Pattern Recognition Molecule Specific for Acetyl Groups. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.47513-47519, 2004.

KRISHNAN, S. M.; DIXIT, N. M. Ribavirin-Induced Anemia in Hepatitis C Virus Patients Undergoing Combination Therapy. **Plos Computational Biology**, v.7, 2011.

KWAK, M-S. *et al.* Serum bilirubin levels are inversely associated with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and Molecular Hepatology**, v.18, n.4, p.383-390, 2012.

LAMPEA, E. *et al.* Epidemic history of Hepatitis C virus in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, p.886–895, 2010.

LANINI, S. *et al.* Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus Epidemic in a Haemodialysis unit: Outbreak Investigation and Infection Outcome. **BMC Infectious Diseases**, v.10, 2010.

LARSSON, A.; RONQUIST, G.; AKERFELDT, T. Lifestyle intervention is associated with decreased concentrations of circulating pentraxin 3 independent of CRP decrease. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v.118, p.165-168, 2013.

LEE, C. H. *et al.* Predicting factors of present hepatitis C virus infection among patients positive for the hepatitis C virus anti- body. **Clinical and Molecular Hepatology**, v.19, p.376-381, 2013.

LEE, S. S. *et al.* Randomised Clinical Trial: The Efficacy of Treatment, Guided by a Shorter Duration of Response, Using Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Hepatitis C Virus Other Than Genotypes 2 or 3. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.35, p.37-47, 2012.

LIU, Y. *et al.* Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**, v.175, n.5, p.3150-3156, 2005.

LOZANO, F. *et al.* Novel MASP2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. **Tissue antigens**, v.66, p.131-135, 2005.

MAHER, S. G. *et al.* IFN- α and INF- λ Differ in Their Antiproliferative Effects and Duration of JAK/STAT Signaling Activity. **Cancer Biology & Therapy**, v.7, p.1109-1115, 2008.

MATSUSHITA, M. *et al.* Activation of the lectin complement pathway by ficolins. **International Immunopharmacology**, v.1, n.3, p.359-63, 2001.

MATSUSHITA, M. *et al.* Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. **Archives of Virology**, v.143, p.645-651, 1998.

MATSUSHITA, M. *et al.* Proteolytic Activities of Two Types of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. **The Journal of Immunology**, v.165, p.2637-2642, 2000.

MELIA, M. T. *et al.* Racial Differences in Hepatitis C Treatment Eligibility. **Hepatology**, v.54, p.70-78, 2011.

MENG, F. *et al.* Assessment of the value of serum cholinesterase as a liver function test for cirrhotic patients. **Biomedical Reports**, v.1, n.2, p. 265-268, 2013.

MIR-NASSERI, M. M. *et al.* Incarceration is a Major Risk Factor for Blood-Borne Infection Among Intravenous Drug Users. **Hepatitis Monthly**, v.11, p.19-22, 2011.

MOLLER-KRISTENSEN, M. *et al.* Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. **Journal of Immunological Methods**, v.282, p.159-167, 2003.

MONDELLI, M. U. *et al.* Natural killer cell functional dichotomy: a feature of chronic viral hepatitis. **Frontiers in Immunology**, v.3, 2012.

NADEEM, A. *et al.* Interferon-Alpha Induced and Ribavirin Induced Thyroid Dysfunction in Patients with Chronic Hepatitis C. **Hepatitis Monthly**, v.2, p. 132-140, 2010.

NAGGIE, S. HCV Management Basics. **Topics in Antiviral Medicine**, v.20, 2012/2013. Disponível em <<http://www.iasusa.org/sites/default/files/tam/20-5-154.pdf>>. Acesso em 07/04/2013.

NAITO, M. *et al.* SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Gastroenterology**, v.40, p.381-388, 2005.

NAKADA, T. *et al.* Evaluation of the potency of telaprevir and its metabolites as inhibitors of renal organic cation transporters, a potential mechanism for elevation of serum creatinine. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 2013.

NARCISO-SCHIAVON, J. L. *et al.* Gender influence on treatment of chronic hepatitis C genotype 1. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3, p.217-223, 2010.

NATTERMANN, J. *et al.* The Predictive Value of IL28 Gene polymorphism for Spontaneous Clearance in a Single Source Outbreak Cohort is Limited in Patients Carrying the CCR5D32 Mutation. **Journal of Hepatology**, v.55, p. 1201-1206, 2011.

NG, K. T. *et al.* Genome Sequence of the Hepatitis C Virus Subtype 6n Isolated from Malaysia. **Genome Announcements**, v.1, 2013.

NUCARA, S. *et al.* Natural history and Clinical Response: "It's the Virus, Stupid, or is it the Host". **BMC Infectious Diseases**, v.12, 2012.

OGUZ, A. *et al.* Predictive Role of Acute Phase Reactants in the Response to Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Gut and Liver**, v.7, n.1, p.82-88, 2013.

OHSAWA, I. *et al.* Cryoprecipitate of patients with cryoglobulinemic glomerulonephritis contains molecules of lectin complement pathway. **Clinical Immunology**, v.101, p.59-66, 2001.

OLESEN, H. V. *et al.* The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis—dysfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. **Clinical Immunology**, v.121, n.3, p.324-331, 2006.

ONG, J. P.; YOUNOSSI, Z. M. Managing the hematologic side effects of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Anemia, neutropenia, and thrombocytopenia. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.71, 2004.

PACIFICO, L. *et al.* Upper limit of normal for alanine aminotransferase: Quo vadis? **Clinica Chimica Acta**, v.422, p. 29–39, 2013.

PARABONI, M. L. R. *et al.* Risk Factors for Infection with Different Hepatitis C Virus Genotypes in Southern Brazil. **The Scientific World Journal**, 2012.

PARERA, M. *et al.* Canine Hepacivirus NS3 Serine Protease can Cleave the Human Adaptor Proteins MAVS and TRIF. **Plos One**, v.7, 2012.

PETTA, S. *et al.* Serum γ -glutamyl Transferase Levels, Insulin Resistance and Liver Fibrosis in Patients with Chronic Liver Diseases. **Plos One**, v.7, n.12, 2012.

RAMOS, J. A. *et al.* A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.7 2012.

RAYCHOUDHURI, A. *et al.* ISG56 and IFITM1 Proteins Inhibit Hepatitis C Virus Replication. **Journal of Virology**, v.85, n.24, p.12881-12889, 2011.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280-3, 1995.

REHERMANN, B. Hepatitis C Virus Versus Innate and Adaptive Immune Responses : A Tale of Coevolution and Coexistence. **The Journal of Clinical Investigation**, v.119, n.7, 2009.

SALAZAR, J. *et al.* C-Reactive Protein: Clinical and Epidemiological Perspectives. **Cardiology Research and Practice**, 2014.

SALUDES V. *et al.* Relevance of Baseline Viral Genetic Heterogeneity and Host Factors for Treatment Outcome Prediction in Hepatitis C Virus 1b-Infected Patients. **Plos One**, v.8, n.8, 2013.

SASAKI, K. *et al.* Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.35, p.960-965, 2000.

SASAKI, Y. *et al.* Effect of Caffeine-Containing Beverage Consumption on Serum Alanine Aminotransferase Levels in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Hospital-Based Cohort Study. **Plos One**, v.8, 2013.

SCHAFRANSKI, M. D. *et al.* Functional MASP2 gene polymorphism in patients with history of rheumatic fever. **Human Immunology**, v.69, p.41-44, 2008.

SCHLAPBACH, L. J. *et al.* Deficiency of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 Associated With Increased Risk of Fever and Neutropenia in Pediatric Cancer Patients. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.26, n.11, p.989-994, 2007.

SCHWAEBLE, W. *et al.* The Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Proteases (MASPs) and MASP19: Four Components of the Lectin Pathway Activation Complex Encoded by Two Genes. **Immunobiology**, v.205, p.455–466, 2002.

SEGAT, L. *et al.* Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. **Clinical Immunology**, v.124, p.13-17, 2007.

SEGAT, L. *et al.* MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. **Journal of Viral Hepatitis**, v.15, p.387-391, 2008.

SHEEHAN, V.; WEIR, A.; WATERS, B. Severe Neutropenia in Patients with Chronic Hepatitis C: A Benign Condition. **Acta Haematologica**, v.129, p.96-100, 2013.

SHERMAN, K. E. Managing Adverse Effects and Complications in Completing Treatment for Hepatitis C Virus Infection. **Topics in Antiviral Medicine**, v.20, p.125-128, 2012.

SHIMIZU, Y. K. *et al.* Isolation of Human Monoclonal Antibodies to the Envelope E2 Protein of Hepatitis C Virus and Their Characterization. **Plos One**, v.8, 2013.

SHINGAKI, N. *et al.* Serological and histological indices of hepatocellular carcinoma and tumor volume doubling time. **Molecular and Clinical Oncology**, v.6, p.977-981, 2013.

SILVEIRA, L. *et al.* Clinical and epidemiological profile of blood donors with positive serology for viral hepatitis in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, p. 269-273, 2011.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. **Journal of General Virology**, v.85, p.3173–3188, 2004.

SINN, D. H. *et al.* Disease progression in chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase levels. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, n.14, p.2256-2261, 2013.

SKJOEDT, M-O. *et al.* A Novel Mannose-binding Lectin/Ficolin-associated Protein Is Highly Expressed in Heart and Skeletal Muscle Tissues and Inhibits Complement Activation. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.285, n.11, p.8234-8243, 2010.

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

SPEAR, G. T. *et al.* Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). **The Journal of Immunology**, v.155, n.9, p.4376-81, 1995.

STENGAARD-PEDERSEN, K. *et al.* Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p.554-60, 2003.

STOVER, C. M. *et al.* Organization of the MASP2 locus and its expression profile in mouse and rat. **Mammalian Genome**, v.15, p.887-900, 2004.

STOVER, C. M. *et al.* The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2–3. **Genes and Immunity**, v.2, n.3, p.119–127, 2001.

STOVER, C. M. *et al.* Two Constituents of the Initiation Complex of the Mannan-Binding Lectin Activation Pathway of Complement Are Encoded by a Single Structural Gene. **The Journal of Immunology**, v.162, p. 3481-3490, 1999.

TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K. The Role of Humoral Innate Immunity in Hepatitis C Virus Infection. **Viruses**, v.4, p.1-27, 2012.

TE, H. S.; RANDALL, G.; JENSEN, D. M. Mechanism of Action of Ribavirin in the Treatment of Chronic Hepatitis C. **Gastroenterology & Hepatology**, v.3, p.218-225, 2007.

THIEL, S. *et al.* Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes & Immunity**, v.8, n.2, p.154-638, 2007.

THIEL, S. *et al.* Polymorphisms in Mannan-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease 2 Affect Stability, Binding to MBL, and Enzymatic Activity. **The Journal of Immunology**, v.182, n.5, p.2939-2947, 2009.

THIEL, S.; FREDERIKSEN, P. D.; JENSENIUS, J. C. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. **Molecular Immunology**, v.43, p.86-96, 2006.

THOMPSON, A. J. *et al.* Genome-wide association study of interferon-related cytopenia in chronic hepatitis C patients. **Journal of Hepatology**, v.56, p.313-319, 2012.

TULIO, S. *et al.* MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, v.72, p.912-915, 2011.

UFEARO, H. *et al.* Complete Blood Count, Measures of Iron Status and Inflammatory Markers in Inner-city African Americans with undiagnosed Hepatitis C Seropositivity. **International Journal of Clinical Chemistry**, v.411, p.653-656, 2010.

UNTERBERGER, C. *et al.* Stat3 is involved in control of MASP2 gene expression. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.364, p.1022-5, 2007.

VALLINOTO, A. C. R. *et al.* Mannose-binding lectin gene polymorphisms are not associated with susceptibility to hepatitis C virus infection in the Brazilian Amazon region. **Human Immunology**, v.70, p.754-757, 2009.

VENEGAS, M. *et al.* IL28B Polymorphisms Associated with Therapy Response in Chilean Chronic Hepatitis C Patients. **World Journal of Gastroenterology**, v.17, n.31, p.3636-3639, 2011.

WALLIS, R. *et al.* Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.7844-7851, 2007.

WARD, S. *et al.* Cellular Immune Responses Against hepatitis C Virus: The Evidence Base 2002. **Clinical & Experimental Immunology**, v.128, p.195-203, 2002.

WEISS, G.; MADSEN, H. O.; GARRED, P. A Novel Mannose-binding Lectin-associated Serine Protease 1/3 Gene Variant. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.65, p.430-434, 2007.

WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W. P.; SARRAZIN, C. Viral Determinants of Resistance to Treatment in Patients with Hepatitis C. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, p. 23-38, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Hepatitis C, Fact Sheet N.164, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en.>>. Acesso em 12/06/2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention & Control of Viral Hepatitis Infection: Framework for Global Action, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/GHP_Framework_En.pdf>. Acesso em 04/08/2013.

YONGQING, T. *et al.* Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: Two genes, five proteins and many functions? **Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics**, v.1824, p.253–262, 2012.

YTTING, H. *et al.* Pre- and postoperative levels in serum of mannan-binding lectin associated serine protease-2 —a prognostic marker in colorectal câncer. **Human Immunology**, v.69, p.414-420, 2008.

YTTING, H. *et al.* Mannan-Binding Lectin (MBL) and MBL-Associated Serine Protease 2 (MASP-2) Genotypes in Colorectal Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.73, p.122-127, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 -	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA.	109
ANEXO 2 -	TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO	110
ANEXO 3 -	QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PACIENTES	113

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA.



Curitiba, 12 de julho de 2013.

Ilmo (a) Sr. (a)
Iara Taborda Messias Reason
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - PR

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Adendo ao Projeto datado de 06 de junho de 2013, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado: "INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DE MARCADORES DA REPSOTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO PELO VIRUS DA HEPATITE C", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em 04 de julho de 2013.

O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 466/2012, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0097.0.208.000-11
Registro CEP: 2467.074/2011-04

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Investigador: Dra. Iara Taborda Messias Reason

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunopatologia – Hospital de Clínicas - UFPR

Endereço e telefone: Av. General Carneiro, 181 - Curitiba - PR - tel. 3360-1800 – R.6537

email: iarareason@hc.ufpr.br

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser.

Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A infecção por hepatite C é vista como problema de saúde pública mundial devido ao longo período da doença sem sintomas, da capacidade de manter-se pelo resto da vida do paciente e o risco de complicações graves, como cirrose, falência hepática e desenvolvimento de câncer no fígado. Estudos demonstram que a primeira resposta do paciente contra o vírus que causa infecção é essencial no controle da infecção. O vírus geralmente produz uma infecção persistente que continuará por toda a vida do indivíduo, salvo quando interrompido pela terapia com interferon, o que aumenta as possibilidades para transmissão do vírus na população humana. Essa infecção persistente acontece tanto por falha dessa resposta imune do indivíduo, quanto pela capacidade do vírus da Hepatite C vencer essas defesas e de ser resistente a terapia medicamentosa.

O vírus da Hepatite C é a causa mais frequente de doença hepática crônica. A principal via de contágio é pelo contato ao sangue contaminado.

Percebe-se que a defesa do indivíduo é de extrema importância para o controle da infecção. Uma das primeiras reações do organismo humano é conhecida como sistema complemento. É essa resposta que iremos investigar nesse projeto, analisando pelo sangue dos pacientes portadores do vírus da Hepatite C a intensidade dessa resposta.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Realizar um estudo de marcadores genético da imunidade inata na infecção pelo vírus da Hepatite C e associação destes com fatores clínicos e epidemiológicos. Os genes em questão são *MBL2*, *FCN1*, *FCN2*, *MASP2*, *MASP1* e *VSIG4*. Além disso, armazenar as amostras de sangue, o soro e o plasma para futuras investigações relacionadas com a infecção.

SELEÇÃO

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Indivíduos adultos (maiores de 18 anos) de ambos os sexos, de qualquer raça ou grupo social;
- Positividade ao teste sorológico anti-HCV e/ou na pesquisa do RNA viral;
- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para participar deste estudo.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes abaixo de 18 anos de idade, HCV negativo no teste sorológico anti-HCV e/ou na pesquisa do RNA viral e que não concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

PROCEDIMENTOS

Caso você participe da pesquisa, será utilizada apenas uma parte do sangue que você irá coletar para realizar a identificação dos genes.

Os riscos que envolvem sua participação no estudo estão relacionados apenas com a coleta de sangue, os quais podem ser: dor no local da punção ou hematoma. Contudo, participando deste estudo, você estará contribuindo para o melhor conhecimento sobre a infecção pelo vírus HCV, o que pode auxiliar tanto no diagnóstico precoce, quanto no tratamento e melhoria da qualidade de vida.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

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

CUSTOS

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

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

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

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética,

podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe (Dra. Iara Taborda Messias Reason e Amanda Alves da Silva / (41) 3360-1800 r. 6537). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

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

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR (Pessoa que aplicou o TCLE)	ASSINATURA	DATA

ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PACIENTES



Projeto: "Investigação do polimorfismo
gênico de marcadores da resposta
imune inata na infecção pelo vírus da
Hepatite C"

Questionário

Nº registro paciente: _____.

1. Nome: _____.
2. Sexo: Feminino Masculino
3. Idade: _____.
4. Grupo Étnico: Euro Brasileiro Afro-descendente
 Indígena Asiático
5. Telefone: _____.
6. Profissão: _____.
7. Modo de transmissão do HCV: _____.
8. Diagnóstico no ano de _____.
9. Genotipagem de HCV do qual é portador:
 1A 2 3
 Não sabe 1B Outros. Qual: _____.
10. Realizou transfusão de sangue? Não Sim. Quando? _____.
11. Apresenta alguma tatuagem ou piercing? Não Sim.
12. Possui mais de 8 parceiros sexuais nos últimos 10 anos? Não Sim.
13. É ou foi usuário de drogas endovenosas ilícitas? Não Sim.
14. Apresenta alguma dessas doenças: HIV/Aids Hepatite B
15. Há alguém na família com Hepatite C? Não Sim. Quem? _____.
16. Faz uso de bebidas alcoólicas? Não Sim.
17. Já realizou tratamento para a Hepatite C? Não Sim.
Qual resultado? Negativo no primeiro tratamento
 Negativo no segundo tratamento
 Recidivante
 Não respondedor
 Interrompeu o tratamento
18. Qual medicação utilizou. Interferon convencional + Ribavirina
 Interferon peguilado + Ribavirina
19. Apresentou algum efeito colateral quando em tratamento para HCV?
 Apresenta/apresentou vários efeitos colaterais
 Apresenta/apresentou alguns efeitos colaterais
 Apresenta/apresentou nenhum efeito colateral
 Suspendeu o tratamento em consequência dos efeitos colaterais

Ass: _____.