

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA CAVASSIN PAES

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV E COINFECTADOS PELO HBV E HCV

Curitiba
2014

MARINA CAVASSIN PAES

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV E COINFECTADOS PELO HBV EHCV

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

Co-Orientadora: Dr^a Angelica Beate Winter Boldt

Curitiba

2014

Paes, Marina Cavassin

Polimorfismos do gene *Masp 1* e concentração sérica de Masp-3 em pacientes infectados pelo HIV e coinfectados pelo HBV e HCV / Marina Cavassin Paes – Curitiba, 2014.

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

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Messias-Reason

Coorientadora: Dra. Angelica Beate Winter Boldt

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

Inclui bibliografia

1. *Masp 1*. 2. Masp-3. 3. HIV. 4. Lectinas. 5. Hepatites virais.
I. Messias-Reason, Iara José de. II. Boldt, Angelica Beate Winter.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.9792

TERMO DE APROVAÇÃO

MARINA CAVASSIN PAES

**Título: "POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1* E
CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE *MASP-3* EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV E COINFECTADOS PELO HBL E HCV"**

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



Profa. Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason
Orientadora



Profa. Dra. Lilian Pereira-Ferrari
Faculdades Integradas do Brasil – UniBrasil



Dra. Luine Rosele Renaud Vidal
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 24 de fevereiro de 2014.

Aos meus pais João Wilson e Mirian, minha irmã Mariana, meu cunhado José Augusto e meu esposo Guilherme pelo amor incondicional, confiança, compreensão, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus por me proporcionar a oportunidade de realizar mais esse projeto e concretizar este mestrado.

À minha família, que foi o pilar de sustentação nesse período, em especial, aos meus pais, João Wilson e Mirian, que durante esses dois anos foram incentivadores e caminharam junto comigo, se preocuparam e me ajudaram das mais diversas maneiras em todos os momentos que precisei, obrigada pela confiança e por fazer de mim o reflexo de vocês, batalhadores e guerreiros.

Ao meu esposo, Guilherme, que mesmo distante, soube me compreender e jamais me abandonou, deixou de me incentivar ou me fortalecer quando eu tive vontade de desistir ou me senti enfraquecida, obrigada pelo amor incondicional e pelo carinho.

À minha irmã e meu cunhado, Mariana e José Augusto, por incentivarem e servirem de exemplo, por me proporcionarem momentos de distração muito agradáveis. Obrigada Mari pelas palavras de incentivo, pelas broncas e por acreditar que eu sou capaz.

À Família do Gui, que me acolheu, me incentivou e me deu maior força nesse período.

À todos os meus amigos e familiares, que solidários compreenderam o período de isolamento e dedicação ao mestrado. Obrigada pela compreensão.

À Professora Dr^a Iara Tabora de Messias-Reason, pela orientação, e principalmente por aceitar me orientar e acreditar que eu iria conseguir fazer um bom trabalho, muito obrigada pela confiança, carinho, compreensão e palavras de incentivo e fortalecimento.

À Professora Dr^a Angelica Boldt, pela co-orientação, pelos ensinamentos e por acreditar que eu conseguiria, obrigada pelas palavras de incentivo, consolo, e por me dar força quando eu pensei em desistir.

Aos demais Professores do LIPM Dr^a Shirley e Dr Renato, obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e por toda contribuição que foi dada neste trabalho.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Imunopatologia da UFPR, que me ajudaram, ensinaram e também estiveram ao meu lado para a conclusão deste trabalho.

Às minhas queridas “Cientetes”, que jamais me deixaram desanimar e sempre estiveram junto comigo, sendo para rir ou para chorar, para ensinar, dividir e colaborar com meu trabalho. Em especial, Amanda e Karla, que fizeram com que o meu mestrado fosse repleto de cores e flores, as levarei carinhosamente em meu coração para sempre.

À Hellen e a Marcia, por me ajudarem com este trabalho de MASP-1, e ao Tulio por ter se dedicado a me ensinar e me passar o conteúdo de VSIg4, que infelizmente não consegui concluir.

Aos pacientes, doadores do banco de sangue, que eu não conheço e talvez jamais conheça, mas que se prontificaram a colaborar com a Ciência.

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

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

RESUMO

A via das lectinas do sistema complemento é ativada na infecção pelo HIV por meio do reconhecimento de glicoproteínas do vírus por ficolinas e pela lectina ligante de manose (MBL), cujas variantes genéticas estão associadas com a susceptibilidade a infecções. As serinas proteases associadas a MBL, como MASP-1, MASP-3 e a proteína truncada MAP44, são codificadas pelo gene *MASP1*, que apresenta polimorfismos cujo papel na susceptibilidade a doenças ainda é desconhecido. Para verificar uma possível associação entre polimorfismos de *MASP1* e concentração sérica de MASP-3 e a infecção pelo HIV, foram genotipados os polimorfismos rs72549262 (+57902 C>G) e rs1109452 (+58267 C>T), localizados na região não traduzida a 3' no exon 12, por PCR-SSP biespecífica. Um total de 205 pacientes HIV+ e 210 controles foram estudados. Entre os pacientes, 88 (43%) eram unicamente infectados pelo HIV, 12 (5,8%) infectados pelo HIV e HCV, 81 (40%) HIV+ e HBV+ e 17 (8,3%) eram triplamente infectados pelo HIV, HBV e HCV (7 indivíduos não foram avaliados para a infecção pelo HBV). As concentrações séricas de MASP-3 foram medidas por ELISA em 152 pacientes e 74 controles. Foram identificados três haplótipos: *MASP1**CC, CT e GT, com frequências de 68,6%, 23,8% e 7,6% nos controles e 68,8%, 22% e 9,3% nos pacientes, respectivamente (P = n.s.). Não se observaram heterozigotos CC/GT em indivíduos HIV/HCV+ (P=0,0102 comparados a indivíduos HIV+HBV+HCV- e P=0,0294 comparados a indivíduos HIV+HCV-). Uma associação entre os genótipos contendo CT e GT e concentrações mais baixas de MASP-3 foi observada nos controles (16,14 em homozigotos CC/CC vs. 11,61 µg/mL nos demais, P=0,016). Concentrações elevadas de MASP-3, porém não os respectivos genótipos, foram associadas à susceptibilidade a infecção pelo HIV (22,16 µg/mL no total de pacientes vs. 14,37 µg/mL nos controles, P=0,0002). Esta associação permaneceu após regressão logística binária incluindo ou não os pacientes coinfectados (P<0,0001, OR=12,2 [IC95%= 3,95-37,67]) e P<0,0001, OR=12,95 [IC95%= 3,19-52,65], respectivamente) e avaliando apenas pacientes HIV/HBV+ (P<0,0001, OR=8,79 [IC95%=2,79-27,66]), independentemente de idade, gênero e grupo étnico. As concentrações de MASP-3 foram ainda mais elevadas nos pacientes HIV+HBV+HCV+ (P=0,031 no modelo reduzido de regressão). Contudo, as concentrações de MASP-3 não se correlacionaram com a carga viral ou com a contagem de células TCD4 nos pacientes HIV+. Os resultados levam-nos a sugerir que as concentrações basais de MASP-3 são influenciadas por polimorfismos do gene *MASP1* e que genótipos heterozigotos *MASP1**CC/GT podem conferir resistência à infecção pelo HCV. Por outro lado, concentrações elevadas de MASP-3 estão fortemente associadas à infecção pelo HIV e a coinfeção HBV/HCV, independentemente dos genótipos associados.

ABSTRACT

The lectin pathway of complement is activated through the recognition of HIV glycoproteins by ficolins and mannose-binding lectin (MBL), whose genetic variants are associated with the susceptibility to HIV infection. Serine proteases associated with MBL, such as MASP-1, MASP-3 and the truncated MASP-4 protein are encoded by *MASP1* gene, which is polymorphic but its role in disease susceptibility is still unknown. In order to verify a possible association between *MASP1* polymorphism and HIV infection, the variants rs72549262 (+57902 C>G) and rs1109452 (+58267 C>T), located in the 3' untranslated region of exon12, were genotyped by bispecific PCR-SSP. A total of 210 controls and 205 HIV patients (88/43% only infected by HIV, 12/ 5.8% HIV+ and HCV+, 81/40% HIV+ and HBV+ and 17/ 8.3% HIV+, HBV+ and HCV+) (7 individuals were not evaluated for HBV infection). Serum concentration of MASP-3 was measured by ELISA in 152 HIV patients and 74 controls. Three haplotypes were identified: *MASP1**CC, CT and GT, with frequencies 68.6%, 23.8% and 7.6% in the controls (in Hardy-Weinberg equilibrium) and 68.8%, 22% and 9.3% in the patients, respectively. There were no CC/GT heterozygotes among HIV+/HCV+ patients (Fisher's exact test P=0.0102 compared with HIV+HBV+HCV- and P=0.0294 compared with HIV+HCV-). In the controls an association between genotypes with CT and GT and low MASP-3 concentrations was observed (16.14 µg/mL in CC/CC homozygotes vs. 11.61 µg/mL in the other genotypes, Mann-Whitney P=0.016). Higher MASP-3 levels, but not the corresponding genotypes, were associated with HIV infection (22.16 in all patients vs. 14.37 µg/mL in the controls, Mann-Whitney P=0.0002). This association remained after binary logistic regression including or not coinfecting patients (P<0.0001, OR=12.2 [CI95%=3.95-37.67]) and P<0.0001, OR=12.95 [CI95%=3.19-52.65], respectively) and evaluating only HIV+/HBV+ (P<0.0001, OR=8.79 [CI95%=2.79-27.66]), independently of age, gender and ethnic group. MASP-3 concentrations were even higher in the HIV+/HBV+/HCV+ (P=0.031 in the reduced regression model). Nevertheless, MASP-3 concentrations were not correlated with viral load or CD4+ T cell counts in HIV+ patients. These results lead us to suggest that basal MASP-3 concentrations are influenced by *MASP1* gene polymorphisms and that *MASP1**CC/GT heterozygotes are protective against HCV infection in HIV patients. On the other hand, higher concentrations of MASP-3 were strongly associated with HIV infection and HBV/HCV coinfections, independently of the associated genotypes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	TAXA DE INCIDÊNCIA DE AIDS POR SEXO E RAZÃO DE SEXOS. BRASIL, 2002 a 2011	22
FIGURA 2 -	TAXA DE INCIDÊNCIA DE AIDS/100 MIL HABITANTES, SEGUNDO A REGIÃO DE RESIDÊNCIA E ANO DE DIAGNÓSTICO	23
FIGURA 3 -	ESTRUTURA DO VÍRUS HIV – 1.....	26
FIGURA 4 -	CICLO DE VIDA DO HIV	27
FIGURA 5 -	VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO	38
FIGURA 6 -	MBL/FICOLINAS ASSOCIADAS AS MASPs (1, 2 e 3)	39
FIGURA 7 -	GENE <i>MASP1</i> E SUA LOCALIZAÇÃO NO CROMOSSOMO 3	41
FIGURA 8 -	SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DO GENE <i>MASP1</i> E LOCALIZAÇÃO NAS PROTEÍNAS MASP-1, MAP44 E MASP-3.....	41
FIGURA 9 -	COMPARAÇÃO DE MODELO DE ATIVAÇÃO DE MASP-1 E MASP-2	43
FIGURA 10 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MBL INTERAGINDO COM O HIV.....	45
FIGURA 11 -	REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO EXON 12 DO GENE <i>MASP1</i>	50
FIGURA 12 -	REGIÕES DE ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DO GENE <i>MASP-1</i> NA PCR-SSP.....	50
FIGURA 13 -	PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES E CONTROLES APÓS A REAÇÃO DE PCR-SSP	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE HIV E AIDS SEGUNDO UF E REGIÃO DE RESIDÊNCIA. BRASIL, 1980 A 2012.....	23
TABELA 2 -	CRITÉRIOS DE DEFINIÇÃO DE CASOS DE AIDS EM INDIVÍDUOS COM IDADE IGUAL OU SUPERIOR A 13 ANOS	30
TABELA 3 -	DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS DE ACORDO COM O CDC ADAPTADO.....	31
TABELA 4 -	ESCALA DE SINAIS, SINTOMAS OU DOENÇAS.....	32
TABELA 5 -	CLASSIFICAÇÃO DOS CINCO TIPOS DE PROGRESSÃO PRA AIDS.....	33
TABELA 6 -	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS (%) DOS GRUPOS INVESTIGADOS.....	48
TABELA 7 -	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS.....	49
TABELA 8 -	INTERPRETAÇÃO DAS BANDAS DA FIGURA 14	52
TABELA 9 -	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (%) DOS PACIENTES ESTUDADOS.....	55
TABELA 10 -	FREQUÊNCIA DOS ALELOS MENOS COMUNS DE POLIMORFISMOS DO EXON 12 DE <i>MASP1</i> NOS DIFERENTES GRUPOS INVESTIGADOS (% \pm DP)	56
TABELA 11 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (%) DE POLIMORFISMOS DO EXON 12 DE <i>MASP1</i>	57
TABELA 12 -	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (%) DE POLIMORFISMOS DO EXON 12 DO GENE <i>MASP1</i>	58
TABELA 13 -	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR <i>LOCUS</i> E HAPLÓTIPO NO GRUPO CONTROLE.....	58
TABELA 14 -	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR <i>LOCUS</i> E HAPLÓTIPO NOS PACIENTES HIV+.....	58
TABELA 15 -	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-3 (μ g/mL).....	61

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3 EM PACIENTES E CONTROLES COM ALELO T E SEM ALELO T	60
GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3 EM PACIENTES HIV+ E CONTROLES.....	61
GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3 EM CONTROLES E PACIENTES HIV E COINFECTADOS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

3 MC	Síndrome de Michels, Malpuech, Mingarelli e Carnevale
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARC	Complexo relacionado à AIDS
ARV	Antirretroviral
CCP	<i>Complement Control Protein</i> – Proteínas de controle do complemento
CCR5	<i>CC-Chemokine Receptor 5</i> – Receptor de quimiocinas
CD 4+	Marcador de membrana de linfócitos T auxiliares
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i> – Centros de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	<i>complementary DNA</i> - Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CL-K1	<i>CDC-like kinase 1</i> – Proteína quinase dupla especificidade CLK1
CMIA	<i>Chemiluminescent microparticle immunoassay</i> - Ensaio imunológico quimioluminescente magnético
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i> - Domínio de reconhecimento de carboidratos
CXCR4	<i>Chemokine receptor type 4</i> – Receptor de quimiocinas tipo 4
DC-SIGN	<i>Dendritic Cells - specific intercellular adhesion molecule 3 - grabbing non integrin</i> – não integrina capturando a molécula 3 de adesão intercelular específica de células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DST	Doença sexualmente transmissível
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELFA	Ensaio imunológico fluorescente ligado a enzima
Env	Envelope
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de

	imunoabsorbância enzimática
EQL	Ensaio imunológico com revelação quimioluminescente
EUA	Estados Unidos da América
Gag	Grupo antígeno específico
gp 120	Glicoproteína 120
gp41	Glicoproteína 41
HAPMAP	<i>Haplotype map</i> – Mapa haplotípico
HBV	Vírus da hepatite B
HC	Hospital de Clínicas
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IB	Imunoblot
IBR	Imunoblot rápido
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN β	Interferon beta
INNTR	Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa
INTR	Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa
IP	Inibidores da protease
ITR	Inibidores da transcriptase reversa
LTNP – EC	<i>Long term non-progressor – elite controllers</i> – Controladores de elite
LTNP – NC	<i>Long term non-progressor, viremic non controllers</i> - Não controladores de viremia
LTNP – VC	<i>Long term non-progressor, viremic controllers</i> – Controladores de viremia
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i> – Serina protease associada à MBL
MASP1	Gene <i>MASP1</i> / <i>MBL-associated serine protease 1</i> – Serina protease 1 associada à MBL
MBL	<i>Mannose Binding Lectin</i> – Lectina ligante de manose
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MEIA	<i>Microparticle enzyme-linked immunoassay</i> - Ensaio

	imunoenzimático de micropartículas
n.s.	Não significativo
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> – Fator nuclear de ativação de células T
NFkB	<i>Factor nuclear kappa B</i> – Fator nuclear k B
OMS	Organização mundial da saúde
OR	<i>Odds ratio</i> – Razão de probabilidade
P	<i>Chronic progressors</i> – Progressores típicos
p17	Proteína 17
p24	Proteína 24
pb	Pares de bases
PCR-SSP	<i>Sequence-specific primer-PCR</i> – PCR com seqüência específica de primers
Pol	Polimerase
Ver	<i>Regulator of Expression of Virion Proteins</i> – Proteína reguladora da expressão viral
RNA	Ácido ribonucleico
RP	<i>Rapid progressors</i> – Progressores rápidos
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência Simia
SNP	Single
SUS	Sistema único de saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TARV	Terapia anti-retroviral
Tat	<i>Trans-Activator of Transcription</i> – Proteína ativadora da transcrição viral
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF α	Fator de necrose tumoral
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i> – Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
UTR	<i>Untranslated region</i> – Região não traduzida
WB	Western Blot

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 JUSTIFICATIVA.....	19
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.2.1 Objetivo geral	20
1.2.2 Objetivos específicos.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)	21
2.1.1 Epidemiologia mundial	21
2.1.2 Epidemiologia no Brasil	22
2.1.3 Transmissão e grupos de risco	24
2.1.4 Estrutura molecular e biológica do HIV	25
2.1.5 Ciclo de vida e infecção pelo HIV	26
2.1.6 Imunopatologia da infecção pelo HIV	28
2.1.6.1 Avaliação imunológica.....	29
2.1.7 Progressão HIV-AIDS	32
2.1.8 Diagnóstico	34
2.1.9 Tratamento	34
2.2 COINFEÇÃO HEPATITES VIRAIS B E C	36
2.3 SISTEMA COMPLEMENTO	37
2.3.1 Via das lectinas	38
2.4 GENE <i>MASP1</i>	40
2.5 INTERAÇÃO ENTRE MBL E HIV.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 CASUÍSTICA	46
3.1.1 Pacientes	46
3.1.2 Controles	47
3.2 MÉTODOS	48
3.2.1 Extração de DNA	48
3.2.2 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP) do gene <i>MASP1</i>	48
3.2.3 Eletroforese em gel de agarose	51
3.3 ENSAIOS DE IMUNOABSORBÂNCIA ENZIMÁTICA (ELISA)	52
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	54
4.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, HAPLOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DO GENE <i>MASP1</i>	56
4.3 ASSOCIAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE MASP-3 COM OS POLIMORFISMOS DO EXON 12 DO GENE <i>MASP1</i>	59
4.4 VALORES SÉRICOS DE MASP-3 E ASSOCIAÇÕES COM INFECÇÃO PELO HIV.....	60
5 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1981 e desde então representa uma grande epidemia mundial. Atualmente, representa um dos maiores problemas de saúde mundial, devido ao seu caráter pandêmico e alta gravidade (HOPE *et al.* 2012; BRASIL, 2010). A AIDS é causada pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus 1 e 2*), retrovírus pertencente à família Retroviridae, gênero *Lentiviridae*, e é caracterizada por afetar o sistema imunológico, destruindo principalmente os linfócitos T CD4+ .. Devido ao comprometimento imunológico os indivíduos infectados pelo HIV, são suscetíveis a diversas infecções oportunistas, caracterizando o quadro clínico característico da AIDS (BRASIL, 2010).

O modo de transmissão do HIV envolve a via sexual (esperma e secreção vaginal), sangue (parenteral e vertical) e leite materno. A partir do momento da instalação da infecção, a transmissão do vírus já pode ocorrer, sendo que indivíduos com infecção aguda ou imunossupressão avançada possuem maior carga viral no sangue e nas secreções sexuais. Entretanto, a rota de transmissão compreende apenas um dos fatores para aquisição do HIV, sendo igualmente importante para que a infecção se instale a virulência do patógeno e os fatores genéticos do hospedeiro (BRASIL, 2010).

A história natural da infecção pelo HIV vem sendo alterada devido ao uso da terapia antirretroviral (TARV), iniciada no Brasil em 1996. Os medicamentos antirretrovirais interferem no ciclo de vida do HIV, reduzindo a carga viral, preservando as células T CD4⁺ e diminuindo a destruição do sistema imunológico, retardando assim o aparecimento da doença clínica, a AIDS (NIAID, 2012).

Indivíduos infectados pelo HIV também estão em risco de adquirir outros agentes infecciosos, incluindo os vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV). Esses vírus são transmitidos através de rotas semelhantes incluindo uso de drogas injetáveis, contato sexual, ou de mãe para filho durante a gravidez ou parto. A coinfeção com as hepatites virais pode complicar a terapia antirretroviral, aumentando o risco de hepatotoxicidade relacionada com o tratamento (SULKOWSKI *et al.*, 2008).

O sistema complemento compõe uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro contra infecções, tendo relevante papel na neutralização e opsonização de vírus. A via das lectinas do complemento é iniciada através do reconhecimento de resíduos acetilados ou de açúcar presentes na superfície de patógenos pela lectina ligante de manose (MBL) ou ficolinas 1, 2 ou 3 (M, L ou H). Contudo a ativação da via das lectinas é dependente das serina proteases MASP-1 (mannan-binding lectin serine protease 1 – serina protease 1 associada à MBL) e MASP-2 (DATTA, P *et al.*, 2006), as quais são imprescindíveis na formação da C3 convertase.

O envolvimento da via das lectinas na infecção pelo HIV foi demonstrado por diferentes autores: CHACKERIAN *et al.*, 1997; EZEKOWITS *et al.*, 1989; DATTA *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2002 e outros. Existem evidências que MBL e ficolinas reconhecem glicoproteínas do envelope do HIV, como gp120, culminando na ativação do complemento através de MASP-1 e MASP-2 (HACKERIAN *et al.*, 1997; EZEKOWITS *et al.*, 1989; DATTA *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2002).. O gene *MASP1*, localizado no cromossomo 3 (3q27-q28) possui 18 exons e dá origem por recomposição alternativa a três diferentes produtos: MASP-1, MASP-2 (uma proteína truncada de 44 kDa) e MASP-3. Polimorfismos do gene *MASP1* possuem ainda papel desconhecido na susceptibilidade à doenças. Sabe-se, contudo, que o polimorfismo rs7851696, localizado na região que codifica exclusivamente a MASP-3, aumenta a susceptibilidade à colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (HAERYNCK *et al.* 2012).

A proteína MASP-3 é um zimogênio, ativado principalmente após o reconhecimento de resíduos acetilados em agentes alvos pela ficolina H (codificada pelo gene *FCN3*), ficolina mais abundante no plasma. Complexada às ficolinas ou a MBL, a MASP-3 inibe a formação da C3-convertase, regulando negativamente a cascata do complemento (SKJOEDT *et al.* 2010). MASP-3, juntamente com CL-K1 (CDC-like kinase 1) também intervém na migração celular durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados. A ausência dessas duas proteínas culmina no desenvolvimento de múltiplas anormalidades em seres humanos, incluindo defeitos craniofaciais, esqueléticos, renais e aberrações neuronais, que caracterizam a síndrome 3MC (ROORYCK *et al.*, 2011).

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 a progressão da doença, conduzindo a possíveis medidas terapêuticas. Dessa forma, polimorfismos genéticos relacionados ao sistema do complemento, especialmente da via das lectinas, representam fortes candidatos de associação com a susceptibilidade a infecção pelo HIV, assim como com a progressão da doença e presença de coinfeção com HBV e HCV.

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que o complemento constitui uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro com importante papel na neutralização e fagocitose de vírus, polimorfismos de componentes da via das lectinas do sistema do complemento e suas concentrações plasmáticas representam fortes candidatos de associação com a infecção pelo HIV, assim como com a progressão da doença e com a presença de coinfeção pelos vírus das hepatites B e C (HBV e HCV). Embora tenham-se observado associações importantes entre os polimorfismos e concentrações da MBL e a susceptibilidade às infecções pelo HIV, HBV e HCV, pouco se sabe sobre o papel desempenhado por outros componentes desta via com estas doenças, especialmente no que se refere ao gene *MASP1* e a proteína MASP-3. Pelo seu importante papel na regulação do sistema complemento, MASP-3 bem como os polimorfismos rs72549262 (+57902 C>G) e rs1109452 (+58267 C>T), localizados na região não traduzida a 3' no exon 12 do gene *MASP1* exclusiva de MASP-3, representam potenciais marcadores para o prognóstico e a susceptibilidade às infecções mencionadas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar polimorfismos do gene *MASP1* e concentrações séricas de MASP-3 em pacientes infectados pelo HIV e em indivíduos controles.

1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as reações de PCR-SSP biespecífica para os polimorfismos rs72549262 (+57902 C>G) e rs1109452 (+58267 C>T), localizados na região não traduzida a 3' no exon 12 do gene *MASP1*.
- Determinar os genótipos e haplótipos de *MASP1* presentes em pacientes portadores do HIV e nos indivíduos controles.
- Quantificar sorologicamente MASP-3 por ELISA.
- Verificar possíveis associações entre genótipos e fenótipos investigados.
- Verificar possíveis associações dos dados genotípicos de *MASP1* e sorológicos de MASP-3 com a susceptibilidade à infecção pelo HIV e presença de marcadores sorológicos de hepatites B e C.
- Verificar se os polimorfismos de *MASP1* estão associados com doenças oportunistas em pacientes HIV+.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

2.1.1 Epidemiologia mundial

Embora o HIV tenha sido identificado pela primeira vez em 1981, estudos de amostras de sangue armazenadas em período anterior a essa data indicam que o vírus foi introduzido na população dos EUA no final dos anos 1970 (NIAID, 2012). Graças à introdução da Terapia Anti-Retroviral (TARV) e políticas de saúde, o número mundial de novas infecções pelo HIV tem diminuído. Segundo a ONU, houve uma queda de 33 % de novos infectados pelo vírus HIV, entre 2001 e 2012. Nesses 11 anos, a redução de novas infecções em crianças foi da ordem de 52%, além da queda de 29% de casos relatados de mortes relacionadas ao HIV (adultos e crianças) e um aumento de 40% de pessoas com acesso à TARV entre 2002 e 2012 (UNAIDS, 2013b). Em 2012, o total de pessoas que viviam com HIV no mundo eram de 35,3 milhões, com 2,3 milhões de novas infecções e 1,6 milhões de mortes associadas à AIDS. Este é o número mais baixo de novas infecções anuais desde meados de 1990, quando aproximadamente 3,5 milhões de pessoas adquiriam o HIV, a cada ano. O número de infecções pelo HIV caiu mais de 50% em 26 países entre 2001 e 2012, e entre 25% e 49% em mais 17 países (UNAIDS, 2013a; UNAIDS, 2013b).

2.1.2 Epidemiologia da infecção pelo HIV no Brasil

A infecção pelo HIV possui grande relevância para a saúde pública no Brasil e no mundo. Em 2012, havia cerca de 530 mil indivíduos, de 15 a 49 anos, infectados pelo HIV no Brasil. Dentre estes casos, 46 mil foram atendidos pela primeira vez na rede pública de saúde e 313 mil pessoas receberam tratamento pelo SUS. Dentre os indivíduos afetados, 65% são homens e 35% mulheres. Acredita-se que existam indivíduos infectados que não estejam nas estatísticas pela falta de notificação aos sistemas de saúde (BRASIL, 2012b; UNAIDS, 2013c).

A taxa de prevalência da infecção pelo HIV na população de 15 a 49 anos, mantém-se estável em 0,6% desde 2004, sendo 0,4% entre mulheres e 0,8% entre homens (BRASIL, 2012b). Apesar do declínio de novas infecções em outros países, as taxas de incidência no Brasil mostram-se constantes (FIGURA 1).

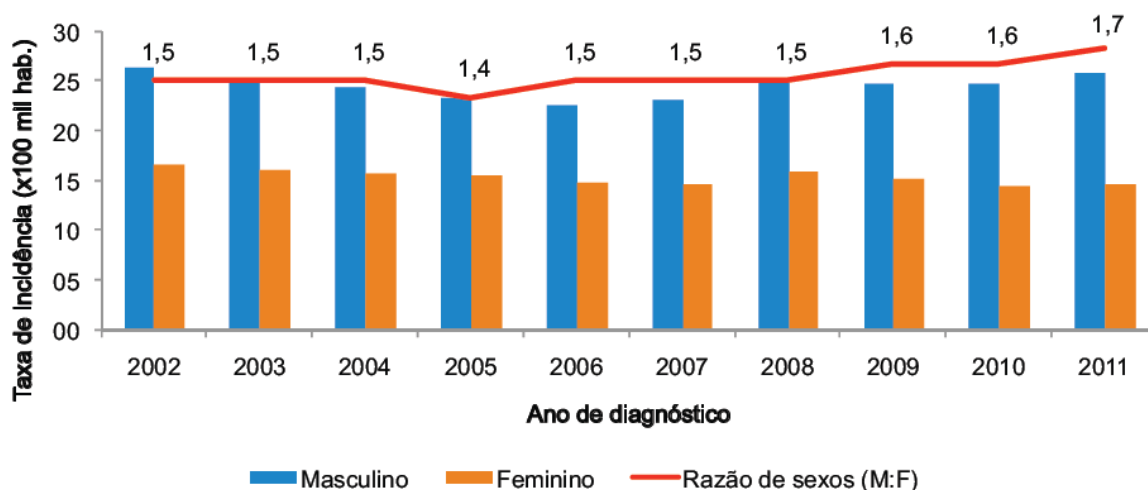


FIGURA 1 - TAXA DE INCIDÊNCIA DE AIDS POR SEXO E RAZÃO DE SEXOS. BRASIL, 2002 A 2011. FONTE: BRASIL, 2012b.

A epidemia de HIV no Brasil está concentrada em populações em situação de maior risco e vulnerabilidade (atitudes e práticas de risco relacionadas às DSTs e uso de drogas injetáveis), pois estas apresentam maior prevalência de infecção pelo HIV quando comparadas com a população geral (BRASIL, 2012b). A TABELA 1 mostra o número de casos notificados no Brasil e em cada região.

TABELA 1: INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE HIV E AIDS SEGUNDO UF E REGIÃO DE RESIDÊNCIA. BRASIL, 1980 A 2012.

UF	Casos Acumulados (1980 a 2012) ⁽¹⁾		Taxa de Incidência de AIDS (2011) ⁽²⁾	Taxa de mortalidade (2011) ⁽³⁾
	n.º	%		
Brasil	656.701	100	20,2	5,6
Distrito Federal	8.545	1,3	19,5	3,8
Norte	32.140	4,9	20,8	5,8
Centro-oeste	37.245	5,7	17,5	4,3
Nordeste	88.830	13,5	13,9	3,9
Sul	130.942	19,9	30,9	7,9
Sudeste	367.540	56,0	21,0	5,9

FONTE: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

NOTAS: (1) Casos notificados até 30/06/2012.

(2) Taxa de incidência por 100 mil habitantes.

(3) Taxa de mortalidade padronizada pelo método direto, com base na população do Brasil em 2000.

Algumas regiões brasileiras apresentaram um aumento na incidência de casos de AIDS, como Norte e Nordeste, FIGURA 2. Por outro lado, o Sudeste apresentou leve declínio, já a região Sul apresenta comportamento instável. Essa mesma tendência pode ser observada nas curvas de mortalidade (UNAIDS, 2013c).

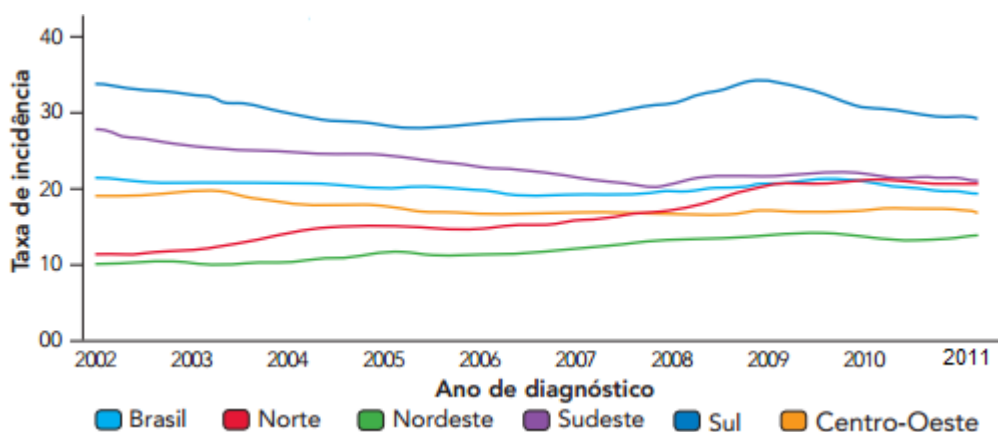


FIGURA 2 - TAXA DE INCIDÊNCIA DE AIDS/100 MIL HABITANTES, SEGUNDO A REGIÃO DE RESIDÊNCIA E ANO DE DIAGNÓSTICO.

FONTE: UNAIDS, 2013c

A maior concentração de casos de infecção pelo HIV no Brasil ocorre nos grandes centros urbanos, onde também se encontram maiores proporções de pessoas em situação de maior vulnerabilidade, tais como homens que fazem sexo com homens (HSH), travestis, profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis (UNAIDS, 2013c; BRASIL, 2012c). No entanto, atualmente nota-se que a epidemia se dissemina dos grandes centros para municípios de médio e pequeno porte (UNAIDS, 2013c).

Segundo a OMS, a epidemia de AIDS no Brasil é concentrada em certos grupos que apresentam prevalência > 5% enquanto que na população de 15 a 49 anos esta é <1%. No período de 2009 a 2010 uma maior prevalência foi observada entre: profissionais de sexo feminino (4,9%), usuários de drogas (5,91%) e HSH (10,5%) (UNAIDS, 2013c). Com relação às faixas etárias, em 2011 as maiores taxas de incidência foram observadas entre 30 e 44 anos de idade, em ambos os sexos (BRASIL, 2012b).

A transmissão materno-infantil do HIV vem apresentando constante redução no cenário nacional. A taxa média de transmissão vertical do HIV, que era de 16% em 1997 no Brasil, diminuiu gradativamente para 8,6% em 2000 e para 6,8% em 2004 (UNAIDS, 2013c). Em 2011, a taxa de incidência era de 2,3 para cada 1000 crianças nascidas vivas (BRASIL, 2012b). De acordo com o Ministério da Saúde, a transmissão vertical do vírus HIV no Brasil caiu 35% entre 2003 e 2012. A taxa de detecção de infecção pelo HIV no país em 2003 era de 5,1 para cada 100 mil habitantes e em 2012, de 3,4 para cada 100 mil habitantes. A Secretaria de Saúde de Curitiba, no Paraná, relata que não houve nenhum registro de criança infectada pelo HIV em 2013, cuja transmissão geralmente ocorre durante a gestação ou na amamentação (CURITIBA, 2014).

2.1.3 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 (BRASIL, 2012a).

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

2.1.4 Estrutura molecular e biológica do HIV

O HIV é um retrovírus pertencente à família dos Lentivírus, que provocam infecções com longos períodos de latência e, portanto levam a deterioração lenta e progressiva do sistema imunológico. Os retrovirus têm seu material genético constituído de RNA e através da enzima transcriptase reversa esses transformam o RNA viral em cDNA, o qual é inserido no DNA da célula infectada pela enzima integrase, iniciando o ciclo viral.

As principais características do HIV são a capacidade de infecção latente a longo prazo das células e de efeitos citopáticos a curto prazo, além de causar doença de progressão lenta. Dois tipos de HIV foram identificados, o HIV-1 que é a causa mais frequente da AIDS e o HIV-2, responsável por causar uma síndrome clínica semelhante, porém com progressão mais lenta. O que difere entre esses dois tipos é a estrutura genômica e a antigenicidade (ABBAS *et al.*, 2012). Além disso, o HIV-1 possui prevalência mundial e maior virulência, e o HIV-2 é endêmico da África Ocidental e Índia (MURPHY *et al.*, 2010b).

A estrutura do vírus HIV consiste em envoltório, matriz, nucleocapsídeo e duas fitas de RNA idênticas, associado a enzimas, que incluem transcriptase reversa, integrase e protease. As enzimas encontram-se acondicionadas em um núcleo compacto em forma de cone composto pela proteína do capsídeo p24, circundada por proteína da matriz (p17), e envolvendo tudo isso está um envelope de fosfolípídeos derivado da célula hospedeira. O envelope viral é constituído pelas glicoproteínas de membrana, codificadas pelo vírus, gp120 e gp41 dispostas em

trímeros e ancoradas na bicamada lipídica do envelope (GREENE *et al.*,2012 / ABBAS *et al*, 2012 / NIAID, 2012) (FIGURA 3).

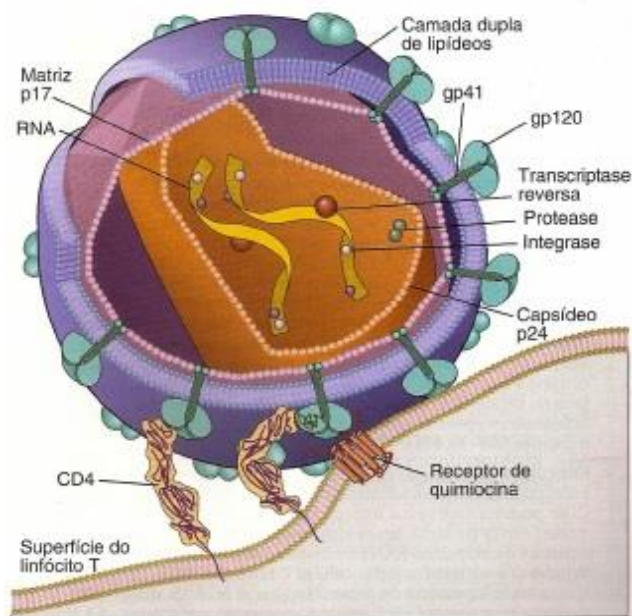


FIGURA 3 - ESTRUTURA DO VÍRUS HIV - 1
 FONTE: ABBAS *et al*, 2012

2.1.5 Ciclo de vida e infecção pelo HIV

As partículas virais que iniciam a infecção geralmente se encontram no sangue, sêmen ou outros líquidos corporais de um indivíduo infectado, sendo introduzidas em outro indivíduo por contato sexual, perfuração da pele por agulha ou via transplacentária (ABBAS *et al.*, 2012). A entrada do HIV em células hospedeiras requer a interação sequencial da glicoproteína viral exterior do envelope gp120, com a glicoproteína CD4 e um dos receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4) ou a proteína DC-SIGN (Dendritic Cells - specific intercellular adhesion molecule - grabbing nonintegrin) das células dendríticas, na superfície da célula. A entrada do vírus se dá por fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Essa ligação libera a glicoproteína gp41, promovendo a fusão do envelope viral com a membrana celular e a deposição do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (MURPHY *et al.*, 2010b) (FIGURA 4).

A gp 120 é a proteína do envelope viral responsável por interagir com MBL ou ficolinas, (associadas a serina proteases MASP-1, -2 e -3) através da ligação destas com açúcares ou compostos acetilados na superfície do HIV. Essa ligação leva à ativação da via das lectinas do sistema complemento (DATTA *et al.*, 2006).

As interações do vírus com o CD4 e com os co-receptores permitem o deslocamento do vírus e a entrada do núcleo capsídeo contendo o genoma viral na célula. A transcriptase reversa viral, a qual é parte integral da partícula viral, copia o genoma de RNA do HIV em DNA dupla fita, a integrase viral medeia a integração do DNA viral no DNA cromossômico da célula hospedeira. Neste estágio, o vírus é latente e pode persistir na célula em estado inativo. A reativação do vírus ocorre quando a célula hospedeira se torna ativada e a transcrição viral é iniciada, resultando no acúmulo de proteínas virais e dos transcritos de RNA do genoma viral completo. As proteínas virais se acumulam na membrana celular com cópias do RNA genômico e brotam como novas partículas virais, ou virion infeccioso (MURPHY *et al.*, 2010a).

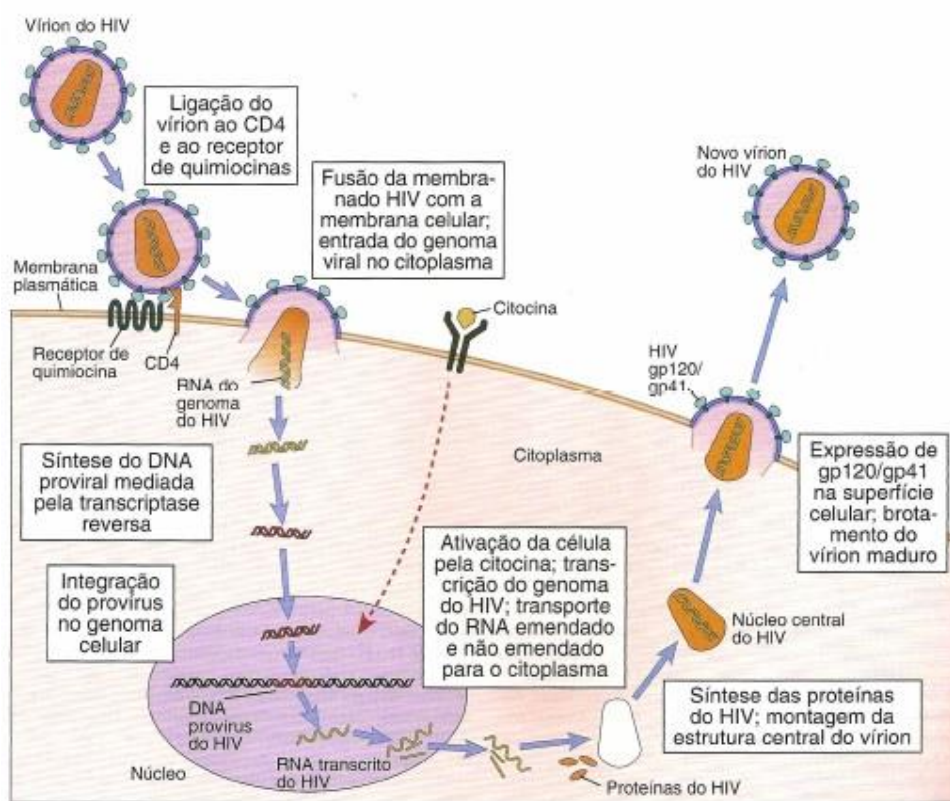


FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO HIV
 FONTE: ABBAS *et al.*, 2012

O HIV exibe tropismo por células que expressam moléculas CD4, destacando-se os linfócitos T auxiliares; as células da linhagem monocítico-macrofágica, incluindo a micróglia do sistema nervoso central, as células dendríticas dos linfonodos e as células de Langerhans da pele. Além disso, pode ocorrer a integração do HIV a células endoteliais, neuronais, astrócitos e células intestinais M da placa de Peyer (LIMA *et al.*, 2010). Alguns receptores de quimiocinas, como o CCR5 e o CXCR4, atuam como correceptores na invasão do HIV nas células hospedeiras (MURPHY *et al.*, 2010b).

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 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 *et al.*, 2010b).

2.1.6 Imunopatologia da infecção pelo HIV

Os sítios dominantes da infecção primária do HIV compreendem as células hospedeiras que expressam CD4 e co-receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 do trato gastrointestinal e da mucosa genital. Com isso, o HIV multiplica-se e dissemina-se nos compartimentos linfoides locais, até atingir os órgãos linfoides periféricos. A fase aguda da infecção caracteriza-se por viremia elevada, resposta imune intensa e rápida queda na contagem de linfócitos T CD4⁺. Altas concentrações do 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 (BRASIL, 2008a).

As manifestações clínicas dessa fase podem variar desde quadro gripal até uma síndrome que se assemelha à mononucleose. Os sintomas se assemelham aos de uma infecção viral, dentre eles nota-se febre, adenopatia, faringite, mialgia,

artralgia, rash cutâneo maculopapular eritematoso, ulcerações muco-cutâneas (mucosa oral, esôfago e genitália), hiporexia, cefaleia, fotofobia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, náusea e vômitos (BRASIL, 2008a).

Após esta fase, há um período assintomático em que persiste a replicação do vírus, porém, o declínio da função e do número de linfócitos T CD4⁺ é gradual. A fase assintomática pode durar de alguns meses a alguns anos, sendo os sintomas clínicos mínimos ou inexistentes. Os exames sorológicos para o HIV são reagentes e a contagem de linfócitos T CD4⁺ pode estar estável ou em declínio (em torno de 500 células/ μ l de sangue). Alguns pacientes apresentam linfadenopatia generalizada persistente, “flutuante” e indolor (BRASIL, 2008a).

A fase sintomática inicial caracteriza-se por sinais e sintomas inespecíficos de intensidade variável, processos oportunistas de menor gravidade, conhecidos com ARC – complexo relacionado à AIDS. São indicativos de ARC: candidíase oral, testes de hipersensibilidade tardia negativos e presença de mais de um dos seguintes sinais e sintomas, com duração superior a um mês, sem causa identificada: linfadenopatia generalizada, diarreia, febre, astenia, sudorese noturna e perda de peso superior a 10%. Ocorre uma elevação da carga viral e a contagem de linfócitos T CD4⁺ < 500 células/ μ l de sangue (BRASIL, 2008a).

A progressão da doença segue para a AIDS, a qual pode ser dividida em: não significativa, moderada, avançada e grave. Esta fase é caracterizada pelo aumento da ocorrência de infecções oportunistas, com maior prevalência de contagens de T CD4⁺ < 200 células/ μ l (WHO, 2007). As doenças oportunistas associadas à AIDS são várias, podendo ser causadas por vírus, bactérias, protozoários, fungos e neoplasias (BRASIL, 2008a).

Dessa forma, a infecção pelo HIV é capaz de desencadear uma perda gradativa da imunocompetência, possibilitando infecções oportunistas por diversos patógenos. Em geral, ocorre a diminuição do número absoluto de TCD4⁺ com o avanço da doença. Porém, pode-se observar aumento de linfócitos T CD4⁺ após uso de terapias antiretrovirais (TARV) (BRASIL, 2008a).

2.1.6.1 Avaliação imunológica

A patogênese da infecção pelo HIV é devida em grande parte à diminuição do número de células T CD4⁺, a qual caracteriza a gravidade da imunodeficiência

e está associada com a progressão da doença para AIDS. Além de conferir susceptibilidade aumentada a infecções oportunistas e outros eventos clínicos associados com o HIV, incluindo déficit de imunidade e óbito (WHO, 2007). De fato, o risco de desenvolver doenças relacionadas a AIDS é muito baixo em pacientes HIV⁺ com contagens de células T CD4⁺ superior a 200 células/ μ l, mesmo quando suas cargas virais atingem 50.000 a 60.000 cópias/ml (SACKS *et al.*, 2004).

O Ministério da Saúde no Brasil adotou alguns critérios para definir casos de AIDS em indivíduos com idade igual ou superior a 13 anos para fins de vigilância epidemiológica - TABELA 2 (BRASIL 2004).

TABELA 2: CRITÉRIOS DE DEFINIÇÃO DE CASOS DE AIDS EM INDIVÍDUOS COM IDADE > 13 ANOS.

<p>Critério CDC (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>) adaptado:</p> <p>Existência de dois testes de triagem reagentes ou um confirmatório para detecção de anticorpos- anti-HIV;</p> <p style="text-align: center;">E</p> <p>Evidência de imunodeficiência: diagnóstico de pelo menos uma doença indicativa de AIDS (TABELA 3);</p> <p style="text-align: center;">E/OU</p> <p>Contagem de LTCD4⁺ inferior a 350 células/mm³</p> <p style="text-align: center;">E/OU</p>
<p style="text-align: center;">Critério Rio de Janeiro/Caracas</p> <p>Existência de dois testes de triagem reagentes ou um confirmatório para detecção de anticorpos anti-HIV;</p> <p style="text-align: center;">E</p> <p>Somatório de pelo menos dez pontos, de acordo com uma escala de sinais, sintomas ou doenças (TABELA 4);</p> <p style="text-align: center;">OU</p>
<p style="text-align: center;">Critério Excepcional Óbito:</p> <p>Menção a AIDS/SIDA (ou termos equivalentes) em algum dos campos da Declaração de Óbito (DO);</p> <p style="text-align: center;">E</p> <p>Investigação epidemiológica inconclusiva;</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Menção a infecção pelo HIV (ou termos equivalentes) em algum dos campos da DO, além de doença(s) associada(s) à infecção pelo HIV;</p> <p style="text-align: center;">E</p> <p>Investigação epidemiológica inconclusiva;</p>

(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 traquéia, 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

TABELA 4 – ESCALA DE SINAIS, SINTOMAS OU DOENÇAS

SINAIS/SINTOMAS/ DOENÇAS	DESCRIÇÃO	PONTOS
Anemia Linfopenia Trombocitopenia	Anemia: hematócrito inferior a 30% em homens e 25% em mulheres; ou hemoglobina inferior a 6,80 mmol/L (menos de 11,0 g/dL) em homens e inferior a 6,20 mmol/L (menos de 10,0 g/dL) em mulheres. Linfopenia: contagem absoluta de linfócitos inferior a 1×10^9 /L (menos de 1.000 células/mm ³). Trombocitopenia: contagem de plaquetas inferior a 100×10^9 /L (menos de 100.000 células/mm ³).	2
Astenia	Por um período igual ou superior a um (1) mês, excluída a tuberculose como causa básica.	2
Caquexia	Perda de peso involuntária superior a 10% do peso habitual do paciente com ou sem emaciação, excluída a tuberculose como causa básica.	2
Dermatite persistente	Lesões eczematosas localizadas ou generalizadas de evolução crônica; Lesões papulovesiculosas disseminadas sem etiologia definida ou micoses superficiais de evolução crônica resistentes ao tratamento habitual.	2
Diarréia	Constante ou intermitente, por um período igual ou superior a um (1) mês.	2
Febre	Igual ou superior a 38°C, de forma constante ou intermitente, por um período igual ou superior a um (1) mês, excluída a tuberculose como causa básica.	2
Linfadenopatia	Maior ou igual a um (1) centímetro acometendo dois (2) ou mais sítios extra-inguinais, por um período igual ou superior a um (1) mês.	2

FONTE: BRASIL 2004

2.1.7 Progressão HIV-AIDS

A progressão da infecção pelo HIV⁺ para a AIDS propriamente dita ocorre quando a contagem de células T CD4⁺ é muito baixa e a carga viral muito elevada. A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV geralmente progridem para a AIDS, enquanto que aqueles que não progridem para a AIDS correspondem a cerca de 1% da população infectada pelo HIV no mundo. Alguns desses indivíduos não progressores são conhecidos como “controladores de elite”, apresentam altas taxas de linfócitos T CD4⁺ e baixa carga viral durante muitos anos (SAKSENA *et al.*, 2007). Os tipos de progressores estão demonstrados na TABELA 5.

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DOS CINCO TIPOS DE PROGRESSÃO PRA AIDS

Classes de progressão para a AIDS	Características
Controladores de Elite (LTNP-EC)	<p style="text-align: center;">PROGRESSORES LENTOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infecção por HIV assintomática acima de 10 anos após a soroconversão; • RNA viral plasmático, sem terapia antirretroviral, abaixo dos níveis de detecção (por exemplo, <75 cópias/mL por bDNA ou, <50 cópias/mL por PCR ultra-sensível); • Episódios isolados de viremia acima de 1000 cópias/mL, desde que não consecutivas e que representem a minoria das determinações disponíveis; • No mínimo 3 determinações de RNA viral plasmático, na ausência de terapia antirretroviral, que abrangem, pelo menos, um período de 12 meses.
Controladores de Viremia (LTNP-VC)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção por HIV assintomática acima de 10 anos após a soroconversão; • RNA viral plasmático, sem terapia antirretroviral, igual ou inferior a 2000 cópias/mL; • Episódios isolados de viremia acima de 2000 cópias/mL, enquanto tais episódios representam a minoria de todas as determinações disponíveis; • No mínimo 3 determinações de RNA viral plasmático, na ausência de terapia antirretroviral, que abrangem, pelo menos, um período de 12 meses.
Não-Controladores de Viremia (LTNP-NC)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção por HIV assintomática acima de 10 anos após a soroconversão; • RNA viral plasmático acima de 2.000 cópias/mL sem terapia antirretroviral, em mais de 50 % das amostras.
Progressores Típicos (P)	<p style="text-align: center;">PROGRESSORES RÁPIDOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infecção sintomática ou início da TARV no prazo de 10 anos após a soroconversão; • No mínimo 3 determinações de RNA viral plasmático, na ausência de terapia antirretroviral, com carga viral acima de 2.000 cópias/mL.
Progressores Rápidos (RP)	<ul style="list-style-type: none"> • Duas ou mais medidas de células T CD4+ abaixo de 350 células/mm³ até 3 anos após a soroconversão, com nenhum valor igual ou superior a 350 células/mm³ na ausência de terapia antirretroviral; • E/OU Início de terapia antirretroviral até 3 anos após a soroconversão, e pelo menos uma contagem de células T CD4+ inferior a 350 células/mm³; • E/OU Aids ou morte decorrente de Aids até 3 anos após a soroconversão, e pelo menos uma contagem de células T CD4+ inferior a 350 células/mm³;

NOTA: LTNP-EC: Long term non-progressor – elite controllers; LTNP-VC: Long term non-progressor, viremic controllers; LTNP-NC: Long term non-progressor, viremic non controllers; P: Chronic progressors; RP: Rapid progressors.

FONTE: CASADO *et al.*, 2010.

2.1.8 Diagnóstico

Segundo o Ministério da Saúde, Portaria n.º 151 de 14 de outubro de 2009, a definição do estado sorológico de um indivíduo infectado pelo HIV é fundamental para sua maior proteção e no controle da infecção e disseminação do vírus. O diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV deve ser realizado em indivíduos > 18 meses (BRASIL, 2009).

A primeira etapa do Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV consiste no teste de triagem (TESTE 1 – T1). Para esta etapa, deverá ser utilizado um teste capaz de detectar anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Poderão ainda ser utilizados, nessa etapa, testes que combinem a detecção simultânea desses anticorpos e de antígeno, incluindo: ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio imunoenzimático de micropartículas – MEIA; ensaio imunológico com revelação quimioluminescente e suas derivações - EQL; entre outros (BRASIL, 2009).

Caso o resultado do teste rápido seja positivo na Etapa I, uma nova amostra deverá ser coletada, para a realização da Etapa II, que consiste: Imunofluorescência indireta - IFI; Immunoblot - IB; Immunoblot rápido - IBR; Western Blot - WB; além de outros métodos registrados na ANVISA e validados pelo Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (BRASIL, 2009).

2.1.9 Tratamento

O principal tratamento para os portadores do HIV corresponde à administração de drogas que compõem a conhecida TARV. A TARV consiste na combinação de pelo menos três anti-retrovirais visando impedir o vírus de se multiplicar no organismo e a progressão da doença para AIDS. Grandes reduções têm sido observadas nas taxas de morte e sofrimento quando é feito uso de um esquema potente, particularmente em estágios precoces da doença. Os objetivos do tratamento são prolongar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida, por meio da redução da carga viral e reconstituição do sistema imunológico. Para que a TARV tenha sucesso, são necessários esforços consideráveis para manter a aderência ao tratamento ao longo da vida e monitorar a resposta ao tratamento,

toxicidade medicamentosa e interações medicamentosas (WHO, 2012a). No Brasil, esse tratamento é subsidiado pelo SUS (Sistema Único de Saúde) desde o ano de 1996 e sua ampla utilização resultou no reconhecido impacto do programa brasileiro de DST/AIDS, melhora nos indicadores de morbidade, de mortalidade e qualidade de vida dos brasileiros que realizam tratamento para o HIV e AIDS (BRASIL, 2008b, WHO, 2009). O acesso expandido à TARV também pode reduzir a transmissão do HIV na população, diminuindo a orfandade e preservando as famílias (WHO, 2009).

De acordo com a OMS (2010), é recomendado o início imediato da TARV em indivíduos HIV+ sintomáticos ou assintomáticos com linfócitos T CD4+ \leq 350 células/mm³. Aqueles que apresentarem sinais clínicos de imunodeficiência avançada ou grave e coinfectados por HBV devem iniciar a TARV, independentemente do resultado da contagem dos linfócitos 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 ou tuberculose (TB).

Os medicamentos anti-retrovirais atuam no bloqueio da ação de enzimas importantes na replicação e ciclo de vida do HIV, sendo classificados em: inibidores da transcriptase reversa (ITR) e inibidores da protease (IP). Os inibidores da transcriptase reversa são subdivididos em três grupos: inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTR); inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR) e inibidores nucleotídicos da transcriptase reversa. As drogas devem ser usadas em combinações padronizadas (normalmente associação de três drogas), para a maximização do efeito (WHO, 2012b). A monoterapia não é recomendada, devido ao inevitável surgimento da resistência medicamentosa, exceto na prevenção da transmissão do HIV da mãe para o filho, como monoterapia de curta duração. O tratamento com dois nucleosídicos também não é recomendado, porque não reduz a mortalidade associada ao HIV na população. O monitoramento da resposta à TARV ocorre através da contagem periódica dos linfócitos T CD4+; do teste de detecção de RNA viral na suspeita de ausência de resposta ao tratamento; e de análise dos sintomas de toxicidade (WHO, 2012b).

Em 2013, a OMS alterou suas diretrizes, recomendando que o tratamento seja iniciado mais cedo possível, e em alguns casos, imediatamente. No caso de

mulheres grávidas HIV+, o acesso à TARV reduz o risco de transmissão do vírus para a criança para < 5%.

2.2 COINFECÇÃO COM HEPATITES VIRAIS B e C

A infecção pelo HIV, a hepatite B e a hepatite C são as três infecções virais crônicas mais comuns, estando entre as dez principais causas de morte por doenças infecciosas (MURIUKI, *et al.* 2013). A coinfeção HIV/HBV/HCV ocorre devido ao compartilhamento das vias de transmissão do HIV, HBV e HCV. A hepatite B possui, como principais vias de transmissão, a sexual e transfusão sanguínea, enquanto a hepatite C está associada ao uso de drogas injetáveis. Logo, as coinfeções HIV/HBV/HCV são comuns, com estimativa de 8,6% de coinfectedados HIV/HBV e de 20% de coinfectedados HIV/HCV (SORIANO, *et al.* 2010; LACOMBE, *et al.* 2012). A coinfeção HIV/HBV/HCV aumenta consideravelmente a mortalidade e comorbidade dos pacientes. A hepatite C é a segunda causa de mortalidade em pacientes com HIV. A coinfeção favorece a replicação de ambos os vírus, conduzindo a uma progressão mais rápida para doença hepática, como cirrose e carcinoma hepatocelular, além de dificultar a recuperação imunológica (REBBANI, *et al.* 2013). Além disso, devido a debilitação imunológica causada pelo HIV, o tempo de evolução para comprometimento hepático é reduzido aproximadamente de 30 para sete anos (CORVINO, *et al.* 2007). Ainda, o comprometimento hepático decorrente da infecção por HCV é agravado pela utilização de TARV, que são drogas hepatotóxicas, sendo esse risco de três a quatro vezes superior ao observado em mono-infectados (CORVINO, *et al.* 2007).

O HBV e o HIV compartilham o modo de transmissão sexual, com isso a coinfeção tornou-se um problema frequente em muitos pacientes infectados pelo HIV. A infecção pelo HBV torna-se mais complicada devido à coinfeção pelo HIV, estando associada a maior taxa de hepatite crônica, maiores níveis de replicação viral e menor depuração espontânea do HBV. Além disso, a frequência de cirrose e mortalidade atribuível à doença hepática aumentam significativamente quando a infecção pelo HBV é complicada pela infecção por HIV (KONOPNICKI *et al.*, 2005). KONOPNICKI *et al.* (2005) observaram que a mortalidade relacionada a doenças do fígado em indivíduos HIV+ aumentou de 8 % em pacientes HBV negativos para 18

% em pacientes HBV positivos. Além disso, o risco de morte relacionado a doenças do fígado foi três vezes maior em indivíduos HBV/HIV. Ainda, existe maior risco de hepatotoxicidade causada por TARV em indivíduos coinfectados pelo HBV e a reconstituição imune induzida pela TARV pode desencadear uma resposta inflamatória mais grave contra o HBV e acelerar a progressão de doenças hepáticas (KONOPNICKI *et al*, 2005).

2.3 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata e humoral (WIESMANN *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2012), com importante papel na eliminação de agente patogênicos, complexos imunes e células apoptóticas presentes na circulação.

As proteínas do complemento estão no plasma normalmente na suas formas inativas, e são ativadas sob condições específicas, gerando produtos com várias funções biológicas efetoras. A ativação do complemento envolve a proteólise sequencial de proteínas para formar complexos enzimáticos com atividades proteolíticas, por meio de outras proteases, denominadas zimogênios. Desta forma, ocorre a ativação de uma cascata proteolítica que irá gerar uma amplificação da ativação, pois, cada molécula de enzima ativada em uma etapa gera múltiplas enzimas ativadas na etapa seguinte (ABBAS *et al*, 2012).

Existem proteínas reguladoras que estão presentes em células do hospedeiro e ausentes nos microrganismos, responsáveis por inibir a ativação autóloga do complemento. As proteínas reguladoras minimizam os danos causados pelo complemento às células do hospedeiro. Os microrganismos não possuem essas proteínas reguladoras e, por isso, ocorre ativação do complemento na sua superfície. O processo de ativação do sistema complemento compreende três vias: clássica, alternativa e das lectinas (FIGURA 5). A via clássica é um componente da imunidade humoral adquirida, já as vias alternativa e das lectinas são mecanismos efetores da imunidade natural (ABBAS *et al*, 2012). Uma vez que o complemento é ativado, produtos da degradação de C3, C4 e C5 promovem 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 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. C3b e C4b agem como opsoninas na superfície de patógenos e medeiam a fagocitose através de CR1 e CR3 presentes em células fagocíticas (HELMY *et al.*, 2006). 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 *et al.*, 2010b).

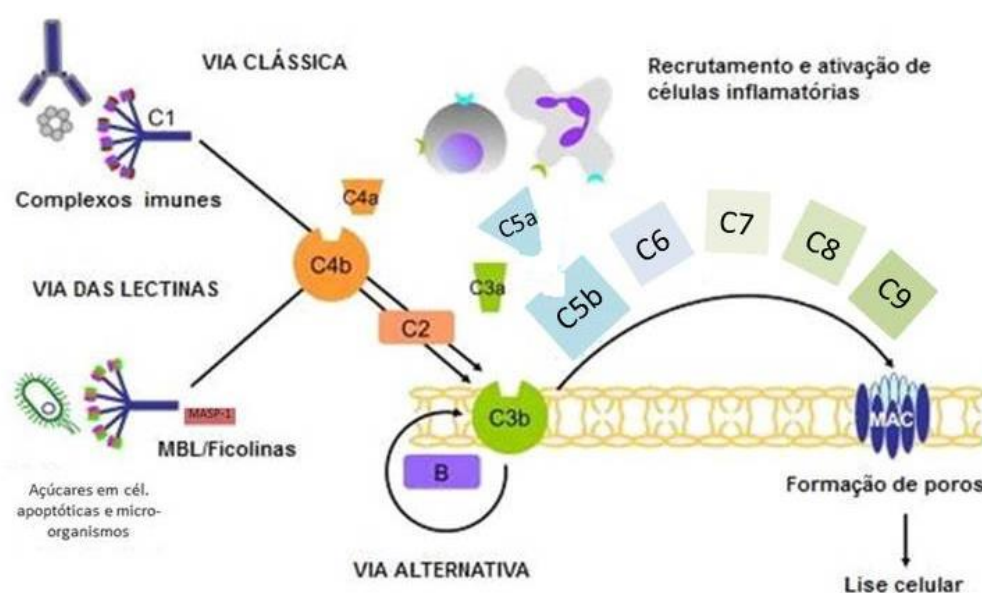


FIGURA 5 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO
 FONTE: GIRARDI *et al.*, 2011 (adaptado).

2.3.1 Via das Lectinas

As moléculas de reconhecimento do sistema imune inato desempenham importante papel na primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções. As que atuam na via das lectinas do sistema complemento dividem-se em lectinas do tipo C e ficolinas, sendo que, os representantes de ambas as famílias são oligômeros constituídos por um número variável de subunidades. Nas lectinas do

tipo C, a ligação ao carboidrato é dependente de cálcio e ocorre no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), sendo que, aquelas que possuem um domínio semelhante ao colágeno, como a MBL são denominadas colectinas (embora as proteínas surfactantes SP-A e SP-D também sejam colectinas, estas não ativam o complemento) (HOLMSKOV *et al*, 2003). Já as ficolinas possuem um domínio semelhante ao colágeno e a ligação a açúcares em patógenos e células apoptóticas se dá através de um domínio semelhante ao fibrinogenio.

A via das lectinas é ativada, na ausência de anticorpo, pela ligação de MBL e/ou ficolinas 1, 2 ou 3 a polissacarídeos microbianos. MBL e ficolinas se assemelham estruturalmente a C1q. A MBL se liga aos resíduos de manose nos polissacarídeos, e também à serina proteases associadas a MBL (MASPs), como MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (FIGURA 6) e a dois fragmentos não enzimáticos (MAp19 e MAp44). Oligômeros maiores de MBL e ficolinas (tetrâmeros a hexâmeros) se associam tipicamente a MASP-1 e MASP-2. Essas duas proteases formam um complexo tetramérico, ativando o complemento pela clivagem de C4 e C2 (ABBAS *et al.*, 2012 ; SOREN *et al.*, 2011). A via das lectinas é principalmente importante no controle de infecções durante o intervalo de tempo entre a perda de anticorpos maternos adquiridos passivamente e a aquisição de um repertório imunológico maduro, bem como em indivíduos com imunossupressão (SOREN *et al.*, 2011).

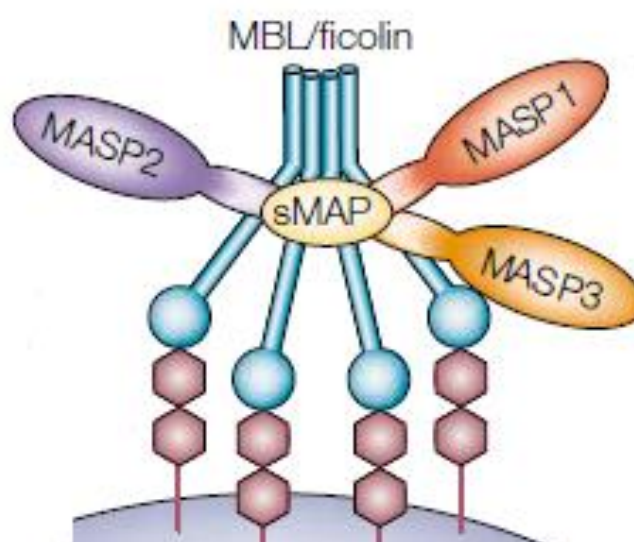


FIGURA 6 - MBL/FICOLINAS ASSOCIADAS AS MASPS (1, 2 e 3).
FONTE: FUJITA, 2002 (adaptado).

A MBL também atua como uma opsonina, ligando-se as carboidratos com manose ou fucose terminal, tipicamente encontrados em glicoproteínas e glicopeptídeos da superfície de células microbianas, porém ausentes em mamíferos. Os receptores de C1q e CR1 na superfície do macrófago mediam a fagocitose dos microrganismos opsonizados pela MBL ou ficolinas (ABBAS *et al*, 2012, JACQUET *et al*, 2013).

Os genes que codificam a MBL e as ficolinas são polimórficos, e certos alelos estão associados à falha na formação de hexâmeros e a concentrações plasmáticas reduzidas destes oligômeros, e causam deficiência funcional da proteína (BOLDT *et al.*, 2012). Baixas concentrações de MBL estão associadas a defeito de opsonização e a infecções de repetição na infância, além de suscetibilidade aumentada a uma variedade de infecções, especialmente em combinação com outros estados de imunodeficiência (GARRED *et al.*, 1997). Por outro lado, concentrações altas de MBL podem, sob certas condições, ser prejudiciais podendo facilitar infecções por certos microrganismos intracelulares e/ou acentuar o dano tecidual resultante da ativação indesejada do complemento (GARRED *et al.*, 1992; GARRED *et al.* 1994; BOLDT *et al.*, 2012).

2.4 O GENE *MASP1* (*mannan-binding lectin serine peptidase 1*)

MASP1 é um gene localizado no cromossomo 3, mais precisamente 3q27-q28 (FIGURA 7), que dá origem a três produtos de processamento alternativo: MASP-1, MASP-3 e MAp44 (TAKADA *et al.*, 1995). O gene abrange 18 exons, dos quais os primeiros oito exons, mais exons 10 e 11, codificam os cinco domínios N-terminais compartilhados por MASP-1 e MASP-3: CUB-EGF-CUB-CCP-CCP. O domínio de serina protease de MASP-1 é codificado por seis exons separados (exons 13-18). Na MASP-3, este domínio é codificado por um único exon (exon 12). Assim, MASP-1 e MASP-3 possuem seus primeiros cinco domínios em comum, mas têm domínios distintos de serina protease. O terceiro produto de processamento alternativo, MAp44, é composto por nove exons: os primeiros oito exons são partilhados com MASP-1 e MASP-3, codificando os primeiros quatro domínios, CUB-EGF-CUB-CCP, enquanto o nono exon é único para MAp44. Uma adenina adicional no exon 8, combinada com os primeiros 50 nucleotídeos do exon

9, leva à codificação do domínio único C-terminal de 17 aminoácidos de MAp44 (SOREN *et al.*, 2011; ROORYCK *et al.*, 2011) (FIGURA 8).

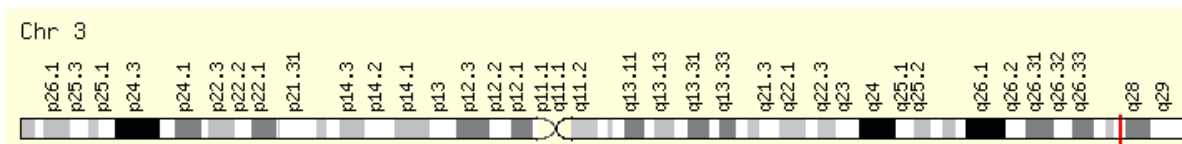


FIGURA 7 - GENE *MASP1* EM SUA LOCALIZAÇÃO NO CROMOSSOMO 3

FONTE: DATABASE OF GENE, 2013

NOTA: o gene está indicado em vermelho

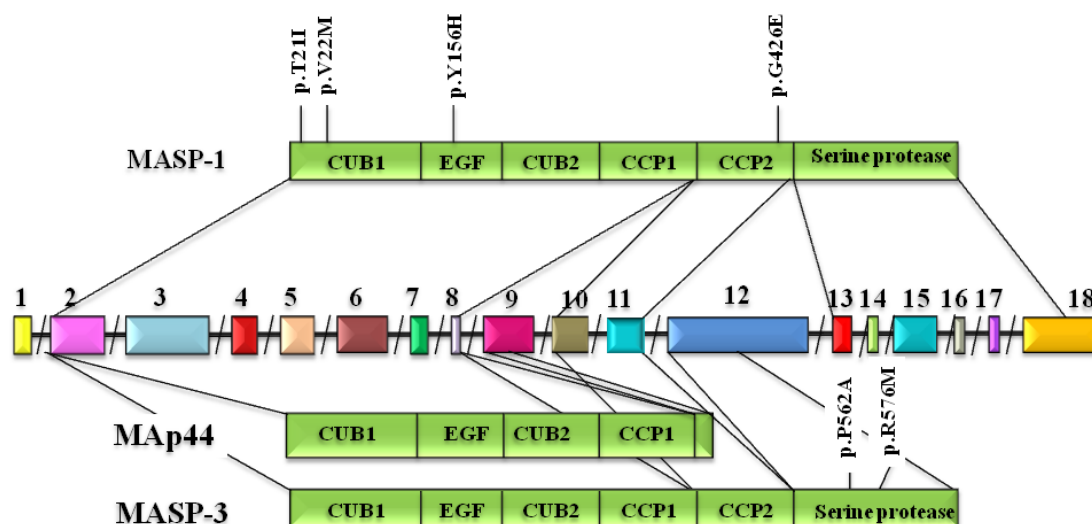


FIGURA 8 - SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DO GENE *MASP1* E LOCALIZAÇÃO NAS PROTEÍNAS MASP-1, MAP44 E MASP-3.

FONTE: BOLDT *et al.*, 2011.

NOTA: Exons estão numerados (exon 12 é exclusivo de MASP-3 e o exon 9 codifica 17 aminoácidos exclusivos de MAp44). Os tamanhos dos introns não são proporcionais. Exon 1 codifica o peptídeo sinal (não representado).

LEGENDA: MASP: mannan-binding lectin associated serine protease; CUB: C1r/C1s, Uegf and bone morphogenetic protein; EGF: epidermal growth factor; CCP: complement control protein.

O gene *MASP1* apresenta seis polimorfismos não sinônimos (FIGURA 8), porém *p.Pro562Ala* e *p.Arg576Met* ocorrem no exon 12 e são, dessa forma, exclusivos do domínio de serina protease de MASP-3 (BROWN *et al.*, 2007). Até o momento, há poucos estudos de associação com doenças e as concentrações ou polimorfismos do gene *MASP1* e suas proteínas: MASP-1/MASP-3/MAp44. Um dos estudos relacionando concentrações séricas e polimorfismos gênicos é de

AMMITZBØLL *et al.* (2013), que demonstraram uma forte associação entre a concentração de uma ou mais das proteínas MASP-1/MASP-3/MAP44 e diferentes SNPs do gene *MASP1*. Dentre estes, quatro SNPs (rs3774275, rs698090, rs72549154 e rs67143992) localizados na região de recomposição alternativa do gene, estão associados ao aumento de MASP-1 e MAP44 e diminuição de MASP-3, ou vice-versa, em indivíduos saudáveis (AMMITZBØLL *et al.*, 2013). Também observou-se uma associação do alelo menos comum do rs850312 (p.L617L) com infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística com idade <15 anos.(HAERYNCK *et al.* 2012).

Em pacientes infectados pelo HCV observou-se uma correlação entre a atividade do complexo MBL/MASP-1 e a gravidade da fibrose (BROWN *et al.*, 2007). Na glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica a atividade do complexo MBL/MASP-1 se relacionou a depósitos glomerulares de fibrinogênio e hematúria prolongada (HISANO *et al.*, 2007). Além disso, evidências recentes demonstraram que mutações raras no exon 12 (exclusivo de MASP-3) estão associadas com a síndrome 3MC, causando deformações craniofaciais (ROORYCK *et al.*, 2011). Esta síndrome engloba quatro distúrbios raros com herança autossômica recessiva, previamente designados como síndromes de: Michels, Malpuech, Mingarelli e Carnevale. As principais características desta síndrome são dimorfismo facial que inclui hipertelorismo, blefarofimose, ptose palpebral, e as sobrancelhas arqueadas altamente, presentes em 70% a 95% dos casos. Além de lábio leporino e fenda palatina, a deficiência de crescimento pós-natal, déficit cognitivo e perda de audição também são achados consistentes, ocorrendo em 40% a 68% dos pacientes. Craniosinostose, radioulnal sinostose e anomalias genitais e vesicorenais podem ocorrer em 20% a 30% dos casos. Características raras incluem defeitos da câmara anterior, anomalias cardíacas, apêndice caudal, hérnia umbilical (onfalocele) e diástase retos (ROORYCK *et al.*, 2011).

A proteína MASP-1 é primariamente expressa no fígado, enquanto que a proteína MASP-3 é expressa de forma ubíqua e também no fígado e em altas concentrações (SEYFTARH *et al.*, 2006). MAP44 é uma proteína truncada, sem o segundo domínio CCP (*Complement Control Protein*) e o domínio de serina protease. A MASP-1 ocorre no soro complexada com MBL e ficolinas e atua na ativação do complemento pela via das lectinas (SKJOEDT *et al.*, 2010).

MASP-1 coopera com MASP-2 na geração da C3 convertase, um processo inibido por MASP-3, uma proteína altamente conservada (STOVER *et al.*, 2003; MOLLER-KRISTENSEN *et al.*, 2007; SKJOEDT *et al.*, 2010). A princípio, MASP-2 foi descrita como ativadora autônoma da via das lectinas, dada a capacidade de se auto-ativar e clivar C4 e C2, enquanto MASP-1 teria apenas papel de apoio. Estudos recentes, no entanto demonstraram que MASP-1 desempenha um papel importante na ativação de MASP-2, sendo que essa ativação depende estritamente de MASP-1. Os autores observaram que MASP-1 ativa MASP-2 e que a inibição de MASP-1 impede a auto-ativação de MASP-2 (DEGN *et al.* 2012). HÉJA *et al.* (2012) afirmaram que MASP-1 controla todo o processo de ativação da via das lectinas, sendo que MASP-1 se auto-ativa e ativa MASP-2. Esta, por sua vez, cliva o componente C4. C4b depositado na superfície de ativação liga-se ao C2, o qual é clivado primariamente por MASP-1 (60%), e em menor extensão, por MASP-2 (40%). Isto resulta na formação do complexo C4b2a (C3 convertase), conforme mostra a FIGURA 9 (HÉJA *et al.*, 2012).

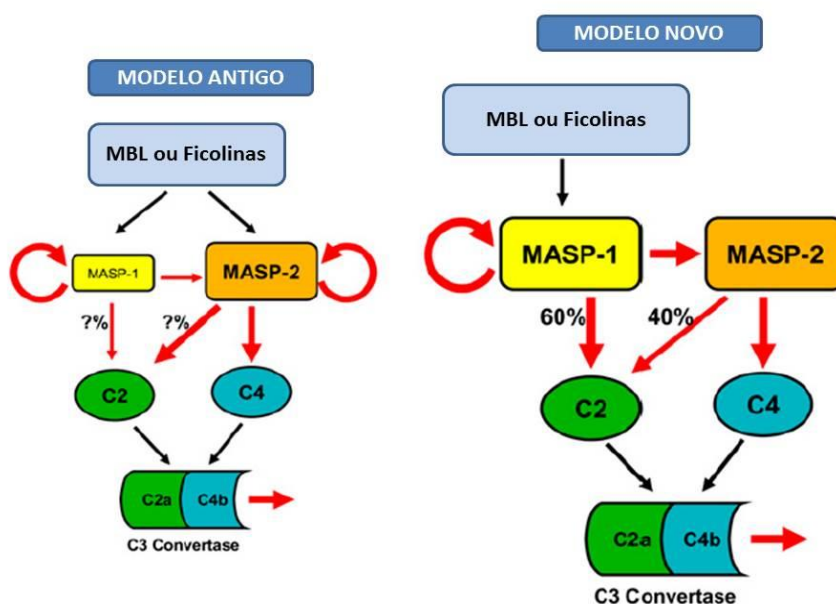


FIGURA 9 – COMPARAÇÃO DE MODELO DE ATIVAÇÃO DE MASP-1 E MASP-2
 FONTE: HÉJA *et al.*, 2012

MASP-1 também é responsável pela ativação do fator D no camundongo, passo essencial para ativação da via alternativa em murinos (TAKAHASHI *et al.*, 2010), porém, não demonstrou ser essencial na ativação da via alternativa no ser

humano (DEGN *et al.* 2012). Além disso, MASP-1/3 cliva fator XIII e fibrinogênio (HAJELA *et al.*, 2002) e atua na coagulação com atividade similar à trombina (TAKAHASHI *et al.*, 2011). A sua atividade proteolítica induz sinalização por Ca^{2+} , NF-kappaB e p38 MAPK em células endoteliais (MEGYERI *et al.*, 2009).

2.5 INTERAÇÕES ENTRE MBL E O HIV

A proteína do invólucro (gp120/gp41) do HIV-1 é altamente glicosilada, sendo que cerca de metade da massa molecular da gp120 consiste em hidratos de carbono N-ligados. Existem evidências de que as N-glicanas da gp 120 inibem a resposta imune adaptativa ao HIV. Embora pacientes infectados pelo HIV apresentem anticorpos capazes de neutralizar o vírus, mutações nos sítios N-glicosilados protegem o HIV dessa neutralização (WEI *et al.*, 2002). Estudos experimentais confirmaram que os oligossacarídeos são um importante mecanismo de escape do vírus à neutralização por anticorpos (CHACKERIAN *et al.*, 1997; CHENG-MAYER *et al.*, 1999).

Enquanto a glicosilação de gp120/gp41 do HIV fornece uma barreira contra o desenvolvimento de fortes respostas de anticorpos ao vírus, também proporciona um potencial local de ataque ao sistema imune inato através de MBL e ficolinas (DATTA *et al.*, 2006). A ligação da MBL ao HIV é dependente das elevadas concentrações de glicanos e manose na gp120, enquanto vírions incorporados em células hospedeiras não contribuem substancialmente para esta interação. Um trímero de MBL pode interagir com várias moléculas de gp120. Além disso, pelo menos duas subunidades estruturais podem interagir com dois ou mais trimeros gp120 (FIGURA 10) (JI, X *et al.*, 2005). A ligação da gp 120 recombinante a MBL, levou à ativação do complemento e a opsonização do HIV (JI, X *et al.*, 2005) (HAURUM *et al.*, 1993),

Um efeito de neutralização direta do HIV pelas células T através de foi observado por EZEKOWITZ *et al.* (1989). Sabe-se também que as concentrações de MBL, que atua como proteína de fase aguda, aumentam durante a infecção por HIV (PROHÁSKA, *et al.*, 1997). Portanto, esses dados indicam que a MBL constitui um mecanismo importante para o reconhecimento do HIV pelo sistema imunológico (JI, X *et al.*, 2005).

Proháska *et al* (1997) observaram concentrações significativamente menores de MBL em indivíduos HIV+ assintomáticos em relação a indivíduos saudáveis HIV neg, indicando que níveis baixos de MBL podem influenciar a suscetibilidade à infecção pelo HIV e a progressão da doença para AIDS.

Mutações no gene *MBL2*, associadas a deficiência da proteína, foram associadas significativamente com a suscetibilidade a infecção pelo HIV e com diminuição da sobrevivência após diagnóstico de AIDS (GARRED *et al.* 1997).

Associação entre polimorfismos do gene *MBL2* e a suscetibilidade a infecção pelo HIV foram relatados pelos autores ZEN, 2005; PROHÁSKA *et al.*, 1997; GARRED *et al.*, 1997, JI *et al.*, 2005, AMMITZBØLL *et al.*, 2013, entre outros.

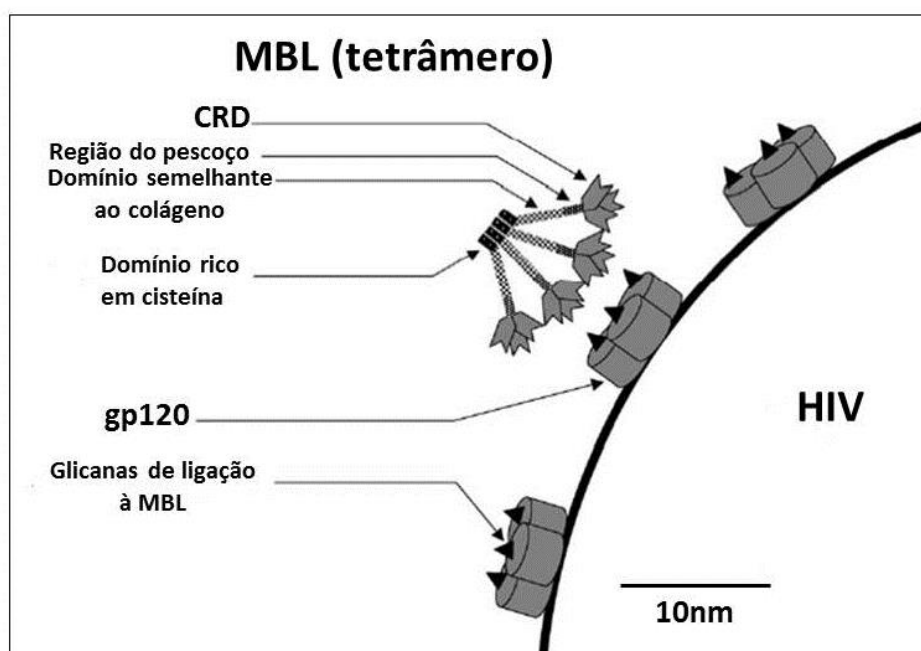


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MBL INTERAGINDO COM O HIV.
FONTE: JI *et al.*, 2005 (adaptado).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Pacientes

Os procedimentos experimentais envolvendo seres humanos foram aprovados pelo “Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná” (CEP/HC-UFPR) (ANEXO 2), sob o número de registro 1409.074/2007-04. As coletas de sangue foram realizadas na Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR em pacientes atendidos no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital de Clínicas da UFPR, de Curitiba, durante o período de abril/2008 a março/2009.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), 205 concordaram em participar do estudo. Foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue venoso em frascos contendo o anticoagulante etilenodiamino tetraacético (EDTA) de cada paciente. Os tubos contendo sangue venoso foram centrifugados e divididos em uma alíquota de plasma e uma da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), contendo cerca de 1 mL cada. Uma alíquota de 3mL do sangue foi obtida do frasco sem anticoagulante. As alíquotas foram armazenadas à temperatura de - 80°C até o momento das análises laboratoriais.

Todos os 205 pacientes HIV+ foram diagnosticados segundo o protocolo da Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde (CNDST/AIDS-MS). Os pacientes foram categorizados, por meio da análise de seus respectivos prontuários, quanto à progressão da infecção para a AIDS seguindo os critérios de definição de casos de AIDS em adultos (BRASIL, 2004), presença de coinfeções por HBV e/ou HCV, presença de doenças oportunistas e contagem de células T CD4+. Os critérios de inclusão no estudo foram: diagnóstico positivo para HIV e idade >18 anos. A presença de coinfeção para HBV foi avaliada através de sorologia positiva para anti HBc e HBSAg e para HCV através da detecção de anti HCV.

Dos 205 pacientes, 88 (43%) apresentaram unicamente infecção pelo HIV, 81(40%) apresentaram infecção pelo HIV e sorologia positiva para HBV, 17 (8,3%)

pacientes infectados pelo HIV apresentaram sorologia positiva HBV e HCV e 12 (5,8%) apresentaram infecção pelo HIV e HCV. Não foi possível obter a informação sobre infecção pelo HBV em sete pacientes, os quais foram incluídos apenas no grupo total de pacientes. Destes sete, apenas um apresentou coinfeção pelo HCV. As características demográficas dos grupos de pacientes encontram-se descritas na TABELA 6.

3.1.2 Controles

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por 210 indivíduos doadores de sangue do Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR).(ANEXO 3), foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue em frascos contendo o anticoagulante EDTA. As amostras de sangue venoso foram centrifugadas e divididas em uma alíquota de plasma e uma da camada leuco-plaquetária (*buffy coat*), contendo cerca de 1 mL cada. Uma alíquota de 3mL do sangue foi obtida do frasco sem anticoagulante, para obtenção de soro. Todos os controles apresentaram resultados negativos dos testes sorológicos para HIV, HBV e HCV. As alíquotas foram armazenadas à temperatura de -80°C até o momento das análises laboratoriais. O grupo controle foi utilizado para estimar as frequências dos SNPs na população de Curitiba e Região Metropolitana e pareado com o grupo dos pacientes HIV+de acordo com as proporções de gênero, grupo étnico e idade (TABELA 6).

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS (%) DOS GRUPOS INVESTIGADOS

	CONTROLES n= 210	PACIENTES HIV+ n = 205 *	SUBGRUPO HIV+HBV- HCV- n = 88	SUBGRUPO HIV+HBV- HCV+ n = 12	SUBGRUPO HIV+HBV+ HCV- n = 81	SUBGRUPO HIV+HBV+ HCV+ n = 17
Gênero						
F	115 (54,8)	110 (53,6)	56 (63,6)	5 (41,7)	40 (49,4)	5 (29,4)
M	95 (45,2)	95 (46,4)	32 (36,4)	7 (58,3)	41 (50,6)	12 (70,6)
Grupo Étnico						
Euro-bras	168 (80)	197 (96,1)	85 (96,6)	11 (91,7)	78 (96,3)	16 (94,1)
Afro-bras	31 (15)	8 (3,9)	3 (3,4)	1 (8,3)	3 (3,7)	1 (5,9)
Ameríndio	8 (3,8)					
Oriental	3 (1,4)					
Idade						
Média	38	46	46	45	45	50
Variação	(18-61)	(18-78)	(18-78)	(30-71)	(24-69)	(35-69)

LEGENDA: * O grupo de pacientes HIV+ inclui sete pacientes que não apresentaram informação sobre coinfeção pelo HBV. Destes, somente um apresentou coinfeção pelo HCV; n, número de indivíduos; Euro-Bras, euro-brasileiro; Afro-Bras, afro-brasileiro.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico dos pacientes e controles foi extraído do *buffy coat* com EDTA utilizando-se os kits comerciais DNAzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), e Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante, compreendendo lise de células, precipitação, lavagem e solubilização do DNA, no Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica – UAD – HC/UFPR.

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase com Iniciadores de Sequência Específica (PCR – SSP) do gene *MASP1*

A PCR–SSP é a reação em cadeia da polimerase utilizada na amplificação seletiva de polimorfismos em fragmentos de DNA. Essa reação baseia-se na utilização de oligonucleotídeos iniciadores de sequência específica (SSP –

Sequence Specific Primer), na qual a falta de pareamento de bases na última posição a 3' do iniciador inibe a amplificação do DNA. Quando há complementaridade de bases, ocorre a amplificação da fita de DNA no sentido 5' → 3'. Portanto, na ausência da complementaridade perfeita entre o nucleotídeo localizado na extremidade 3' do iniciador (ou primer) e a fita molde, não há amplificação da sequência desejada.

Os iniciadores são compostos por 18 a 22 nucleotídeos e desenhados 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 (TABELA 7). Os iniciadores também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação, neste caso, um fragmento de 500pb do gene *FCN2*.

Neste trabalho, foi realizada uma PCR-SSP simples, em que apenas um fragmento específico, contendo 2 SNPs, foi amplificado na reação. O outro fragmento amplificado foi o controle endógeno, para verificar a qualidade da amplificação.

TABELA 7 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS

PCR-SSP MASP1 +57902 a +58257 (Exon 12)	
Iniciador direto	
MASP1 Ex12_+57902 Cf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGAT C 3'
MASP1 Ex12_+57902 Gf	5' CCCTCTCTCTTAGTGTGAT G 3'
Iniciador reverso	
MASP1 Ex12_+58267 Cr	5' CGACTAAGTCCCCATATT C G 3'
MASP1 Ex12_+58267 Tr	5' CGACTAAGTCCCCATATT C A 3'
Fragmento	365 pb
Controle Endógeno	
Iniciador direto	
FCN2 Ex8f	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'
Iniciador reverso	
FCN2 Ex8r	5' AAAGGGTTGATTGCGAAAC 3'
Fragmento	500 pb

FONTE: dbSNP (DATABASE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS), 2013

LEGENDA: A nomenclatura adotada para os iniciadores é como segue: [nome do gene] [região de complementaridade (Ex- Exon)]_[localização e nome do SNP][f- direto, r- reverso]. Em negrito: nucleotídeo variante; pb, pares de base.

Neste trabalho, foram analisados os SNPs rs72549262 (+57902 C>G) e rs1109452 (+58267 C>T), situados no exon 12, a +57902 e +58267 pares de base do sítio de início da transcrição (ATG) do exon 1 do gene *MASP1*. O exon 12 codifica exclusivamente para o domínio de serina protease da proteína MASP-3 .

Os iniciadores diretos e reversos (TABELA 6) foram desenhados de acordo com a sequência NT_005612 do cromossomo 3 (FIGURA 11). As regiões de acoplamento dos iniciadores e as respectivas localizações dos polimorfismos estudados estão ilustrados na FIGURA 12.

LOCUS NT_005612 76982 pb EXON 12 (alternative and exclusive MASP-3)	INICIADORES	SNPs
57421 AAGTACACCCGCACTTCCGACAGCACACTCCACATTACTTATCAGACCATATGGAATGGA		
57481 ACACACTGACCTAGCGGTGGCTTCTCCTACCGAGACAGCCCCAGGACCCTGAGAGGCAG		
57541 AGTGTGGTATAGGGAAAAGGCTCCAGGCAGGAGACCTGTGTTCTGAGCTTGCCAAGTC		
57601 TCTTCCC[GTCTGGCCCTCACTCTACC G/C] AGTAATACAATGCAGGAGCTCAACCAAGGCC		
57661 TCTGTGCCAATCCCAGCACTCCTTTCCAGGCCATGCTTCTACCCAGTGCCCTTTATTC		
57721 ACTCCTGACCCTTATCAAACCCATCGGTCTACTGTTGGTATAACTGAGCTTGACCTG		
57781 ACTATTAGAAAATGGTTTCTAACATTGAAGTGAATGCCGATCTGTATATTTTCTGCTC		
57841 TGCCTTCTGGGACTAGCCTTGGCCTAATCCTTCTCTAGGAGAAGAGCATTAGGTTTTG		
57901 GGAGATGGCTCATAGCCAAGC [CCCTCTCTTGTAGTGTGAT [C/G] CCTTGGAGCACCTTCATGC	+57902 Cf/Gf	rs: 72549262
57961 C]TGGGGTTTCTCTCCAAAAGCTTCTTGCAGTCTAAGCCTTATCCCTTATGTTCCCAT		
58021 AAAGGAATTTCAAAGACATGGAGAAAGTTGGGAAGGTTTGTGCTGACTGCTGGGAGCAG		
58081 AATAGCGTGGGAGGCCACCAAGCCCTAAATCCATTGTCAACTCAGAACACATTTG		
58141 GGCCCATATGCCACCTGGAAACACCAGCTGACACCATGGGCGTCCACACCTGTGCTCCA		
58201 GACAAGCACAAAGCAATCTTTTCAGCCTTGAATGTATTCTGAAAGGCTACCTGAAGCC		
58261 CAGGCC [C/T GAATATGGGGACTTAGTCG] ATTACCTGAAAAAGAAAAGACCCACACTGTGTC	+58267 Cr/Tr	rs: 1109452
58321 CTGCTGTCTTTTGGGAGGAAAATGGAAGAAAGAGTGGGGTGGGCACATTAGAAGTCAC		
58381 CCAAATCTGCGCAGGCTGCCTGGCATCCCTGGGGCATGAGCTGGGCGGAGAATCCACCCC		
58441 GCAGGATGTTTCAGAGGGACCCACTCCTTCATTTTCAGAGTCAAAGGAATCAGAGGCTCA		
58501 CCCATGGCAGGCAGTGAAGAGCCAGGAGTCTGGGTTCTAGTCCCTGCTCTGCCCCCA		
58561 ACTGGCTGTATAACCTTTGAAAAATCATTCTTTTGTCTGAGTCTCTGGTTCTCCGTCAG		
58621 CAACAGCTGGCATAAGGTCCCTGCAGGTTCTTCTAGCTGGAGCACTCAGAGCTTCCC		
58681 TGACTGCTAGCAGCCTCTGCGCCCTCACAGGGCTGATTGTTCTCTCTCCCTGGAGCT		
58741 CTCTCTCTGAAAATCTCCATCAGAGCAAGGCAGCCAGAGAAGCCCTGAGAGGGAATGA		
58801 TTGGGAAGTGTCCACTTTCTCAACCGGCTCATCAACACACTCCTTTGCTATGAATGGC		
58861 ACATGTAATGATGTTATATTTTGTATCTTTATATCATATGCTTACCATTCTGTAAG		
58921 GGCCTGCAATTGTGCTCCATCAGGGGTCTCAAGTGGAATAAACCCCTGTTGATAAC		

FIGURA 11 – REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO EXON 12 DO GENE *MASP1* – SEQUÊNCIA NT_005612

LEGENDA: f – iniciador direto; r – iniciador reverso

NOTA: A sequência em destaque corresponde a parte do exon 12. As regiões de hibridação de cada iniciador estão coloridas com suas respectivas cores, indicando a localização e os SNPs estão nas colunas a direita.

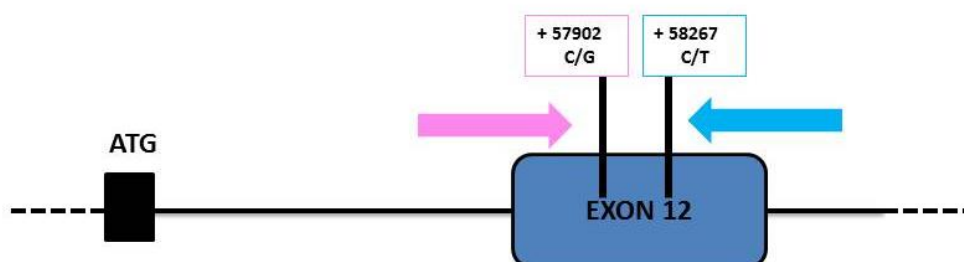


FIGURA 12 - REGIÕES DE ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DO GENE *MASP1* NA PCR-SSP
LEGENDA: Seta rosa: iniciador direto; Seta azul: iniciador reverso; ATG: sítio de início da transcrição; em azul escuro: Exon 12. Os SNPs foram numerados a partir do sítio de início da transcrição.

As PCRs foram realizadas a partir de 20 a 100 ng de DNA genômico e 0,1 a 0,3 μM de cada iniciador específico na presença de 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM e 0,6 unidades de Taq polimerase. A PCR foi realizada em 35 ciclos, cada ciclo iniciando com 94°C (período de desnaturação) por 20 segundos e terminando com 72°C (período de extensão) por 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores é de 61°C nos 10 primeiros ciclos, 59°C nos 10 ciclos seguintes, 57°C nos 15 seguintes, garantindo boa especificidade e quantidade de produto. Cada PCR foi acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e controles de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos procurados do controle endógeno.

3.2.3 Eletroforese em Gel de Agarose

O resultado da amplificação da PCR foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com Sybrsafe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), fluorescente sob luz azul. Em todos os casos, a genotipagem é rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados. Os padrões eletroforéticos obtidos após a reação de PCR-SSP *MASP1* Ex 12 estão representados na FIGURA 13. Sua interpretação é dada na TABELA 8.

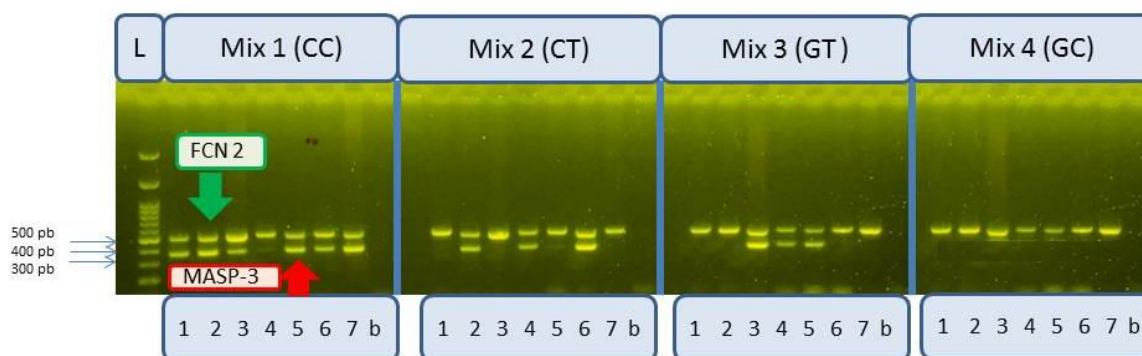


FIGURA 13 - PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES E CONTROLES APÓS A REAÇÃO DE PCR-SSP

NOTA: branco é o controle negativo da reação

LEGENDA: pb, pares de base; L, *Ladder* (padrão de peso molecular de 100 pb); 500pb / 400pb / 300pb: bandas padrões do *Ladder*. Banda FCN 2 = 500pb. Banda MASP-3 = 365pb.

TABELA 8 - INTERPRETAÇÃO DAS BANDAS REPRESENTADAS NA FIGURA 13

AMOSTRA	GENÓTIPO Exon 12	AMOSTRA	GENÓTIPO Exon 12
1	CC/CC	5	CC/GC
2	CC/CT	6	CC/CT
3	CC/GC	7	CC/CC
4	CT/GC	b (branco)	-----

3.3. ENSAIO DE IMUNOADSORBÂNCIA ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETERMINAÇÃO DE MASP-3

A concentração sorológica de MASP-3 foi avaliada em 152 amostras do grupo de pacientes HIV+ e 74 do grupo controle, compostas por indivíduos de diferentes genótipos de *MASP1*. Dentre o grupo de pacientes HIV+, 66 (43,4%) tinham sorologia negativa para HBV e HCV, 68 (44,7%) apresentaram sorologia positiva para HBV, 8(5,3%) eram positivos para HCV, 7 (4,6%) para HBV e HCV (não houve informação disponível acerca da coinfeção pelo HBV em três pacientes). O método utilizado foi o ensaio de imunoadsorbância enzimática (ELISA ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com o kit HK339 (Hycult Biotechnology, Uden, Países Baixos) para a detecção de 8 a 500 ng/mL de MASP-3, seguindo-se as instruções do fabricante (ANEXO 4).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas por meio de contagem direta. A hipótese de equilíbrio de Hardy e Weinberg foi avaliada utilizando-se o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5 (EXCOFFIER *et al.*, 2010). Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se o teste de Fisher bicaudal, cálculo da razão de chances (odds ratio, OR) no pacote de programas SISA (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/twooby2.htm>). Diferenças entre as concentrações séricas de MASP-3 nos grupos investigados foram avaliadas com os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.. Estas últimas análises foram realizadas no programa Graphpad Prism 5.01. A regressão logística

binária de todos os dados foi realizada no programa STATA versão 9.2. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Na TABELA 9 estão listados os dados clínicos de pacientes que apresentaram informações completas para avaliação dos parâmetros de fase da doença (presença ou não de AIDS) e prevalência de doenças oportunistas. Não houve associação entre os dados demográficos e clínicos com a susceptibilidade à infecção pelo HBV ou HCV, comparados ao grupo de pacientes unicamente HIV+. Contudo, houve associação entre o gênero masculino com a tripla infecção por HIV, HBV e HCV (Regressão logística $P=0,013$, $OR=4,2$ [IC95%=1,36-13,0]). Corroborando esses achados, em estudo epidemiológico recente no estado do Piauí, observou-se uma associação entre a coinfeção HIV/HBV e o gênero masculino (OLIVEIRA *et al.* 2013). Também em outro estudo que incluiu mais de 34000 indivíduos infectados pelo HIV em San Francisco (EUA), a coinfeção com hepatites virais (HBV e/ou HCV) foi mais frequente no gênero masculino, especialmente entre homossexuais de origem europeia (SANCHEZ *et al.* 2014).

De acordo com o Boletim epidemiológico HIV-AIDS do Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais/SVS/MS (BRASIL, 2012b) as taxas de prevalência de infecção por HIV na população brasileira são: população geral – 0,4%; homens – 0,5%; mulheres – 0,3%; profissional do sexo – 4,9%; usuários de drogas – 5,9%; HSH – 10,5%. Portanto, observa-se que a maior prevalência de infectados pelo HIV é encontrada no gênero masculino, especialmente entre HSH, dados corroborados neste estudo. Entre a população do gênero masculino que são HSH observa-se uma maior tendência de maior número de parceiros sexuais casuais, principalmente entre os jovens. Esse fato explica a associação de maior prevalência de infecção pelo HIV entre jovens do gênero masculino. A chance de um jovem HSH ser infectado pelo HIV é aproximadamente 13 vezes maior quando comparado com jovens masculinos e femininos em geral. Portanto, conclui-se que o grupo HSH jovem possui maior vulnerabilidade a aquisição do HIV (BRASIL, 2012b).

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (%) DOS PACIENTES HIV+ ESTUDADOS

		HIV+ HBV-HCV-	HIV+ HBV-HCV+	HIV+ HBV+HCV-	HIV+ HCV+HBV+	
AIDS	SIM	56 (63,6)	7 (58,3)	44 (54,3)	14 (82,4)	
	NÃO	32 (36,4)	5 (41,6)	37 (45,7)	3 (17,6)	
	Total	88	12	81	17	
Contagem de linfócitos CD4+	Mediana (variação)	208 (6-952)	172,5 (9-1000)	210 (6-1034)	96 (23-791)	
	Mediana AIDS (variação)	111,5 (6-766)	67 (9-218)	91 (6-594)	93 (23-791)	
	Mediana não AIDS (variação)	391 (211-952)	398,5 (319-1000)	413 (207-1034)	237 (210-264)	
	Total	63	10	65	13	
Carga viral	Mediana (variação)	77000 (230- 750000)	36550 (50- 500000)	52200 (59- 750000)	69950 (1200- 750000)	
	Mediana AIDS (variação)	126000 (230- 750000)	261000 (22000- 500000)	140000 (59- 750000)	54900 (1200- 750000)	
	Mediana não AIDS (variação)	29000 (450- 750000)	25665 (50- 127888)	27050 (400- 488000)	85000 (85000)	
	Total	53	6	57	10	
Número de doenças oportunistas	Candidíase	15 (22)	2 (12,5)	11 (14,5)	3 (17,6)	
	Citomegalovirose	0	0	1 (1,3)	0	
	Criptococose	3 (4,4)	1 (6,3)	2 (2,6)	0	
	Criptosporidiose	4 (5,9)	0	0	0	
	Herpes zoster	4 (5,9)	0	3 (3,9)	0	
	Isosporíase	1 (1,5)	0	1 (1,3)	0	
	Linfoma	2 (2,9)	0	0	0	
	Meningite Criptocócica	0	1 (6,3)	0	1 (5,9)	
	Neurotoxoplasmose	4 (5,9)	2 (12,5)	8 (10,5)	3 (17,6)	
	Pneumocistose	5 (7,4)	2 (12,5)	2 (2,6)	0	
	Pneumonia	1 (1,5)	0	0	0	
	Sarcoma de Kaposi	3 (4,4)	0	0	2 (11,8)	
	Tuberculose	6 (8,8)	1 (6,3)	3 (3,9)	4 (23,5)	
	Ausência	34 (50)	6 (40)	45 (59,2)	4 (23,5)	
	Total de diagnósticos	82	15	76	17	
	PREVALÊNCIA CUMULATIVA DE DOENÇAS OPORTUNISTAS	Uma	24 (35,3)	2 (18,2)	16 (23,5)	9 (64,3)
		Duas	6 (8,8)	2 (18,2)	3 (4,4)	1 (7,1)
Três		4 (5,9)	1 (9,1)	3 (4,4)	0	
Quatro		0	0	1 (1,5)	0	
Ausência		34 (50)	6 (5,5)	45	4 (28,6)	
Total de casos diagnosticados	68	11	68	14		

4.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, HAPLOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DO GENE *MASP1*

Por meio do teste exato de diferenciação populacional de Raymond e Rousset, observou-se que a distribuição dos SNPs +57902 C>G (rs72549262) e +58267 C>T (rs1109452) foi homogênea entre ameríndios, afro- e euro-brasileiros, dentro e entre os grupos de controles e pacientes (TABELA 10).

Logo, foi-nos possível reunir indivíduos com ascendências diferentes em um só grupo amostral de controles e outro, de pacientes. Os SNPs investigados compõem três haplótipos *CC*, *CT* e *GT*. O haplótipo *GG* não foi observado, o que provavelmente se deve ao elevado desequilíbrio de ligação existente entre estes polimorfismos, uma vez que estão muito próximos (365 pb). Estes resultados são concordantes com a proporção aproximada de haplótipos para a população europeia, deduzida com base em dados do projeto HapMap: 60% *CC*, 30% *CT*, 10% *GT*. A distribuição de haplótipos foi homogênea entre os diferentes grupos e subgrupos investigados, exceto entre o grupo de pacientes HIV+HBV+HCV- e o grupo triplamente infectado HIV+HBV+HCV+ (teste exato de diferenciação populacional $P=0,042$) (TABELA 11).

TABELA 10 – FREQUÊNCIA DOS ALELOS MENOS COMUNS DE POLIMORFISMOS DO EXON 12 DE *MASP1* NOS DIFERENTES GRUPOS INVESTIGADOS (% \pm DP)

POPULAÇÃO	N	rs 72549262 (+57902 C>G)	rs 1109452 (+58267 C>T)
Controles	420		
Euro-brasileiros	342	6,8 \pm 1,4	31,0 \pm 2,5
Afro-brasileiros	62	10,7 \pm 3,4	33,3 \pm 5,2
Ameríndios/orientais	16	9,1 \pm 6,3	31,8 \pm 10,2
HIV +	410		
Euro-brasileiros	394	9,4 \pm 1,5	31 \pm 2,3
Afro-brasileiros	8	6,3 \pm 6,3	37,5 \pm 12,5

LEGENDA: N = número de cromossomos; DP = desvio-padrão

TABELA 11 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (%) DE POLIMORFISMOS DO EXON 12 DO GENE *MASP1*

Haplótipo	CONTROLES	PACIENTES HIV +	SUBGRUPO HIV+HBV- HCV-	SUBGRUPO HIV+HBV+ HCV-	SUBGRUPO HIV+HBV- HCV+	SUBGRUPO HIV+HBV+ HCV+
+57902						
+58267						
N	420	410	176	162	24	34
CC	288 (68,57)	282 (68,78)	115 (65,34)	115 (70,99)	19 (75,00)	24 (70,59)
CT	100 (23,81)	90 (21,95)	44 (25,00)	29 (17,90)	3 (16,67)	10 (29,41)
GT	32 (7,62)	38 (9,27)	17 (9,65)	18 (11,11)	2 (8,33)	0 (0,00)

LEGENDA: N = número de cromossomos;

A distribuição dos genótipos também foi homogênea entre controles e pacientes, embora uma tendência de maior número de homozigotos *CT/CT* entre os pacientes foi observada (Teste exato de Fisher $P[O>E|O<E]= 0,084$) (TABELA 12).

Esta mesma distribuição apresentou-se concordante com as premissas do modelo de equilíbrio de Hardy e Weinberg, exceto no caso dos pacientes, devido a um excesso de heterozigotos para o polimorfismo em +58267, com relação ao que seria esperado pela frequência do alelo correspondente (TABELAS 13 e 14). Este desequilíbrio não é inesperado, uma vez que o grupo de pacientes foi selecionado para a presença de doença, não sendo representativo da população geral. Ainda, observou-se associação entre heterozigotos *CC/GT* e a ausência de infecção pelo HCV (15/81 ou 18,5% em HIV+HBV+HCV- vs. 0/29 em HIV+HCV+, independente da infecção pelo HBV: teste exato de Fisher $P=0,0102$). A mesma diferença permaneceu considerando todos os indivíduos HIV+HCV-, independentemente da infecção pelo HBV (teste exato de Fisher $P=0,0294$). Esta diferença provavelmente foi a principal causa da diferenciação populacional verificada entre os grupos HIV+HBV+HCV- e HIV+HBV+HCV+, mencionada anteriormente, e do desequilíbrio de Hardy e Weinberg nos pacientes (TABELA 14). Este resultado deve ser confirmado com aumento do tamanho amostral dos grupos coinfectados, especialmente HCV positivos.

TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (%) DE POLIMORFISMOS DO EXON 12 DO GENE *MASP1*

Genótipo +57902+58267/ 57902+58267	CONTROLES	PACIENTES HIV +	SUBGRUPO HIV+HBV- HCV-	SUBGRUPO HIV+HBV+ HCV-	SUBGRUPO HIV+HBV- HCV+	SUBGRUPO HIV+HBV+ HCV+
N	210	205	88	81	12	17
CC/CC	95 (45,2)	90 (43,9)	33 (37,5)	37 (45,7)	07 (58,3)	09 (52,9)
CC/CT	76 (36,2)	77 (37,6)	39 (44,3)	26 (32,1)	04 (33,3)	06 (35,3)
CC/GT	22 (10,5)	25 (12,2)	<u>10 (11,4)</u>	<u>15 (18,5)</u>	<u>0 (0,0)</u>	<u>0 (0,0)</u>
CT/CT	09 (4,3)	03 (1,5)	01 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	02 (11,8)
CT/GT	06 (2,8)	07 (3,4)	03 (3,4)	03 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
GT/GT	02 (1,0)	03 (1,5)	02 (2,3)	0 (0,0)	01 (8,3)	0 (0,0)

LEGENDA: N – número de indivíduos. Sublinhado: frequências significativamente diferentes.

TABELA 13 - EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR *LOCUS* E HAPLÓTIPO NO GRUPO CONTROLE

Locus	N	Het. Obs.	Het. Esp.	P	D. P.
+57902	210	0,13333	0,14111	0,33764	0,00046
+58267	210	0,46667	0,43205	0,26649	0,00042
Haplótipos	210			0,417	0,0025

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

TABELA 14 - EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG POR *LOCUS* E HAPLÓTIPO NOS PACIENTES HIV+

Locus	N	Het. Obs.	Het. Esp.	P	D. P.
+57902	205	0,15610	0,16860	0,38860	0,00049
+58267	205	0,49756	0,43051	0,03456	0,00019
Haplótipos	205			0,00889	0,0004

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

4.3 ASSOCIAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE MASP-3 COM OS POLIMORFISMOS DO EXON 12 DO GENE *MASP1*

A concentração de MASP-3 apresentou-se diminuída em indivíduos controle que apresentaram o alelo *T* (genótipos *CT* ou *GT*), comparado a homozigotos com o alelo *C* (*CC/CC*), com medianas de 16,14 e 11,61 µg/mL, $p = 0,16$ (GRÁFICO 1).

Em estudo recente, polimorfismos no intron 8 (rs3774275) e no exon 9 (rs698090) do gene *MASP1* foram igualmente associados com a modulação das concentrações de MASP-3 no soro. Especificamente, homozigose para o alelo menos comum de rs3774275 foi associada com um decréscimo de 26% na concentração mediana de MASP-3, acompanhada de um acréscimo de 29% em MAp44 e 13% em MASP-1. Esses polimorfismos, assim como os investigados no presente estudo, estão situados na região de recomposição alternativa do gene, compartilhada pelos mRNAs que dão origem a MASP-1, MASP-3 e MAp44 (AMMITZBØLL *et al.*, 2013). Além disso, o nosso grupo verificou a mesma associação encontrada no presente estudo, com as concentrações de MASP-3 na população saudável dinamarquesa (Mann-Whitney $P < 0.0001$, MENDES *et al.* manuscrito em preparação). A diminuição na concentração de MASP-3 pode estar associada a uma maior afinidade de microRNAs pelo polimorfismo 58267T na região não traduzida (UTR) do exon 12, levando à destruição do mRNA ou ao bloqueio da sua tradução, que ocorre quando não há complementaridade perfeita entre a sequência do microRNA e o mRNA.

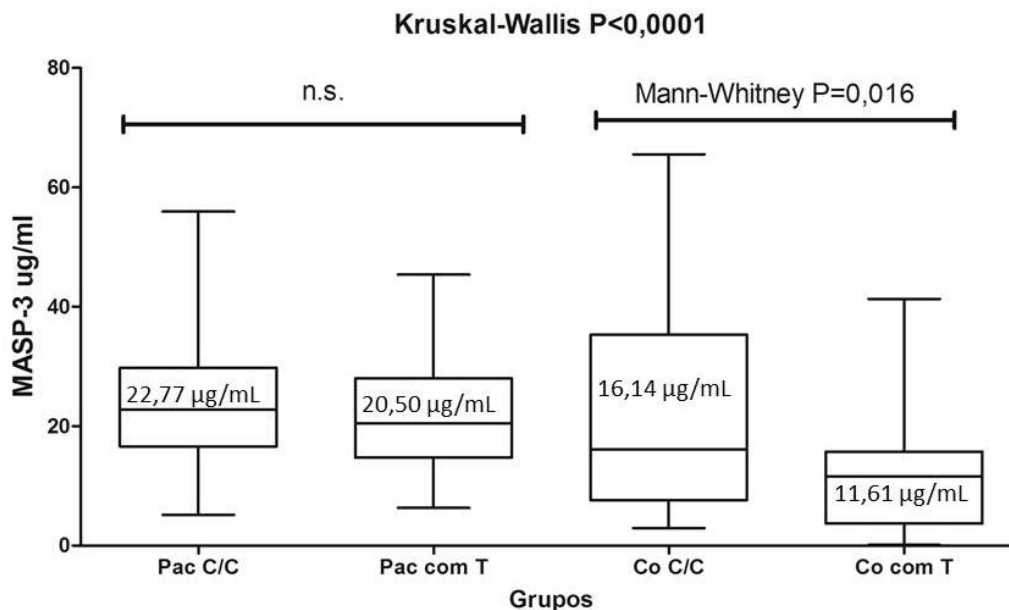


GRAFICO 1 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3 EM PACIENTES E CONTROLES COM ALELO T E SEM ALELO T NA POSIÇÃO +58267 DO GENE *MASP1*

NOTA: Box-plot com mediana, níveis máximo e mínimo.

LEGENDA: Pac, pacientes; Co, controles; n.s. não significante.

4.4 VALORES SÉRICOS DE MASP-3 E ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO HIV

As concentrações de MASP-3 em pacientes HIV+ foram significativamente aumentadas em relação aos controles ($p=0,0002$), independentemente da presença ou não de coinfeção com HBV e HCV (TABELA 15 e GRÁFICO 2). Por meio de regressão logística binária, demonstrou-se que concentrações elevadas de MASP-3 estão associadas à susceptibilidade a infecção por HIV após correção por idade, gênero e grupo étnico ($P<0,0001$; OR= 12,20; IC95% = 3,95 - 37,67). Ao analisar-se os pacientes HIV+ (não coinfectados com HBV ou HCV) em relação aos controles nota-se que essa associação permanece ($P<0,0001$, OR=12,95 [IC95%= 3,19-52,65]), assim como quando se avalia os pacientes com sorologia positiva para HBV (excluindo os pacientes com sorologia positiva para HCV) ($P<0,0001$, OR=8,79 [IC95%=2,79-27,66]) (GRÁFICO 3).

As concentrações de MASP-3 permaneceram associadas com a susceptibilidade à tripla HIV/HBV/HCV infecção após correção pelo gênero (único

fator demográfico associado), quando comparados com pacientes unicamente positivos HIV (P=0,031).

Contudo, as concentrações de MASP-3 não se mostraram correlacionadas com a carga viral ou com a contagem de células T CD4+ nos pacientes HIV+.

TABELA 15 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-3 ($\mu\text{g/mL}$)

Grupo	N	Mediana	Varição
Controles	74	14,4	0,14 – 65,53
HIV+	152	22,16	5,15 – 55,95
HIV+HBV-HCV-	66	22,19	8,92 - 56,0
HIV+HBV-HCV+	08	22,49	11,84 – 44,44
HIV+HBV+HCV-	68	21,08	5,15 – 54,32
HIV+HCV+HBV+	07	27,54	13,99 – 40,64

LEGENDA: N, número de indivíduos.

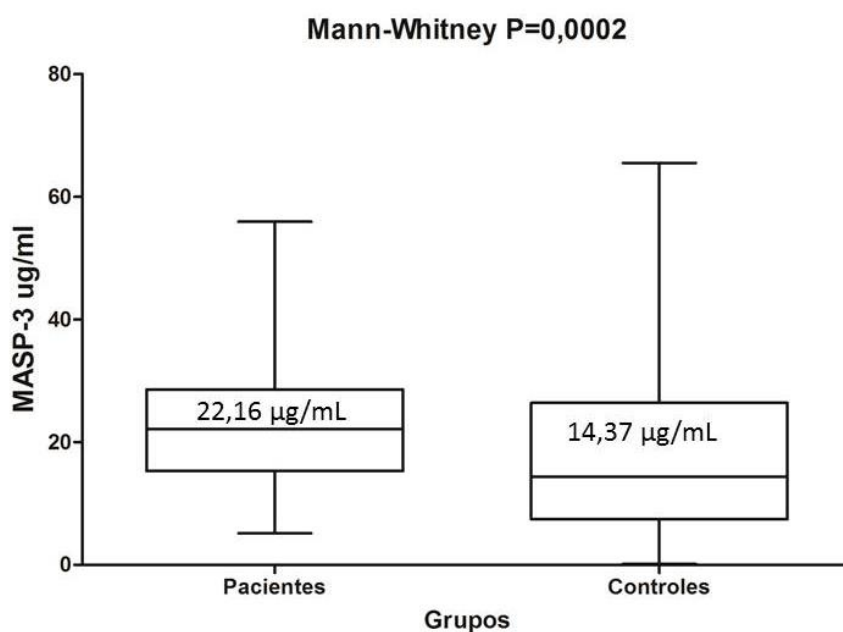


GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3 EM PACIENTES HIV+ E CONTROLES

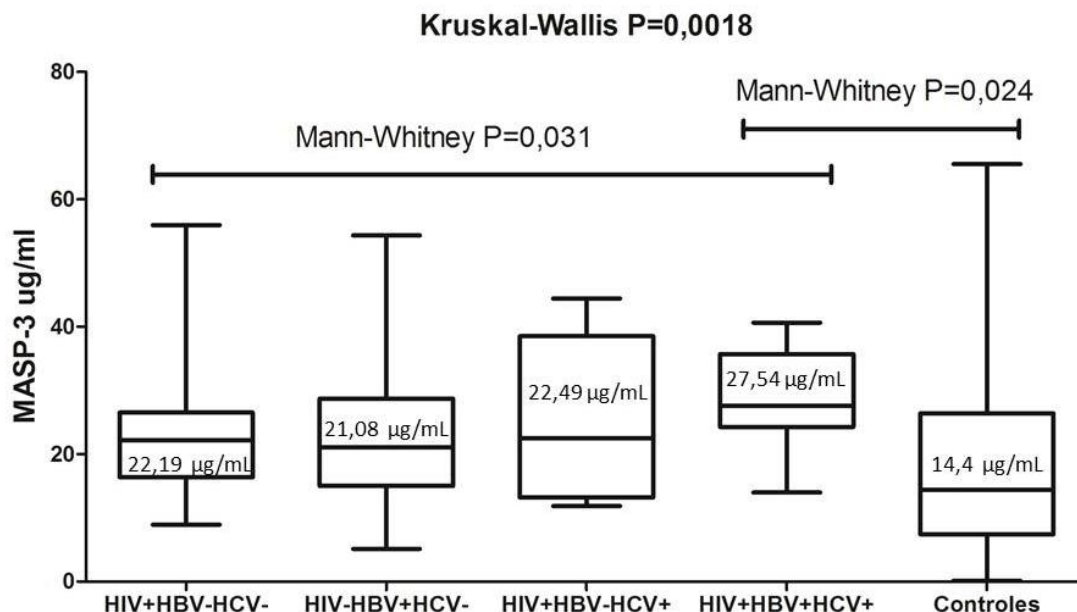


GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MASP-3 EM CONTROLES E PACIENTES HIV E COINFECTADOS

Este é o primeiro estudo a identificar uma associação entre a infecção pelo HIV e concentrações de MASP-3, sendo que altas concentrações da proteína se relacionaram com o aumento da susceptibilidade a infecção.

Estudos recentes demonstraram uma relação de concentrações altas de MASP-3 com a resposta ao tratamento com o imunobiológico anti-TNF α em pacientes com doença de Chron (SANDAHL *et al.* 2013). Concentrações elevadas de MASP-3 também foram relatadas em pacientes com esclerose múltipla, submetidos à terapia com interferon beta (PETERSEN *et al.* 2009).

Por outro lado, não houve associação entre as concentrações de MASP-3 e a susceptibilidade a infecções graves em pacientes com câncer hematológico submetidos a quimioterapia (AMEYE *et al.* 2011). Também não se observou diferença entre as concentrações de MASP-3 em pacientes com doença cardiovascular e controles (FRAUENKNECHT *et al.* 2013).

Outros estudos recentes não encontraram associação com concentração de MASP-3 e doenças. No presente estudo, não houve associação entre concentrações superiores de MASP-3 nos pacientes sob terapia antiretroviral, o

que nos leva a sugerir que as concentrações aumentadas se devem à infecção pelo HIV e coinfeção pelo HBV/HCV.

Os resultados da análise genética dos polimorfismos investigados neste estudo deverão ser confirmados por meio de uma haplotipagem que inclua maior número de polimorfismos do gene *MASP1* especialmente os associados com as concentrações das proteínas codificadas pelo gene *MASP1*, tais como rs698090 e rs3774275 (AMMITZBØLL *et al.*, 2013) e replicados em estudos futuros com pacientes HIV+ e coinfectados pelo HBV e HCV. Além disso, análises sorológicas das proteínas MASP-1 e MAp44 deverão ser realizadas, já que existe forte associação entre essas proteínas e MASP-3. Estudos tem demonstrado que o aumento das concentrações de MASP-3 ocorre simultaneamente com a diminuição de MASP-1 e MAp44 e vice-versa (AMMITZBØLL *et al.*, 2013).

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo levam-nos a concluir que:

- não há associação entre os genótipos (rs 72549262 e rs 1109452) do gene *MASP1* e susceptibilidade à infecção pelo HIV e coinfeção com HBV.
- genótipos heterozigotos *MASP1* *CC/GT se mostraram associados com a ausência de coinfeção pelo HCV nos pacientes HIV+
- as concentrações basais de MASP-3 são influenciadas por polimorfismos do gene *MASP1*, em específico na posição +58267 na região UTR do Exon 12.
- concentrações elevadas de MASP-3 estão fortemente associadas à infecção pelo HIV e coinfeção com HBV e HCV, independente dos genótipos de *MASP1*.
- não houve associação entre concentrações de MASP-3 e uso de TARV ou presença de doenças oportunistas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Elsevier, 2012.
- AMEYE, L.; PAESMANS, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C.; AOUN, M.. M-ficolin levels are associated with the occurrence of severe infections in patients with haematological cancer undergoing chemotherapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, p. 303–308, 2012.
- AMMITZBØLL, C.G.; STEFFENSEN, R.; NIELSEN, H.J.; THIEL, S.; TENGAARD-PEDERSEN, K.; BOGSTED, M.; JENSENIUS, J.C.. Polymorphisms in the *MASP1* Gene Are Associated with Serum Levels of MASP-1, MASP-3, and MASP44. **Plos One**, v. 8, Issue 9, 2013.
- 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.
- BOLDT, A. B. W., GRISBACH, C, STEFFENSEN, R., THIEL, S., KUN, J. F. J., JENSENIUS, J. C., MESSIAS-REASON, I. J. T. Multiplex sequence-specific PCR reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MASP19 serum levels. **Human Immunology**. v.72, p.753 - 760, 2011.
- BOLD, A. B. W., GOELDNER, I., MESSIAS-REASON, I. J.T.. Relevance of Lectin Pathway of Complement in Rheumatic Diseases. **Advances in Clinical Chemistry**, vol. 56. Elsevier, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças**. Brasília: Ministério da Saúde, 2 ed., 2004.
- BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Ministério da Saúde, 7 ed., 2008a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV**. 7 ed, Brasil, 2008b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Portaria n.º 151 de 14 de outubro de 2009**. Aprova, na forma dos Anexos a esta Portaria, etapas sequenciadas e o Fluxograma Mínimo para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses, de uso obrigatório pelas instituições de saúde públicas e privadas. Brasília, DF – 2009.
- BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Ministério da Saúde, 8 ed., 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS**. AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. Disponível em <
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Aids_etiologia_clinica_diagnostico_tratamento.pdf >. Acesso em 15/04/12a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e hepatites virais. **Boletim epidemiológico HIV-AIDS**. Brasília: Ministério da Saúde, ano I, n. 1, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e hepatites virais. **Aids no Brasil**. Brasília, dezembro de 2012c. Disponível em:
http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/page/2010/36364/aids_no_brasil_2012_17137.pdf. Acesso em 01/03/2014.

BROWN, K. S. et al. Severe fibrosis in hepatitis C virus-infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex. **Clinical and Experimental Immunology**., v. 147, n. 1, p. 90-98, 2007.

CASADO, C.; COLOMBO, S.; RAUCH, A.; et al.. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. **PloS One**, v. 5, p. 1-6, 2010.

CHACKERIAN, B.; RUDENSEY, L. M.; OVERBAUGH, J.. Specific N-linked and Olinked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7719–7727, 1997.

CHENG-MAYER, C. *et al.*. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 7, p. 5294–5300, 1999.

CORVINO, S.M.; HENRIQUES, R.M.S.; GROTTTO, R.M.T.; PARDINI, M.I.M.C.. Coinfecção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, n.4, São Paulo, dezembro de 2007.

CURITIBA. Secretaria Municipal de Saúde (SESA). Disponível em: <
<http://www.curitiba.pr.gov.br/noticias/curitiba-nao-teve-criancas-infectadas-pelo-hiv-em-2013/31876>>. Acesso em: 01/02/2014.

DATABASE OF GENE. Bethesda (MD): National Center of Biotechnology Information, National Library of Medicine. MASP1 mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor) [*Homo sapiens* (human)] Gene ID: 5648 . Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5648> >. Acesso em 30/05/2013.

DATABASE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine.

SNPs: rs: 72549262, rs: 1109452. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>>. Acesso em 01/08/2013.

DATTA, P.; RAPPAPORT, J.. HIV and complement: hijacking an immune defense. **Biomed Pharmacother**, v. 60, p. 561– 568, 2006.

DEGN, S.E.; JENSEN, L.; HANSEN, A.G.; DUMAN, D.; TEKIN, M.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S.. Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 Is Crucial for Lectin Pathway Activation in Human Serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 Is Required for Alternative Pathway Function. **The Journal of Immunology**, v. 189, p. 3957-3969, 2012.

EZEKOWITZ, R. A. *et al.*. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. **The Journal Experimental Medicine**, New York, v. 169, n. 1, p. 185-196, 1989.

FRAUENKNECHT, V.; THIEL, S.; STORM, L.; MEIER, N.; ARNOLD, M.; SCHMID, J.P.; SANER, H.; SCHROEDER, V.. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v.173, p. 112-120, 2013.

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.

GARRED, P. et al. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? **European Journal of Immunogenet**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 125-131, 1994.

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

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H.O.; KOCH, C.. Mannose-binding lectin deficiency -- revisited. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 40, n. 2-4, p. 73-84, 2003.

GIRARDI, G.; PROHÁSZKA, Z.; BULLA, R.; TEDESCO, F.; SCHERJON. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. **Molecular Immunology**, v. 48, Issue 14, p. 1621-1630, The Netherlands, 2011.

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 10/03/2012.

HAERYNCK, F.; STEEN, K.V.; CATTART, T.; LOEYS, B.; VAN DAELE, S.; SCHELSTRAETE, P.; CLAES, K.; VAN THIELEN, M.; CANCK, I.; JOHN, J.M.M.; BAETS, F.. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of

early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. **Human Immunology**, v. 73, p. 1175–1183, 2012.

HAJELA, K.; KOJIMA, M.; AMBRUS, G.; WONG, K. H. N.; MOFFATT, B. E.; FERLUGA, J.; HAJELA, S.; GÁL, P.; SIM, R. B.. The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). **Immunobiology**, v. 205, p. 467 – 475, 2002.

HAURUM, S. T. *et al.*. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**, Philadelphia, v. 7, n. 10, p.1307-1313, 1993.

HÉJA, D.; HARMAT, V.; FODOR, K.; WILMANN, M.; DOBÓ, J.; KÉKESI, K.A.; ZÁVODSZKY, P.; GÁL, P.; PÁL, G.. Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 24, p. 20290 – 20300, 2012.

HELMY, K.Y.; *et al.* CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. **Cell**, v. 124, Issue 5, p. 915-927, San Francisco – USA, 2006.

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

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.

HOPE, T. J.; TRONO, D. **Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome**. Disponível em <<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-00&doc=kb-02-01-02>>. Acesso em 10/07/2012.

JACQUET, M.; LACROIX, M.; ANCELET, S.; GOUT, E.; GABORIAUD, C.; THIELENS, N.M.; ROSSI, V.. Deciphering complement receptor type 1 interactions with recognition proteins of the lectin complement pathway. **The Journal of Immunology**, 190 (7), p. 3721-3731, 2013.

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

KONOPNICKI, D.; MOCROFT, A.; ANTUNES, F.; LEDERGERBER, B.; KATLAMA, C.; ZILMER, K.; VELLA, S.; KIRK, O.; LUNDGREN, J.D.; Hepatitis B and HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort. **AIDS**, v. 19, n. 6, p. 593-601, 2005.

LACOMBE, K.; ROCKSTROH, J.; HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. **Gut**, v. 61, Suppl 1, p. i47–58, 2012

LIMA, A. L. M. *et al.* **HIV/AIDS: perguntas e respostas**. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/resources/crt_aids/arquivosbibliotecacrt/TARigospdfcompletos/hiv_aids__perguntas.pdf>. Acesso em: 15/06/2012.

MEGYERI, M. *et al.* Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 5, p. 3409-3416, 2009.

MOLLER-KRISTENSEN, M. *et al.* Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. **International Immunology**, v. 19, n. 2, p. 141-149, 2007.

MURIUKI, B.M.; GICHERU, M.M.; WACHIRA, D.; NYAMACHE, A.K.; KHAMADI, S.A.; Prevalence of hepatitis B and C viral co-infections among HIV-1 infected individuals in Nairobi, Kenya. **BMC Research Notes**, v.6, p.363, 2013.

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.

NIAID - 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 10/05/2012.

OLIVEIRA, E.H.; LIMA VERDE, R.M.C.; PINHEIRO, L.M.L.; BENCHIMOL, M.G.; ARAGÃO, A.L.E.D.; LEMOS, J.A.R.; OLIVEIRA-FILHO, A.B.; VALLINOTO, A.C.R.. HBV infection in HIV-infected subjects in the state of Piauí, Northeast Brazil. **Archives of Virology - Springer- Verlag Wien** 2013.

PETERSEN, T.; MØLLER-LARSEN, A.; THIEL, T.; BRUDEK, T.; HANSEN, T.K.; CHRISTENSEN, T.. Effects of interferon-beta therapy on innate and adaptive immune responses to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W, cytokine production, and the lectin complement activation pathway in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 215, p. 108–116, 2009.

PROHÁSKA, Z.; THIEL, S.; UJHELYI, E.; SZLÁVIK, J.; BÁNHEGYI, D.; FÜST, G.. Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of the disease. **Immunol Lett**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 171-175, 1997.

REBBANI, K.; OULADLAHSEN, A.; BENSGHIR, A.; AKIL, A.; LAMDINI, H.; ISSOUF, H.; *et al.* Co-infections with hepatitis B and C viruses in human

immunodeficiency virus-infected patients in Morocco. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, p. 454-457, 2013.

ROORYCK, C.; DIAZ-FONT, A.; OSBORN, D.P.S.; *et al.* Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. **Nature Genet.**, v. 43, n. 3, p. 197-203, 2011.

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.

SANCHEZ, M.A; SCHEER, S.; SHALLOW, S.; PIPKI, S.; HUANG, S.. Epidemiology of the Viral Hepatitis-HIV Syndemic in San Francisco: A Collaborative Surveillance Approach. **Data Harmonization and Registry Matching. Public Health Reports**.129 Suppl 1, p. 95-101, 2014.

SANDAHL, T.D.; KELSEN, J.; DIGE,A.; DAHLERUP, J.F.; AGNHOLT, J.; THIEL, S.. The lectin pathway of the complement system is downregulated in Crohn's disease patients who respond to anti-TNF- α therapy. **Journal of Crohn's and Colitis**, 2013.

SEYFTARH, J.; GARRED, P.;MADSEN, H. O. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (*mbl2*) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 7, p. 962-971, 2006.

SKJOEDT, M. O. *et al.* A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8234-8243, 2010.

SOREN, E.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S.. Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System. **The American Journal of Human Genetics** v.88, p.689-705, June 10, 2011.

SORIANO, V.; VISPO, E.; LABARGA, P.; MEDRANO, J.; BARREIRO, P.. Viral hepatitis and HIV co-infection. **Antiviral Research**, v.85, n. 1, p. 303–315, 2010.

STOVER, C. M. *et al.* Murine serine proteases MASP-1 and MASP-3, components of the lectin pathway activation complex of complement, are encoded by a single structural gene. **Genes and Immunity**., v. 4, n. 5, p. 374-384, 2003.

SULKOWSKI, M.S. Viral hepatitis and HIV coinfection. **Journal of Hepatology**, v48, p. 353-367, 2008.

TAKADA, F. *et al.* Localization of the genes for the 100-kDa complement-activating components of Ra-reactive factor (CRARF and Crarf) to human 3q27-q28 and mouse 16B2-B3. **Genomics**, v. 25, n. 3, p. 757-759, 1995.

TAKAHASHI, M. *et al.* Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 1, p. 29-37, 2010.

TAKAHASHI, K. *et al.* Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 96-102, 2011.

TERAI, I. *et al.* Human serum mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1): determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 110, n. 2, p. 317-323, 1997.

UNAIDS, **Aids by the numbers**. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2013/JC2571_AIDS_by_the_numbers_en.pdf. Suíça, 2013a.

UNAIDS, **Global Report Aids Epidemic 2013**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. "UNAIDS / JC2502/1/E"- Revised and reissued, Novembro de 2013b.

UNAIDS, **A ONU e a resposta à aids no Brasil**. Disponível em: <http://www.unaids.org.br/documentos/A%20ONU%20e%20a%20resposta%20-%20PORTUGU%C3%8AS.pdf>. Acesso em 01/03/13. Brasília, 2013c.

WEI, X. *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, London, v. 422, n. 6929, p. 307–312, 2002.

WIESMANN, C.; *et al.* **Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation**. **Nature**, v. 444, p 217 – 220, USA, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **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 10/05/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **AIDS epidemic update: December 2009**. Disponível em <http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf>. Acesso em 05/08/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV Treatment / Antiretroviral therapy**. Disponível em <<http://www.who.int/hiv/topics/treatment/en/index.html>>. Acesso em 10/05/2012a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TB/HIV: Manual Clínico. Terapia antiretroviral para o tratamento da infecção pelo HIV**. Disponível em: <

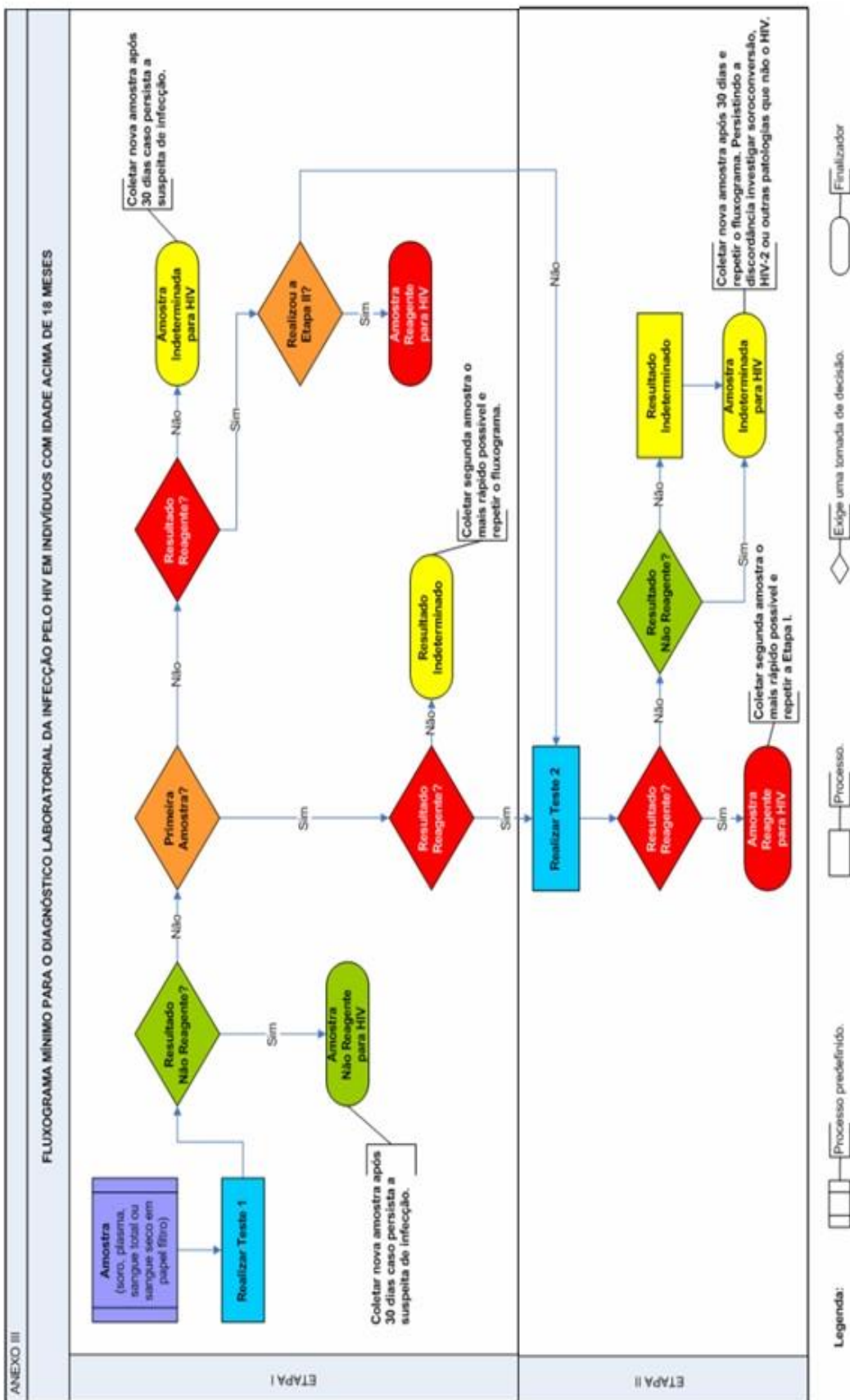
http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_HTM_TB_2004.329_por_chap11.pdf >. Acesso em 10/12/2012b.

ZEN, C. H. Influência do polimorfismo gênico da lectina ligante de manose na suscetibilidade à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida. Curitiba, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 - FLUXOGRAMA MÍNIMO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV EM INDIVÍDUOS COM IDADE ACIMA DE 18 MESES.....	74
ANEXO 2 – TERMO DE APROVAÇÃO ATUALIZADO DO PROJETO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP/HC).....	75
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	76
ANEXO 4 – PROTOCOLO DA QUANTIFICAÇÃO DE MASP-3 NO SORO (HK339).....	77

ANEXO 1 – FLUXOGRAMA MÍNIMO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV EM INDIVÍDUOS COM IDADE ACIMA DE 18 MESES



ANEXO 2 – 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
Iara J. T. de Messias-Reason
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - Paraná

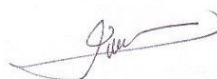
Prezada Pesquisadora:

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 3 – 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 4 – PROTOCOLO DA QUANTIFICAÇÃO DE MASP-3 NO SORO KIT HYCULT BIOTECH (HK 339)

Cuidados: O Kit deve ser armazenado em geladeira (2 a 8^oC).

Preparo anterior ao procedimento:

1. Selecione 88 amostras de soro (não usar plasma, pois os resultados que obtivemos foram praticamente todos abaixo do blanc com a diluição mínima prevista no kit, de 20X) para uma placa de 96 poços (os 8 poços restantes serão ocupados com a curva standard de diluição seriada do kit. Duas das 88 amostras devem ser repetições da placa anterior. Ou então, separe as amostras de acordo com a sua necessidade.
2. Organize as amostras e faça um esquema da placa por colunas para que a coluna 12 seja reservada para o standard. A mesma organização deve ser seguida nos tubos para diluição e nas caixinhas de ponteiros como controle de pipetagem, como mostrado no esquema abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostr a 1	Amostr a 9	Amostr a 17	Amostr a 25	Amostr a 33	Amostr a 41	Amostr a 49	Amostr a 57	Amostr a 65	Amostr a 73	Amostr a 81	Standar d 1
B	Amostr a 2	Amostr a 10	Amostr a 18	Amostr a 26	Amostr a 34	Amostr a 42	Amostr a 50	Amostr a 58	Amostr a 66	Amostr a 74	Amostr a 82	Standar d ½
C	Amostr a 3	Amostr a 11	Amostr a 19	Amostr a 27	Amostr a 35	Amostr a 43	Amostr a 51	Amostr a 59	Amostr a 67	Amostr a 75	Amostr a 83	Standar d ¼
D	Amostr a 4	Amostr a 12	Amostr a 20	Amostr a 28	Amostr a 36	Amostr a 44	Amostr a 52	Amostr a 60	Amostr a 68	Amostr a 76	Amostr a 84	Standar d 1/8
E	Amostr a 5	Amostr a 13	Amostr a 21	Amostr a 29	Amostr a 37	Amostr a 45	Amostr a 53	Amostr a 61	Amostr a 69	Amostr a 77	Amostr a 85	Standar d 1/16
F	Amostr a 6	Amostr a 14	Amostr a 22	Amostr a 30	Amostr a 38	Amostr a 46	Amostr a 54	Amostr a 62	Amostr a 70	Amostr a 78	Amostr a 86	Standar d 1/32
G	Amostr a 7	Amostr a 15	Amostr a 23	Amostr a 31	Amostr a 39	Amostr a 47	Amostr a 55	Amostr a 63	Amostr a 71	Amostr a 79	Amostr a 87	Standar d 1/64
H	Amostr a 8	Amostr a 16	Amostr a 24	Amostr a 32	Amostr a 40	Amostr a 48	Amostr a 56	Amostr a 64	Amostr a 72	Amostr a 80	Amostr a 88	Blanc

Procedimento:

Em todos os procedimentos, nunca encostar a ponteira no fundo do poço! Lembrar que o poço está coberto com anticorpos! Cuidado para não esbarrar a placa e espirrar o líquido no selante!

3. Retire as amostras e todos os reagentes que serão utilizados (incluindo a placa) do congelador ou geladeira e deixe que atinjam a temperatura ambiente (entre 20 e 25^oC, confira no termômetro).
4. Arrume 88 tubos de ensaio de vidro (ou a quantidade de amostras a serem diluídas) na mesma configuração das amostras na placa (não escreva nos tubos, pois a tinta da caneta não é removível e ele terá que ser jogado fora).
5. Misturar as amostras no vortex.
6. Diluir o "dilution buffer" 10X adicionando 90 mL de água destilada aos 10 mL contidos no kit ([final] = 1X). Pode ser armazenado em geladeira por poucos dias (não utilizar mais da metade por placa, pois uma ampola é o suficiente para duas placas!).

7. Colocar 180 μL de dilution buffer 1X em cada tubo de ensaio (ou o volume mínimo necessário para a diluição das amostras).
8. Adicionar 20 μL de soro aos 180 μL de dilution buffer 1X (diluição 1:10); misturar no vortex e aplicar 100 μL da mistura no poço correspondente da placa (o tempo entre a aplicação da primeira e da última amostra deve ser inferior a 15 minutos). As ponteiros podem ser jogadas no lixo e os tubos de ensaio devem ser colocados em hipoclorito para posterior lavagem.
9. Na última coluna da placa a partir do segundo poço (H2, H3, H4, H5, H6, H7 e H8) aplicar 100 μL de "binding buffer" 1X.
10. Diluir o "standard", 5000 ng em pó com 1 mL de água destilada e misturar bem para diluir completamente. Separar 500 μL em um eppendorf e congelar imediatamente a -20°C , devidamente identificado para utilizar na segunda placa do kit. Do restante fazer uma diluição 1:10 utilizando 100 μL do standard e 900 μL de binding buffer. Deve ser utilizado em até 15 minutos após a diluição. A curva iniciará em 500 ng/mL, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 0 ng.
11. No primeiro poço da última coluna da placa (H1) adicionar 200 μL do standard; retirar 100 μL desse poço e adicionar no poço abaixo e misturar bem; repetir o procedimento até o sétimo poço e descartar os 100 μL retirados dele (o oitavo poço deve permanecer apenas com os 100 μL de binding buffer).
12. Cobrir a placa com um selante que não tenha cola muito forte (não usar o do kit pois ele rasga como papel quando for retirado e nem o usado para PCR pois a cola é muito forte) e deixar por 2 horas a 37°C na estufa.

Fazer os passos 12 a 14 durante a incubação!

13. Diluir o "wash buffer" 40X adicionando 780 mL de água destilada aos 20 mL do kit. Colocar no frasco de plástico próprio para a lavadora de placas ([final] = 1X).
14. Preparar a lavadora de placas.
15. Diluir um dos frasco de "tracer" adicionando 1 mL de água destilada ao pó, misturar bem e adicionar 11 mL de "dilution buffer" 1X. Pode ser armazenado em geladeira (2 a 8°C) por um mês.
16. Após o término da incubação das amostras retirar o selante e fazer 3 lavagens (de \pm 300 μL) com wash buffer 1X na lavadora de placas.
17. Retirar a placa do equipamento e com muito cuidado inverter a placa batendo forte sobre folhas de papel toalha (segurando em uma mão o papel toalha e na outra mão a placa) para retirar o excesso de líquido. Voltar com muito cuidado pois as tiras da placa podem se soltar e não são identificadas.
18. Adicionar 100 μL do tracer diluído por poço. (Utilizar multicanal e não precisa trocar as ponteiros se não encostar no fundo do poço; colocar um frasco do tracer em uma "barquinha" (identificada para uso exclusivo com tracer, que deve ser lavada apenas com água da torneira sob um jato forte e depois enxaguada com água destilada) para poder pipetar com a multicanal; o que

sobrar jogar fora) Selar e incubar novamente por 1 hora a temperatura ambiente com agitação leve.

19. Diluir o "streptavidin-peroxidase" adicionando 1 mL de água destilada ao pó e após misturar bem adicionar 23 mL de dilution buffer. Pode ser armazenado em geladeira (2 a 8°C) por um mês.

20. Realizar novamente as lavagens no equipamento. Idem ao n. 16.

21. Adicionar 100 µL de "streptavidin-peroxidase" por poço. (Utilizar multicanal e não precisa trocar as ponteiros se não encostar no fundo do poço; colocar metade do volume - 12 mL em uma "barquinha" (identificada para uso exclusivo com "streptavidin-peroxidase", que deve ser lavada apenas com água da torneira sob um jato forte e depois enxaguada com água destilada) para poder pipetar com a multicanal; o que sobrar jogar fora.) Selar e incubar novamente por 1 hora a temperatura ambiente com agitação leve.

22. Realizar novamente as lavagens no equipamento. Idem ao n. 16.

23. Adicionar 100 µL de TMB por poço. (Utilizar multicanal e não precisa trocar as ponteiros se não encostar no fundo do poço; colocar metade do volume - 11 mL em uma "barquinha" (identificada para uso exclusivo com TMB, que deve ser lavada apenas com água da torneira sob um jato forte e depois enxaguada com água destilada) para poder pipetar com a multicanal; o que sobrar jogar fora.) Selar e incubar novamente por 30 minutos a temperatura ambiente NO ESCURO, PROTEGIDO DA LUZ - no armário. A cor ficará azul.

24. Preparar o espectrofotômetro e a impressora no mínimo 20 minutos antes de realizar a leitura:

a. ligar a impressora na tomada 110V!!! e no botão na frente, canto esquerdo e ligar o espectrofotômetro na tomada 220V (é bivolt) e no botão na lateral direita; Ele irá fazer a checagem.

25. Adicionar 100 µL de "stop solution" por poço. (Utilizar multicanal e não precisa trocar as ponteiros se não encostar no fundo do poço; colocar metade do volume - 10 mL em uma "barquinha" (identificada para uso exclusivo com "stop solution", que deve ser lavada apenas com água da torneira sob um jato forte e depois enxaguada com água destilada) para poder pipetar com a multicanal; o que sobrar jogar fora.) A cor ficará amarela.

26. Fazer a leitura da absorbância a 450 nm no espectrofotômetro dentro de um tempo não maior do que 30 minutos.

27. Análise dos dados.