

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE GRISBACH

**POLIMORFISMOS DO GENE FICOLINA-2 (*FCN2*) EM PACIENTES
COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

Curitiba

2012

CAROLINE GRISBACH

**POLIMORFISMOS DO GENE FICOLINA-2 (FCN2) EM PACIENTES
COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Linha de Pesquisa em Estudo de fatores associados à fisiopatologia humana, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências.

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

Co-orientadora: Dr^a. Angelica Beate Winter Boldt

Curitiba

2012

Grisbach, Caroline

Polimorfismos do gene Ficolina-2 (*FCN2*) em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) / Caroline Grisbach – Curitiba, 2012.

76 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason

Coorientadora: Angélica Beate Winter Boldt

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Inclui bibliografia

1. Polimorfismo genético. 2. Gene da Ficolina-2 (FCN2). 3. PCR-SSP. 4. HIV.

I. Messias-Reason, Iara José Taborda de. II. Boldt, Angelica Beate Winter. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 575.2

TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINE GRISBACH

Título: POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA FICOLINA 2 EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

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 Lúcia Alves Pedroso
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Geraldo Picheth
Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 21 de maio de 2012.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Pai Celestial, que esteve ao meu lado o tempo todo, dando-me força, apoio, sabedoria, equilíbrio e também me confortou nos desafios e momentos de dificuldades.

A minha família e familiares pelo carinho, incentivo, apoio e grande companheirismo que muito contribuiu para a escrita deste trabalho e para meu bem-estar.

A minha orientadora, Profa. Dra. Iara J. T. Messias-Reason, por ter me dado a oportunidade de fazer parte da maravilhosa equipe do Laboratório de Imunopatologia Molecular e ter me ajudado em todos os momentos que precisei.

A minha co-orientadora, Dra. Angelica B. W. Boldt, por estar continuamente disposta a me ensinar, auxiliar e acompanhar, sempre com um ótimo humor e uma disposição descomunal.

A Profa. Dra. Shirley Utiyama por ter disponibilizado os materiais necessários para a realização da quantificação sérica da ficolina-2 e a Flávia Nass Arroteia, por sua ótima companhia e execução desses testes. Ao Prof. Renato por me instruir e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Ery por sua pronta disposição em colaborar com esse estudo.

Aos pesquisadores envolvidos com os estudos em pacientes HIV, Alberto M. Lima, por sua dedicação e indispensável contribuição nas coletas dos dados clínicos; a Professora Regina Tizzot, por sua companhia, apoio e ensinamentos na área.

A todos que pertencem ao Laboratório de Imunopatologia Molecular que, de alguma forma, ajudaram-me direta e indiretamente. As exímias pesquisadoras Paola, Denise, Dany, Grazielle, Stefanie, Isabela, Priscila, Angelica, Karla, Aline, Camila e as funcionárias Sandra e Janir pelo companheirismo, ótimos momentos e grande amizade.

As pessoas que são muito especiais para mim, Milena, Rafaella, Danielle, Francielle, Paulo, Ingrid, Juliana F., Juliana S., Priscila, Blondy, Flávia, Amanda, Jaqueline, Suelen e Matheus pela grande amizade, apoio, conforto, incentivo e companheirismo.

RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) induz uma perda gradativa da imunocompetência, culminando no estágio final da doença conhecida como síndrome da imunodeficiência humana (AIDS). Devido ao compartilhamento das vias de transmissão, a coinfeção com a hepatite viral C (HCV) é observada frequentemente. O sistema complemento compreende a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, podendo ser ativado pela lectina ligante de manose (MBL) ou ficolinas (FCN-1, FCN-2 ou FCN-3). O gene da ficolina-2 (*FCN2*) apresenta polimorfismos (SNPs) na região promotora (-986 G>A, -602G>A e -4A>G), que estão associados a variações nos valores séricos da proteína. Além disso, baixas concentrações séricas foram associadas com maior susceptibilidade a doenças infecciosas. Neste trabalho, buscou-se avaliar uma possível associação entre estes polimorfismos e os valores séricos correspondentes com a suscetibilidade: à infecção pelo HIV, à AIDS, a doenças oportunistas relacionadas à AIDS e à coinfeção HCV/HIV. Os SNPs foram identificados por amplificação sequência-específica (PCR-SSP) em 214 indivíduos saudáveis (controles), 180 pacientes HCV-/HIV+ e 33 pacientes HCV+/HIV+. A ficolina-2 foi quantificada em 92 destes controles e 88 dos pacientes HIV+ através de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Não houve desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para as distribuições genóticas, exceto para o *locus-602* nos pacientes HCV-/HIV+, e as frequências alélicas correspondem ao esperado para populações de ascendência europeia ($p=0,55$). As distribuições haplotípicas e genóticas foram significativamente diferentes entre controles e pacientes HCV-/HIV+ ($p=0,02$) e entre controles e pacientes totais ($p=0,01$), respectivamente. Observou-se uma associação entre o haplótipo AGA e entre genótipos contendo este haplótipo, mais especificamente AGA/GGA e AGA/AGG, com a suscetibilidade a infecção pelo HIV ($p=0,005$, $OR=1,94$, $IC95\%= 1,22-3,07$) e ($p=0,001$, $OR= 2,28$, $IC95\%=1,39-3,74$), respectivamente. Entretanto, não houve associação com a suscetibilidade à AIDS ($p=0,39$) e doenças oportunistas ($p=0,71$). Os pacientes apresentaram concentrações séricas mais elevadas do que os controles ($p=0,007$), porém não houve associação entre as concentrações de ficolina-2 e a presença de doença oportunista ($p=0,89$) ou AIDS ($p=0,75$). Entretanto, verificou-se que valores séricos mais elevados estão associados a contagens de linfócitos T CD4+ superiores a 250 células/ μ l ($p=0,047$). Em geral, não houve associação entre as concentrações séricas de ficolina-2 e os genótipos e haplótipos de *FCN2* ($p=0,20$ e $0,58$ em controles e pacientes, respectivamente). Por meio de análise *in silico*, observou-se que os SNPs -986 e -602 alteram sítios de ligação de fatores de transcrição. De fato, as concentrações associadas a estes *loci* foram superiores nos pacientes, e os valores séricos correspondentes aos haplótipos tenderam a essa mesma diferença, significativa apenas nos homozigotos ($p=0,01$ e $p=0,03$, $p=0,08$ e $p=0,03$, respectivamente). Contudo, as concentrações séricas associadas ao haplótipo AGA permaneceram estáveis ($p=0,45$). Portanto, a combinação AGA no promotor de *FCN2* é possivelmente irresponsiva à regulação por proteínas de fase aguda do fígado, o que pode ser ultimamente responsável pelo aumento da susceptibilidade à infecção.

ABSTRACT

The infection caused by human immunodeficiency virus (HIV) induces a gradual loss of immune response, culminating in the final stage of the disease known as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Due to sharing of transmission pathways, the co-infection with hepatitis C virus (HCV) is often observed. The complement system comprises the first line of host defense against pathogens and can be activated by the mannose binding lectin (MBL) or ficolins (FCN-1, FCN-2 or FCN-2). The ficolin-2 gene (*FCN2*) has polymorphisms (SNPs) in the promoter region (-986 G> A, -602G>A and -4A>G) which are associated with changes in serum protein levels. Moreover, low serum concentrations have already been associated with increased susceptibility to infections. This work aimed to evaluate a possible association between these polymorphisms and corresponding serum levels to the susceptibility, HIV infection, AIDS, AIDS-related opportunistic diseases and HCV/HIV coinfection. The SNPs were identified by sequence-specific amplification (PCR-SSP) in 214 healthy subjects (controls), 180 HCV-/HIV+ patients and 33 HCV+/HIV+ patients. The ficolin-2 was quantified in 92 controls and 88 HIV+ patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were not observed for genotypic distributions, except for the -602 locus in HCV-/HIV+ patients, and the allele frequencies are similar to those expected for populations with European ascendancy ($p=0.55$). The haplotype and genotype distributions were significantly different between controls and HCV-/HIV+ patients ($p=0.02$) and between controls and all patients ($p=0.01$), respectively. It was found an association between the AGA haplotype and among genotypes containing this haplotype, specifically AGA/CGA and AGA/AGG, with susceptibility to HIV infection ($p=0.005$, $OR=1.94$, $95\%CI=1.22-3.07$) and ($p=0.001$, $OR=2.28$, $95\%CI=1.39-3.74$), respectively. However, no associations were observed with susceptibility to AIDS ($p=0.39$) and opportunistic infections ($p=0.71$). Patients had higher serum levels than controls ($p=0.007$), but there was no association between levels of ficolin-2 and the presence of opportunistic infection ($p=0.89$) or AIDS ($p=0.75$). Nevertheless, higher levels are associated with CD4+ T cells counts greater than 250 cells/ μ l ($p=0.047$). In general, it was not observed an association between ficolin-2 levels and *FCN2* genotypes and haplotypes ($p=0.20$ and 0.58 in controls and patients, respectively). In silico analysis of the *FCN2* promoter revealed that SNPs -986 and -602 modify transcription factors binding sites. In fact, concentrations associated with these loci were higher in the patients, and there was a trend to the same difference among the haplotypes, significant only in homozygotes ($p=0.01$ and $p=0.03$, $p=0.08$ and $p=0.03$, respectively). However, serum levels associated with AGA haplotype remained stable ($p=0.45$). Therefore, the AGA combination in the *FCN2* promoter seems to be unresponsive to the regulation by acute phase proteins produced in the liver, which may be ultimately responsible for the increased susceptibility to HIV infection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	14
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FICOLINAS.....	16
FIGURA 3 – GENE <i>FCN2</i> E SUA REGIÃO PROMOTORA.....	17
FIGURA 4 – PROGRESSÃO DA DOENÇA EM PROGRESSORES TÍPICOS (TP), NÃO PROGRESSORES DE LONGO PRAZO (LTNP) E PROGRESSORES RÁPIDOS (RP), DE ACORDO COM AS CONTAGENS DE CÉLULAS T CD4+ E VIREMIA.....	26
FIGURA 5 – REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO PROMOTOR DO GENE <i>FCN2</i>	34
FIGURA 6 – REGIÕES DE ACOPLAMENTO DOS INICIADORES NA PCR-SSP <i>FCN2</i>	35
FIGURA 7 – CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO -986/-602 (PROM12).....	37
FIGURA 8 – CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO -602/-4 (PROM23).....	37
FIGURA 9 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP <i>FCN2</i> PROM12.....	38
FIGURA 10 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP <i>FCN2</i> PROM23.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 ENTRE CONTROLES E PACIENTES.....	48
GRÁFICO 2 –	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 COM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE DOENÇAS OPORTUNISTAS.....	49
GRÁFICO 3 –	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 COM RELAÇÃO ÀS CONTAGENS DE LINFÓCITOS T CD4+.....	49
GRÁFICO 4 –	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 COM RELAÇÃO AO ESTÁGIO DA DOENÇA.....	51
GRÁFICO 5 –	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AOS GENÓTIPOS -986/-602/-4 EM CONTROLES E PACIENTES.....	53
GRÁFICO 6 –	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AO <i>LOCUS</i> -986 EM PACIENTES E CONTROLES.....	54
GRÁFICO 7 –	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AO <i>LOCUS</i> -602 EM PACIENTES E CONTROLES.....	55
GRÁFICO 8 –	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AO <i>LOCUS</i> -4 EM PACIENTES E CONTROLES.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES ASCENDÊNCIAS (dbSNP).....	17
TABELA 2 –	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (%) DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES ASCENDÊNCIAS (dbSNP).....	18
TABELA 3 –	DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS DE ACORDO COM O CDC ADAPTADO.....	23
TABELA 4 –	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS (%) DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	31
TABELA 5 –	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS.....	36
TABELA 6 –	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (%) DOS PACIENTES ESTUDADOS.....	41
TABELA 7 –	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR <i>LOCUS</i> E HAPLÓTIPO NO GRUPO CONTROLE.....	43
TABELA 8 –	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR <i>LOCUS</i> E HAPLÓTIPO NOS PACIENTES HCV+/HIV+.....	43
TABELA 9 –	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR <i>LOCUS</i> E HAPLÓTIPO NOS PACIENTES HCV-/HIV+.....	43
TABELA 10 –	FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENOS COMUNS DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	44
TABELA 11 –	VALOR DE $P \pm$ DESVIO PADRÃO OBTIDOS PELO TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL NOS TRÊS GRUPOS ESTUDADOS.....	45
TABELA 12 –	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (%) DE POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i>	45
TABELA 13 –	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (%) DE POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i>	46
TABELA 14 –	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA FICOLINA-2 ($\mu\text{g/mL}$) EM DIFERENTES ESTUDOS DE CASO-CONTROLE.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo geral	12
1.1.2 Objetivos específicos.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Sistema Complemento	13
2.1.1 Ficolina-2.....	14
2.2 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	19
2.2.1 Epidemiologia mundial e nacional	19
2.2.2 Estrutura e biologia do HIV.....	20
2.2.3 Imunopatogenia da infecção pelo HIV.....	22
2.2.4 Progressão HIV-AIDS.....	24
2.2.5 Terapia Antiretroviral (TARV)	27
2.2.6 Coinfecção por hepatite viral C	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 CASUÍSTICA.....	31
3.1.2 Pacientes.....	31
3.1.3 Controles	32
3.2 MÉTODOS	32
3.2.1 Testes sorológicos.....	32
3.2.1.1 Ensaios de imunoadsorbância enzimática (ELISA)	32
3.2.1.2 Anticorpos anti-HCV	33
3.2.2 Extração de DNA.....	33
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)	33
3.2.3.1 PCR-SSP do gene <i>FCN2</i>	34
3.2.4 Eletroforese em gel de agarose	38
3.2.5 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Análise preliminar	41
4.2 Equilíbrio de Hardy e Weinberg.....	42

4.3	Frequências alélicas, haplotípicas e genóticas	43
4.4	Valores séricos de Ficolina-2	47
4.5	Associação dos valores séricos da ficolina-2 com os polimorfismos do gene <i>FCN2</i>	52
5	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) atinge cerca de 35 milhões de pessoas no mundo, sendo que 20% delas estão coinfetadas pelo vírus da hepatite C (HCV) (SORIANO *et al.*, 2010). A coinfeção HCV/HIV representa um importante fator de morbidade e mortalidade das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) (WEBER *et al.*, 2006) e a sua prevalência varia de acordo com os fatores de risco nas diferentes populações (ALTER, 2006). No Brasil, essa prevalência varia de 5 a 53,8%, dependendo da região investigada (SEGURADO *et al.*, 2004; MORIMOTO *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008, FARIAS *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010), podendo alcançar até 84% em usuários de drogas injetáveis (UDI) (ZOCRATTO *et al.*, 2006; MARCHESINI *et al.*, 2007). O HIV e HCV possuem algumas similaridades como as vias de transmissão, dentre as quais se destacam a sexual e intravenosa, respectivamente. Porém, há diferenças significativas na eficiência da infecção de cada vírus e suas respectivas prevalências geográficas. Contudo, a rota de transmissão compreende apenas um dos fatores de susceptibilidade à aquisição de doenças infecciosas, havendo relevância a análise dos fatores genéticos do hospedeiro.

Sabe-se que a infecção pelo HIV pode comprometer seriamente o sistema imunológico do indivíduo, tornando-o suscetível a diversas infecções oportunistas, que caracterizam o quadro clínico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Porém, estudos recentes indicam que a glicosilação das proteínas gp120 e gp41 do envelope viral do HIV constituem potenciais sítios de ativação do sistema complemento através da lectina ligante de manose (MBL) (JI; GEWURZ; SPEAR, 2005). Além disso, encontrou-se associação entre variantes alélicas do gene *MBL2*, responsáveis por baixas concentrações sorológicas da MBL, com a susceptibilidade a infecção do HIV e progressão da AIDS (GARRED *et al.*, 1997). A proteína sérica ficolina-2 ou ficolina-L possui similaridades estruturais e funcionais com a MBL. Ambas apresentam frequentes polimorfismos na região promotora dos seus genes, capazes de causar reduções nos níveis de expressão dessas e consequente diminuição da ativação do sistema complemento. Com relação às infecções por HCV, evidências experimentais verificaram a capacidade de reconhecimento e ligação da ficolina-2 na glicoproteína E1 do HCV, contribuindo para eliminação do

patógeno (ZHAN; ZHANG, 2007). Como o fígado é o principal sítio de expressão do gene *FCN2*, além de corresponder ao sítio de invasão, replicação e alvo de lesão celular causada pelo HCV, espera-se que a ficolina-2 esteja envolvida com a depuração plasmática das partículas virais e proteção das células hepáticas contra a infecção por HCV.

A investigação dos fatores genéticos envolvidos em doenças é essencial, não somente por permitir melhor entendimento da sua imunopatogênese, mas, também, para a identificação de marcadores prognósticos, capazes de indicar caminhos da progressão da doença, conduzindo a possíveis medidas terapêuticas que beneficiem pacientes portadores de diferentes enfermidades. Uma vez que compõem a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, os polimorfismos dos componentes da via das lectinas do complemento representam fortes candidatos a associações com a progressão do HIV-AIDS e com a suscetibilidade a coinfeção por HCV.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre haplótipos e genótipos da região promotora do gene da ficolina-2 (*FCN2*) e os respectivos valores séricos da proteína com a suscetibilidade à infecção pelo HIV.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar se as concentrações séricas da ficolina-2 e polimorfismos de *FCN2* estão associados com:

- a suscetibilidade a infecção pelo HIV,
- a presença de doenças oportunistas relacionadas à AIDS,
- a fase da doença causada pelo HIV,
- a presença da coinfeção por HCV.

- Verificar possíveis associações entre os polimorfismos investigados e os valores séricos da proteína,

- Identificar os fatores de transcrição que reconhecem os polimorfismos do promotor de *FCN2 in silico*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

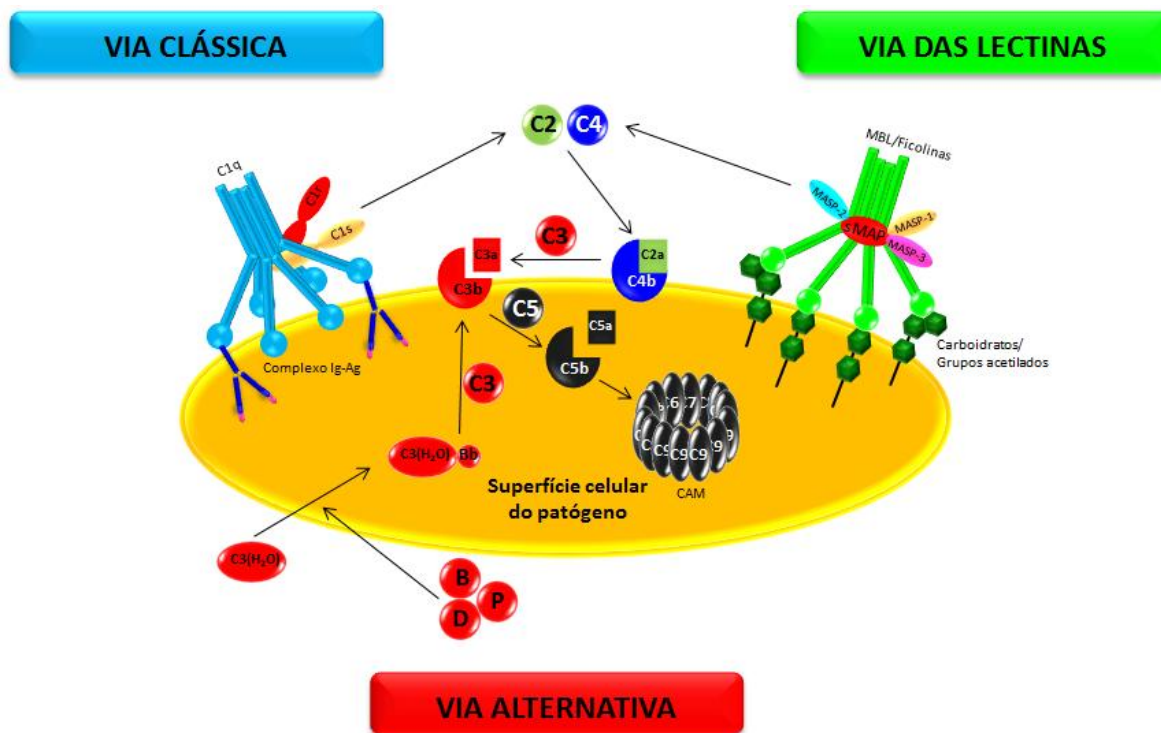
2.1 Sistema Complemento

O sistema complemento compõe um dos principais mecanismos da resposta imune inata contra agentes infecciosos e, além disso, é um importante efetor da imunidade mediada por anticorpos. Dele, fazem parte mais de 35 proteínas plasmáticas e de superfície celular capazes de reconhecer patógenos; diferenciar tecidos saudáveis, restos celulares e células apoptóticas; e atuar na manutenção da homeostase (BOLDT; GOELDNER; MESSIAS-REASON, 2012). Este reconhecimento é realizado por proteínas potencialmente inativas que se tornam ativadas de forma estável após sua ligação aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou a constituintes celulares alterados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O processo de ativação do sistema complemento compreende três vias: clássica, alternativa e das lectinas (Figura 1). A via clássica inicia-se pela ligação de C1q na superfície de bactérias, na proteína C reativa ou em complexos antígeno-anticorpo (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010a). A via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea de C3 ou pelo reconhecimento de PAMPs pela properdina (GARRED *et al.*, 2009). A via das lectinas, descrita recentemente, é iniciada pela atividade proteolítica desencadeada pelas serinas proteases associadas à MBL (MASPs) ou às ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3), as quais reconhecem os PAMPs. Após a ativação da via das lectinas, MASP-2 cliva C4 e C2 em C4b2b, formando a enzima C3 convertase. Por outro lado, MASP-1 pode clivar C3 diretamente e levar à ativação da via alternativa (FUJITA, 2002; GARRED *et al.*, 2009). A cascata proteolítica desencadeada pelo processo de ativação permitirá uma grande amplificação e rapidez da resposta inflamatória, pois cada ativação de um elemento pré-formado pode gerar, rapidamente, múltiplas enzimas e complexos enzimáticos ativados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os produtos da clivagem sequencial C3, C4 e C5 são capazes de promover múltiplos efeitos biológicos. As anafilatoxinas C3a e C5a são potentes mediadores inflamatórios, causando contração da musculatura lisa e degranulação de basófilos e mastócitos, com liberação de histamina e outras substâncias vasoativas. Além disso, C5a é um potente fator quimiotático para células fagocíticas, levando à ativação e liberação de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio. Já C3b e C4b previnem a

agregação de complexos imunes e promovem seu transporte predominantemente através da ligação ao receptor CR1 em células fagocíticas e hemácias. Por sua vez, o complexo lítico terminal C5b-9 exibe efeito lesivo sobre membranas celulares e, uma vez associado a essas, promove a lise osmótica (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010b).



FONTE: O autor (2012)

FIGURA 1 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

LEGENDA: Complexo Ig-Ag: Complexo Imunoglobulina-Antígeno; B: Fator B; D: Fator D; CAM: Complexo de Ataque a Membrana; P – Properdina.

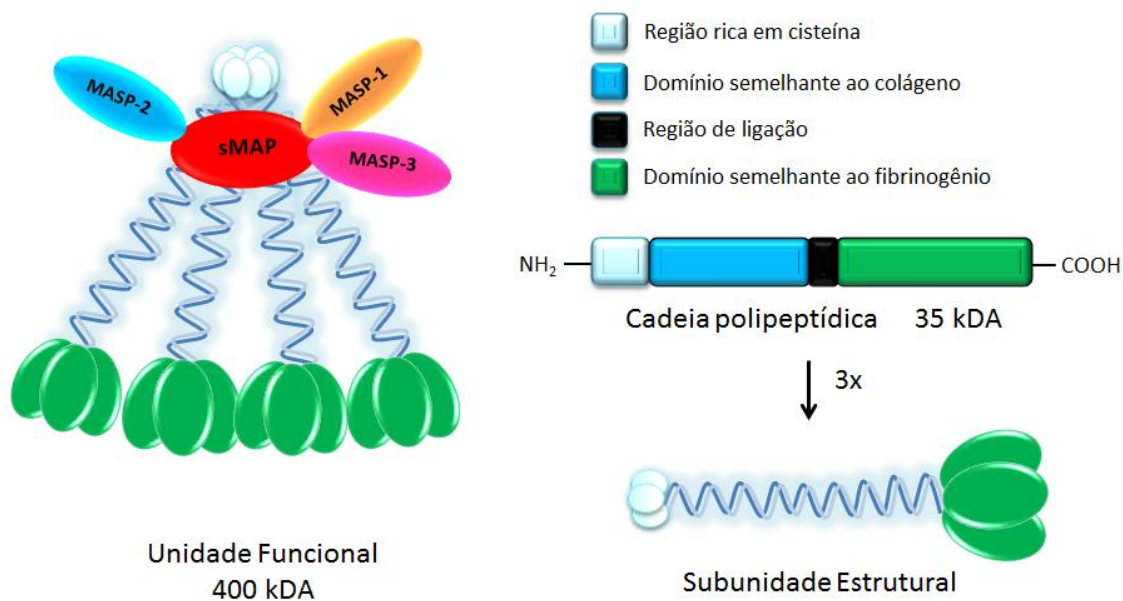
2.1.1 Ficolina-2

As ficolinas são moléculas de reconhecimento do sistema complemento capazes de promover opsonização, fagocitose e destruição de patógenos mediada pela ativação da via das lectinas (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2007; MATSUSHITA, 2010). Adicionalmente, as ficolinas podem mediar a eliminação de células apoptóticas e necróticas, promovendo a ativação do sistema complemento e

subsequente fagocitose dos restos celulares (KURAYA *et al.*, 2005; JENSEN *et al.*, 2007).

Apesar de constituírem a via das lectinas, esta denominação não é adequada uma vez que as ficolinas não são capazes de se ligar diretamente aos carboidratos, possuindo os compostos acetilados como ligantes preferenciais (KRARUP *et al.*, 2004). Mais especificamente, a ficolina-2 reconhece moléculas como o ácido lipoteóico (LTA), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilactosamina (LacNAc), ácido N-acetil-neuramínico (NANA) constituintes de peptidoglicanos (PG), polissacarídeos, glicoproteínas e glicoconjugados (CHEN *et al.*, 2006). Esses potenciais sítios de ligação podem estar presentes na parede e/ou membrana celular de microrganismos (fungos e bactérias), protozoários, e em envelope virais (MATSUSHITA, 2010). Já foi descrita a capacidade de ligação da ficolina-2 em *Salmonella typhimurium* TV119, que contém lipopolissacarídeos com resíduos de GlcNAc; em *Escherichia coli*; em diversos sorotipos das bactérias capsuladas de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (KRARUP *et al.*, 2004; KRARUP *et al.*, 2005; AOYAGI *et al.*, 2008). Além disso, a ficolina-2 tem a capacidade de interagir com a proteína C reativa, estabilizando a ligação com bactérias e ativando a via das lectinas sob condições inflamatórias (baixa quantidade de cálcio e pH baixo) (NG *et al.*, 2007). Outros possíveis ligantes incluem elastina, corticosteroide, fibrina, fibrinogênio e ácido desoxirribonucléico (DNA) (CEDZYNSKI *et al.*, 2007; MATSUSHITA, 2010).

As ficolinas são proteínas multiméricas constituídas por quatro ou mais subunidades unidas por pontes de dissulfeto (Figura 2) (OHASHI; ERICKSON, 1998; GARRED *et al.*, 2010). Sua estrutura é composta por um domínio amino(N)-terminal constituído de resíduos de cisteína; domínio semelhante ao colágeno (CD) contendo repetições Gly-Xaa-Xaa (onde Xaa é qualquer aminoácido); e um domínio carboxi(C)-terminal, conhecido como região semelhante ao fibrinogênio (FBG). O CD é responsável pelas interações com as MASPs, as quais levam a ativação do sistema complemento. Já o arranjo polar presente no domínio FBG compõe a região de reconhecimento dos grupos acetilados presentes em carboidratos (GARRED *et al.*, 2009).



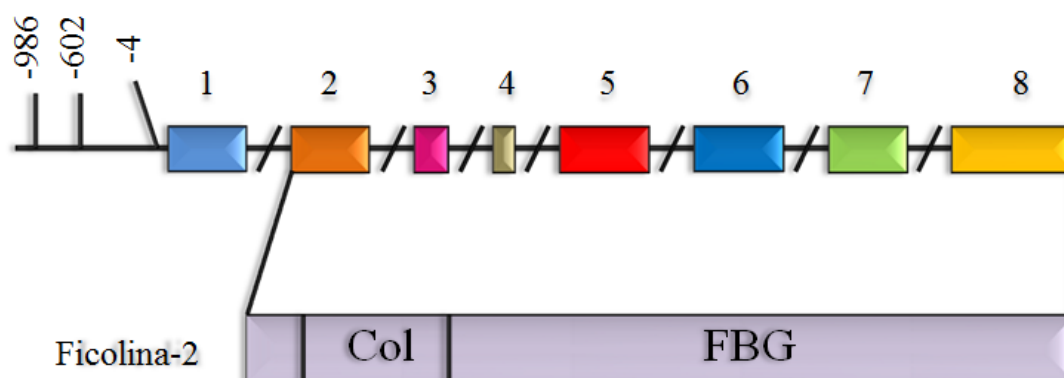
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FICOLINAS

O gene codificante da ficolina-2 (*FCN2*) localiza-se no braço longo do cromossomo 9 (9q34) e contém oito exons. O primeiro exon codifica a região 5' não traduzida (5' UTR), o peptídeo sinal e nove aminoácidos da região N-terminal. O segundo e o terceiro exons codificam o domínio semelhante ao colágeno. O quarto exon codifica a região de ligação. Os exons sete e oito são responsáveis pela codificação da região localizada a montante do domínio semelhante ao colágeno. O último exon codifica o domínio FGB e a região 3' UTR (ENDO *et al.*, 1996). O gene *FCN2* é expresso principalmente no fígado, enquanto os demais sítios contêm quantidades ínfimas de seu RNA mensageiro (mRNA) (MATSUSHITA *et al.*, 1996; HUMMELSHOJ *et al.*, 2008).

De acordo com Munthe-Fog *et al.* (2007), baixas concentrações de ficolina-2 são <3 µg/ml, concentrações intermediárias compreendem o intervalo 3-6 µg/ml e as altas concentrações são >6 µg/ml, aproximadamente. Em caucasianos, a mediana da concentração da ficolina-2 é de 5 µg/ml com uma variação interindividual de 1-12 µg/ml (HUMMELSHOJ *et al.*, 2005; MUNTHE-FOG *et al.*, 2007). A variação da concentração sérica da ficolina-2 está associada com a presença de três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -986G>A (dbSNP rs3124952), -602G>A (dbSNP rs3124953) e -4A>G (dbSNP

rs17514136), contados a partir do sítio de início da transcrição e situados na região promotora deste gene (Figura 3) e uma mutação não sinônima no exon 8 +6424G>T (dbSNP rs7851696) (HUMMELSHOJ *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; HERPES *et al.*, 2006; CEDZYNSKI *et al.*, 2007; MUNTHER-FOG *et al.*, 2007; MESSIAS-REASON *et al.*, 2009; MESSIAS-REASON; KREMSNER; KUN, 2009). As frequências alélicas e genotípicas desses SNPs, em diferentes populações, estão listadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.



FORNTE: BOLDT; GOELDNER; MESSIAS-REASON, 2012

FIGURA 3 – GENE *FCN2* E SUA REGIÃO PROMOTORA

LEGENDA: A região promotora do gene *FCN2*, contendo os SNPs -986 G>A, -602 G>A e -4 A>G, está identificada pela linha preta horizontal; os exons estão numerados de 1 a 8; os introns estão ilustrados entre os exons; Col., região semelhante ao colágeno; FBG, região semelhante ao fibrinogênio.

TABELA 1– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE *FCN2* EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES ASCENDÊNCIAS (dbSNP)

SNPs	N	Europeia	N	Africana	N	Asiática
-986 G>A rs3124952	226 ³	G – 104 (46,0) A – 122 (54,0)	224 ¹	G – 179 (79,9) A – 45 (20,1)	172 ²	G – 152 (88,4) A – 20 (11,6)
-602 G>A rs3124953	226 ³	G – 170 (75,2) A – 56 (24,8)	226 ¹	G – 224 (99,1) A – 2 (0,9)	172 ²	G – 166 (96,5) A – 6 (3,5)
-4 A>G rs17514136	120 ⁴	A – 86 (71,7) G – 34 (28,3)	118 ⁵	A – 90 (76,3) G – 28 (23,7)	120 ⁶	A – 109 (90,8) G – 11 (9,2)
+6424 G>T rs7851696	4550 ⁷	G – 3904 (85,8) T – 646 (14,2)	226 ¹	G – 184 (81,4) T – 42 (18,6)	172 ²	G – 148 (86,0) T – 24 (14,0)

LEGENDA: N, número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem; ¹HapMap_YRI (Nigerianos); ²HapMap_JPT (Japoneses); ³HapMap_CEU (Norte-Americanos); ⁴1000GENOMES (Norte-Americanos); ⁵1000GENOMES (Nigerianos); ⁶1000GENOMES (Chineses e Japoneses); ⁷NHLBI-ESP (Norte-Americanos).

NOTA: Dados do dbSNP (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

TABELA 2– FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (%) DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE FCN2 EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES ASCENDÊNCIAS (dbSNP)

SNPs	N	Europeia	N	Africana	N	Asiática
-986 G>A rs3124952	226³	A/A –60 (26,5) A/G – 124 (54,9) G/G –42 (18,6)	224¹	A/A –12 (5,4) A/G –66(29,5) G/G – 146 (65,2)	172²	A/A – 0(0,0) A/G –40 (23,3) G/G – 132 (76,7)
-602 G>A rs3124953	226³	A/A –10 (4,4) A/G –92 (40,7) G/G – 124 (54,9)	226¹	A/A – 0 (0,0) A/G – 4 (1,8) G/G – 222 (98,2)	172²	A/A – 0 (0,0) A/G –12 (7,0) G/G – 160 (93,0)
-4 A>G rs17514136	946⁴	A/A – 626 (66,2) A/G – 274 (29,0) G/G –46 (4,9)	-	-	-	-
+6424 G>T rs7851696	4550⁵	G/G – 3349 (73,6) G/T – 1110 (24,4) T/T – 86(1,9)	226¹	G/G – 146 (64,6) G/T –76 (33,6) T/T – 4 (1,8)	172²	G/G – 124 (72,1) G/T –48 (27,9) T/T – 0 (0,0)

LEGENDA: N, número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem; ¹HapMap_YRI (Nigerianos); ²HapMap_JPT (Japoneses); ³HapMap_CEU (Norte-Americanos); ⁴CLINSEQ_SNP; ⁵NHLBI-ESP(Norte-Americanos).

NOTA: Dados do dbSNP (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

Baseando-se em pesquisas atuais, os haplótipos -986,-602,-4 mais comuns são: GGA, AAA, AGG e AGA (MUNTHER-FOG *et al.*, 2007; MESSIAS-REASON; KREMSNER; KUN, 2009). O haplótipo AGA foi associado como um fator protetor contra hanseníase, febre reumática (FR), doença cardíaca reumática crônica (CRHD) e HBV (MESSIAS-REASON; KREMSNER; KUN, 2009; MESSIAS-REASON *et al.*, 2009; TONG *et al.*, 2011). O haplótipo AGG foi associado como um fator de proteção contra HBV (TONG *et al.*, 2011) e o GGA como um fator de suscetibilidade à CRHD (MESSIAS-REASON *et al.*, 2009).

Adicionalmente, estudos recentes revelam que a presença do nucleotídeo adenina (A) nas posições -986 e -602 e de guanina (G) na posição -4 estão associadas às elevadas concentrações de ficolina-2 no soro de maneira aditiva (HUMMELSHOJ *et al.*, 2005; MUNTHER-FOG *et al.*, 2007). Portanto, sabendo que a variação da produção interindividual de ficolina-2 é influenciada geneticamente, os haplótipos AAA e AGG estão associados aos altos valores séricos de ficolina-2, AGA às concentrações intermediárias e GGA às baixas concentrações séricas da mesma. Os baixos valores séricos foram associados ao risco aumentado a doenças infecciosas como infecções respiratórias em crianças e adultos (HOLMSKOV; THIEL; JENSENIUS, 2003; ATKINSON *et al.*, 2004; HUMMELSHOJ *et al.*, 2005;

CEDZINSKI *et al.*, 2009). Além disso, existem evidências que baixas concentrações de ficolina-2 estão envolvidas na gravidade da nefropatia por IgA (ROOS *et al.*, 2006) e do lúpus eritematoso sistêmico (WATANABE *et al.*, 2012). Diferentemente desses estudos, verificou-se concentrações séricas da ficolina-2 mais elevadas em pacientes com infecções virais, como HBV (TONG *et al.*, 2011) e HCV (LIU *et al.*, 2009).

2.2 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Os primeiros casos de AIDS foram relatados em 1981, nos Estados Unidos, em pacientes homossexuais do sexo masculino residentes de grandes centros urbanos (Nova Iorque, São Francisco e Los Angeles) que foram a óbito devido a doenças como sarcoma de Kaposi e pneumonia (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981). Embora suspeitassem que a doença infecciosa estivesse relacionada ao estilo de vida, o surgimento de novos casos entre os heterossexuais e as crianças recém-nascidas sugeriu que esta doença poderia ser transmitida pelas vias sexual, vertical e parental. No Brasil, em 1982, foram registrados os primeiros casos de AIDS, inicialmente atendidos no Hospital Emílio Ribas, em São Paulo.

A identificação do agente causador da AIDS foi possível somente em 1983 por Gallo *et al.* (1983), após a descrição do vírus T linfotrófico humano do tipo III (HTLV-III) isolado de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com AIDS. Levy *et al.* (1984) isolaram vírus, denominado retrovírus associado à AIDS (ARV), de pacientes que manifestavam ou não o quadro de AIDS. Em 1986, após a reunião do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, o agente causador da AIDS passou a ser denominado oficialmente como *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (COFFIN *et al.*, 1986; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2006).

2.2.1 Epidemiologia mundial e nacional

Estudos estatísticos mundiais desenvolvidos pela JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS) e WORLD HEALTH ORGANIZATION

(WHO) (2009) estimam que haja 31,1 a 35,8 milhões de pessoas infectadas com o HIV, sendo que cerca de 93,7% são adultos e 6,3% são crianças. A incidência de novos casos é de 2,7 milhões/ano e a taxa de mortalidade por AIDS é de 2 milhões/ano.

De acordo com o Departamento de Informática do SUS (DATASUS), durante o período de janeiro 1980 a junho de 2010 foram diagnosticados 592.914 casos de HIV/AIDS no Brasil, sendo que as regiões sul e sudeste contêm 77,5% dos casos. Cerca de 86,4% dos casos de HIV/AIDS do Estado do Paraná estão concentrados da cidade de Curitiba e Região Metropolitana. A razão de sexo (M:F) nacional é de aproximadamente 1,5:1 desde o ano de 2002. Em 2008, foram detectados 18,2 novos casos por 100.000 habitantes e o coeficiente de mortalidade por AIDS foi de 6,1/100.000 habitantes, sendo que a região sul possui a maior taxa de mortalidade (9.4/100.000 habitantes) (BRASIL, 2011a).

2.2.2 Transmissão e grupos de risco

As principais vias de transmissão do HIV são a sexual, intravenosa e vertical (da mãe para o filho, durante a gravidez, no parto ou pelo leite materno). As atividades de maior risco compreendem variações nos parceiros sexuais, sem o uso de métodos preventivos; transfusão sanguínea; compartilhamento de seringas e agulhas não esterilizadas (como acontece entre usuários de drogas injetáveis); gravidez em mulher infectada pelo HIV; e recepção de órgãos ou sêmen de doadores infectados.

Estudos mostram que os homens que fazem sexo com homens (HSH) e usuários de drogas injetáveis (UDI) masculinos continuam apresentando maior risco de infecção quando comparados com a população geral, com taxas de incidência 15 vezes maiores do que nos heterossexuais (BARBOSA JÚNIOR *et al.*, 2009). Paralelamente, é observado um crescimento importante no número de casos entre as mulheres, sendo que a transmissão sexual a mais relevante (97%).

2.2.2 Estrutura e biologia do HIV

O HIV pertence à família *Retroviridae*, cujos membros apresentam um genoma composto por duas fitas simples de RNA, capsídeo em formato de cone e

longo período de incubação (BÜCHEN-OSMOND, 2004). Há dois tipos conhecidos: o HIV-1, que possui prevalência mundial e maior virulência, e o HIV-2, endêmico da África Ocidental e Índia (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010b).

O envelope viral é constituído pelas glicoproteínas gp120 e gp41 dispostas em trímeros e ancoradas na bicamada lipídica (GREENE; PETERLIN, 2006). O capsídeo envolve proteínas p24; genoma viral; e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. O genoma viral contém os genes das proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*); e regulatórias (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*), que determinam a infectividade, produzem novas cópias do vírus ou causam a doença. Entre o envelope e o capsídeo viral situa-se a matriz, composta pela proteína p17 (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASE, 2009).

Verifica-se o tropismo da infecção do HIV por células que expressam a molécula CD4, destacando-se os linfócitos T auxiliares; as células da linhagem monocítico-macrofágica, incluindo a microglia do sistema nervoso central, as células dendríticas dos linfonodos e as células de Langerhans da pele. Além disso, pode ocorrer a adesão do HIV em células endoteliais, neuronais, astrócitos e células intestinais M da placa de Peyer (LIMA *et al.*, 1996). Ainda, alguns receptores de quimiocinas, como o CCR5 e o CXCR4, atuam como correceptores da invasão do HIV nas células hospedeiras (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010b).

O ciclo de replicação do HIV compreende os seguintes passos: fusão viral na membrana celular; transcrição reversa; integração, transcrição e tradução do DNA viral; e montagem do vírus (CERVIA, 2009).

A entrada do vírus se dá por fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. A glicoproteína gp120 está envolvida, principalmente, na interação com o receptor CD4; com os receptores de quimiocinas (CCR5 e CXR4); e com a proteína DC-SIGN das células dendríticas. Essa ligação libera a glicoproteína gp41, causando a fusão do envelope viral com a membrana celular e a deposição do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira.

Ainda no citoplasma, o genoma viral é transcrito pela enzima transcriptase reversa e o cDNA é integrado no cromossomo da célula hospedeira com o auxílio da integrase viral. A ativação de células T CD4+ induz a expressão de fatores de transcrição, como o NFκB e NFAT, responsáveis por iniciar a transcrição do genoma do HIV. Os RNA mensageiros (mRNA), produzidos a partir do DNA viral integrado,

são processados simultaneamente, permitindo a tradução precoce de *tat* e *rev*. A proteína *tat* aumenta a transcrição do RNA viral e a *rev* facilita o transporte do RNA processado ou não ao citoplasma. Os transcritos sem processamento (genomas virais) são empacotados com o auxílio das proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*), constituindo as novas partículas virais que, por sua vez, são liberadas para o meio extracelular (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010b).

2.2.3 Imunopatogenia da infecção pelo HIV

Os sítios dominantes da infecção primária do HIV compreendem as células que expressam CD4 e pelo menos um dos receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4) do trato gastrointestinal e da mucosa genital. Com isso, o HIV multiplica-se e dissemina-se nos linfonodos locais até atingir os órgãos linfoides periféricos.

A fase aguda caracteriza-se por um alto nível de viremia no sangue periférico e uma diminuição significativa de linfócitos T CD4+ circulantes. Há uma intensa replicação viral e essa grande quantidade de vírus na corrente sanguínea levam à ativação de linfócitos T CD8+, que eliminam as células infectadas pelo HIV e estimulam a produção de anticorpos, os quais são fatores determinantes para a soroconversão. As manifestações clínicas podem ocorrer em 50 a 90% dos casos e, normalmente, tem duração entre 1 a 4 semanas após a infecção primária (BRASIL, 2008).

Após esta fase, há um período assintomático, no qual 50 a 70% dos indivíduos desenvolvem linfadenopatia, em que persiste a replicação do vírus, porém o declínio da função e do número de linfócitos T CD4+ é gradual. Geralmente, a fase assintomática, a qual está relacionada diretamente com a progressão da doença, pode durar entre 3 a 20 anos (LEVY, 2009). Quando os sintomas tornam-se frequentes, geralmente presentes em indivíduos que possuam contagens de células T CD4+ em torno de 500 células/ μ l de sangue, a fase sintomática é estabelecida. Enquanto a quantidade de linfócitos T CD4+ permanecerem acima de 350 células/ μ l, as infecções mais comuns são geralmente causadas por bactérias, como as infecções respiratórias e tuberculose. Com a progressão da doença, são observadas infecções atípicas, respostas tardias à antibioticoterapia e/ou reativação de infecções antigas, como, por exemplo, a tuberculose ou neurotoxoplasmose. Quando as

contagens de linfócitos T CD4+ atingem entre 200 a 300 células/ μ l, são observados sintomas constitucionais como febre baixa, fadiga, diarreia crônica, sudorese noturna, cefaleia, alterações neurológicas e infecções bacterianas (bronquites, pneumonia, sinusite) e lesões orais (leucoplasia oral pilosa) (BRASIL, 2008).

Este último estágio da doença constitui a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a qual pode ser classificada em: não significativa, moderada, avançada e grave. É caracterizada pelo aumento da ocorrência de infecções oportunistas e neoplasias, com maior prevalência em contagens abaixo de 200 células/ μ l de sangue (Organização Mundial da Saúde, 2007). As infecções oportunistas mais comuns são: pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (antigamente definido como *P. carinii*), neurotoxoplasmose, tuberculose pulmonar atípica ou disseminada, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus. E as neoplasias mais frequentes são: sarcoma de Kaposi, linfomas não-Hodgkin e o câncer de colo uterino (mulheres jovens) (BRASIL, 2008).

De acordo com os critérios do CDC adaptado, é considerado um caso de AIDS todo indivíduo com idade \geq 13 anos que apresentar evidência laboratorial de infecção pelo HIV (dois testes de triagem para detecção de anticorpos anti-HIV ou um confirmatório reagente) e o diagnóstico de imunodeficiência (pelo menos uma doença indicativa de AIDS – Tabela 3 – e/ou contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 350 células/ mm^3), independentemente da presença de outras causas de imunodeficiência (BRASIL, 2004).

TABELA 3 - DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS DE ACORDO COM O CDC ADAPTADO

-
1. Câncer cervical invasivo;
 2. Candidose de esôfago;
 3. Candidose de traqueia, brônquios ou pulmões;
 4. Citomegalovirose em qualquer outro local que não sejam fígado, baço e linfonodos; como a retinite por citomegalovírus;
 5. Criptococose extrapulmonar;
 6. Criptosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
 7. Herpes simples mucocutâneo, por um período superior a 1 mês;
 8. Histoplasmose disseminada (localizada em quaisquer órgãos que não exclusivamente em pulmão ou linfonodos cervicais/hilares);

9. Isosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
10. Leucoencefalopatia multifocal progressiva (vírus JC, um poliomavírus);
11. Linfoma não-Hodgkin de células B (fenótipo imunológico desconhecido) e outros linfomas dos seguintes tipos histológicos: Linfoma maligno de células grandes ou pequenas não clivadas (tipo Burkitt ou não-Burkitt) e Linfoma maligno imunoblástico sem outra especificação (termos equivalentes: sarcoma imunoblástico, linfoma maligno de células grandes ou linfoma imunoblástico);
12. Linfoma primário do cérebro;
13. Pneumonia por *Pneumocystis carinii*;
14. Qualquer micobacteriose disseminada em órgãos outros que não sejam o pulmão, pele ou linfonodos cervicais/hilares (exceto tuberculose ou hanseníase);
15. Reativação de doença de Chagas (meningoencefalite e/ou miocardite);
16. Sepses recorrentes por bactérias do gênero *Salmonella* (não tifóide);
17. Toxoplasmose cerebral.

FONTE: BRASIL, 2004

Dessa forma, a infecção pelo HIV é capaz de desencadear perda gradativa da imunocompetência, possibilitando a infecção oportunista por diversos patógenos, culminando com a AIDS. Em geral, ocorre a diminuição do número absoluto destas células com o avanço da infecção pelo HIV, porém, pode-se detectar um aumento de linfócitos T CD4+ após a ação de terapias antiretrovirais (TARV).

2.2.4 Progressão HIV-AIDS

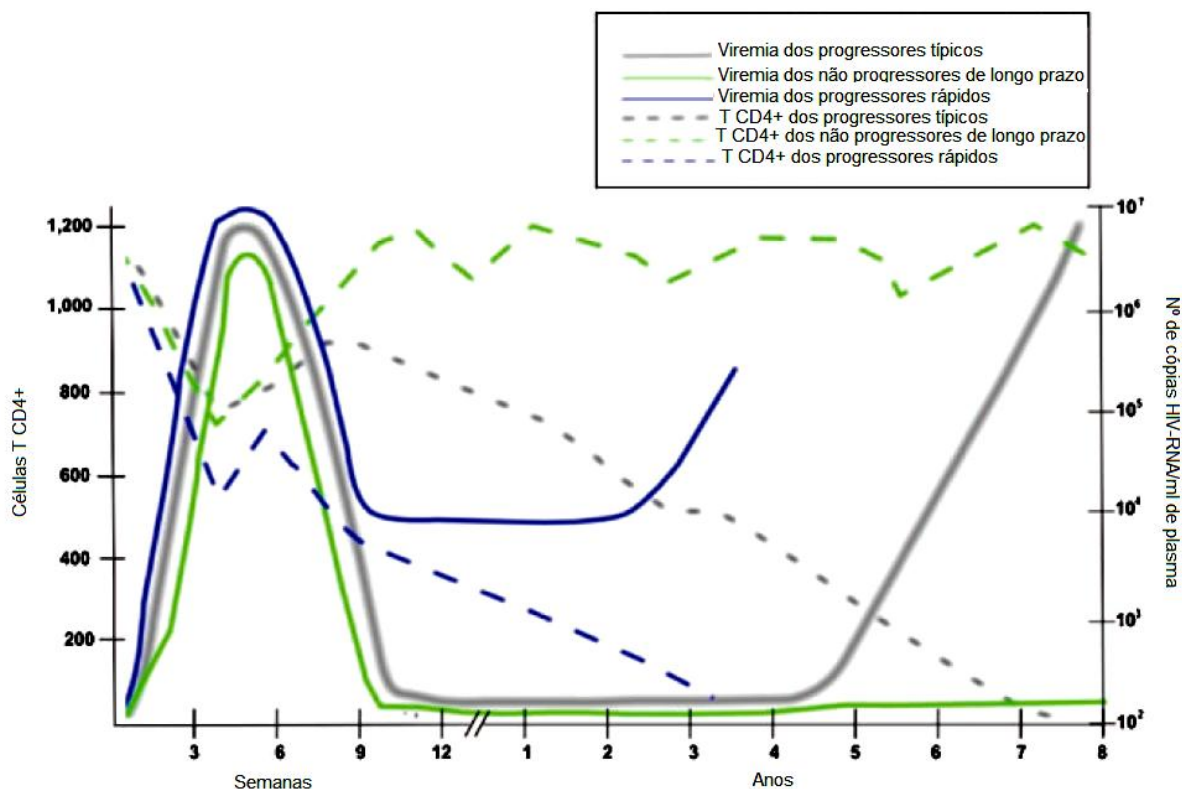
Segundo um estudo de coorte multicêntrico, realizado por Mellors *et al.* (1997), que acompanharam 1.604 pacientes infectados pelo HIV durante 10 anos, a carga viral foi considerada o melhor marcador prognóstico para a progressão HIV-AIDS, seguido da contagem dos linfócitos T CD4+. Além de discriminar o risco de progressão entre todas as quantidades de células T CD4+, a carga viral foi capaz de prever suas respectivas taxas de decaimento. Porém, o risco de surgimento de doenças relacionadas à AIDS era muito baixo em indivíduos que tinham uma contagem > 200 células/μl, mesmo quando a carga viral atingisse 50.000 a 60.000

cópias/ml. Isso sugere que a contagem de linfócitos T CD4+ é mais adequada como um marcador de prognóstico em curto prazo do risco de surgimento das doenças relacionadas à AIDS, quando comparada com a carga viral. Enquanto a carga viral leva a destruição das células T CD4+, é a contagem delas que irá determinar, em curto prazo, o risco de progressão para a AIDS. Embora a carga viral seja um bom marcador de progressão da doença, a combinação desta com a contagem de linfócitos T CD4+ possui maior relevância para estimativa do prognóstico (SACKS *et al.*, 2004).

O tempo de progressão pode variar significativamente entre os indivíduos infectados pelo HIV e, de acordo com estudos de coortes, foi possível identificar quatro principais grupos de progressores, (LEVY, 1993; SHEPPARD *et al.*, 1993; BUCHBINDER *et al.*, 1994; EASTERBROOK, 1994; PHAIR, 1994; KIRCHHOFF *et al.*, 1995; PANTALEO *et al.*, 1995), sendo que três deles estão representados pela Figura 4.

O primeiro grupo compõe os progressores típicos (*Typical progressors* – TP), que representam 70 a 80% dos casos, apresentam tempo de progressão para a AIDS de 6 a 10 anos, e vivenciam doença ativa, com replicação viral persistente e decaimento progressivo de células T CD4+ (PANTALEO; FAUCI, 1996). O segundo grupo é formado pelos progressores rápidos (*Rapid progressors* – RP), que são identificados em 10 a 15% dos casos, progredem para a AIDS em 2 a 5 anos, e apresentam sinais clínicos e laboratoriais característicos (PANTALEO; FAUCI, 1996; POROPATICH; SULLIVAN JR, 2011). Os sintomas constitucionais, como a síndrome aguda do HIV, podem persistir mesmo após a transição da fase aguda para a crônica, e o período de latência pode ser ausente ou muito breve. O controle inicial da explosão da viremia do HIV parece não ser eficaz e, mesmo após sua diminuição inicial, os níveis de viremia podem aumentar rapidamente (PANTALEO; FAUCI, 1996). O terceiro grupo é constituído pelos não progressores de longo prazo (*Long-term nonprogressors* – LTNP), observados em 2 a 4% dos casos, e que possuem um tempo de progressão ≥ 10 anos (MIKHAIL; WANG; SAKSENA, 2003; LAMA; PLANELLES, 2007). Estes progressores são capazes de manter baixos níveis de viremia (5.000 a 15.000 cópias de HIV-RNA/ml de plasma) e altas contagens de células T CD4+ (≥ 500 células/ μ l) (HUNT, 2009; MIKHAIL *et al.*, 2003). Muitas vezes são assintomáticos durante 10 a 20 anos e possuem carga viral

indetectável nos primeiros anos após a infecção por HIV (MADEC *et al.*, 2005; OKULICZ *et al.*, 2009). Dentro do grupo LTNP, pode-se encontrar os controladores de elite (*Elite controllers* - EC), representando $\leq 1\%$ dos casos, os quais possuem quantidade de HIV-RNA indetectáveis (< 50 cópias/ml) e quantidade normais de células T CD4+ (≥ 500 células/ μ l) durante um período que pode variar de meses a anos (SAKSENA *et al.*, 2007; PIACENTINI *et al.*, 2009). E o quarto grupo é denominado de progressores lentos ou sobreviventes de longo prazo (*Slow progressors* ou *Long-term survivors* – SP ou LTS), os quais possuem um tempo de progressão semelhante aos TP, porém os parâmetros clínicos e laboratoriais (T CD4+ < 500 células/ μ l e HIV-RNA ≥ 10.000 cópias/ml) permanecem estáveis por um longo período (BETTS, 1999; LEVY, 2009).



FONTE: Modificado de POROPATICH; SULLIVAN JR, 2011.

FIGURA 4 – PROGRESSÃO DA DOENÇA EM PROGRESSORES TÍPICOS (TP), NÃO PROGRESSORES DE LONGO PRAZO (LTNP) E PROGRESSORES RÁPIDOS (RP), DE ACORDO COM AS CONTAGENS DE CÉLULAS T CD4+ E VIREMIA

2.2.5 Terapia Antiretroviral (TARV)

O tratamento principal da doença compreende a administração da terapia antiretroviral (TARV), constituída, principalmente, por drogas que atuam em diferentes fases do ciclo da replicação viral. As drogas antiretrovirais são classificadas em: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidores da protease (IP), inibidores de fusão, antagonistas de coreceptores de citocinas (constituídos por antagonistas de CCR5 e antagonistas de CXR4) e inibidores da integrase. Devido mecanismos de atuações diferentes, estas drogas são utilizadas em associações para a maximização do seu efeito.

Para estimar o prognóstico e definir o início da TARV, realizam-se contagens seriadas dos linfócitos T CD4+, que correspondem aos marcadores do estado imunológico dos indivíduos, e quantifica-se a carga viral plasmática do HIV, que é um preditor da queda subsequente da quantidade de linfócitos T CD4+ (BRASIL, 2008). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2007), é recomendado o início imediato da TARV em indivíduos HIV positivos sintomáticos ou assintomáticos com o número de linfócitos T CD4+ ≤ 350 células/mm³. Aqueles que apresentarem sinais clínicos de imunodeficiência avançada ou severa devem iniciar o tratamento com antiretrovirais independentemente do resultado da contagem dos linfócitos T CD4+. Aconselha-se, também, que pacientes HIV positivos coinfectados por HBV iniciem a TARV independentemente da contagem de T CD4+. As drogas utilizadas na TARV são indicadas de acordo com o tipo de paciente (mulheres grávidas, adolescentes ou adultos) e presença de coinfeção por HBV, HCV ou tuberculose (TB).

O monitoramento da TARV ocorre através da contagem periódica dos linfócitos T CD4+; do teste de detecção de RNA viral em suspeita de ausência de resposta ao tratamento; e de análise laboratorial e sintomática da toxicidade após o início do tratamento. Com relação à hepatotoxicidade, há quatro mecanismos envolvidos nos danos hepáticos desencadeados pela TARV. De uma maneira geral, os ITRN podem causar lesão hepática através da inibição da polimerase gama mitocondrial dos hepatócitos, ocasionando esteatose, acidose láctica ou até mesmo insuficiência hepática. O segundo mecanismo de toxicidade hepática envolve a produção de metabólitos tóxicos associados aos IP (Tipranavir), culminando em

alterações idiossincrásicas. O último mecanismo está relacionado com as reações hipersensibilidade, observadas em todas as classes de TARV, desencadeando alterações hepáticas (BRASIL, 2008).

No Brasil, o fornecimento da TARV é assegurado pela Lei 9.313 desde o ano de 1996, e tem contribuído significativamente no aumento da sobrevida e na diminuição da taxa de mortalidade dos indivíduos portadores do HIV (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Porém, uma parte da população vivendo com HIV/AIDS, que utilizam a TARV ao longo prazo, está convivendo com os efeitos de toxicidade dos medicamentos, como, por exemplo, lipodistrofia e na presença das coinfeções por HBV ou HCV (BRASIL, 2008).

2.2.6 Coinfecção por hepatite viral C

Devido ao compartilhamento de rotas de transmissão, a coinfeção por hepatite viral C (HCV) atinge cerca de 10 a 30% das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) (ALTER, 2006; SULKOWSKI, 2007; SORIANO *et al.*, 2010). A prevalência do marcador da infecção por HCV, o anti-HCV, na população residente das capitais brasileiras é de 1,56% (IC 95% 1,28-1,91) para entre os indivíduos de 20 a 69 anos (BRASIL, 2011b). Nos indivíduos infectados pelo HIV, a prevalência desse marcador varia de 5 a 54%, dependendo da região investigada e do desenho do estudo (SEGURADO *et al.*, 2004; MORIMOTO *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008, FARIAS *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010), podendo chegar até 84% em UDIs (ZOCRATTO *et al.*, 2006; MARCHESINI *et al.*, 2007).

A transmissão mais prevalente do HCV ocorre através do contato com sangue infectado em virtude de exposição percutânea, destacando-se o compartilhamento de agulhas e seringas para uso de drogas (BRASIL, 2011b). A coinfeção HCV/HIV pode ser observada em cerca de 50 a 90% dos usuários de drogas injetáveis (UDI) (PAVAN *et al.*, 2003; MENDES-CORREA; BARONE; GIANINI, 2005; ALTER, 2006; SULKOWSKI, 2007). Além disso, acidentes com contato percutâneo ao sangue infectado são relativamente frequentes

(SULKOWSKI, 2008). Embora a transmissão sexual tenha uma incidência relativamente baixa (10 a 14%), (SULKOWSKI, 2007), a coexistência de alguma doença sexualmente transmissível (DST), como o HIV, constitui relevante facilitador para a transmissão sexual (BRASIL, 2011b).

Com o aumento da utilização de TARV, caracteristicamente hepatotóxicas, as doenças associadas à coinfeção de hepatites virais passaram a adquirir grande impacto na sobrevivência de indivíduos HIV positivos (BICA *et al.*, 2001; SULKOWSKI, 2007). Segundo um estudo de coorte de indivíduos norte-americanos infectados pelo HIV realizado por Palella *et al.* (2006), houve uma queda significativa da mortalidade relacionadas à AIDS, passando de 3,7/100 pessoas em 1996 para 0,32/100 pessoas em 2004. Por outro lado, observou-se um aumento das causas de morte associadas a eventos não relacionados diretamente à AIDS, como, por exemplo, doenças hepáticas, que inclui a hepatite C, criando um novo perfil da infecção pelo HIV nas populações que possuem acesso à TARV.

Há evidências claras de que o HIV agrava significativamente o curso natural da infecção por HCV (GRAHAM *et al.*, 2001; SULKOWSKI, 2007). Dentre as consequências da coinfeção por HCV em indivíduos HIV positivos, observou-se diminuição na taxa de depuração viral do HCV, com aumento na carga de RNA viral e um aumento na velocidade da progressão das doenças relacionadas à infecção pelo HCV (SULKOWSKI, 2002). A interação entre os vírus HIV e HCV, nos indivíduos coinfectados, tem resultado no aumento da mortalidade relacionada com as doenças do fígado, quando comparada com a de indivíduos monoinfectados com o HIV (BONACINI *et al.*, 2004). Além disso, com aumento da viremia do HCV, diante da infecção pelo HIV, o risco de transmissão vertical e, possivelmente, de transmissão sexual tem se elevado (BRASIL, 2008).

De acordo com Thomas *et al.* (2000), indivíduos HIV negativos, podem apresentar taxa de depuração espontânea do HCV de 30% durante a fase aguda, enquanto que a cronicidade da doença se estabelece em mais de 80% dos casos em indivíduos HIV positivos. Além disso, os indivíduos coinfectados que atingem a fase crônica da hepatite C apresentam progressão mais rápida para a fibrose hepática (ARANZABAL *et al.*, 2005; MARTÍN-CARBONERO, 2004). Segundo a metanálise realizada por Graham *et al.* (2001), a taxa de progressão para cirrose hepática nos indivíduos coinfectados HCV/HIV foi três vezes maior que a dos monoinfectados

com HIV, e seis vezes quando o desfecho da doença hepática era do tipo descompensada.

Por outro lado, quando são avaliados os efeitos da presença do HCV sobre o curso natural da infecção pelo HIV, os resultados são conflitantes (GREUB *et al.*, 2000; PIROTH *et al.*, 2000; DE LUCA *et al.*, 2002; SULKOWSKI *et al.*, 2002; LINCOLN *et al.*, 2003; AMIN *et al.*, 2004; BONACINI *et al.*, 2004). Segundo um estudo realizado na Suíça, a presença do HCV foi associada ao aumento do risco de morte e progressão à AIDS, foi atribuído a menor eficiência da recuperação da contagem de linfócitos T CD4+ (PIROTH *et al.*, 2000; DE LUCA *et al.*, 2002; LAW *et al.*, 2004). Porém, estudos posteriores não encontraram diferenças com relação à sobrevivência dos pacientes coinfectedados HCV/HIV, quando a análise multivariada foi aplicada para corrigir o uso de TARV, cargas virais basais, contagens de linfócitos T CD4+, idade, etnia e fatores de risco associados à transmissão do HIV (SULKOWSKI *et al.*, 2002; AMIN *et al.*, 2004; ROCKSTROH; SPENGLER, 2004; BONACINI *et al.*, 2004). As causas dessas divergências podem estar relacionadas às diferenças de adesão ao tratamento antiretroviral, à ausência de ferramentas adequadas para a medição desta variável e à ausência de padronização da TARV. Além disso, alguns estudos levam em consideração a mortalidade em geral enquanto outros apenas a mortalidade relacionada apenas com o HIV (ROCKSTROH, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.2 Pacientes

De acordo com o projeto intitulado “Investigação do polimorfismo gênico de marcadores da resposta imune inata na infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana)”, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP/HC-UFPR)(ANEXO 1), as coletas de sangue foram realizadas em 213 pacientes HIV positivos atendidos no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPR durante período de abril/2008 a março/2009. O diagnóstico foi realizado segundo o protocolo da Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde (CNDST/AIDS-MS). Os critérios de inclusão no estudo foram: diagnóstico positivo para HIV e idade superior a 18 anos. O pareamento dos grupos estudados foi verificado de acordo com o sexo, grupo étnico e idade (Tabela 4).

TABELA 4- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS (%) DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

	CONTROLES n=214	HCV+/HIV+ n=33	HCV-/HIV+ n=180	p^a
Sexo				
F	104 (48,6)	12 (36,4)	103 (57,2)	0,26
M	110 (51,4)	21 (63,6)	77 (42,8)	
Grupo étnico				
Euro-brasileiro	204 (95,3)	31 (93,9)	172 (95,6)	0,99
Afro-brasileiro	10 (4,7)	2 (6,1)	8 (4,4)	
Idade				
Média	39,8 (±12,3)	44,2 (±11,5)	40,0 (±10,5)	0,61
Varição	18-76	24-66	18-73	

LEGENDA: n, número de indivíduos; entre parênteses, desvio padrão; P, probabilidade; a, teste exato de Fisher

Através da análise dos respectivos prontuários, obtiveram-se informações quanto ao estágio da doença, seguindo os critérios de definição de casos de AIDS em adultos (BRASIL, 2004); à presença de doenças oportunistas; e à presença da coinfeção por HCV.

3.1.3 Controles

Após o devido esclarecimento e consentimento de 214 doadores de sangue (ANEXO 2), foi coletado aproximadamente 5 ml de sangue venoso em frascos contendo etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A alíquota de soro foi obtida do frasco sem anticoagulante, no qual foram previamente obtidos os resultados dos testes sorológicos para HCV e HIV, realizados no Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR). Os indivíduos com resultados positivos para estes testes foram excluídos da amostra dos controles. As amostras de sangue venoso foram centrifugadas e divididas em uma alíquota de plasma e uma da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), contendo cerca de 1 ml cada. As alíquotas foram armazenadas à temperatura de -80°C até o momento das análises laboratoriais.

O grupo foi constituído por 110 (51,4) homens e 104 (48,6%) mulheres, 204 (95,3%) euro-brasileiros e 10 (4,7%) afro-brasileiros, com média de idade de 39,8 ± 12,3 anos. Este grupo foi utilizado para estimar as frequências dos SNPs na população saudável de Curitiba e Região Metropolitana.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Testes sorológicos

3.2.1.1 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)

A concentração sorológica de ficolina-2 foi avaliada em 100 amostras do grupo controle e 88 pacientes HIV positivos, compostas por indivíduos de diferentes genótipos. A metodologia utilizada foi o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) com o kit HK336 (Hycult Biotechnology, Uden, Países Baixos) para a detecção de 16-1.000 ng/ml de ficolina-2, seguindo-se as instruções do fabricante (ANEXO 3).

3.2.1.2 Anticorpos anti-HCV

Os resultados foram previamente obtidos pelo projeto de pesquisa “Avaliação clínica-epidemiológica de co-infecção com hepatites B e C e tuberculose em pessoas vivendo com HIV/AIDS no estado do Paraná” (BANPESQ: 2007021749), o qual está devidamente vinculado ao projeto previamente aprovado pelo CEP/HC-UFPR (ANEXO 1). Os anticorpos anti-HCV foram determinados através de micro ensaios imunoenzimáticos com quimioluminiscência (QMA), utilizando-se sistemas comerciais ARCHITECT (Abbott, Libertyville, IL, Estados Unidos). O diagnóstico de HCV foi confirmado através da análise dos prontuários dos pacientes com resultados positivos para o teste sorológico.

3.2.2 Extração de DNA

Para o grupo dos pacientes, a extração do DNA genômico foi previamente realizada no Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica – UAD – HC/UFPR, utilizando-se o kit comercial DNAzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante.

Para o grupo controle, o DNA genômico foi extraído do sangue total/EDTA utilizando-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) e DNAzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)

A tipagem por PCR-SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o nucleotídeo localizado na extremidade 3' do iniciador (ou primer) e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada. Dessa forma, os iniciadores de 18 a 22 nucleotídeos são projetados de maneira que o nucleotídeo da extremidade 3' seja complementar à variante polimórfica de interesse, permitindo a tipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes candidatos na população estudada. Além disso, os

iniciadores da PCR-SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos para verificar a qualidade da reação.

Neste trabalho, foram realizadas duas PCR-SSPs simples, onde é amplificado apenas um fragmento específico por reação, e biespecíficas, onde são utilizados dois iniciadores específicos simultaneamente, permitindo a haplotipagem dos SNPs da região estudada por meio de seis reações por amostra.

3.2.3.1 PCR-SSP do gene *FCN2*

Foram analisados três SNPs situados no promotor do gene *FCN2*: -986, -602 e -4pb do sítio de início da transcrição (*ATG*) do exon 1. Os iniciadores diretos e reversos (Tabela 5) foram desenhados de acordo com a sequência *NT_019501* do cromossomo 9 (Figura 5). As regiões de acoplamento dos iniciadores e as respectivas localizações dos polimorfismos estudados estão ilustradas na figura 6.

	LOCUS	NT_019501	9110 bp	Iniciadores
661	ccaagccatctttctaggttccatctgcatctccatggagcctgtgtcttccccaggt			
721	tcatccctggacctcatctgcatctggcatagccttaattaagtcttgagaggtctgccc			
781	taaacaccacggaacccgaggggtcttaactagtcatagtctcaggaccacacatctc			
841	catgggcatgaaggaaaatccgatgggattttgtttctcgcgtggctttgctgggctgg			
901	ggtcacagtttaaaatccttctactgatcttgccaaggaagaaggc [acctcggcatccccg			
961	atggca/g]gcaggtggcaggggtgcggtggtagtgggaggtgcagtgctggttccgtctc			
1021	tgggggctttaggtatacggcctctggggcccacctgctactgtctctgtctctaacct			-986 Af/Gf
1081	ggctcagccaaggcgagagtgacaccttcaggccagctcttctccaaaaggcgaacaca			
1141	ccactgaagtaagtcacagccactcactaggtgggatgtctggcctcagggtcagggg			
1201	gttccctgggcccctaggagtgaaattcacctactctcatcctccctacaggctaagccc			
1261	tgcattcacactcaaggtctccccctcagatgtgtacctgggtcatagtccccaggtc			
1321	ccactct [tctctcctttccctcctgttc [g/a]tgtgcccctgtgctctacat]ctgccccag			
1381	gaaacagtgagacacacagcattttcctctcctttcaccctggcagcctgctggacct			-602 Af/Gf
1441	catagtggcagtttccaagcctcctgaggagagtcceaagtctgctcatgatgtggtgag			
1501	ggttactgtgtaaggcccacaccagtgcccattgaccagcctggccatgaggactctag			-602 Ar/Gr
1561	gtattcggataaggagagagacctctttgaaagcagaacatctttagcaaacccttctt			
1621	gttccccgttctcagctcatggtgacatctgctcaccgctgaacaaaaggtgggaggatgg			
1681	gcctgggctctttgcccaggccacaagcaagtcagcctgttccctggaaggagaccgtc			
1741	cccctgcagggatgacagtcgccatgggatccccaggggcgggggtagggagcagccc			
1801	tggagatgatctcgacctcctgctggcgtcaccaggcccgaggaggaagcggctgctc			
1861	actcggagatgagaaaattggagtctgagggaggtggcttctctagccctataagaggg			
1921	caggcaccttttgaagcaaagACCAGA [A/GGAGATGGAGCTGGACAGAGC] TGTGGGGTCCCT			
1981	GGGCGTGCCACCCTGCTGCTCTCTTTCC TGGGCATGGCCTGGGCTCTCCAGGCGGCAGA			
2041	CACCTGTCCAGgtaaggcactccagggcctcctcctggaacttctcgtccctgaaagc			-4 Ar/Gr

FIGURA 5 - REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO PROMOTOR DO GENE *FCN2*

LEGENDA: f – iniciador direto; r – iniciador reverso.

NOTA: A sequência em destaque corresponde a parte da região promotora de *FCN2*, sendo que as letras maiúsculas indicam a área delimitada pelo exon 1. As regiões de hibridação de cada iniciador

estão coloridas com suas respectivas cores indicadas na coluna da direita, sendo que o SNP em verde (-602 G>A), é uma região comum de hibridação dos iniciadores -602 Af/Gf e Ar/Gr.

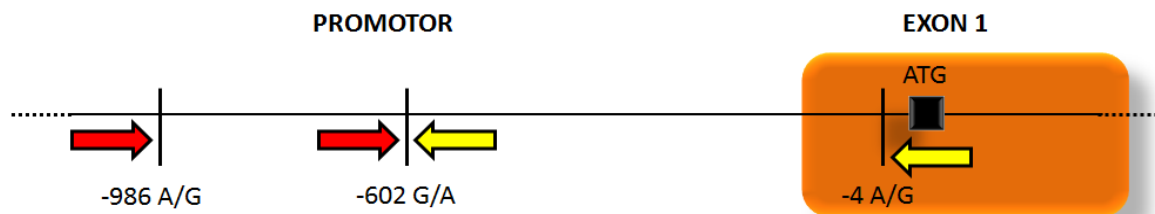


FIGURA 6 – REGIÕES DE ACOPLAMENTO DOS INICIADORES NA PCR-SSP FCN2

LEGENDA: Seta vermelha: iniciador direto; Seta amarela: iniciador reverso; ATG: sítio de início da transcrição; em laranja: Exon 1. Os SNPs foram numerados a partir do sítio de início da transcrição.

Para cada reação de PCR utilizou-se de 20 a 100 ng de DNA genômico e 0,2 µM de cada iniciador, na presença de 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 1x de Tampão Coral (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) ou 1x de Tampão GoFlexi Green (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), de 0,35 a 0,7 mM de solução Q (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 0,15 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos ou Promega, Madison, WI, Estados Unidos). A amostra de controles e pacientes foi submetida à reação de PCR em termociclador sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C (período de desnaturação) por 20 segundos e terminando com 72°C (período de extensão) por 1 minuto e 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi alta nos 10 primeiros ciclos, intermediária nos 10 seguintes e baixa nos 10 últimos ciclos, garantindo boa especificidade e quantidade de produto. Cada PCR é acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e amostras de DNA de genótipos conhecidos, utilizados como controles positivo/negativo.

TABELA 5- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS

Iniciador direto		Iniciador reverso		Fragmento
PCR-SSP -986 a -602 (Prom12)				
FCN2 Prom -986 Af	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCA 3'	FCN2 Prom -602 Ar	5' TATGTAGAGCACAGGGGCACAT 3'	374 pb
FCN2 Prom -986 Gf	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCG 3'	FCN2 Prom -602 Gr	5' TATGTAGAGCACAGGGGCACAC 3'	374 pb
PCR-SSP -602 a -4 (Prom23)				
FCN2 Prom -602 Af	5' TCTCTCCTTTCCCTCCTGTTCA 3'	FCN2 Prom -4 Ar	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCT 3'	648 pb
FCN2 Prom -602 Gf	5' TCTCTCCTTTCCCTCCTGTTCCG 3'	FCN2 Prom -4 Gr	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCC 3'	648 pb
Controle endógeno				
HGH f	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	HGH r *	5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'	431 pb
FCN2 Ex8f	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'	FCN2 Ex8r	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3'	500 pb

LEGENDA: HGH, *Human Growth Hormone*; f, *forward* (ou direto); r, *reverse* (ou reverso); Em negrito, nucleotídeos variantes; pb, pares de base; Prom, promotor; Ex8, exon 8.

Para a identificação do genótipo completo dessa região do promotor do gene *FCN2*, foi necessária a realização de dois tipos de PCR-SSP: a PCR-SSP *FCN2* Prom12, que amplifica a região entre os SNPs -986 G>A e -602 G>A (Figura 7), produzirá um fragmento de 374 pb; e a PCR-SSP *FCN2* Prom23, que amplifica a região entre os SNPs -602 G>A e -4 A>G (Figura 8), produzirá um fragmento específico de 648 pb e 431 pb do gene do hormônio de crescimento humano (HGH) ou 500 pb do exon 8 do gene *FCN2* correspondente ao controle endógeno.

PCR <i>FCN2</i> PROM12			
Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Tampão (x)	5	1	3
Sol. Q (x)	5	0,7	2,1
MgCl ₂ (mM)	25	2	1,2
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer -986 Af/Gf (uM)	10	0,2	0,3
Primer -602 Ar/Gr (uM)	10	0,2	0,3
Primer <i>FCN2</i> Ex8f ou HGHf	10	0	0
Primer <i>FCN2</i> Ex8r ou HGHr	10	0	0
Taq Brasileira	5	0,15	0,45
DNA			1
H ₂ O			6,53
Total			15
Produtos esperados:	986Af/Gf -> -602Ar/Gr	374 pb	
Programa:	FCN2T1	68-66-64	

FIGURA 7 – CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO-986/-602 (PROM12)

LEGENDA: [Inicial], concentração inicial; [Final], concentração final; Vol., volume.

NOTA: A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi de 68°C nos 10 primeiros ciclos, 66°C nos 10 seguintes e 64°C nos 10 últimos ciclos.

PCR <i>FCN2</i> PROM23			
Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Tampão (x)	5	1	3
Sol. Q (x)	5	0,35	1,05
MgCl ₂ (mM)	25	2	1,2
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer -602 Af/Gf (uM)	10	0,2	0,3
Primer -4 Ar/Gr (uM)	10	0,2	0,3
Primer <i>FCN2</i> Ex8f ou HGHf	10	0,2	0,3
Primer <i>FCN2</i> Ex8r ou HGHr	10	0,2	0,3
Taq Brasileira	5	0,15	0,45
DNA			1
H ₂ O			6,98
Total			15
Produtos esperados:	602Af/Gf -> -4Ar/Gr	648 pb	
	HGHf -> HGHr	431 pb	
	<i>FCN2</i> Ex8f -> <i>FCN2</i> Ex8r	500 pb	
Programa:	FCN2T2	65-62-59	

FIGURA 8 – CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO -602/-4 (PROM23)

LEGENDA: [Inicial], concentração inicial; [Final], concentração final; Vol., volume.

NOTA: A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi de 65°C nos 10 primeiros ciclos, 62°C nos 10 seguintes e 59°C nos 10 últimos ciclos.

3.2.4 Eletroforese em gel de agarose

O resultado da amplificação foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0 % corado com Sybrsafe (5 μ l a cada 100 ml de agarose) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), fluorescente em transiluminador sob luz azul. Em todos os casos, a genotipagem é rápida e baseia-se na análise do padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.

Os padrões eletroforéticos obtidos após as reações PCR-SSP *FCN2* Prom12 e 23 estão representados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

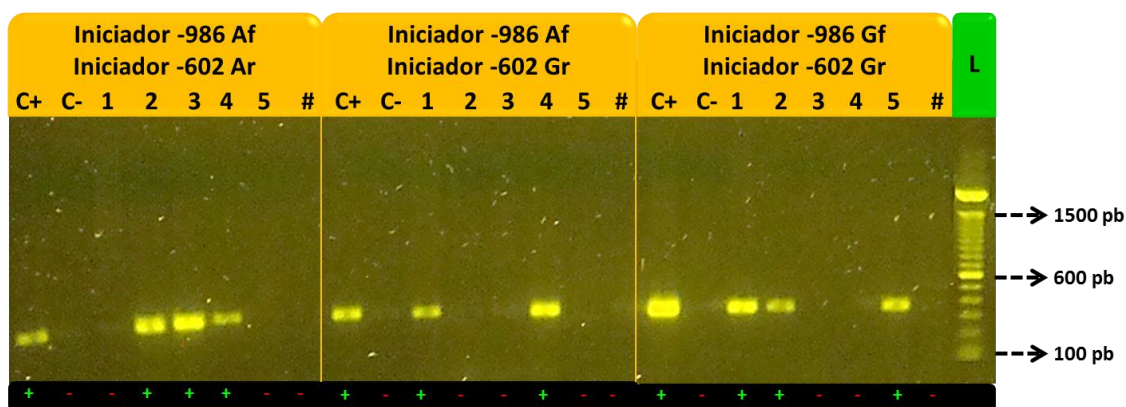


FIGURA 9 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP *FCN2* PROM12

Legenda: C+, controle positivo; C-, controle negativo; f, iniciador direto; r, iniciador reverso; #, controle negativo; L, Marcador de pares de base (Ladder 100 pb) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

NOTA: Tamanho do fragmento Prom12 (374 pb). A interpretação dos genótipos é: 1 – AG/GG; 2 – AA/GG; 3 – AA/AA; 4 – AA/AG; e 5 – GG/GG.

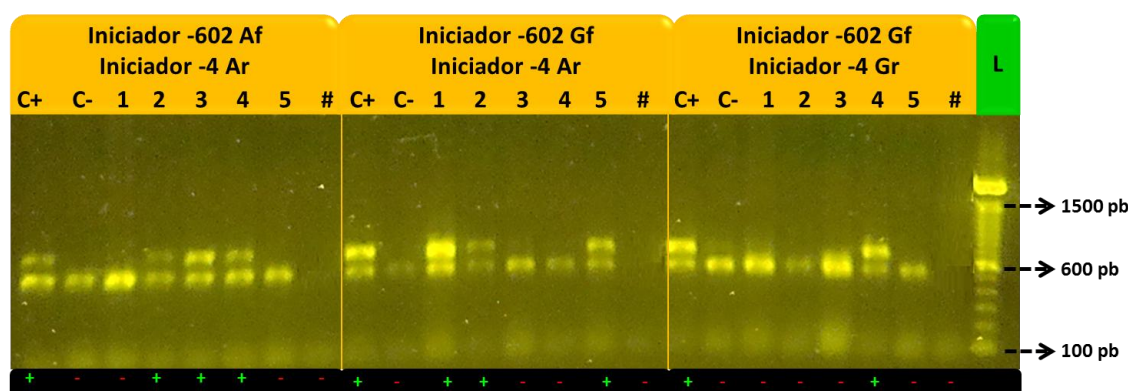


FIGURA 10 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP *FCN2* PROM23

Legenda: C+, controle positivo; C-, controle negativo; f, iniciador direto; r, iniciador reverso; #, controle negativo; L, Marcador de pares de base (Ladder 100 pb) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

NOTA: Tamanho dos fragmentos - Prom12 (648 pb) e FCN2Ex8 (500 pb). A interpretação dos genótipos é: 1 – GA/GA; 2 – AA/GA; 3 – AA/AA; 4 – AA/GG; e 5 – GA/GA.

3.2.5 Análise estatística

A estatística descritiva dos dados demográficos e clínicos foi obtida através do programa SPSS v. 13.0 (SPSS, Inc., EUA). As frequências alélicas, haplotípicas e genóticas foram quantificadas através de contagem direta. As hipóteses de equilíbrio de Hardy-Weinberg, segundo Guo e Thompson (2002), e de diferenciação populacional, segundo Raymond e Rousset (1995) e Goudet *et al.* (1996), foram avaliadas utilizando-se o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5 (EXCOFFIER, 2010). O teste exato de diferenciação populacional foi configurado com 10.000 passos da cadeia de Markov e 1.000 passos de desmemorização. O teste de homogeneidade entre os controles genotipados neste trabalho e os dados encontrados na literatura foi realizado através do teste de Fisher 2 por 5 do SISA (UITENBROEK, 1997).

Para as análises de associação foram realizados os testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes do qui-quadrado com correção de Pearson ou teste de Fisher bicaudal. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Valores de *p* menores que 0,05 serão considerados significativos.

A suposição de normalidade dos dados foi rejeitada através do teste de Shapiro-Wilk realizado pelo programa SPSS v. 13.0 (SPSS, Inc., EUA). A possibilidade de associação entre genótipo e fenótipo foi testada através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., EUA). Para a predição dos sítios de ligação dos fatores de transcrição na região promotora do gene *FCN2* foi utilizada a ferramenta TESS (SCHUG, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise preliminar

Na Tabela 6, estão listados os dados clínicos de pacientes que apresentaram informações completas que possibilitassem a avaliação dos parâmetros de fase da doença (AIDS ou não AIDS) e prevalência de doenças oportunistas. Quando os pacientes HCV+/HIV+ e HCV-/HIV+ foram comparados entre si, de acordo com a progressão da doença, verificou-se que a coinfeção por HCV está associada ao estágio final da doença, conhecido como AIDS (teste exato de Fisher $p=0,02$, $OR=2,33$, $IC95\%=1,05-5,17$). Isso leva-nos a sugerir que a presença da coinfeção HCV+/HIV+ está associada ao estágio final da doença (AIDS), porém estudos mais detalhados devem ser realizados para verificar se esta associação está relacionada à presença da coinfeção HCV+/HIV+. A prevalência de doenças oportunistas foi semelhante entre os pacientes, tanto com relação à quantidade cumulativa de diagnósticos por paciente (teste exato de Fisher $p=0,09$) quanto pela frequência relativa de cada doença por número total de diagnósticos (teste exato de Fisher $p=0,41$).

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (%) DOS PACIENTES ESTUDADOS

		HCV+/HIV+	HCV-/HIV+	P^a	OR (IC95%)
AIDS	Sim	24 (77,4)	101 (56,4)	0,02	2,33 (1,05-5,17)
	Não	7 (22,6)	78 (43,6)		
	Total de indivíduos	31	179		
Prevalência de doenças oportunistas	Câncer Cervical	0 (0,0)	1 (0,5)	0,09	n.a.
	Candidíase	7 (17,5)	35 (17,9)		
	Citomegalovirose	0 (0,0)	2 (1,0)		
	Criptococose	1 (2,5)	7 (3,6)		
	Hepatite B	0 (0,0)	1 (0,5)		
	Herpes zoster	0 (0,0)	15 (7,7)		
	Isosporíase	0 (0,0)	4 (2,0)		
	Linfoma	0 (0,0)	2 (1,0)		
	Meningite Criptocócica	2 (5,0)	1 (0,5)		
Neurocisticercose	0 (0,0)	1 (0,5)			

		HCV+/HIV+	HCV-/HIV+	P ^a	OR (IC95%)
Prevalência de doenças oportunistas	Neurotoxoplasmose	5 (12,5)	16 (8,2)		
	Pneumocistose	3 (7,5)	9 (4,6)		
	Pneumonia	1 (2,5)	1 (0,5)		
	Sarcoma de Kaposi	3 (7,5)	6 (3,1)	0,09	n.a
	Sífilis	0 (0,0)	1 (0,5)		
	Tuberculose	8 (20,0)	15 (7,7)		
	Ausência	10 (25,0)	75 (38,3)		
	Total de diagnósticos	40	196		
Prevalência cumulativa de doenças oportunistas	Uma	11 (36,7)	57 (35,2)		
	Dois	8 (26,7)	22 (13,6)		
	Três	1 (3,3)	7 (4,3)	0,41	n.a.
	Quatro	0 (0,0)	1 (0,6)		
	Ausência	10 (33,3)	75 (46,3)		
	Total de indivíduos	30	162		

LEGENDA: OR, razão de chances; IC, intervalo de confiança; P, probabilidade;^a, teste exato de Fisher; n. a., não aplicável.

4.2 Equilíbrio de Hardy e Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para os três loci e para os haplótipos identificados através da PCR-SSP para o promotor de *FCN2* nos grupos controle e pacientes HCV+/HIV+ (Tabelas 7 e 8). Nas duas populações, podem-se assumir as premissas de que os cruzamentos são aleatórios; as gerações são discretas; o tamanho populacional é representativo; e os efeitos evolutivos de migração, mutação e seleção natural são desprezíveis. A análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes HCV-/HIV+ (Tabela 9) apresentou um desvio significativo na posição -602A>G (Teste de Guo e Thomson $p=0,049$), devido a uma deficiência de heterozigotos para este *locus* e para os haplótipos (Teste de Guo e Thomson $p=0,009$). A rejeição da hipótese de Hardy-Weinberg sugere um excesso de homozigose na posição -602, que pode estar associada à suscetibilidade a infecção por HIV.

TABELA 7 - EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR LOCUS E HAPLÓTIPO NO GRUPO CONTROLE

Locus	n	Het. Obs.	Het. Esp.	P	D. P.
-986	214	0,523	0,501	0,585	0,0005
-602	214	0,271	0,293	0,345	0,0005
-4	214	0,360	0,376	0,586	0,0005
Haplótipos				0,136	0,002

LEGENDA: n = número de indivíduos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

NOTA: teste de Guo e Thomson (1992).

TABELA 8 - EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR LOCUS E HAPLÓTIPO NOS PACIENTES HCV+/HIV+

Locus	n	Het. Obs.	Het. Esp.	P	D. P.
-986	33	0,576	0,491	0,471	0,0005
-602	33	0,212	0,239	0,466	0,0005
-4	33	0,485	0,429	0,680	0,0005
Haplótipos				0,828	0,0012

LEGENDA: n = número de indivíduos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

NOTA: teste de Guo e Thomson (1992).

TABELA 9 - EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR LOCUS E HAPLÓTIPO NOS PACIENTES HCV-/HIV+

Locus	n	Het. Obs.	Het. Esp.	P	D. P.
-986	180	0,489	0,492	1,000	0,0000
-602	180	0,289	0,340	0,049*	0,0002
-4	180	0,311	0,347	0,195	0,0004
Haplótipos				0,009*	0,0005

LEGENDA: n = número de indivíduos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

NOTA: teste de Guo e Thomson (1992).

4.3 Frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas

As frequências alélicas para os SNPs -986G>A (*rs3124952*), -602G>A (*rs3124953*) e -4A>G (*rs17514136*) da região promotora do gene *FCN2* encontram-se listadas na Tabela 10. Estas são semelhantes àquelas encontradas em europeus para todos os *loci* estudados (Qui-Quadrado $p=0,78$), de acordo com o banco de dados dbSNP (2012). Logo, as frequências alélicas deste trabalho estão distribuídas de acordo com o esperado em populações de ascendência europeia. Não foram observadas diferenças significativas entre as distribuições alélicas dos controles e dos dois grupos de pacientes para os três SNPs investigados (Qui-Quadrado $p>0,22$).

TABELA 10 – FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENOS COMUNS DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE *FCN2* EM DIFERENTES POPULAÇÕES

População	N	<i>g.680489G>A</i> (-986 G>A) <i>rs3124952</i>	<i>g.680873G>A</i> (-602 G>A) <i>rs3124953</i>	<i>g.681471A>G</i> (-4 A>G) <i>rs17514136</i>
Europeus ^{1,2}	226 ¹	G – 104 (46,0)	G – 170 (75,2)	A – 86 (71,3)
	120 ²	A – 122 (54,0)	A – 56 (24,8)	G – 34 (28,3)
Controles	428	G – 214 (50,0±2,4)	G – 352 (82,2±1,8)	A – 321 (75,0±2,1)
		A – 214 (50,0±2,4)	A – 76 (17,8±1,8)	G – 107 (25,0±2,1)
HCV+/HIV+	66	G – 27 (40,9±6,1)	G – 57 (86,4±4,3)	A – 46 (69,7±5,7)
		A – 39 (59,1±6,1)	A – 9 (13,6±4,3)	G – 20 (30,3±5,7)
HCV-/HIV+	360	G – 156 (43,3±2,6)	G – 282 (78,3±2,2)	A – 280 (77,8±0,06)
		A – 204 (56,7±2,6)	A – 78 (21,7±2,2)	G – 80 (22,2±0,06)

LEGENDA: N = número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem ±desvio padrão.

NOTA:¹Dados dos SNPs -986 G>A e -602 G>A do grupo HapMap; ²Dados do SNP -4 A>G do Grupo 1000GENOMES.

Considerando apenas as frequências haplotípicas dos *loci* estudados, o teste exato de Raymond e Rousset (1995) verificou-se uma diferenciação populacional entre controles e pacientes HCV-/HIV+ (Tabela 11). O fato do grupo dos pacientes HCV+/HIV+ ser considerado semelhante tanto aos controles quanto aos pacientes HCV-/HIV+ leva-nos a sugerir a presença de um possível viés relacionado ao tamanho amostral do grupo HCV+/HIV+. Devido à semelhança populacional encontrada entre os pacientes HCV+/HIV+ e HCV-/HIV+, para as

análises subsequentes, estas populações foram reunidas em um único grupo denominado “pacientes”.

TABELA 11 - VALOR DE $P \pm$ DESVIO PADRÃO OBTIDOS PELO TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL NOS TRÊS GRUPOS ESTUDADOS

	Populações	
	Controles	HCV-/HIV+
Controles	-	-
HCV-/HIV+	0,02±0,005	-
HCV+/HIV+	0,12±0,006	0,29±0,008

NOTA: Teste exato de Raymond e Rousset (1995).

As frequências haplotípicas obtidas nos controles (Tabela 12) foram previamente comparadas com os dados do estudo realizado por Messias-Reason, Kremsner e Kun (2009), no qual 210 indivíduos saudáveis foram sequenciados para o promotor de *FCN2*. A semelhança proporcional entre as frequências haplotípicas foi confirmada com uma probabilidade igual a 0,55. Os três haplótipos mais comuns foram GGA, AGG e AAA, com uma frequência cumulativa de 92,8% neste trabalho e 89,6% no de Messias-Reason, Kremsner e Kun (2009).

TABELA 12 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (%) DE POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE *FCN2*

Haplótipo -986-602-4	CONTROLES N=428	PACIENTES N=426	<i>P</i>	OR (IC95%)
GGA	214 (50,0±2,0)	183(43,0±2,0)	n. s.	n. a.
AGG	107 (25,0±2,0)	100 (23,5±2,0)	n. s.	n. a.
AAA	76 (17,8±2,0)	87 (20,4±2,0)	n. s.	n. a.
AGA	31 (7,2±2,0)	56 (13,1±2,0)	0,005	1,94 (1,22-3,07)

LEGENDA: N = número de cromossomos; entre parênteses: desvio padrão.n.s, não significativo; n. a., não aplicável. OR, razão de chances; IC, intervalo de confiança.

NOTA: Teste exato de Fisher.

Comparando-se as frequências haplotípicas entre pacientes e controles (Tabela 12), observou-se um excesso de haplótipos AGA nos pacientes ($p=0,005$, $OR=1,94$, $IC95%= 1,22-3,07$). Este excesso é um reflexo do número superior de genótipos AGA/GGA e AGA/AGG (29/214 ou 13,5% nos controles e 56/213 ou

26,3% nos pacientes; $p=0,001$, $OR= 2,28$, $IC95\%= 1,39-3,74$) e está associado com uma diferença significativa entre as distribuições genotípicas de pacientes e controles ($p=0,01$) (Tabela 13). Entretanto, não houve diferença significativa entre os genótipos do promotor de *FCN2* e o estágio final da doença causada pelo HIV ($p=0,39$). Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos e a prevalência cumulativa de doenças oportunistas associadas à AIDS ($p=0,71$).

TABELA 13 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (%) DE POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE *FCN2*

Genótipo -986-602-4/-986-602-4	CONTROLES N=214	PACIENTES N=213	P	OR (IC95%)
AGG/GGA	53 (24,8)	38 (17,8)	n.s.	n.a.
GGA/GGA	51 (23,8)	38 (17,8)	n.s.	n.a.
AAA/GGA	38 (17,8)	32 (15,0)	n.s.	n.a.
AGA/GGA	21 (9,8)	37 (17,4)	0,02	1,93 (1,09-3,43)
AAA/AGG	19 (8,9)	21 (9,9)	n.s.	n.a.
AGG/AGG	15 (7,0)	14 (6,6)	n.s.	n.a.
AAA/AAA	9 (4,2)	14 (6,6)	n.s.	n.a.
AGA/AGG	5 (2,3)	13 (6,1)	0,04	2,94 (1,04-8,31)
AGA/AGA	2 (0,9)	0 (0,0)	n.s.	n.a.
AAA/AGA	1 (0,5)	6 (2,8)	n.s.	n.a.

LEGENDA: n – número de indivíduos..n.s, não significativo; n. a., não aplicável. OR, razão de chances; IC, intervalo de confiança.

NOTA: Teste exato de Fisher.

No estudo realizado por Messias-Reason, Kremsner e Kun (2009), a frequência do haplótipo *AGA* foi significativamente menor em pacientes quando comparados ao grupo controle ($p<0,001$), constituindo um fator protetor a hanseníase na população brasileira ($OR=0,13$, $IC95\% 0,03-0,432$). Da mesma forma, Messias-Reason *et al.* (2009), observaram que o haplótipo *AGA* possui um efeito protetor contra a febre reumática ($p=0,008$, $OR=0,32$, $0,13-0,77$). Ao contrário, Assaf *et al.* (2012) verificaram que o haplótipo *AGA* era mais frequente em pacientes com leishmaniose cutânea do que em controles ($p=0,006$), caracterizando um fator de suscetibilidade ao desenvolvimento desta doença em árabes sírios ($OR=2,0$, $IC95\%= 1,2-3,4$). De forma semelhante a estes autores, o excesso do haplótipo

AGA identificado no presente estudo leva-nos a sugerir um possível efeito desse haplótipo na suscetibilidade à infecção pelo HIV.

4.4 Valores séricos de Ficolina-2

Para a quantificação sérica da ficolina-2, foram selecionados 92 indivíduos saudáveis e 88 pacientes portadores do HIV. Na Tabela 14 estão listados os resultados obtidos do presente estudo e de outros estudos da variação sérica da ficolina-2, reportados na literatura. A mediana encontrada nos controles está abaixo daquela encontrada no estudo realizado por Munthe-Fog *et al.* (2007) em 214 dinamarqueses (5,4 µg/ml) (teste de Wilcoxon $p=0,0005$), porém, é praticamente idêntica a mediana de 76 dinamarqueses em um trabalho anterior (3,0 µg/ml) (HUMMELSHOJ *et al.*, 2005).

TABELA 14—CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA FICOLINA-2 (µg/mL) EM DIFERENTES ESTUDOS DE CASO-CONTROLE

Estudo	Pop.	Grupo	n	Varição	Mediana	P
Tong <i>et al.</i> (2011)	VT	Controles	213	0,2-7,0	3,6	<0,001
		Pacientes ¹	175	n. i.	5,4	
Faik <i>et al.</i> (2011)	GB	Controles ² T ₀	88	3,5–23,2	15,2	<0,0001
		Pacientes ³ T ₀	70	0,0–23,8	11,4	
		Controles ² T ₁	76	5,1–24,3	12,3	0,0001
		Pacientes ³ T ₁	70	1,9–16,4	10,8	
Liu <i>et al.</i> (2009)	CH	Controles	150	n.i.	4,7	<0,05
		Pacientes ⁴	103	n.i.	7,2	
Presente estudo	EB	Controles	92	0,1-12,3	2,9	0,007 ^a
		Pacientes ⁵	88	0,4-24,4	3,5	

LEGENDA: Pop., população; n, número de indivíduos; n. i., não informado; n.s, não significativo; n. a., não aplicável. VT, vietnamitas; GB, gaboneses; CH, chineses; EB, euro-brasileiros;¹HBV; ²Malária leve; ³Malária grave; ⁴HCV; ⁵HIV; T₀ fase aguda; T₁ fase saudável; ^aTeste U de Mann-Whitney.

Segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney, foi verificada uma diferença significativa nas concentrações séricas de ficolina-2 entre os controles e

pacientes ($p=0,007$) (Gráfico 1). Este resultado foi similar aos estudos de Liu *et al.* (2009) e Tong *et al.* (2011), os quais observaram valores mais elevados da ficolina-2 nos pacientes infectados pelo HCV e HBV, respectivamente, quando comparados aos controles ($p<0,05$).

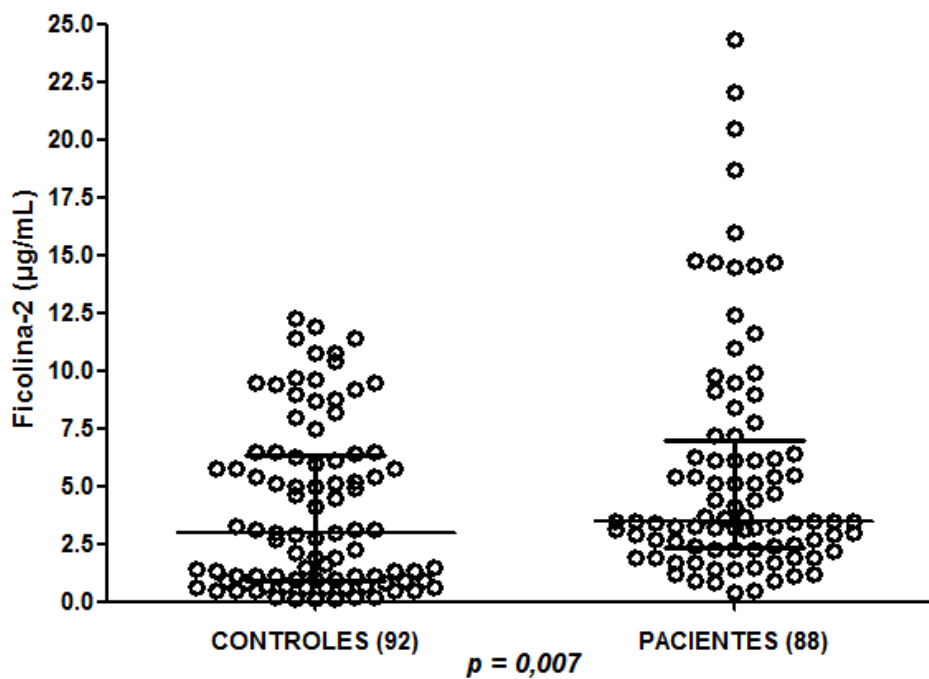


GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 ENTRE CONTROLES E PACIENTES

LEGENDA: Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney.

Não houve associação entre os valores séricos de ficolina-2 e a presença cumulativa de doenças oportunistas (Gráficos 2). Entretanto, verificou-se que as concentrações mais elevadas estão associadas a contagens de linfócitos T CD4+ superiores a 250 células/ μ l (Mann-Whitney $p=0,047$) (Gráfico 3). Interessantemente, o corolário foi observado por Maas *et al.* (1998) para MBL, que possui função muito similar à ficolina-2. Neste estudo, foi observada uma associação entre variantes causadoras de baixos valores séricos de MBL e baixo número de linfócitos T CD4+ em pacientes com AIDS.

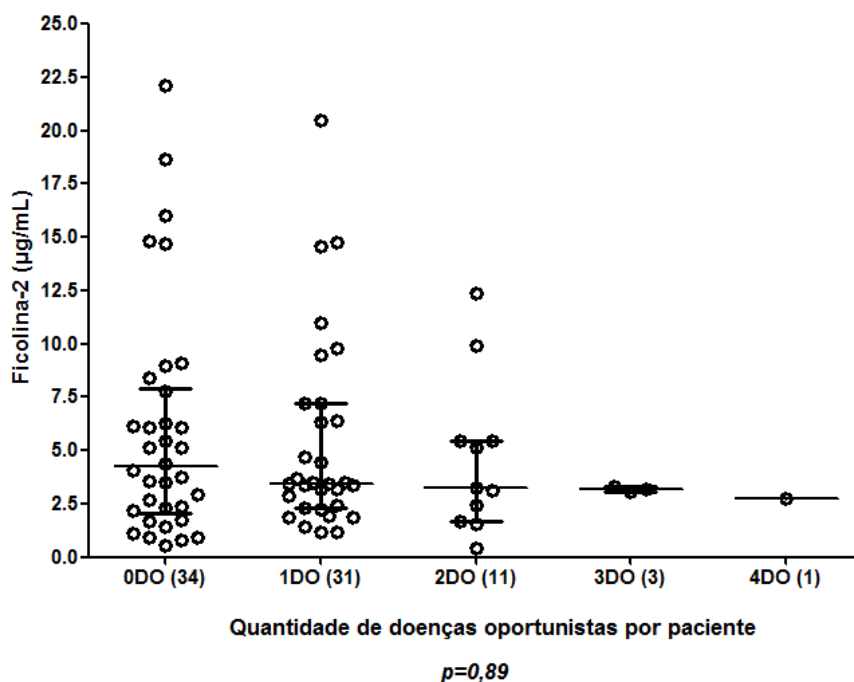


GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 COM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE DOENÇAS OPORTUNISTAS

LEGENDA: Entre parênteses – número de indivíduos; DO, doença oportunista.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Kruskal-Wallis.

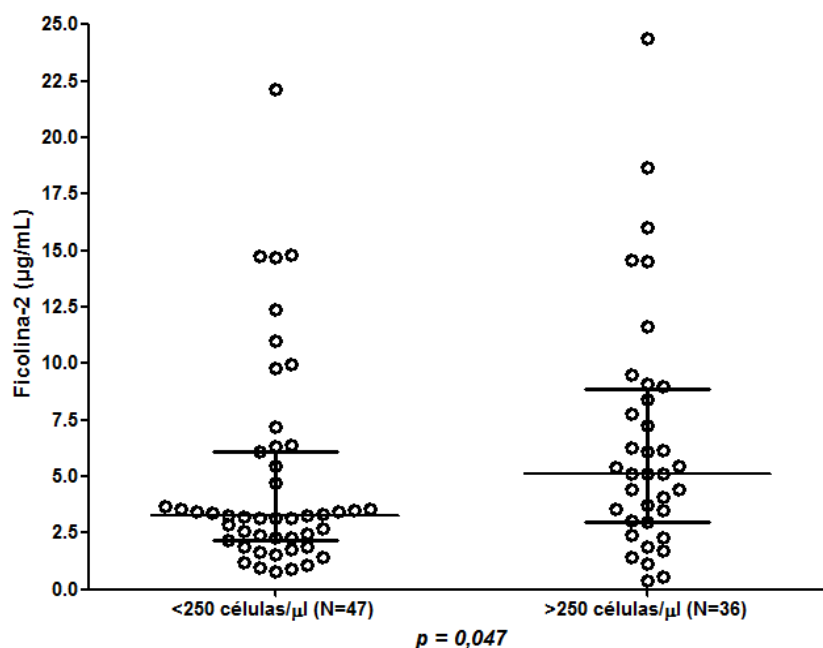


GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 COM RELAÇÃO ÀS CONTAGENS DE LINFÓCITOS T CD4+

LEGENDA: Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney.

Embora não tenha sido observada uma associação entre os valores séricos de ficolina-2 e a AIDS (Gráfico 4), os altos valores séricos verificados nos pacientes podem estar associados à resposta aguda da doença. Esta resposta é caracterizada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Um importante marcador de fase aguda é a proteína C reativa, que pode se ligar a uma variedade de patógenos e ativar as proteínas do sistema complemento, resultando na deposição de C3b na superfície do microrganismo (BILATE *et al.*, 2007). Sabe-se que a história natural da infecção pelo HIV é marcada por um aumento considerável da proteína C reativa, independentemente das contagens de linfócitos T CD4+ e cargas virais (LAU *et al.*, 2006). Similarmente, Amah *et al.* (2011) também verificaram um aumento da proteína C reativa em pacientes com malária e com hepatite B. Zhang *et al.* (2009) observaram uma forte interação entre a proteína C reativa e a ficolina-2, promovendo a alça de amplificação, e intensificação das vias clássica e das lectinas. NG *et al.* (2007) verificaram que a interação entre as duas proteínas é essencial e suficiente para aumentar em 50% a ativação total do componente C4. Como a concentração sérica da proteína C reativa aumenta ao longo da progressão da doença causada pelo HIV e o principal sítio de expressão do gene *FCN2* são os hepatócitos, leva-nos a sugerir que o aumento fisiológico da ficolina-2 esteja associado com as interações com a proteína C reativa durante a resposta de fase aguda na doença.

Estudos em pacientes HIV+ revelaram resultados ambíguos, no contexto da progressão da doença e valores séricos da MBL, a qual possui similaridades funcionais e estruturais com a ficolina-2. Dois estudos verificaram que os altos valores séricos de MBL estavam associados negativamente com a progressão da doença, tendo um efeito protetor (GARRED *et al.*, 1997; BONIOTTO *et al.*, 2000). Similarmente a este trabalho, Senaldi *et al.* (1995) observaram que os valores séricos de MBL eram mais elevados em pacientes infectados pelo HIV do que em controles. Interessantemente, Maas *et al.* (1998) e Vallinoto *et al.* (2011) observaram uma associação entre variantes causadoras de baixas concentrações de MBL e proteção contra a AIDS. Entretanto, não observaram associação alguma com MBL em pacientes brasileiros HIV+ do estado do Pará – embora este resultado possa estar relacionado ao pequeno número amostral (95 indivíduos).

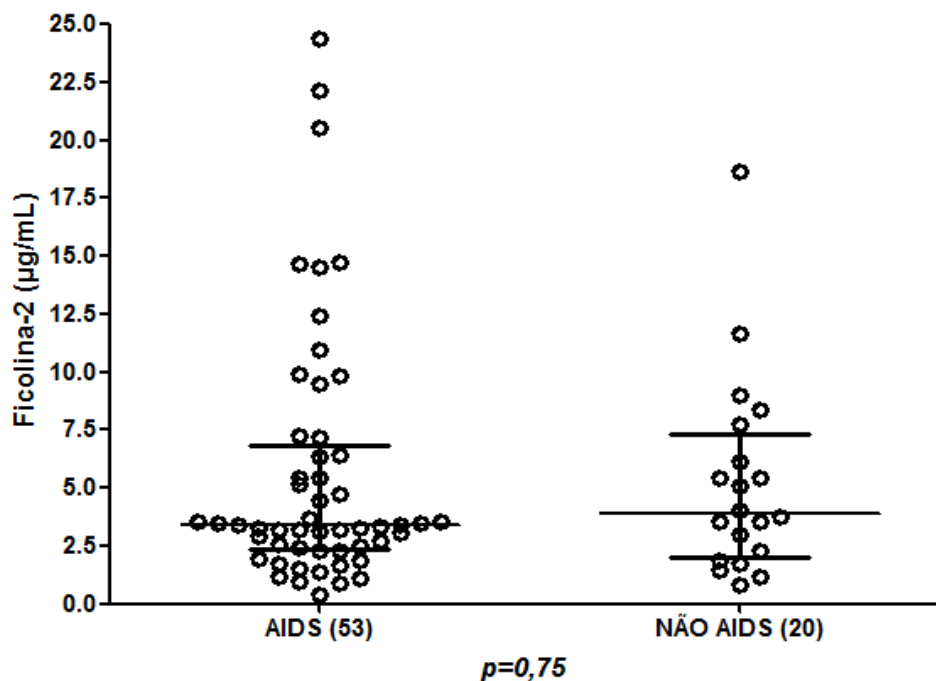


GRÁFICO 4 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 COM RELAÇÃO AO ESTÁGIO DA DOENÇA

LEGENDA: Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Mann-Whitney.

Pacientes com hepatite B crônica apresentaram valores mais baixos de ficolina-2 do que os pacientes com hepatite B aguda ($p < 0,0001$) (Tong *et al.*, 2011). No trabalho de Faik *et al.* (2011), as concentrações mais altas de ficolina-2 foram observadas nos casos de malária grave ($p < 0,0001$), sendo observada uma diminuição significativa da concentração sérica da ficolina-2 entre as fases aguda e pós-tratamento nestes casos ($p < 0,0001$). Na fase pós-tratamento, os pacientes de malária leve apresentaram concentrações mais elevadas da ficolina-2 do que os pacientes de malária grave ($p = 0,0001$) (FAIK *et al.*, 2011). Diferentemente desses estudos, os altos valores séricos observados nos pacientes portadores do HIV não estão relacionados à fase inicial da doença, uma vez que a maioria dos pacientes estudados se encontra no estágio final da doença (AIDS) (53 ou 72,6% *versus* 20 ou 27,4%), no qual os indivíduos apresentam uma importante disfunção do sistema imunológico, facilitando a infecção oportunista por diversos patógenos. Além disso, a fase aguda tem uma duração curta (1 a 4 semanas) e geralmente é oligossintomática. Da mesma forma, pacientes com HCV apresentaram valores séricos mais altos do que os controles e, quando os pacientes crônicos foram

comparados com os pacientes de HCV aguda, verificou-se um aumento significativo na concentração sérica da ficolina-2 nos pacientes de HCV crônica (LIU *et al.*, 2009).

Como o presente estudo é pioneiro em pacientes infectados pelo HIV, são necessários estudos funcionais que verifiquem a capacidade de ligação da ficolina-2 ao HIV e aos patógenos oportunistas relacionados à AIDS como vírus, bactérias, protozoários ou fungos (WIGG, 2008). Entretanto, os altos valores séricos encontrados nos pacientes sugerem que a ficolina-2 tenha um papel importante na amplificação da ativação do sistema complemento durante a resposta de fase aguda, promovendo a opsonização, fagocitose e destruição do HIV e/ou patógenos oportunistas relacionados à AIDS, em associação com a proteína C reativa.

4.5 Associação dos valores séricos da ficolina-2 com os polimorfismos do gene *FCN2*

Embora outros autores tenham sugerido que a variação na concentração sérica da ficolina-2 é determinada geneticamente, de maneira aditiva, pelos SNPs (-986G>A, -602G>A e -4A>G) do promotor de *FCN2* (HUMMELSHOJ *et al.*, 2005; MUNTHER-FOG *et al.*, 2007), Kilpatrick e Chalmers (2012) relataram que as concentrações séricas circulantes de ficolina-2 são razoavelmente estáveis em indivíduos saudáveis e que fatores não genéticos podem estar afetando a variação sérica. De fato, não foi encontrada uma diferença significativa entre as concentrações séricas de ficolina-2 e os genótipos para cada *locus*, assim como para haplótipos, em controles ($p=0,20$) e pacientes ($p=0,58$). Porém, observou-se uma tendência à significância entre valores séricos correspondentes aos mesmos genótipos entre controles e pacientes ($p=0,08$) (Gráfico 5).

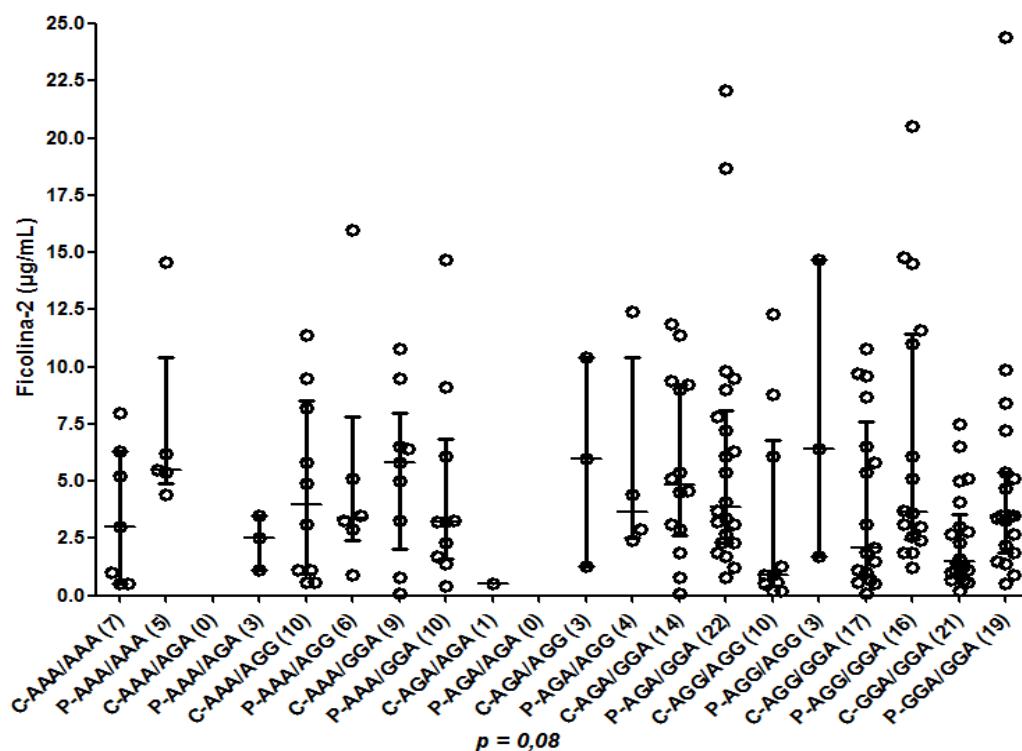


GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AOS GENÓTIPOS -986/-602/-4 EM CONTROLES E PACIENTES

LEGENDA: P – Pacientes; C – Controles. Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Kruskal-Wallis.

Quando os controles homocigotos foram comparados com pacientes homocigotos, verificou-se um aumento significativo das concentrações séricas de ficolina-2 nos pacientes ($p=0,03$). Contudo, os valores séricos gerados pelo haplótipo AGA, associado à suscetibilidade à infecção pelo HIV, são intermediários e permanecem relativamente estáveis durante a doença ($p=0,56$). Resultados semelhantes foram obtidos em trabalho anterior, comparando-se os valores séricos de MBL associados aos mesmos genótipos em pacientes com malária leve e malária grave (BOLDT *et al.*, 2006).

O presente estudo corrobora os resultados obtidos por Faik *et al.* (2011), no qual não foram encontradas diferenças significativas entre os valores séricos da ficolina-2 e os SNPs do promotor de *FCN2* em controles. Contudo, Faik *et al.* (2011) observaram diferenças significativas entre as concentrações da ficolina-2 geradas por diferentes genótipos compostos por haplótipos de *FCN2* em pacientes com malária leve, no estágio agudo da doença ($p=0,008$), assim como Tong *et al.* (2011) em controles ($p<0,0001$) e pacientes com hepatite B ($p=0,008$).

Analisando-se as concentrações séricas de ficolina-2 entre controles e pacientes, diferenças significativas foram encontradas para os *loci*-986 (Gráfico 6) e -602 (Gráfico 7), respectivamente. Similarmente, Assaf *et al.* (2012) observaram uma variação significativa da concentração sérica da ficolina-2 entre os genótipos do *locus* -602, e Tong *et al.* (2011) apenas entre os genótipos do *locus* -986. No entanto, é importante ressaltar que nestes dois últimos estudos, o SNP +6424G>T (*p.A258S*) do exon 8 também foi incluído na análise. Este polimorfismo está associado aos valores séricos mais baixos de ficolina-2 e não foi investigado no presente trabalho.

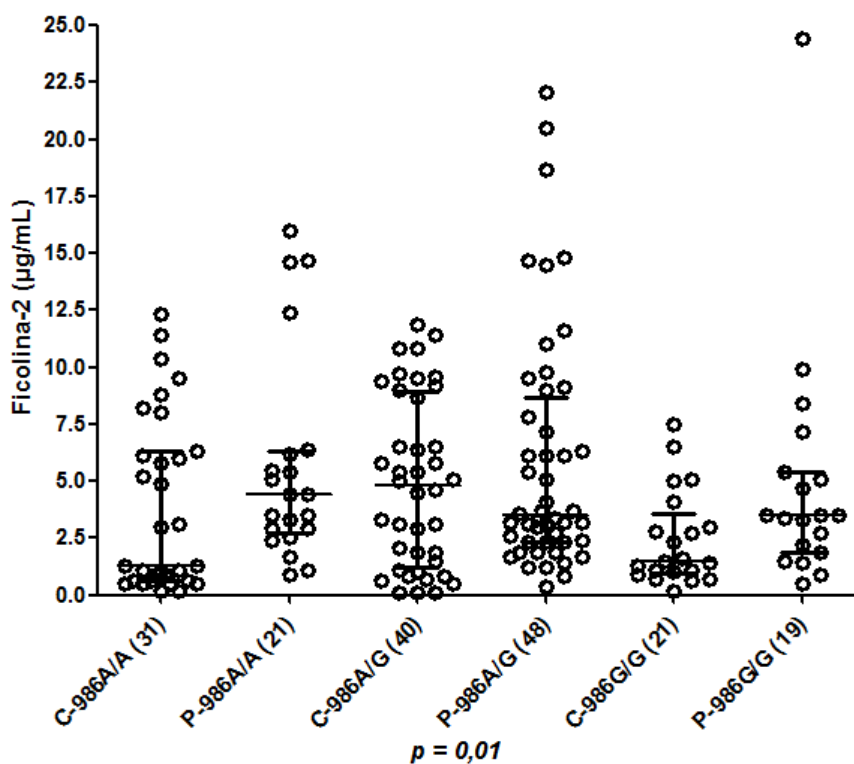


GRÁFICO 6 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AO LOCUS -986 EM PACIENTES E CONTROLES

LEGENDA: P – Pacientes; C – Controles. Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Kruskal-Wallis.

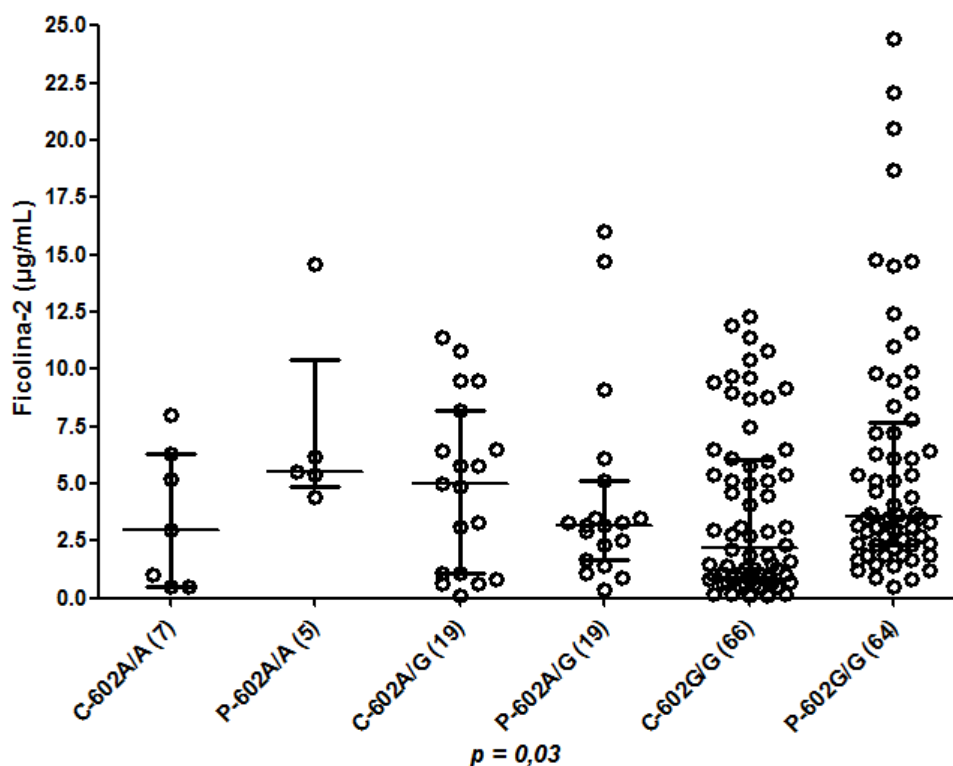


GRÁFICO 7 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AO LOCUS -602 EM PACIENTES E CONTROLES

LEGENDA: P – Pacientes; C – Controles. Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Kruskal-Wallis.

De acordo com a análise *in silico*, a presença das variantes alélicas -986A e -602A, associadas aos valores séricos mais elevados descritos na literatura (HUMMELSHOJ *et al.*, 2005; MUNTHE-FOG *et al.*, 2007), modificam os sítios de ligação de fatores de transcrição. O alelo principal (G) na posição -986 é reconhecido pelo fator de transcrição *NIP (100061)*, enquanto a variante alélica (A) é reconhecido por outras proteínas regulatórias como *YY1 (100012)*, *HEB (100173)*, *MyoD (100075)*. Na posição -602 foi observado que o alelo principal (G) não é reconhecido por nenhum fator de transcrição, enquanto a variante alélica (A) pode ser reconhecida pelo *TF3E3-S (100409)*. Para o *locus-4*, não houve associação estatística entre as concentrações da ficolina-2 e a distribuição alélica (Gráfico 8). A alteração dessas sequências consenso possivelmente é reconhecida por proteínas reguladoras envolvidas na expressão de genes da resposta aguda, porém estudos posteriores são necessários para confirmar essa hipótese.

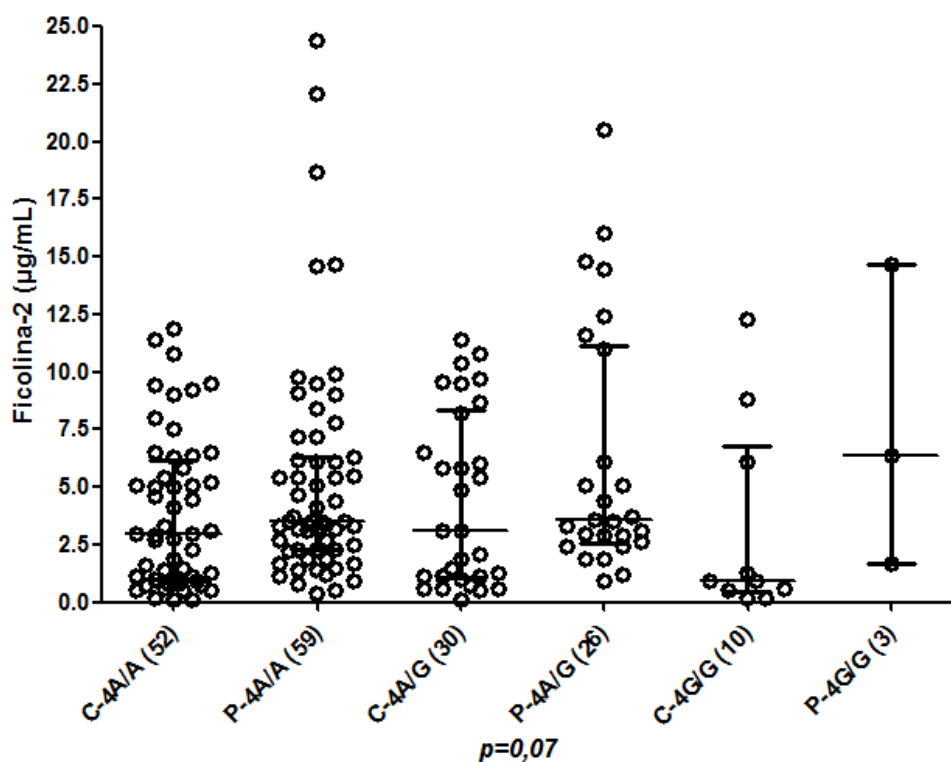


GRÁFICO 8 -CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-2 CORRESPONDENTES AO LOCUS -4 EM PACIENTES E CONTROLES

LEGENDA: Entre parênteses – número de indivíduos.

NOTA: Mediana e variação interquartil estão indicadas; Teste de Kruskal-Wallis.

Através do teste dos sinais (*Wilcoxon Signed Rank Test*), verificou-se que as concentrações séricas do haplótipo GGA mostraram um desvio significativo da mediana prevalente nas elevadas concentrações séricas ($6,0\mu\text{g/ml}$) tanto em pacientes ($p=0,03$) quanto em controles ($p=0,0001$). Este fato pode estar relacionado ao desequilíbrio de ligação absoluto entre este haplótipo e uma mutação não sinônima localizada no exon 8 ($+6424G>T$ ou $p.A258S$), associada aos valores séricos da ficolina-2 mais baixos descritos na literatura (MUNTHER-FOG *et al.*, 2007; FAIK *et al.*, 2011; TONG *et al.*, 2011; ASSAF *et al.*, 2012). Este desvio também é compatível com os dados da literatura de que a presença do nucleotídeo guanina (G) nas posições -986 e -602 e de adenina (A) na posição -4 está associada a baixas concentrações de ficolina-2 no soro de maneira aditiva (MUNTHER-FOG *et al.*, 2007).

A expressão do gene *FCN2* aumenta consideravelmente durante a infecção pelo HIV, como provável resultado da regulação por proteínas a de fase aguda do fígado. Contudo, as concentrações séricas associadas ao haplótipo *AGA* permanecem estáveis. Este haplótipo foi associado à susceptibilidade à doença, levando-nos a sugerir que a sua irresponsividade à regulação é ultimamente responsável pelo aumento da susceptibilidade à infecção.

5 CONCLUSÕES

- Foram identificados quatro haplótipos (AAA, AGA, AGG e GGA) nos controles e pacientes, sendo que foi observada uma associação significativa com o haplótipo e a suscetibilidade a infecção pelo HIV *per se* ($p=0,005$, OR 1,94, IC95% 1,22-3,07).
- Os pacientes infectados pelo HIV apresentaram valores séricos de ficolina-2 significativamente aumentados em relação aos controles ($p=0,007$).
- Não houve associação entre os polimorfismos de *FCN2* fase da doença, prevalência cumulativa de doenças oportunistas relacionadas à AIDS e a presença da coinfeção HCV/HIV.
- Os valores séricos mais elevados estão relacionados às variantes alélicas -986^a ($p=0,01$) e -602A ($p=0,03$), as quais alteram sequências consenso reconhecidas por proteínas reguladoras possivelmente envolvidas na expressão de genes da resposta aguda, acionada na presença de patógenos oportunistas e/ou do próprio HIV.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALTER, M. J. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. **Journal of Hepatology**, v.44, Supl. 1, p.S6-9, 2006.

AMAH, U. K. *et al.* Comparative study of C-Reactive Protein and other biochemical parameters in patients with hepatitis B and malaria in Calabar, Nigeria. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 109-112, 2011.

AMIN, J. *et al.* HIV and hepatitis C coinfection within the CAESAR study. **HIV Medicine**, v. 5, n. 3, p. 174-179, 2004.

AOYAGI, Y. *et al.* L-ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 179–188, 2008.

ARANZABAL, L. *et al.* Influence of liver fibrosis on highly active antiretroviral therapy-associated hepatotoxicity in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 4, p. 588–593, 2005.

ASSAF, A. *et al.* Genetic Evidence of Functional Ficolin-2 Haplotype as Susceptibility Factor in Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-7, 2012.

ATKINSON, A. P. *et al.* L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 3, p. 517-520, 2004.

BARBOSA JÚNIOR, A. *et al.* Tendências da epidemia de AIDS entre subgrupos sob maior risco no Brasil, 1980-2004. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 727-737, 2009.

BETTS, M. R. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 15, n. 13, p. 1219-1228, 1999.

BICA, I. *et al.* Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 492-497, 2001.

BILATE, Angelina M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, São Paulo- Brasil, v. 8, n. 2, p.47-51, 2007.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. **Genes Immunology**, v. 7, n. 5, p. 393-400, 2006.

BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Chapter 4 - Clinical relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. In: MAKOWSKI, G. S. (Org.). **Advances in Clinical Chemistry**. Chennai, India: Elsevier, v. 56, 2012, p. 105-153.

BONACINI, M. *et al.* Survival in patients with HIV infection and viral hepatitis B or C: a cohort study. **AIDS**, v. 18, n. 15, p. 2039-2045, 2004.

BONIOTTO, M. *et al.* Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. **Genes and Immunity**, v. 1, n. 5, p. 346-348, 2000.

BRAGA, W. S. M. *et al.* Baixa prevalência do vírus da hepatite B, vírus da hepatite D e vírus da hepatite C entre pacientes com o vírus da imunodeficiência humana ou síndrome da imunodeficiência adquirida na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.6, p.519-522, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Crítérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças**. Brasília: Ministério da Saúde, Série n. 60, 2004.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Ministério da Saúde, 7 ed., 2008.

BRASIL. Departamento de Informática do SUS. Informações da Saúde: Epidemiológicas e Morbidade. Disponível em <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em 20/04/2011a.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, ano II, n. 01, 2011b.

BUCHBINDER, S. P. *et al.* Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. **The Journal of Infection**, v. 29, n.3, p. 263-269, 1994.

BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed). 00.061.1.06.009. Human immunodeficiency virus 1. **ICTVdB - The Universal Virus Database, versão 3**. ICTVdB: Universidade de Columbia, Nova Iorque, USA, 2004.

CARVALHO, F.H.P. *et al.* Co-infecção por HIV/HCV em hospital universitário de Recife, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 1, p. 133-139, 2009.

CEDZYNSKI, M. *et al.* Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, n. 1, p. 99–104, 2007.

CEDZYNSKI, M. *et al.* L-ficolin (ficolin-2) insufficiency is associated with combined allergic and infectious respiratory disease in children. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2-3 , p. 415–419, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). *Pneumocystis pneumonia*--Los Angeles. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 30, n. 21, p. 250-252, 1981.

CERVIA, J. S. **HIV and Your Immune System**. Disponível em <<http://www.thebody.com/content/art53763.html>>. Acesso em 10/07/2010.

CHEN, X. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behçet's disease. **Journal of Dermatological Science**, v. 43, n. 3, p. 201-205, 2006.

COFFIN, J. *et al.* What to call AIDS virus? **Nature**, v. 321, n. 6065, p. 10, 1986.

DATABASE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. **SNPs: rs3124952, rs3124953 e rs17514136**. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>>. Acesso em 10/02/2012.

DE LUCA, A. *et al.* Coinfection with hepatitis viruses and outcome of initial antiretroviral regimens in previously naive HIV-infected subjects. **Archives of Internal Medicine**, v. 162, n. 18, p. 2125-2132, 2002.

EASTERBROOK, P. J. Non-progression in HIV infection. **AIDS**, v. 8, n. 8, p. 1179-1182, 1994.

ENDO, Y. *et al.* Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. **Genomics**, v. 36, n. 3, p. 515-521, 1996.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. **Immunobiology**, v.212, n. 4-5, p. 371-379, 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FAIK, I. *et al.* Ficolin-2 levels and genetic polymorphisms of *FCN2* in malaria. **Human Immunology**, v. 72, n. 1, p. 74-79, 2011.

FARIAS, N. *et al.* Características dos usuários e fatores associados à soropositividade para o HIV em usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) no Estado de São Paulo, 2000 a 2007. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5, n.60, 2008.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 5, p.346-353, 2002.

GALLO, R. C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 865-867, 1983.

GARRED, P. *et al.* Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, v. 349, n. 9047, p. 236-240, 1997.

GARRED, P. *et al.* MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3—The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 46, n.14, p. 2737-2744, 2009.

GARRED, P. *et al.* The genetics of ficolins. **Journal of Innate Immunology**, v. 2, p. 3-16, 2010.

GOUDET, J. *et al.* Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v. 144, p. 1933-1940, 1996.

GRAHAM, C. S. *et al.* Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Course of Hepatitis C Virus Infection: A Meta-Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, n.4, p.562-569, 2001.

GREENE, W. C.; PETERLIN, B. M. **Molecular Insights Into HIV Biology**. Disponível em <<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-00&doc=kb-02-01-01>>. Acesso em 10/07/2010.

GREUB, G. *et al.* Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. **Lancet**, v. 356, n. 9244, p.1800-1805, 2000.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HERPES, B. L. *et al.* Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 7, p. 851-855, 2006.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 547-578, 2003.

HUMMELSHOJ, T. *et al.* Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 12, p. 1651–1658, 2005.

HUMMELSHOJ, T. *et al.* Comparative study of the human ficolins reveals unique features of ficolin-3 (Hakata antigen). **Molecular Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1623-1632, 2008.

HUNT, P. W. Natural control of HIV-1 replication and long-term nonprogression: overlapping but distinct phenotypes. **The Journal of Infectious Disease**, v. 200, n. 11, p. 1636-1638, 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTVdB – The Universal Database version 4**, 2006.

JENSEN, M. L. *et al.* Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 5, p. 856-865, 2007.

JI, X.; GEWURZ, H., SPEAR, G. T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 2, p. 145-152, 2005.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **AIDS epidemic update**: December 2009. Disponível em <http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf>. Acesso em 15/08/2010.

KILPATRICK, D. C.; CHALMERS, J. D. Human L-Ficolin (Ficolin-2) and Its Clinical Significance. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012 , n. 2012 , p. 1-10 , 2012.

KIRCHHOFF, F. *et al.* Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 4, p. 228-232, 1995.

KRARUP, A. *et al.* L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47513–47519, 2004.

KRARUP, A. *et al.* Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules Mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1052–1060, 2005.

KURAYA, M. *et al.* Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. **Immunobiology**, v. 209, n. 9, p. 689-697, 2005.

LAMA, J.; PLANELLES, V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. **Retrovirology**, v. 4, n. 52, p. 1-25, 2007.

LAU, B. *et al.* C-Reactive Protein Is a Marker for Human Immunodeficiency Virus Disease Progression. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, p. 64-70, 2006.

LAW, W. P. Impact of viral hepatitis co-infection on response to antiretroviral therapy and HIV disease progression in the HIV-NAT cohort. **AIDS**, v. 18, n. 8, p. 1169-1177, 2004.

LEVY, J. A. *et al.* Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, n. 4664, p. 840-842, 1984.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis and long-term survival. **AIDS**, v. 7, n. 11, p. 1401-1410, 1993.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 147–160, 2009.

LINCOLN, D. *et al.* HIV/HBV and HIV/HCV coinfection and outcomes following highly active antiretroviral therapy. **HIV Medicine**, v. 4, n. 3, p. 241-249, 2003.

LIU, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 1996.

MAAS, J. *et al.* Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. **AIDS**, v. 12, n. 17, p. 2275-2280, 1998.

MADEC, Y. *et al.* Undetectable viremia without antiretroviral therapy in patients with HIV seroconversion: an uncommon phenomenon? **Clinical Infectious Disease**, v. 40, n. 9, p. 1350-1354, 2005.

MARCHESINI, A. M. *et al.* Hepatites B e C em usuários de drogas injetáveis vivendo com HIV em São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.41, Supl. 2, p.57-63, 2007.

MARTÍN-CARBONERO, L. *et al.* Incidence and predictors of severe liver fibrosis in HIV infected patients with chronic hepatitis C—a European collaborative study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 1, p. 128–133, 2004.

MATSUSHITA, M. *et al.* A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2448-2454, 1996.

MATSUSHITA, M. Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. **The Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 24-32, 2010.

MELLORS, J. W. *et al.* Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, n. 12, p. 946-54, 1997.

MENDES-CORREA, M. C. J; BARONE, A. A.; GIANINI, R. J. Risk factors associated with hepatitis C among patients co-infected with human immunodeficiency virus: A case-control study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.6, p.762-767, 2005.

MESSIAS-REASON, I. J. T. *et al.* Ficolin 2 (*FCN2*) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 395-399, 2009.

MESSIAS-REASON, I. J. T.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. Functional Haplotypes That Produce Normal Ficolin-2 Levels Protect against Clinical Leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 6, p. 801-804, 2009.

MIKHAIL, M.; WANG, B.; SAKSENA, N. K. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. **AIDS Reviews**, v. 5, n. 4, p. 230-244, 2003.

MORIMOTO, H. K. *et al.* Seroprevalence and Risk Factors for Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 and 2 Infection in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and Other Communities in Paraná, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 21, n.4, p.256-262, 2005.

MUNTHE-FOG, L. *et al.* The Impact of FCN2 Polymorphisms and Haplotypes on the Ficolin-2 Serum Levels. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, n. 4, p. 383-392, 2007.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. O sistema complemento e a imunidade inata. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010a.p. 61-81.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010b. p. 495-544.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASE. **Structure of HIV**. Disponível em <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/pages/structure.aspx> Acesso em 10/07/2010.

NG, P. M. *et al.* C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. **EMBO Journal**, v. 26, p. 3431-3440, 2007.

OHASHI, T.; ERICKSON, H. P. Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, n. 2, p. 223-32, 1998.

OKULICZ, J. F. *et al.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 11, p. 1714-1723, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO case definitions of hiv for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children**. Genebra, Suíça: WHO Press; 2007. Disponível em <<http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/HIVstaging150307.pdf>>. Acesso em 10/07/2010.

PALELLA, F. J. *et al.* Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. **Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes**, v. 43, n. 1, p. 27-34, 2006.

PANTALEO, G; FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of HIV Infection. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 825–854, 1996.

PAVAN, M.H. *et al.* Viral hepatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. **Brazilian Journal of infectious Disease**, v. 7, n.4, p. 253-61, 2003.

PHAIR, J. P. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 10, n. 8, p. 883-885, 1994.

PIACENTINI, L. *et al.* Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, n. 1, p. 110-124, 2009.

PIROTH, L. *et al.* Hepatitis C virus co-infection is a negative prognostic factor for clinical evolution in human immunodeficiency virus-positive patients. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 7, n. 4, p. 302-308, 2000.

POROPATICH, K.; SULLIVAN, D. J. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. **The Journal of General Virology**, v. 92, Pt. 2, p. 247-68, 2011.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

ROCKSTROH, J. K.; SPENGLER, U. HIV and hepatitis C virus co-infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 7, p. 437-444, 2004.

ROCKSTROH, J. K. Influence of viral hepatitis on HIV infection. **Journal of Hepatology**, v.44, Supl 1, p.S25-27, 2006.

RODRIGUES, M. D. C. V. *et al.* A co-infecção HIV/HCV em Serviços de Doenças Infecciosas de Moçambique e do Brasil: estudo comparativo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.5, p.518, 2008.

ROOS, A. *et al.* A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. **European Journal of Immunology**, v. 34, p. 921–929, 2004.

SACKS, S. L. *et al.* Lessons from HIV and hepatitis viruses. **Antiviral Research**, v.63, Supl.1, p. S11-8, 2004.

SAKSENA, N. K. *et al.* Elite HIV controllers: myth or reality? **AIDS Reviews**, v. 9, n. 4, p. 195-207, 2007.

SANTOS, K. F. *et al.* Alterações laboratoriais encontradas em indivíduos co-infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e pelo Vírus da Hepatite C (HCV). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.21-24, 2010.

SCHUG, J. Using TESS to Predict Transcription Factor Binding Sites in DNA Sequence. **Current Protocols in Bioinformatics**, Cap. 2, Unid. 2.6, 2008.

SEGURADO, A. C. P. *et al.* Hepatitis C Virus Coinfection in a Cohort of HIV-Infected Individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and Associated Factors. **AIDS Patient Care and STDs**, v.18, n.3, p.135-143, 2004.

SENALDI, G. *et al.* Circulating levels of mannose binding protein in human immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infection**, v. 31, n. 2, p. 145–148, 1995.

SHEPPARD, H. W. *et al.* The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. **AIDS**, v.7, n. 9, p. 1159-1166, 1993.

SORIANO, V. *et al.* Viral hepatitis and HIV co-infection. **Antiviral Research**, v. 85, n. 1, p. 303-315, 2010.

SULKOWSKI, M. S. Hepatitis C Virus Infection in HIV-infected patients. **Current Hepatitis Reports**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2002.

SULKOWSKI, M. S. The HIV-Coinfected Patient: Managing Viral Hepatitis. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.45, Supl. 2, p.S36-37, 2007.

SULKOWSKI, M. S. Viral Hepatitis and HIV coinfection. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 353-367, 2008.

THOMAS, D. L. *et al.* The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. **Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 4, p. 450–456, 2000.

TONG, H. V. *et al.* Ficolin-2 Levels and *FCN2* Haplotypes Influence Hepatitis B Infection Outcome in Vietnamese Patients. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2011.

UITENBROEK, D. G. **SISA Fisher 2 by 5**. 1997. Disponível em: <<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>> Acesso em: 23/11/2010.

VALLINOTO *et al.* Characterization of mannose-binding lectin plasma levels and genetic polymorphisms in HIV-1-infected individuals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 1-3, 2011.

WATANABE, H. Serum L-ficolin levels in patients with systemic lupus erythematosus. **Modern Rheumatology**, *Online First*, 2012.

WEBER, R. *et al.* Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 15, p. 1632–1641, 2006.

WIGG, M. D. Vírus da Imunodeficiência Humana. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 410-447.

ZHAN, L.; ZHANG, X-L. Binding of L-ficolin to HCV glycoprotein E1 stimulates opsonophagocytosis to targets cells expressed E1 by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 44, n.1-3, p. 262, 2007.

ZHANG, J. *et al.* Local Inflammation Induces Complement Crosstalk Which Amplifies the Antimicrobial Response. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2009.

ZOCRATTO, K. B. F. *et al.* Infecções e co-infecções pelos vírus HCV e HIV: uso de drogas injetáveis e comportamento sexual, Projeto AJUDE-Brasil I. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.4, p.839-848, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 –	TERMO DE APROVAÇÃO ATUALIZADO DO PROJETO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP/HC).....	74
ANEXO 2 –	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	75
ANEXO 3 –	PROTOCOLO DA QUANTIFICAÇÃO DE FICOLINA-2 NO PLASMA (HK336).....	76

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO ATUALIZADO DO PROJETO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP/HC)



Curitiba, 02 de agosto de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Melissa Negro Luciano
Lara J. T. de Messias-Reason
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - Paraná

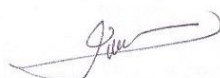
Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que a **Solicitação de Aprovação do Novo Cronograma e Inclusão de Dois Novos Pesquisadores** (Alberto Cardoso Martins Lima, Caroline Grisbach), referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DE MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO POR HIV (VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA)", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em 29 de julho de 2011.

O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e suas complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0079.0.208.000-07
Registro CEP: 1409.074/2007-04

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 LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar como parte do grupo controle de um estudo intitulado “**Investigação do polimorfismo gênico de marcadores da resposta imune inata na infecção por HIV**”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b) O objetivo desta pesquisa é conhecer a associação entre proteínas que participam da resposta imunológica às infecções e a evolução da AIDS.
- c) Caso você participe da pesquisa, será utilizada apenas uma parte do sangue que você irá coletar para realizar os exames laboratoriais de rotina.
- d) Como em qualquer exame você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados com a coleta de sangue.
- e) Os riscos que envolvem sua participação no estudo são relacionados apenas com a coleta de sangue e podem ser dor no local da punção ou hematoma.
- f) Contudo os benefícios esperados são: contribuir para o melhor conhecimento da resposta imunológica ao HIV.
- g) Os mestrandos Alberto Cardoso Martins Lima e Caroline Grisbach, sob a orientação da Dra. Iara José Tabora de Messias-Reason, telefone 41 3360-1800 ramal 6537/6523, responsável por este estudo, estarão sempre a sua disposição para qualquer esclarecimento.
- h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem liberdade de recusar ou se aceitar a participar do estudo, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são da sua responsabilidade.
- m) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data ___/___/_____

Assinatura

Pesquisador:

ANEXO 3 – PROTOCOLO DA QUANTIFICAÇÃO DE FICOLINA-2 NO PLASMA (HK336)

Material: Plasmas armazenados a -70°C

- 1 – Diluição em 10x do plasma com o tampão de ligação de ficolina-2;
- 2 – Transferir 100 μl do padrão, amostras e controles, preferencialmente em duplicata, para seus respectivos poços;
- 3 – Aplicar a fita adesiva sobre a placa e batê-la levemente para eliminar qualquer bolha de ar;
- 4 – Incubar a placa ou strips durante 1h a 37°C ;
- 5 – Lavar o prato 4 vezes com o tampão de lavagem;
- 6 – Remover cuidadosamente o selante da placa;
- 7 – Esvaziar a placa por inversão, agitá-la dentro de uma pia e mantê-la invertida sobre folhas de papel;
- 8 – Adicionar 200 μl de tampão de lavagem em cada poço e esperar 20 segundos;
- 9 – Repetir os procedimentos 7 e 8 por 3 vezes;
- 10 – Esvaziar a placa e batê-la gentilmente sobre folhas de papel;
- 11 – Adicionar 100 μl do anticorpo biotinizado em cada poço;
- 12 – Cobrir a bandeja com a cobertura adesiva e incubar por 1h em temperatura ambiente;
- 13 – Repetir os procedimentos 7 e 8 por 3 vezes;
- 14 – Adicionar 100 μl do conjugado de estreptavidina ligada à peroxidase diluída em cada poço;
- 15 – Repetir o procedimento 12;
- 16 – Repetir os procedimentos 7 e 8 por 3 vezes;
- 17 – Adicionar 100 μl do substrato TMB em cada poço;
- 18 – Cobrir a bandeja com a cobertura adesiva e incubá-la por 20 a 30 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz solar;
- 19 – Adicionar 100 μl da solução de parada e misturar a solução através da movimentação circular da placa. Bater gentilmente a bandeja para a eliminação das bolhas de ar;
- 20 – Fazer a leitura do placa em 450 nm, dentro dos 30 minutos após a adição da solução de parada.