

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAMYRES MINGORANCE CARVALHO

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* DO SISTEMA
COMPLEMENTO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO.

CURITIBA

2015

TAMYRES MINGORANCE CARVALHO

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* DO SISTEMA
COMPLEMENTO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO.

Monografia apresentada à disciplina TCC-II como
requisito para a conclusão do curso de Biomedicina,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Angelica Beatle Winter Boldt

Co-orientadora: Drª Marcia Holsbach Beltrame

CURITIBA

2015

Agradeço a Deus pela vida e proteção, e por colocar as pessoas certas em meu caminho.

A universidade pela oportunidade de crescimento.

A minha orientadora e amiga Dr^a Angelica B.W. Boldt, pela força e dedicação a este projeto. Seu apoio de forma interessada e sincera acompanhou a realização desse trabalho do começo ao fim. Todas as sugestões, conversas e reflexões foram fundamentais ao longo do percurso. Essa contribuição é de grande valia, não só na minha vida profissional, mas também pessoal.

A minha amiga Dr^a Marcia H. Beltrame que co-orientou esse trabalho com dedicação e paciência, e mesmo estando fora do país nunca me deixou sem chão.

A Prof^a Dr^a Iara Messias, por sempre acreditar no meu trabalho e me acolher no laboratório, me apresentando um grupo de pesquisa incrível. Às “cientetes” do Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC pelo trabalho juntas. Em especial agradeço a Hellen Cris W. Mendes por todas as vezes que me incentivou a não desistir da pesquisa, mesmo com todas as dificuldades. E também um agradecimento especial à Sandra Catarino pela amizade e companheirismo nesses dois anos.

A Dr^a Maria Luiza Petzl-Erler, por permitir o uso das amostras do laboratório e nunca duvidar do meu trabalho.

A Dr^a Ana Lucia Vieira Mion, que dedicou parte do seu tempo me ajudando, mesmo que não fizesse parte de suas obrigações como supervisora de estágio. Me apoiou durante a monografia e vem me ensinando técnicas de biologia molecular essenciais no meu desenvolvimento profissional.

Aos meus pais que foram meus heróis e companheiros ao longo de toda vida, me amando e me fortalecendo em todos os momentos, agradeço e dedico esse trabalho, pois cheguei até aqui graças ao seu apoio incondicional. A pequena Maria Clara, que já sabe sobre polimorfismos e sistema complemento, por todas as vezes que estudei com ela por perto. Aposto que suas primeiras palavras serão “genótipo associado”. A minha tia Beatriz por ter se dedicado a estudar comigo inúmeras vezes, mesmo que nada daquilo fizesse sentido a quem estuda História.

Ao meu namorado Nathan pelo apoio e carinho, e por dedicar parte da sua vida agitada para aprender sobre o meu trabalho, ou me tirar dos estudos para que o estresse não dominasse.

Aos amigos pelo apoio sincero todas as vezes que precisei. Em especial agradeço à biomédica Gabrielle A. Nascimento, por ter sido tão companheira durante todo o curso, e por ter dedicado parte do seu tempo para me ajudar com esse projeto.

A todos que fizeram parte da minha formação, direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Pênfigo foliáceo (PF) é uma desordem autoimune endêmica no Brasil, de etiologia complexa e pouco conhecida. O sistema complemento é ativado durante a doença, causando a deposição dos seus componentes e produtos de clivagem em espaços intracelulares, levando ao rompimento da adesão entre os queratinócitos epidermais e à formação de lesões bolhosas (acantólise). A via das lectinas do complemento é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP's) por MBL ou ficolinas, associadas às serina proteases MASP-1 e MASP-2. Polimorfismos no gene *MASP2* estão associados a diferentes concentrações da proteína, assim como à susceptibilidade a doenças, em diferentes populações. Para avaliar uma possível associação entre estes polimorfismos e a susceptibilidade ao PF, foram genotipados 261 pacientes e 262 controles por meio de PCR-sequência específica (PCR-SSP) para quatro polimorfismos de *MASP2*. As amostras de sangue foram coletadas, principalmente, no Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) e pareadas com 95 controles da região de Campo Grande (MS) e 167 doadores de sangue de Curitiba. Dispõe-se também dos dados de concentração sérica de MASP-2, previamente determinados por TRIFMA em 114 pacientes e 82 controles, e por ELISA em 76 controles. A correção por sexo, idade e grupo étnico não foi necessária, uma vez que estes fatores demográficos não se apresentaram associados à doença. A proteína MASP-2 apresentou-se em maiores concentrações em indivíduos controles, quando comparados aos pacientes com e sem tratamento. Os indivíduos homozigotos *GA/GA* (polimorfismos rs2273344 no intron 4 e rs9430347 no intron 5) apresentaram maiores concentrações da proteína MASP-2 em relação aos *AG/GA* e *AG/AG* (medianas 572,0 vs 441,1 e 270,8 ng/ml, $p < 0,0001$ respectivamente, em controles; 686,0 vs. 341,5 e 187,0 ng/ml, $p < 0,0001$, respectivamente, em pacientes). Este genótipo aumenta a susceptibilidade à doença (OR=4,87 [IC95% 1,60–14,74], $p = 0,0025$). O genótipo *CV/TV* (polimorfismos rs17409276 no intron 9 e rs2273346 no exon 10) também esteve mais presente em pacientes (30,0%) do que em controles (17,8%), o que confere aumento à susceptibilidade ao pênfigo foliáceo (OR=1,94 [IC95% 1,26–2,98], $p = 0,003$). Tais associações se mantiveram após regressão logística binária (*GA/GA* (OR=4,21 [IC95%=1,38-12,77], $p = 0,011$) e *CV/TV* (OR=2,13 [IC95%=1,39-3,27], $p = 0,001$). Os haplótipos *Intron4_G*Intron5_A* e *Intron9_T*Exon10_V* também se mostraram associados positivamente à doença (OR=1,46 [IC95% 1,03–2,05], $p = 0,03$ e OR=1,47 [IC95% 1,03–2,10], $p = 0,04$, respectivamente), e estão relacionados às maiores concentrações séricas da proteína MASP-2. Homozigotos *CV/TV* parecem apresentar maior proteção à doença, pois esse genótipo está presente em 69,1% dos controles e 59,9% dos pacientes. Além disso, o haplótipo *Intron4_A*Intron5_G* foi observado em 86,0% dos indivíduos controles e 80,9% dos pacientes (OR=0,68 [IC95% 0,49–0,96], $p = 0,03$). Foi observada, também, associação de proteção à doença com concentrações de MASP-2 superiores a 400 ng/ml (OR=0,35 [IC95%=0,20-0,61],

$p < 0,0001$). As associações encontradas com *AGCV/AGTV* (OR= 3,43 [IC95% 1,50–7,85], $p=0,025$) e *AGCV/AGCV* (OR=0,62 [IC95% 0,42–0,90], $p=0,01$) mostram que esses polimorfismos estão em blocos haplotípicos diferentes, mas a presença de *GACV/GATV* em 4,2% dos pacientes e nenhum controle sugere que os polimorfismos rs2273344, rs9430347, rs17409276 e rs2273346 podem ter um efeito aditivo na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.

Palavras-chave: via das lectinas; sistema complemento; pênfigo foliáceo; MASP-2.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1. Pênfigo foliáceo	8
2.2. Sistema complemento	10
2.3. MASP-2.....	12
2.3.1. Polimorfismos de MASP2 e associação com doenças.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Comitê de ética.....	16
3.2. Amostras	16
3.3. Genotipagem	17
3.4. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS	20
4.1. Concentrações séricas da proteína MASP-2	20
4.2. Polimorfismos no Intron 4 (rs2273344) e no Intron 5 (rs9430347) do gene <i>MASP2</i>	22
4.3. Polimorfismos no Intron 9 (rs17409276) e no Exon 10 (rs2273346) do gene <i>MASP2</i>	23
4.4. Associação entre os genótipos de <i>MASP2</i> e as concentrações de MASP-2.....	24
4.4.1 Polimorfismos no Intron 4 e no Intron 5.....	24
4.4.2 Polimorfismos no Intron 9 e no Exon 10.....	25
4.5. Associações com os haplótipos de <i>MASP2</i>	26
4.6. Análise multivariada.....	27
5. DISCUSSÃO.....	28
6. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

O pênfigo é uma doença autoimune órgão-específica com formação de autoanticorpos contra desmossomos, responsáveis pela adesão celular epidermal. Como consequência, tem-se o processo de acantólise (JONES et al., 1984). Dentre as diferentes formas conhecidas, as principais são o pênfigo vulgar (PV), caracterizado por lesões em camadas basais da pele e anticorpos anti-desmogleína-3, enquanto o pênfigo foliáceo (PF) tem como alvo principal a desmogleína 1, encontrada principalmente nas camadas mais superficiais da pele (CHIDGEY et al., 2002). Os autoanticorpos presentes na doença se comportam como antígenos, ativando o sistema imunológico e gerando uma mobilização para a formação de um mecanismo efetivo que reconheça esse potencial patógeno e o elimine de forma eficaz. Uma das alternativas possíveis de resposta a antígenos é o sistema do complemento, que pode ser ativada por três vias: a via clássica, a qual é ativada por complexos antígeno-anticorpo, a via alternativa, ativada na superfície das células microbianas na ausência de anticorpo e a via das lectinas, a qual é ativada por proteínas plasmáticas, como MBL (lectina ligante de manose) e ficolinas, que se ligam a açúcares ou resíduos acetilados, respectivamente, na superfície nos microorganismos. Todas elas resultam na geração de complexos enzimáticos que são capazes de clivar a proteína C3 (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2008). Com a ativação do sistema complemento no pênfigo foliáceo, há então a deposição de seus componentes em espaços intracelulares, rompimento da adesão celular epidermal e da mucosa e lesões bolhosas (KAWANA; GEOGHEGAN; JORDON, 1985).

O PF é classificado, de acordo com a epidemiologia, como pênfigo foliáceo clássico e pênfigo foliáceo endêmico, também chamado fogo selvagem (FS). Ambos possuem o mesmo quadro clínico e imuno-histológico, mas enquanto o PF clássico é raro e acontece no mundo todo, o fogo selvagem é observado em áreas rurais da América Latina, incluindo várias regiões do Brasil, além de possuir grande ocorrência em casos familiares (CAMPBELL; CUNHA; ROCHA, 2001). A etiologia do FS ainda é pouco conhecida, mas sabe-se da relevância dos fatores ambientais e genéticos, o que justifica a busca por associações de possíveis genes com a doença. Em trabalhos recentes do nosso grupo, observou-se a deposição de MBL em lesões de PV (MESSIAS-REASON; NISHIHARA; MOCELIN, 2011) e uma tendência à susceptibilidade ao PF em indivíduos com baixos níveis da serina protease 2 associada a MBL (MASP-2) e níveis mais elevados de MBL (MESSIAS-REASON et al., 2008), evidenciando o papel desempenhado pela via das lectinas no desenvolvimento da doença.

Visto isso, o objetivo principal desse trabalho foi verificar se polimorfismos do gene *MASP2*: rs2273344 (*g.7164A>G*), rs9430347 (*g.9430347G>A*), rs17409276 (*g.21081C>T*) e rs2273346 (*g.21389T>C*, *p.V377A*) estão associados à susceptibilidade ao pênfigo foliáceo e às formas clínicas da doença, através da genotipagem de 261 amostras de pacientes com pênfigo foliáceo e 262 controles. Além disso, avaliamos a relação dos polimorfismos com as

concentrações séricas anteriormente verificadas para MASP-2, propondo um possível mecanismo de regulação das concentrações da MASP-2 no soro de pacientes com o pêfigo foliáceo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Pêfigo foliáceo

Pêfigo é o nome dado ao conjunto de doenças bolhosas da pele, consequência do processo de desprendimento das células epidermais (acantólise). Esse processo é resultado da formação de autoanticorpos contra desmogleína, uma proteína do desmossomo (GRANDO, 2012). Dentre as diferentes formas conhecidas, as mais frequentes são o pêfigo vulgar (PV), caracterizado por lesões em camadas basais da pele e anticorpos anti-desmogleína-3, e o pêfigo foliáceo (PF), com anticorpos que tem como alvo a desmogleína-1, encontrada principalmente nas camadas menos profundas da epiderme, causando lesões mais superficiais (CHIDGEY, 2002). O diagnóstico diferencial das doenças não se deve exclusivamente à presença dos autoanticorpos, visto que 7% dos pacientes de pêfigo foliáceo possuem anti-desmogleína-3 (HILARIO-VARGAS et al., 2006), e cerca de 0,31% da população saudável possui anti-desmogleína -1 e/ou -3, sem necessariamente desenvolver a doença (PRÜSSMAN et al., 2015).

A lesão primária do PF é uma bolha superficial que, na maioria das vezes, ocorre na forma de discretas erosões, escama fina e aderente ou pequena crosta hemorrágica. Clinicamente, o FS manifesta-se de duas formas: localizada e generalizada (CAMPBELL; CUNHA; ROCHA, 2001). A forma localizada é caracterizada por lesões bolhosas e vesículas superficiais limitadas a face, cabeça, pescoço e partes altas do tronco. Geralmente tem remissão espontânea em poucos meses ou anos. A lesão primária também pode se manifestar da forma generalizada, onde as bolhas são mais invasivas em um processo agudo e agressivo, as lesões são disseminadas pelos membros, e pode ser acompanhada de febre, artralgia e mal estar geral (revisado por AOKI; RIVITTI; DIAZ, 2015). Até o momento, sabe-se da presença de anticorpos do tipo IgG, predominantemente o subtipo IgG4, em pacientes com a doença ativa, reconhecendo os domínios EC-1 e EC-2 das desmogleínas -1 e -3. Em áreas altamente endêmicas foi observada a presença de IgM e células T CD4, ambas reconhecendo a desmogleína-1 nos pacientes (LI et al., 2003). Em indivíduos sem a doença, em remissão ou em estado pré-clínico foi observada a presença de IgG1, que reconhece o domínio EC-5, considerado “não patogênico”. Foi observado também que sete em cada 100 pacientes de FS apresentam anticorpos contra desmogleína-3, predominante em pêfigo vulgar, além de autoanticorpos contra E-caderinas (FLORES et al., 2012; HILARIO-VARGAS et al., 2006).

De acordo com a epidemiologia, o PF pode ser classificado em duas diferentes formas: o pêfigo foliáceo esporádico e pêfigo foliáceo endêmico (PFE), esse também conhecido como fogo selvagem (FS). Imuno e histologicamente, ambas as formas possuem não diferem, mas

enquanto o PF clássico é raro e tem incidência global, o FS é observado em áreas rurais da América Latina, incluindo várias regiões do Brasil, além de possuir grande ocorrência em casos familiares (CAMPBELL; CUNHA; ROCHA, 2001). Baseado nessa distribuição geográfica, supõe-se que, além da genética, fatores ambientais também possam estar envolvidos na patogênese da doença. As tribos Xavante, no Mato Grosso, e as tribos Terena e Limão Verde, no Mato Grosso do Sul, são bastante estudadas pela sua alta prevalência de FS. Em Limão Verde a prevalência de pênfigo foliáceo endêmico é de 3,2%, e a incidência é de 1-4 novos casos por ano (HANS-FILHO et al., 1996. FRIEDMAN et al., 1995). Em 1992, Lombardi e colaboradores sugeriram que um vetor fosse responsável por esses índices, pois carregariam uma molécula responsável pelo gatilho da resposta anti-desmogleína-1. Foi visto que a picada do mosquito *Simulium* é de 4 a 7 vezes mais frequente em indivíduos que desenvolvem a doença (LOMBARDI et al., 1992), e que a espécie *Simulium nigrimanum* é mais comum nos assentamentos da tribo Terena quando comparados a outras áreas não endêmicas (EATON et al., 1998).

Tanto pênfigo foliáceo quanto pênfigo vulgar são tratados com drogas supressoras do sistema imune, a fim de evitar a formação de bolhas. Por essa razão, a terapia de escolha geralmente é o uso de glicocorticóides sistêmicos, somados à adjuvantes imunossupressores e agentes anti-inflamatórios. Antes do advento da corticoterapia, não era raro encontrar atraso de crescimento na infância e nanismo nesses pacientes (VIEIRA, 1940). Hoje em dia é comum o aparecimento de infecções oportunistas, visto a redução de resposta imune gerada por esse tratamento (LESHEM et al., 2014). Algumas alternativas terapêuticas são avaliadas para reduzir os efeitos adversos do tratamento. A medicina tradicional chinesa mostrou resultados positivos quando associada a corticoterapia, melhorando as condições clínicas do paciente e reduzindo a dose utilizada da droga, a fim de minimizar os efeitos colaterais (YU et al., 2009). Além disso, é uma estratégia terapêutica que reduz a toxicidade do medicamento e melhora a absorção da droga no organismo (WU et al., 2012). Algumas ervas medicinais com efeito anti-inflamatório também podem ser úteis, de forma a diminuir a resposta inflamatória que o pênfigo promove (HUANG et al., 2005). Recentemente o rituximab (RTX), um anticorpo monoclonal anti-CD20 que induz depleção de células B, mostrou-se eficaz e altamente tolerado no tratamento da doença. Um ciclo de tratamento gera remissão completa, em média, em 5,8 meses e duração de pouco mais de um ano. Altas doses de RTX parecem estar associadas à maior duração de remissão. No entanto, os efeitos colaterais são mais intensos (WANG et al., 2014).

Sabe-se que existe um componente genético de suscetibilidade ao FS (DIAZ et al., 1989), justificado em parte pelo grande número de casos familiares, bem como pelas associações observadas com genes *HLA* classe II (MORAES et al., 1997), genes para citocinas, IL4 e IL6 (PEREIRA et al., 2004), moléculas co-estimuladoras de linfócitos T, CD86 e moléculas coestimuladoras de células B, CD40 e CD40L (MALHEIROS e PETZEL-ERLER, 2009). Além disso, alguns polimorfismos estão envolvidos em possíveis mecanismos de proteção à doença,

como foi visto em uma associação entre ativação dos genes *KIR*, seus ligantes HLA e a proteção ao pênfigo foliáceo (AUGUSTO et al., 2012). Associações genéticas também foram vistas em outras formas de pênfigo. HIROSE e colaboradores relatam que polimorfismos no gene mitocondrial que codifica para ATP-sintase 8 estão associados à susceptibilidade ao pênfigo foliáceo (HIROSE et al., 2015). Os autoanticorpos anti-mitocondriais que iniciam a via apoptótica em algumas doenças autoimunes possuem ativação semelhante à encontrada nos queratinócitos expostos aos autoanticorpos no pênfigo vulgar, por exemplo. Logo, algumas drogas protetoras de mitocôndria são eficientes em inibir os anticorpos presentes no pênfigo, impedindo-os de causar acantólise (MARCHENKO et al., 2010), e medicamentos para o tratamento de pênfigo protegeriam também os queratinócitos contra danos mitocondriais (KALANTARI-DEHAGHI et al., 2013).

2.2. Sistema complemento

O sistema complemento é um dos braços efetores do sistema imune inato e compreende mais de 50 proteínas plasmáticas e associadas à membrana que interagem umas com as outras e com outras moléculas do sistema imunológico de maneira altamente regulada (RICKLIN et al., 2010). A ativação desse sistema se dá por intermédio do reconhecimento de padrões moleculares específicos nas superfícies dos patógenos. Em consequência, há uma mobilização das células do sistema imune, promovendo uma rápida inflamação para conter o agente infeccioso (HOFFMANN et al., 1999). O sistema complemento é eficaz em reconhecer certos padrões microbianos, podendo também ser ativado por inúmeros ligantes endógenos.

O evento central da ativação do complemento é a proteólise da proteína C3, que gera produtos biologicamente ativos e a subsequente ligação de C3b às superfícies das células microbianas ou a anticorpos ligados aos antígenos. A ativação do sistema complemento se dá por três vias: clássica, alternativa e das lectinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) (Figura 1). Todas as vias de ativação culminam na produção de anafilatoxinas e opsoninas, resultando na formação do complexo de ataque a membrana e lise celular do patógeno (DUNKELBERGER; SONG, 2010). A via clássica é iniciada pela ligação do complexo C1 às moléculas IgG ou IgM ligadas ao antígeno. A via alternativa resulta da proteólise espontânea de C3 e da ligação estável de C3b, seu produto de quebra, às superfícies microbianas, sem depender de anticorpos (ABBAS; LICHTMANN, PILLAI, 2008). A via das lectinas, por sua vez, é iniciada pelo reconhecimento de açúcares e resíduos acetilados altamente conservados nos microrganismos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), pela lectina ligante de manose (MBL) ou ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3) ou ainda, colectina COLEC11 (BELTRAME et al., 2015; BOLDT; GOELDNER; DE MESSIAS-REASON, 2012). Após o reconhecimento de padrões de açúcares (manose, fucose, N-acetil-D-glucosamina) por MBL ou de resíduos acetilados pelas ficolinas, a cascata do complemento é desencadeada pela atividade proteolítica das serinas proteases associadas a MBL, ficolinas ou COLEC11 (MASP-1 e MASP-2) (GARRED et al., 2009). Como resultados da ativação desta via, podemos então destacar a opsonização e fagocitose de

patógenos, a ativação de células inflamatórias, participação na regulação da resposta imune e eliminação de complexos imunes e células apoptóticas.

Alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes do sistema complemento resultam em variantes não funcionais das proteínas efetoras. Desde a descoberta da deficiência de MBL nos anos 80, a falta de proteínas do sistema complemento tem sido associada a infecções recorrentes, somado a vários polimorfismos relacionados à susceptibilidade ou proteção às doenças infecciosas (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011; INGELS et al., 2014). No entanto, a deficiência de ativação do sistema imune pode ter um efeito benéfico, visto que altas concentrações das proteínas do sistema complemento são capazes de gerar uma resposta inflamatória excessiva (BOLDT; GOELDNER; DE MESSIAS-REASON, 2012).

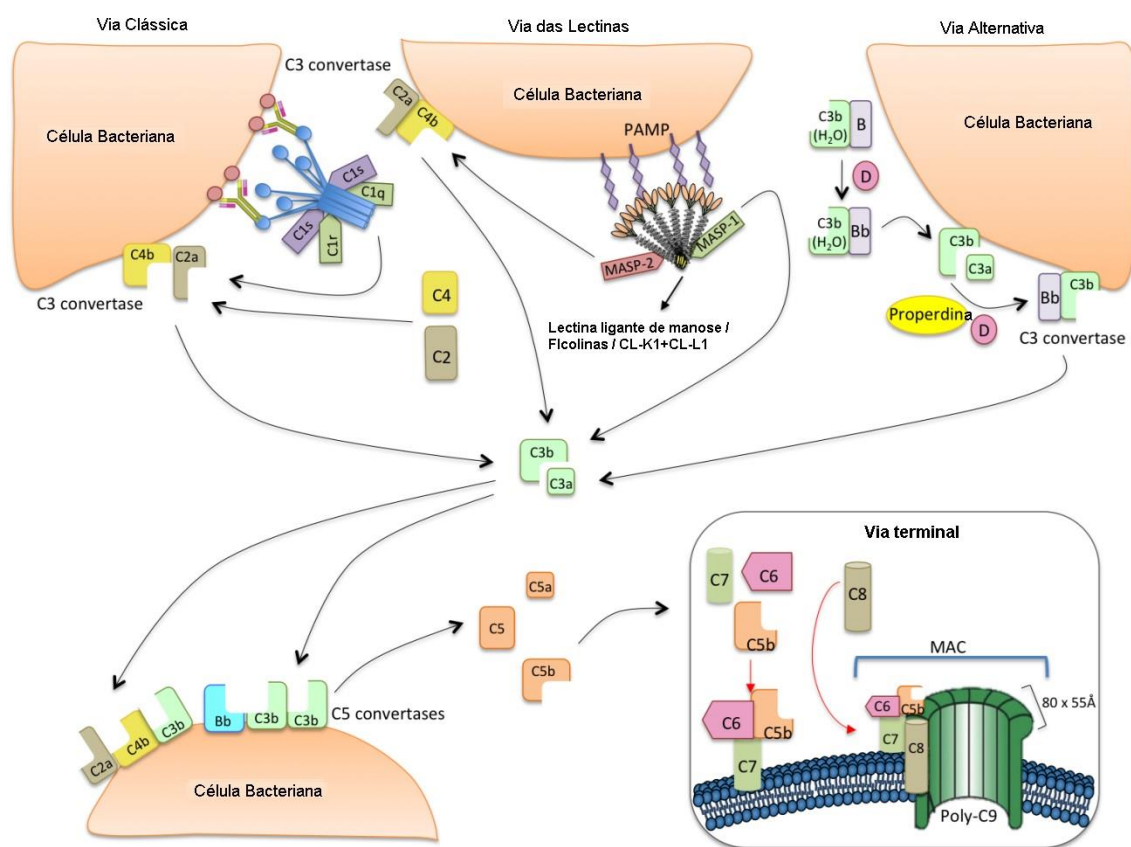


Figura 1. Vias de ativação do sistema complemento. No centro a via das lectinas.

NOTA: Subsequente à ativação da via clássica pela ligação de C1q na superfície do agente ativador, C1s cliva C4, que se liga de forma covalente à superfície do patógeno, e em seguida, cliva C2, levando à formação do complexo C4b2a, a C3 convertase da via clássica. A ativação da via das lectinas ocorre através da ligação de oligômeros de MBL, oligômeros de ficolina ou heteromorfos de colectina (CL-K1 + CL-L1), complexados a homodímeros de serina-proteases associadas à MBL-1 e 2 (MASP-1 e MASP-2, respectivamente), a vários grupos de hidratos de carbono ou acetilados sobre a superfície de patógenos (PAMPs). Como C1s, MASP-2 induz a formação da C3 convertase, C4b2a, porém sua ativação é dependente de MASP-1. MASP-1

também cliva C2 e C3. A ativação da via alternativa depende de baixo grau de hidrólise espontânea de C3 no plasma que leva à formação de C3b. Este C3b liga o Fator B (homólogo a C2) para formar o complexo C3bB. A clivagem do Fator B pelo Fator D forma a C3 convertase da via alternativa, C3bBb. A properdina estabiliza este complexo. A C3 convertase cliva C3 em fragmentos C3b, que se ligam covalentemente ao lado do local de ativação do complemento (levando a opsonização). Esse processo amplifica a cascata e promove a fagocitose, bem como a resposta inflamatória e da imunidade adaptativa. Além disso, há a formação da C5 convertase que leva a clivagem de C5 em C5a e C5b e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). C5a atua como uma potente anafilotoxina e C5b forma um complexo com C6 e C7, o qual é inserido na membrana celular. Posteriormente, moléculas de C8 e C9 (80 x 55 Å) ligam-se a este complexo, resultando em um complexo de ataque à membrana (C5b-9). As três vias convergem para esta via terminal comum, culminando em lise e morte celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

FONTE: Adaptado de BELTRAME et al., 2015

2.3. MASP-2

Descoberta em 1997 por Thiel e colaboradores, a serina protease 2 associada a MBL (MASP-2) é uma das moléculas chave na resposta imune inata (THIEL et al., 1997). Produzida pelo fígado, essa serina protease se liga à MBL, colectina-11 e ficolinas de forma cálcio-dependente, resultando em ativação da via das lectinas do complemento (ALI et al., 2012; MA, SKJOEDT, GARRED 2013). Quando ligada a colectinas ou ficolinas, MASP-2 medeia a clivagem dos componentes C4 e C2 do sistema complemento para gerar C3 convertase, logo depois de ativada por MASP-1 (GÁL et al., 2005). A sua atividade catalítica chega a ser 50 vezes superior a C1s (KERR et al., 2008). Além disso, MASP-2 também está envolvida na cascata de coagulação, através da clivagem de protrombina (KRARUP et al., 2007) e no agravamento de lesões de isquemia/reperfusão (SCHWAEBLE et al., 2011).

O gene *MASP2* está localizado entre as subbandas 23 e 31 da banda 6, região 3, do braço curto do cromossomo 1 (1p36.23-31) (STOVER et al., 1999) e é formado por 12 exons. O primeiro exon não é traduzido e dez dos que se seguem codificam os seis domínios presentes na proteína MASP-2: dois domínios CUB (proteína morfogenética de osso, C1r/C1s e Uegf), um domínio similar ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), dois domínios do tipo “controle de proteína de complemento” (CCP) e o domínio de serina protease (FUJITA et al., 2002). A recomposição alternativa do RNA mensageiro (mRNA) do gene *MASP2* gera também uma proteína de 19 kDa chamada MAp19 (sMAP ou *small mannose-associated protein*). O exon 12 codifica o domínio de serina protease, sendo, portanto, único da proteína MASP-2, enquanto o exon 5 é exclusivo de MAp19. Ambas as proteínas compartilham regiões codificadas pelos exons 2, 3 e 4 (STOVER et

al, 1999) (Figuras 2). MAp19 consiste em apenas os domínios CUB e EGF, com um resíduo EQSL adicional (STOVER et al., 1999). Tem-se sugerido que MAp19 compete com MASP-2 pela ligação à MBL, regulando a ativação do sistema complemento (IWAKI et al., 2006). Contudo, somente uma pequena fração de MAp19 está associada com MBL ou ficolinas, com afinidade dez vezes inferior a de MASP-2 (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011).

2.3.1. Polimorfismos de *MASP2* e associação com doenças

Vários SNPs já foram investigados no gene *MASP2* (Figura 2, Tabela 1). Os SNPs nos domínios CUB, EGF e serina protease podem alterar a eficiência funcional de MASP-2. Já as concentrações da proteína variam de acordo com polimorfismos nos introns 4, 5 e 9 e exon 10, este responsável por codificar o último domínio CCP (BOLDT et al., 2011, 2013, 2014; STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003; THIEL et al., 2007; TULIO et al., 2011). Tais concentrações também variam nas diferentes populações. Africanos da Zâmbia, por exemplo, apresentam menores concentrações em ng/mL quando comparados aos chineses em Hong Kong, americanos ou dinamarqueses. Deficiência de MASP-2 foi encontrada em aproximadamente 0,15 – 0,3% dos europeus homozigotos para o polimorfismo *p.120G* no exon 3 do gene *MASP2*. A substituição de uma asparagina por uma glicina altera a ligação do íon cálcio no primeiro domínio CUB, resultando em uma proteína com baixa capacidade de ligar em colectinas e ficolinas (THIEL et al., 2007). Stengaard-Pedersen e colaboradores (2003) descreveram um paciente adulto com infecções recorrentes por *Streptococcus pneumoniae*, que apresentava o alelo *p.120G* no exon 3 do gene *MASP2* e, por consequência, concentrações reduzidas de MASP-2. Logo, a deficiência da proteína funcional foi associada a uma susceptibilidade aumentada ao desenvolvimento de doenças imunológicas e infecções (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003). O alelo *p.126L*, também responsável por baixas concentrações de MASP-2, já foi associado a um aumento da susceptibilidade a infecção pelo vírus HIV (BOLDT et al., 2014) e um alto risco de desenvolvimento de cardiopatia crônica em pacientes com doença de Chagas (BOLDT, LUZ, MESSIAS-REASON, 2011). Concentrações reduzidas de MASP-2 resultantes de polimorfismos no gene *MASP2* também estão associados a um aumento da susceptibilidade a infecção por vírus linfotrófico – T humano (COELHO et al., 2013), hepatite C (TULIO et al., 2011), infecções bacterianas (DE ROOIJ et al., 2010) e hanseníase (BOLDT et al., 2013). Em contrapartida, Itas concentrações de MASP-2 associadas a baixas concentrações de MAp19 foram relacionadas a polimorfismos nos introns 4, 5 e 9 (BOLDT et al., 2011, 2013). Concentrações séricas da proteína superiores a 360 ng/ml foram associadas à neoplasias em crianças gravemente doentes (INGELS et al., 2014), e desenvolvimento de graves infecções em adultos em tratamento quimioterápico contra neoplasias hematológicas (AMEYE et al., 2012).

As concentrações de MASP-2 também estão associadas à idade e, mesmo que por um período de tempo mantenham-se estáveis em um adulto saudável, esses valores tendem a reduzir ao longo da vida (MØLLER-KRISTENSEN et al., 2003; SALLENBACH et al., 2011; YIITING et al., 2007).

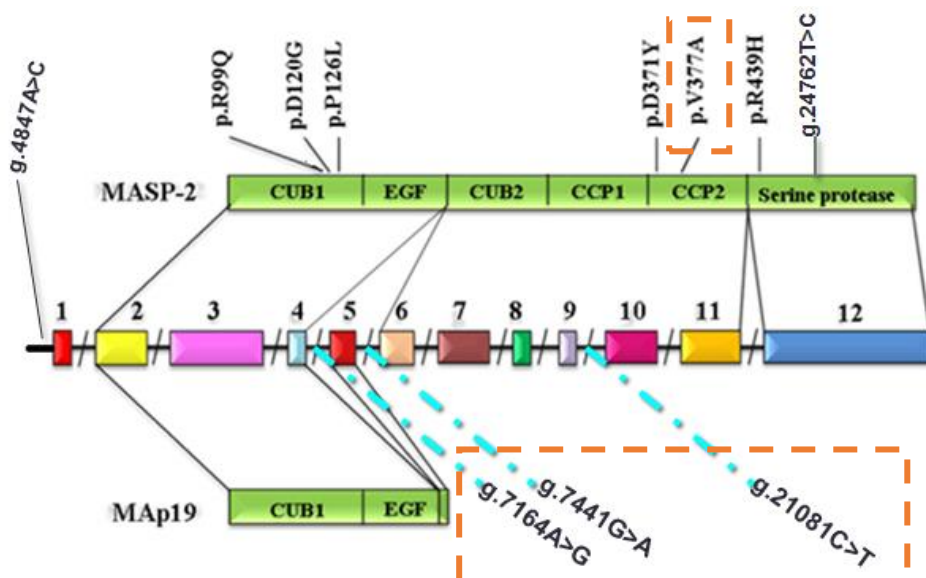


Figura 2. Estrutura gênica e polimorfismos no gene *MASP2*, com relação aos domínios das proteínas MASP-2 e MAP19.

NOTA: Em destaque os polimorfismos estudados nesse trabalho.

LEGENDA: MASP: serina protease associada à MBL (*Mannan-binding lectin Associated Serine Protease*); CUB: proteína morfogenética de osso, C1r/C1s e Uegf (*C1r/C1s and Uegf, Bone morphogenetic protein*); EGF: fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*); CCP: proteína de controle do complemento (*Complement Control Protein*).

FONTE: (BOLDT; GOELDNER; DE MESSIAS-REASON, 2012).

Tabela 1: Polimorfismos no gene *MASP2*.

dbSNP	Região gênica	Nomenclatura HGVS	Substituição de aminoácidos
rs7548659	Promotor	<i>g.4847A>C</i>	n.a.
rs61735600	Exon 3	<i>g.5557G>A</i>	p.R99Q
rs72550870	Exon 3	<i>g.5620A>G</i>	p.D120G
rs56392418	Exon 3	<i>g.5638C>T</i>	p.P126L
rs2273344	Intron 4	<i>g.7164A>G</i>	n.a.
rs9430347	Intron 5	<i>g.7441G>A</i>	n.a.
rs17409276	Intron 9	<i>g.21081C>T</i>	n.a.
rs12711521	Exon 10	<i>g.21370G>T</i>	p.Y371D
rs2273346	Exon 10	<i>g.21389T>C</i>	p.V377A
rs12085877	Exon 12	<i>g.24599G>A</i>	p.R439H
rs1782455	Exon 12	<i>g.24762T>C</i>	p.S493=

LEGENDA: negrito: alelo menos comum na população europeia; n.a.: não aplicável; dbSNP: número de identificação no banco de dados de polimorfismos de nucleotídeo único, HGVS: Human Genome Variation Society.

Baseado em: BOLDT et al., 2011, 2013.

A árvore filogenética dos haplótipos do gene *MASP2* apresenta dois clados, cada um com 5 haplótipos que surgiram a partir da sequência CRDPCDVRC (Figura 3). O clado *1 é composto por CRDPCDVRC e por todos os outros 4 haplótipos com *g.24762C* no exon 12. O clado *2 é formado por CRDPCDVRT e os outros quatro haplótipos com *g.24762T*. O clado *1B tem o *g.21081T* do intron 9 em comum. No mesmo estudo em que foi publicada esta nomenclatura, também foi encontrada uma associação entre esta variante, característica de haplótipos do clado 2, e concentrações altas de MASP-2 no soro. O clado *1C é composto por dois haplótipos associados com baixas concentrações de MASP-2, apresentando *p.126L* ligada a *p.439R* ou *p.439H*. Os haplótipos do clado *2A compartilham a *p.371D* e as variantes *g.24762T* no exon 12. A variante *p.377A* ocorre neste contexto e está associada com baixas concentrações de MASP-2 (haplótipo *2A2-*l*). Os haplótipos do clado *2B têm a variante *p.371Y* em comum. O haplótipo *2B1 tem a variante *g.4847C* do promotor, enquanto que os haplótipos *2B2 compartilham a variante *g.4847A*, apresentando um haplótipo associado com deficiência de MASP-2, portando o alelo *p.120G* (*2B2B-*l*) (Figura 3) (BOLDT et al., 2011).

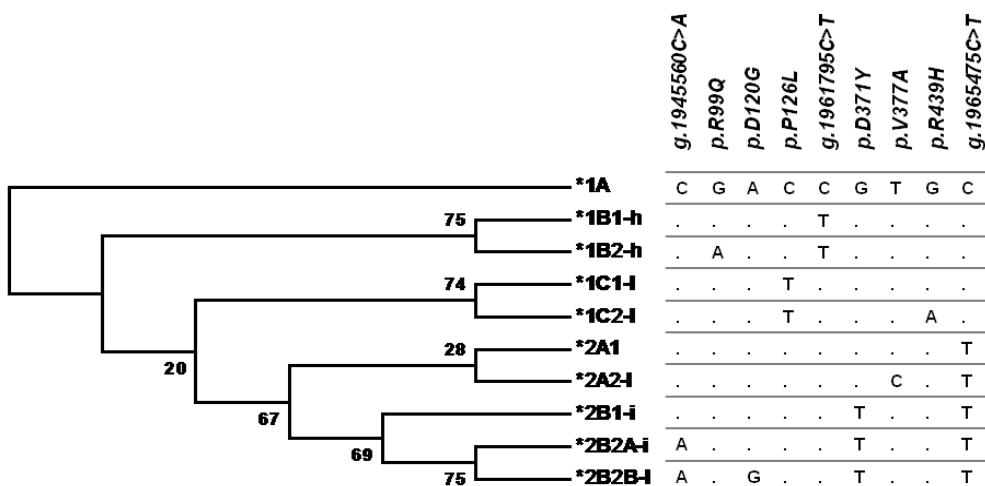


Figura 3: Nomenclatura filogenética de *MASP2*.

NOTA: Árvore filogenética dos haplótipos de *MASP2* com as posições correspondentes aos SNPs (GenBank: NT_021937.18, CAB50735), onde “h”, “i” e “l” referem-se aos haplótipos de *MASP2* produtores de concentrações altas (≥ 600 ng/mL), intermediárias (200-600 ng/mL) e baixas (<200 ng/mL) de MASP-2, respectivamente.

FONTE: BOLDT et al., 2011.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

O presente estudo foi aprovado pela CONEP (Comitê Nacional de Ética em Pesquisa), parecer 505.988, de 02/01/2014, sob o título “Genes e suas variações: análise molecular, evolutiva e funcional, em populações e em doenças”. Todos os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa e preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2. Amostras

Os pacientes com pênfigo foliáceo foram diagnosticados com base em dados clínicos e imunohistoquímicos. Desde o início dos anos 80, são coletadas amostras de sangue para extração de DNA pela equipe do LGMH (Laboratório de Genética Molecular Humana), principalmente no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, MS), mas também no Hospital de Dermatologia Sanitária de Piraquara (Piraquara, PR), no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP), no Lar da Caridade (Uberaba, MG) e no Hospital de Clínicas da UFPR (Curitiba, PR). O DNA das amostras foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico através da técnica que utiliza fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (FCI) (SAMBROOK; FRITSCH, MANIATIS, 1989). As 261 amostras de sangue de pacientes não consanguíneos entre si, foram pareadas com 262 controles de acordo com a idade e ancestralidade (Tabela 2), dos quais 95 foram recrutados no Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) e 167 são indivíduos saudáveis, moradores de Curitiba e arredores. A quantificação sorológica de MASP-2 foi previamente obtida por ELISA (*enzyme-linked immunoadsorbance assay*) para 76 controles (com mediana de 245 ng/ml - variando de 42 a 769 ng/ml) e por TRIFMA, uma técnica de quantificação proteica baseada no íon európio e padronizada na Dinamarca, para 82 controles e 114 pacientes (MESSIAS-REASON et al., 2008).

Tabela 2. Dados clínico-demográficos dos indivíduos controles e pacientes com pênfigo foliáceo.

	CONTROLES (%)	PACIENTES (%)
	N = 262	N = 261
Sexo		
Mulheres	49,4	52,1
Homens	49,8	47,5
Sem dado	0,8	0,4
Idade		
<15 anos	-	0,4
15 – 30 anos	8,4	10,7

31 – 50 anos	44,3	30,0
51 – 70 anos	29,4	39,4
> 70 anos	17,2	18,4
Sem dado	0,8	1,1

Ancestralidade

Eurobrasileiros	55,9	51,0
Afrobrasileiros	39,0	34,8
Indígenas	4,7	5,4
Afrobrasileiros + Indígenas	-	5,7
Sem dado	0,4	3,1

Forma da doença

Generalizada	-	35,3
Localizada	-	13,4
Sem informação	-	51,3

FONTE: o autor (2015).

3.3. Genotipagem

Para a genotipagem destas amostras foi utilizada amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCR-SSP), técnica já otimizada para *MASP2* em nosso laboratório. Nesta técnica a amplificação é realizada utilizando combinações de até seis pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos, para que haja tipagem simultânea de até seis SNPs em apenas quatro reações por amostra (BOLDT et al., 2011).

A PCR se utiliza de pares de iniciadores específicos, que são complementares à região flanqueadora da sequência de DNA de interesse, e diferem apenas no último nucleotídeo complementar ao SNP que se deseja identificar (Tabela 3). Esses iniciadores, tanto direto como reverso, são adicionados a um mix com 2mM de dinucleotídeos trifosfatados (dNTP), tampão coral 1x, glicerol 1,5%, 0,02 U/μl de enzima Taq polimerase e 20ng de DNA genômico. Após da desnaturação do DNA, ocorre o acoplamento (helicoidização) desse iniciador à região complementar, em uma temperatura calculada de modo que apenas 50% dos iniciadores em solução, possam se ligar (temperatura de fusão de estringência elevada). Caso haja complementaridade perfeita com o nucleotídeo correspondente ao SNP pesquisado, há extensão da fita pela enzima, uma vez que um nucleotídeo mal-pareado nesta última posição não oferece uma hidroxila 3'OH livre para a adição de nucleotídeos. Dessa maneira, a Taq polimerase só amplifica os fragmentos que apresentem complementaridade perfeita entre o iniciador e o alelo em questão. Quando não há essa complementaridade, a reação de alongamento da cadeia não

acontece. Cerca de 30-40 termociclagens bastam para amplificar o DNA em progressão geométrica, gerando milhares de cópias dos fragmentos de interesse.

Foram realizados dois protocolos diferentes de PCR, objetivando a coamplificação de fragmentos específicos para os polimorfismos de *MASP2*. Outros fragmentos, específicos para SNPs dos genes *FCN2*, *MBL2* e *FCN1* também foram coamplificados, juntamente com os controles de qualidade da reação (fragmentos genéricos de *FNC2* e de hormônio de crescimento humano – *HGH*), o que caracteriza as reações como multigênicas. Todas as amplificações foram iniciadas pela desnaturação do DNA por 5 minutos, a 94°C, e terminaram pela extensão final da cadeia, por 5 minutos, a 72°C. Cada protocolo foi realizado em 30 ciclos, cada ciclo iniciando a 94°C por 20 segundos e terminando a 72°C, por 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores (listados na tabela 3) foi reduzida a cada 10 ciclos, para garantir uma alta especificidade de reação e um grande volume final de fragmentos com o alelo pesquisado. Cada PCR é acompanhada de controles negativos – solução completa sem o DNA, e controles positivos (amostra com genótipo conhecido para os polimorfismos procurados). O resultado é observado em gel de agarose a 1,5%, corado com Sybrsafe (Invitrogen), fluorescente sob luz azul (figura 4).

Tabela 3. Iniciadores específicos utilizados para *MASP-2*, *FCN1*, *FCN2* e os controles de reação.

Identificação SNP	Iniciador	Sequência 5' → 3'
<i>MASP2</i>		
rs2273344	MASP2 Intr4_rs2273344Gf	5' GTTCCCTGCACTGTGGGACG 3'
	MASP2 Intr4_rs2273344Af	5' GTTCCCTGCACTGTGGGACA 3'
rs9430347	MASP2 Intr5_rs9430347Ar	5' CTCCCACCCCAGAGACACGT 3'
	MASP2 Intr5_rs9430347Gr	5' CTCCCACCCCAGAGACACGC 3'
rs17409276 (<i>g.21081C>T</i>)	MASP2 Intr9_+16060Cf	5' CAGCACACCTCTTCCTCC 3'
	MASP2 Intr9_+16060Tf	5' CAGCACACCTCTTCCTCT 3'
rs2273346 (<i>g.21389T>C, p.V377A</i>)	MASP2 Ex10_377Vr	5' GGACCTGTGATGTACTCCA 3'
	MASP2 Ex10_377Ar	5' GACCTGTGATGTACTCCG 3'
<i>FCN1</i>		
rs2989727	FCN1 Prom_-1981Gf	5' CCCATGAGCCTGGTTATCG 3'
	FCN1 Prom_-1981Af	5' CCCATGAGCCTGGTTATCA 3'
	FCN1 Promr	5' ACCTCCTCTTCCTTGCAACA 3'
<i>FCN2</i>		

rs3124952	FCN2 Prom -986Af	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCA 3'
	FCN2 Prom -986Gf	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCG 3'
rs17514136	FCN2 Prom -4Ar	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCT 3'
	FCN2 Prom -4Gr	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCC 3'
Controles de reação	HGHf	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'
	HGHr	5' CCACTCACGGATTCTGTTGTGTTT C 3'
	FCN2 Ex8f	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'
	FCN2 Ex8r	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3'

LEGENDA: nomenclatura dos iniciadores é dada por: nome do gene, seguida da região de complementariedade (Prom = Promotor, In = Intron, Ex = Exon), a localização de acordo com o início da transcrição e o nucleotídeo ou o aminoácido variante. Os iniciadores diretos são representados por “f” e reversos por “r”. Em negrito: nucleotídeo variante.

FONTE: o autor (2015).

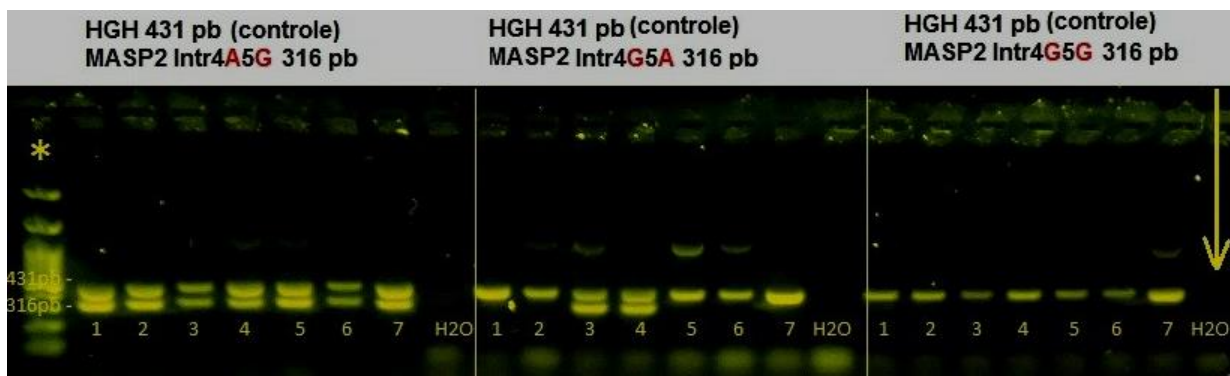


Figura 4. Representação de PCR-SSP em gel de agarose dos polimorfismos dos introns 4 e 5 de *MASP2*.

NOTA: nesse exemplo, foram feitas as combinações possíveis de iniciadores e as amostras repetidas em três reações diferentes. A combinação de iniciadores específicos Intron4_A*Intron5_A foi testada apenas em 100 amostras pertencentes a diferentes grupos étnicos, no contexto de um projeto anterior, e não foi encontrada (BOLDT, comunicação pessoal). Isto se explica pelo fato do desequilíbrio de ligação entre os SNPs dos introns 4 e 5 ser muito alto (estão fisicamente muito próximos), logo, não se observam todos os haplótipos possíveis. Nestas reações, também foi incluída a amplificação sequência-específica de um fragmento de 1022pb, correspondente ao promotor de *FCN2* (ficolina2, posições -986 e -4), o que caracteriza esta reação como multigênica e *HGH* (gene do hormônio de crescimento humano), o controle utilizado

nessas reações de PCR. (*) indica o marcador de peso molecular de 100pb. Interpretação para MASP2: indivíduos 1, 2, 5, 6 e 7 são homozigotos AG/AG. Os indivíduos 3 e 4 são AG/GA.

FONTE: o autor (2015).

3.4. Análise estatística

As frequências haplotípicas e genóticas foram obtidas por contagem direta, uma vez que a PCR-SSP permite haplotipagem física. Os testes exatos de diferenciação populacional e de avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados utilizando o pacote de programas ARLEQUIN v.3.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). Para as análises de associação com as concentrações de proteína, utilizamos os testes t de Student/ ANOVA ou Mann-Whitney/ Kruskal-Wallis, dependendo se a distribuição dos valores foi ou não, paramétrica, respectivamente, no programa GraphPad Prism 5.01. Já para as análises de associação com a doença, fizemos testes de independência entre as variáveis utilizando o teste de Fisher bicaudal com cálculo de odds ratio e intervalo de confiança de 95%, pelo pacote de programas "SISA" (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/>). Para ajustar os resultados por idade, sexo e ancestralidade, utilizamos o modelo reduzido de regressão logística no programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Por meio do teste exato de diferenciação populacional, foi observada homogeneidade entre as frequências alélicas dos controles do Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) e as da amostra de Curitiba e arredores, permitindo a sua reunião em apenas um grupo amostral. As amostras dos indivíduos controles estão dentro do proposto pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, no entanto nos pacientes observou-se excesso de homozigose ou heterozigose, a depender do polimorfismo em questão.

4.1. Concentrações séricas da proteína MASP-2

Em um estudo anterior (MESSIAS-REASON et al., 2008) com 114 pacientes e 82 indivíduos controles quantificados, foi observada uma tendência a baixas concentrações da proteína MASP-2 em pacientes de pênfigo foliáceo ($p=0,06$). Essa tendência foi confirmada pelo nosso estudo comparando as concentrações séricas de MASP-2 independente do genótipo (239,5 ng/ml em pacientes vs. 313,9 ng/ml em controles, $p=0,0004$), como mostra a figura 5. Foi utilizado teste de Mann-Whitney, visto que a distribuição das concentrações seguiu um padrão não normal. As medianas das amostras avaliadas por diferentes métodos (TRIFMA e ELISA) não apresentaram diferença significativa (teste de Mann-Whitney), razão pela qual foi possível avaliar as medições em conjunto.

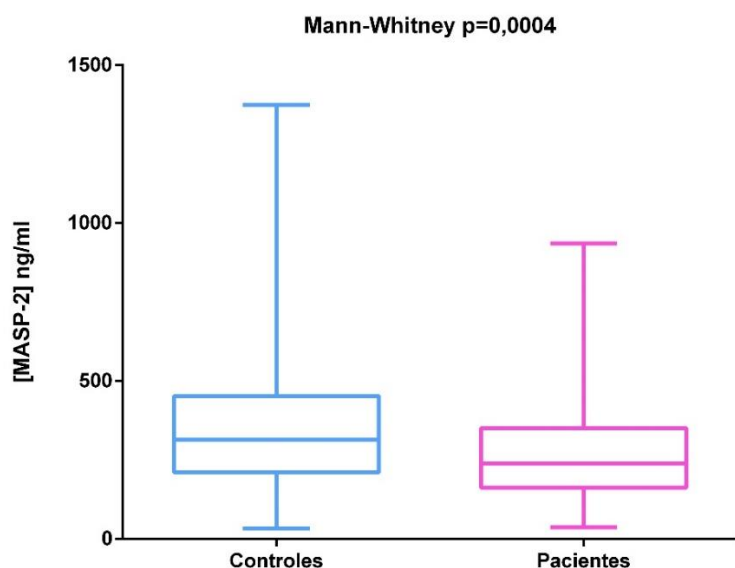


Figura 5. Distribuição das concentrações séricas da proteína MASP-2 (ng/ml) em pacientes e controles.

FONTE: o autor (2015).

As concentrações séricas da proteína MASP-2 não diferiram entre as formas localizada e generalizada de pênfigo foliáceo, como mostra a figura 6. No entanto, apenas 48,6% dos pacientes possui dados sobre a forma da doença, o que diminui o poder estatístico para análise de associação com as concentrações da proteína, bem como dos genótipos associados às diferentes manifestações clínicas.

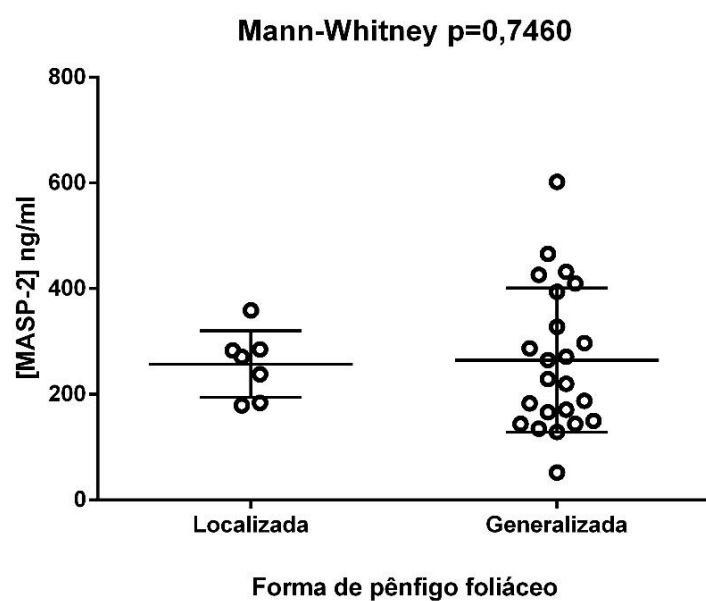


Figura 6. Distribuição das concentrações séricas da proteína MASP-2 (ng/ml) nas formas localizada e generalizada da doença pênfigo foliáceo.

FONTE: o autor (2015).

As concentrações séricas da proteína MASP-2 diferiram entre os indivíduos controles e pacientes com tratamento (Mann-Whitney, $p=0,001$), e foi observada uma tendência a menores concentrações da proteína em pacientes sem tratamento quando comparados aos controles (Mann-Whitney, $p=0,076$). Essa tendência pode ser justificada pelo pequeno número amostral de pacientes sem tratamento (apenas 7 indivíduos). Não houve diferença estatística entre os dois grupos de pacientes (Figura 7).

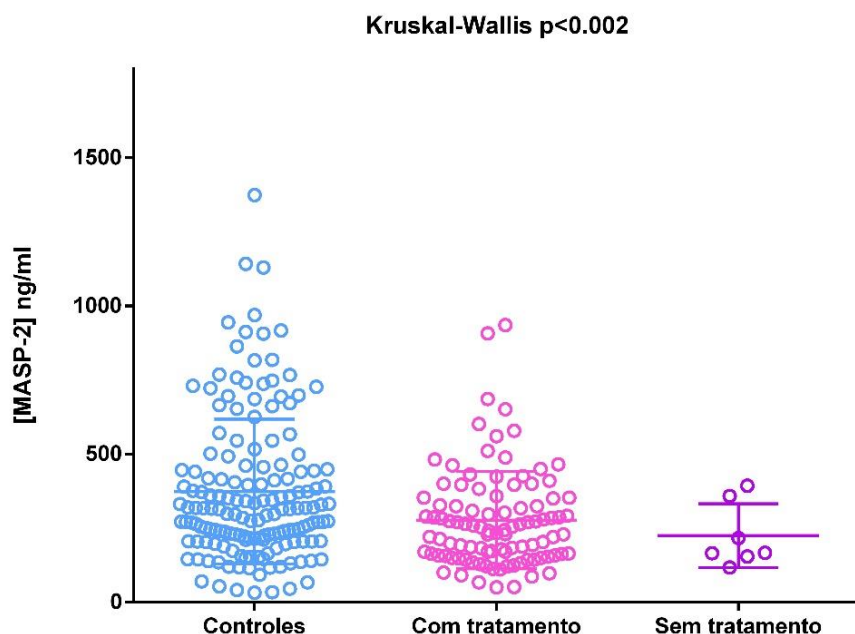


Figura 7. Distribuição das concentrações séricas da proteína MASP-2 (ng/ml) em controles e pacientes com tratamento e pacientes sem tratamento.

FONTE: o autor (2015).

4.2. Polimorfismos no Intron 4 (rs2273344) e no Intron 5 (rs9430347) do gene *MASP2*.

Para os polimorfismos dos introns 4 e 5 foram genotipadas 228 amostras de pacientes e comparadas aos 262 indivíduos controles. A distribuição das frequências dos genótipos nos controles apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,69$), no entanto observou-se um excesso de homozigotos *GA/GA* no grupo dos pacientes ($p=0,0004$). De fato, houve uma associação entre esse genótipo e a doença, presente em 1,5% (4/262) dos controles e 7,0% (16/228) dos pacientes, $OR=4,87$ [$IC95\%=1,60-4,68$], $p=0,0025$. O alelo *GA* também foi associado à doença ($OR=1,45$ [$IC95\%=1,03-2,04$], $p=0,03$), pois tal haplótipo está presente em 19,1% (87/456) dos cromossomos dos pacientes e 13,9% (73/524) dos controles. Ao contrário, o alelo *AG* foi associado à proteção à doença, presente em 86,0% (451/524) dos indivíduos controles e 80,9% dos pacientes (369/456), $OR=0,69$ [$IC95\%=0,48-0,96$], $p=0,03$ (Tabela 4). No entanto, não foi observada relação entre homozigotos *AG/AG* e o pênfigo foliáceo.

Tabela 4. Frequências dos genótipos (%) dos polimorfismos nos introns 4 e 5 do gene *MASP2* em pacientes de pênfigo foliáceo e controles.

GENÓTIPOS	<i>AG/AG</i>	<i>AG/GA</i>	<i>GA/GA</i>
Controles (%)	73,7	24,8	1,5
N = 262			
Pacientes (%)	68,9	24,1	7,0
N = 228			
HAPLÓTIPOS	<i>AG</i>	<i>GA</i>	-
Controles (%)	86,1	13,9	
n = 524			
Pacientes (%)	80,9	19,1	
n = 456			

LEGENDA: em negrito o genótipo (*GA/GA*) e o haplótipo (*GA*) associados à susceptibilidade e o haplótipo (*AG*) associado à proteção ao pênfigo foliáceo. N = número de indivíduos, n = número de cromossomos.

FONTE: o autor (2015).

4.3. Polimorfismos no Intron 9 (rs17409276) e no Exon 10 (rs2273346) do gene *MASP2*.

Para os polimorfismos do Intron 9 e do Exon 9 do gene *MASP2* foram genotipados 247 pacientes e 236 controles. A distribuição das frequências dos genótipos nos controles apresentou-se em equilíbrio de Hardy e Weinberg, no entanto para os pacientes não foi observado equilíbrio. Foi vista uma associação positiva entre o genótipo *CV/TV* e a doença, presente em 30,0% (74/247) dos pacientes e 17,8% (41/236) dos controles, OR=1,94 [IC95%=1,26–2,98], p=0,003. O alelo *TV* mostrou-se associado à susceptibilidade à doença, presente em 17,6% (87/494) dos pacientes e 12,5% (60/472) dos controles, OR=1,47 [IC95%=1,03-2,10], p=0,038. Além disto, foi observada associação entre os homocigotos *CV/CV* e a proteção à doença, pois tal genótipo está presente em 69,1% (163/236) dos indivíduos controles e 59,9% (148/247) dos pacientes, OR=0,65 [IC95%=0,44-0,94], p=0,03 (Tabela 5). Não houve associação quando comparadas as frequências alélicas de *CV* entre os grupos.

Tabela 5. Frequências dos genótipos (%) dos polimorfismos no intron 9 e exon 10 do gene *MASP2* em pacientes de pênfigo foliáceo e controles.

GENÓTIPOS	<i>CA/CA</i>	<i>CA/CV</i>	<i>CA/TV</i>	<i>CV/CV</i>	<i>CV/TV</i>	<i>TV/TV</i>
Controles (%)	0,4	8,1	2,1	69,1	17,8	2,5
N = 236						
Pacientes (%)	-	6,9	1,2	59,9	30,0	2,0
N = 247						

HAPLÓTIPOS	CA	CV	TV	-	-	-
Controles (%)	5,5	82,0	12,5			
n = 472						
Pacientes (%)	4,1	78,3	17,6			
n = 494						

LEGENDA: em negrito o genótipo (*CV/TV*) e o haplótipo (*TV*) associados à susceptibilidade e o genótipo (*CV/CV*) associado à proteção ao pênfigo foliáceo. N = número de indivíduos, n = número de cromossomos.

FONTE: o autor (2015).

4.4. Associação entre os genótipos de *MASP2* e as concentrações de *MASP-2*.

4.4.1. Polimorfismos no Intron 4 e no Intron 5.

As concentrações séricas por genótipo foram avaliadas por teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney por serem dados contínuos não paramétricos. Dos pacientes genotipados, 103 foram quantificados. A distribuição dos valores correspondente ao genótipo *GA/GA* apresentou mediana de 572,0 ng/ml, comparado a 441,1 ng/ml para *AG/GA* e 270,8 ng/ml em *AG/AG*. O genótipo *GA/GA* está, portanto, associado a maiores concentrações da proteína *MASP-2* nos controles ($p < 0,0001$). Esse mesmo padrão é observado nos pacientes, onde portadores do genótipo *GA/GA* apresentaram maiores concentrações da proteína (mediana de 686,0 ng/ml), seguido por *AG/GA* (341,5 ng/ml) e *AG/AG* (187,0 ng/ml) ($p < 0,0001$). Houve diferença significativa entre as concentrações da proteína de controles e pacientes homocigotos *AG/AG* ($p = 0,005$) (Figura 8).

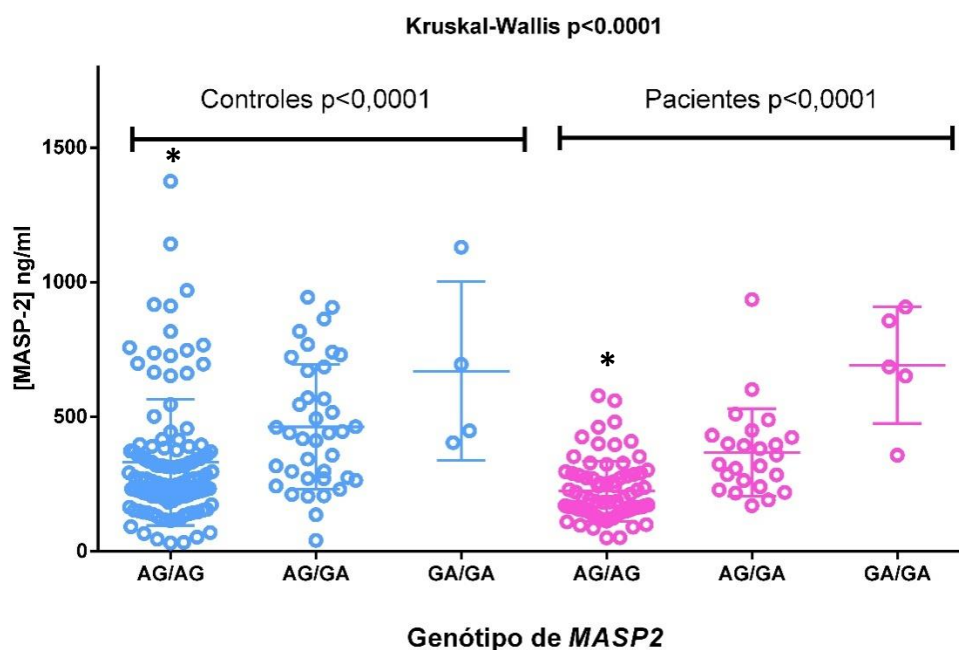


Figura 8. Distribuição das concentrações séricas da proteína MASP-2 (ng/ml) com relação aos genótipos dos polimorfismos nos introns 4 e 5 de *MASP2* em controles e pacientes.

LEGENDA: (*) houve diferença significativa entre os grupos de pacientes e controles para esse genótipo.

FONTE: o autor (2015).

4.2.2. Polimorfismos no Intron 9 e no Exon 10.

Dos pacientes genotipados para os polimorfismos no intron 9 e no exon 10, 93 foram quantificados. O genótipo *CA/CA* ocorreu apenas em um indivíduo controle (275,0 ng/ml). A presença do haplótipo *TV* está associado a maiores concentrações da proteína MASP-2 em controles, visto a distribuição de concentrações apresentada por homocigotos *TV/TV* apresentou mediana de 449,0 ng/ml, seguido de 451,3 ng/ml em *CV/TV* e 446,5 ng/ml em *CA/TV*. A distribuição das concentrações da proteína em indivíduos com os genótipos *CA/CV* e *CV/CV* teve medianas de 210,5 e 281,5 ng/ml, respectivamente. Esse mesmo padrão foi observado nos pacientes, onde portadores do genótipo *TV/TV* apresentam maiores concentrações da proteína (mediana de 505,5 ng/ml). Foi observada mediana de 437,0 ng/ml em *CA/TV*, 338,5 ng/ml em *CV/TV*, 272,5 ng/ml em *CA/CV* e 188,0 ng/ml em *CV/CV*. Houve uma diferença significativa entre as medianas dos homocigotos *CV/CV* dos diferentes grupos ($p < 0,0001$) (Figura 9).

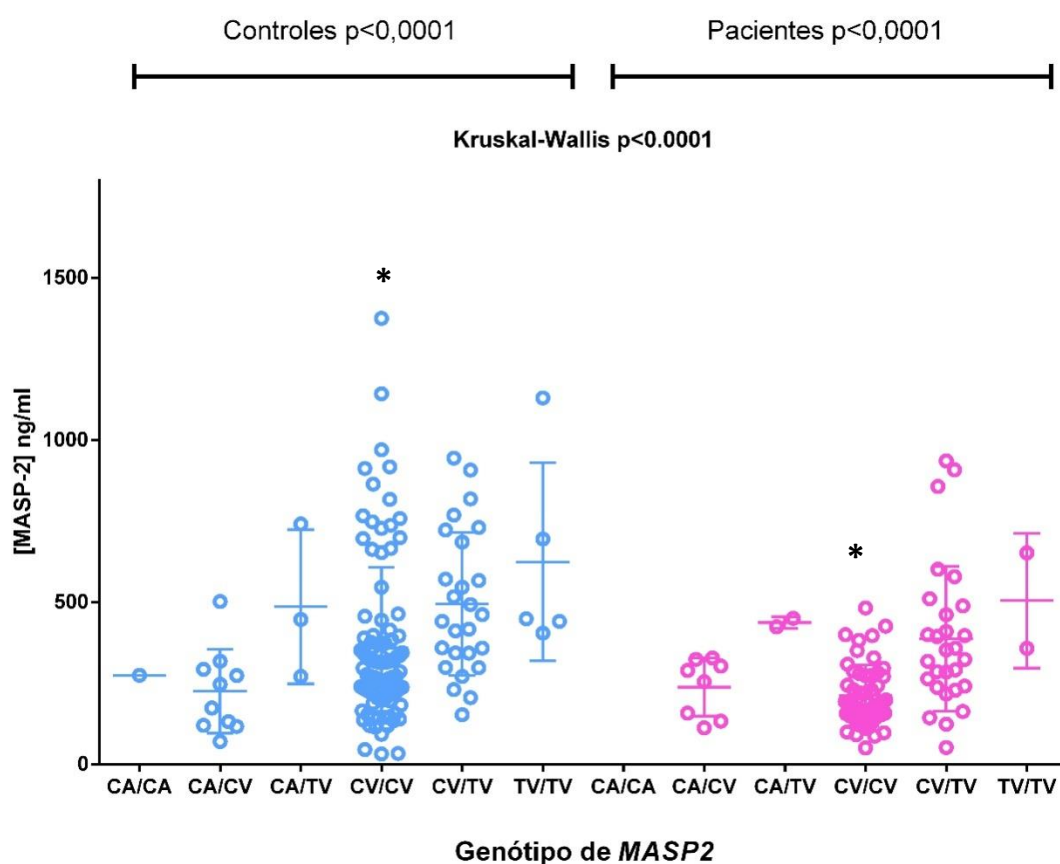


Figura 9. Distribuição das concentrações séricas da proteína MASP-2 (ng/ml) correspondente aos genótipos dos polimorfismos no intron 9 e exon 10 de *MASP2* em controles e pacientes.

LEGENDA: (*) houve diferença significativa entre os grupos de pacientes e controles para esse genótipo.

FONTE: o autor (2015).

4.5. Associações com os haplótipos de *MASP2*

Visto a associação positiva entre os polimorfismos rs2273344 e rs9430347 e rs17409276 e rs2273346, a relação entre a doença e tais polimorfismos foi analisada em conjunto em 214 pacientes e 236 controles. Os indivíduos controles apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Wenber ($p=0,79$), o que não foi verificado no grupo de pacientes ($p=0,003$). O genótipo GACV/GATV foi observado em 4,2% dos pacientes, mas em nenhum indivíduo controle ($p=0,001$), e está associado à altas concentrações da proteína MASP-2 (mediana 882,5 ng/ml). Além disso, foi observada associação com os genótipos AGCV/AGTV (OR=3,43 [IC95% 1,50-7,85], $p=0,0025$) e AGCV/AGCV (OR=0,62 [IC95% 0,42-0,90], $p=0,013$), sugerindo que as relações entre os polimorfismos dos íntrons 4 e 5 e do íntron 9 e exon 10 e a susceptibilidade ou proteção ao pênfigo foliáceo são independentes. As concentrações séricas da proteína MASP-2 foram maiores em indivíduos portadores dos haplótipos GA e TV, tanto em pacientes quanto em controles, como mostram a figura 10 e a tabela 6.

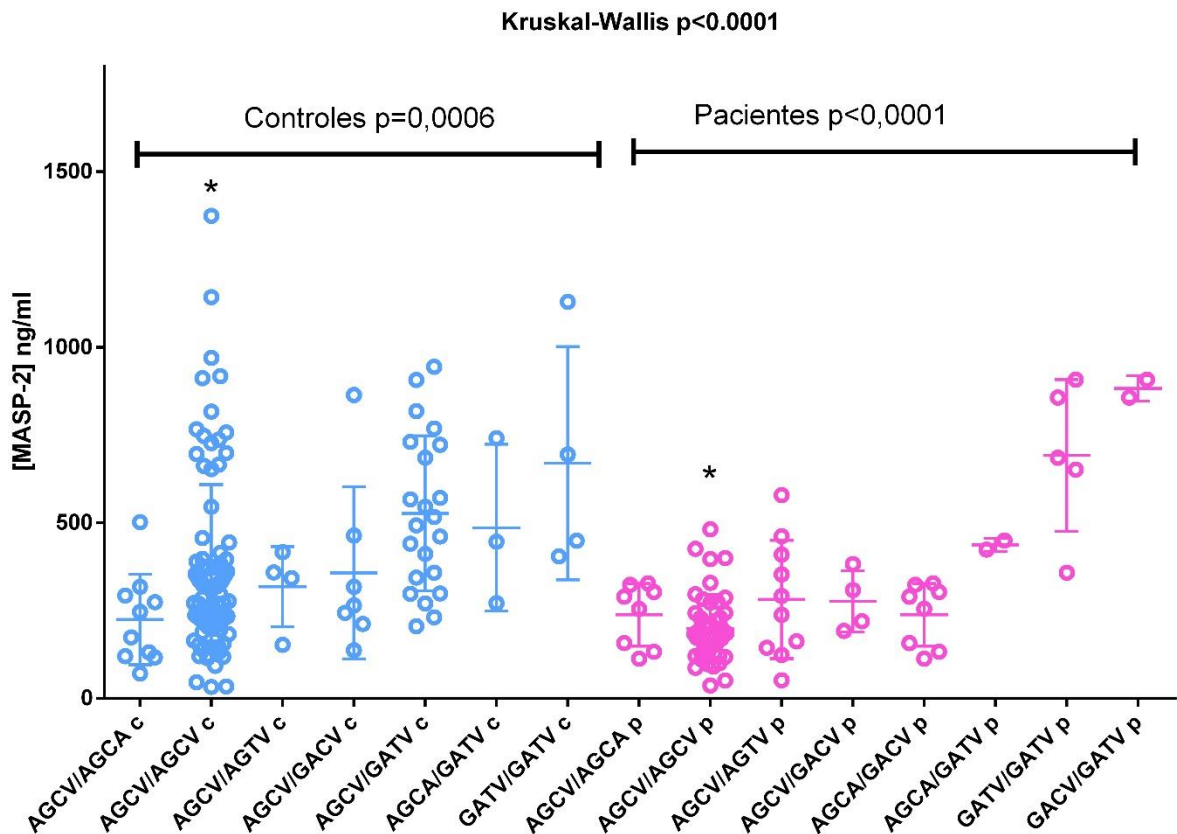


Figura 10. Distribuição das concentrações séricas da proteína MASP-2 (ng/ml) associada aos genótipos dos polimorfismos nos introns 4, 5 e 9 e no exon 10 de *MASP2* em controles e pacientes.

LEGENDA: (*) houve diferença significativa entre as concentrações séricas da proteína MASP-2 nos grupos de controles e pacientes.

FONTE: o autor (2015).

Tabela 6. Frequências e medianas das concentrações da proteína MASP-2 de acordo com o genótipo em controles e pacientes.

GENÓTIPO	CONTROLES		PACIENTES	
	FREQUÊNCIA (%)	Mediana [MASP2] (ng/ml)	FREQUÊNCIA (%)	Mediana [MASP2] (ng/ml)
AGCV/AGCA	9,6	210,5	7,0	272,5
AGCA/AGCA	0,6	275,0*	-	-
AGCV/AGCV	88,7	285,9	50,9	183,5
AGCV/AGTV	4,8	351,1	10,7	265,0
AGCV/GACV	8,9	265,0	6,5	264,5
AGCA/GATV	3,0	446,5	0,9	437,0
AGCA/GACV	1,8	-	-	-
AGCV/GATV	20,3	505,2	16,4	341,5
GATV/GATV	2,4	572,0	1,9	686,0
GACV/GATV	-	-	4,2	882,5
AGTV/GATV	1,2	441,1*	0,5	-
GACV/GACV	-	-	0,9	-

Legenda: (*) apenas um indivíduo quantificado. (-) indivíduos sem quantificação de MASP-2.

FONTE: o autor (2015).

4.6. Análise multivariada

Todas as associações avaliadas com o teste exato de Fisher foram avaliadas, também, por regressão logística binária (Tabela 7). A correção por sexo, idade e grupo étnico não foi necessária, uma vez que estes fatores demográficos não se apresentaram associados à doença. A associação de susceptibilidade se manteve entre a doença e os genótipos *GA/GA* (OR=4,21 [IC95%=1,38-12,77], $p=0,011$), *CV/TV* (OR=2,13 [IC95%=1,39-3,27], $p=0,001$), *AGCV/AGTV* (OR=3,06 [IC95%=1,35-6,99], $p=0,008$) e genótipos com o haplótipo *TV* (OR=1,85 [IC95%=1,24-2,76], $p=0,003$). Houve associação independente de proteção à doença com concentrações de MASP-2 superiores a 400 ng/ml (OR=0,35 [IC95%=0,20-0,61], $p<0,0001$).

Tabela 7. Associações avaliadas por regressão logística binária.

	Oddis Ratio	IC95%	Valor de p
Haplótipos			
<i>TV</i>	1,85	1,24-2,76	0,003
Genótipos			
<i>GA/GA</i>	4,21	1,38-12,77	0,011
<i>CV/TV</i>	2,13	1,39-3,27	0,001
<i>AGCV/AGTV</i>	3,06	1,35-6,99	0,008
Concentrações de MASP-2			
> 400 ng/ml	0,35	0,20-0,61	0,0001

FONTE: o autor (2015).

5. DISCUSSÃO

Pênfigo foliáceo é uma doença autoimune endêmica com formação de anticorpos anti-desmogleína-1, capazes de ativar o sistema complemento (JONES et al., 1984). O possível envolvimento da via das lectinas no PF foi nos sugerido pela deposição de MBL e Ficolina-2 em lesões de pênfigo vulgar (MESSIAS-REASON; NISIHARA; MOCELIN, 2011). Neste trabalho, as concentrações séricas de MASP-2 foram significativamente inferiores nos pacientes, confirmando a tendência observada em um estudo anterior (MESSIAS-REASON et al., 2008) com o aumento do número de indivíduos controles quantificados para a proteína. A associação entre susceptibilidade à doença e (1) genótipos e haplótipos relacionados a altas concentrações basais de MASP-2 e (2) baixas concentrações da proteína em pacientes, pode ser justificada pelo consumo da proteína quando há uma elevada taxa de ativação do sistema complemento, como ocorre na evolução da doença (MESSIAS et al., 1989). Uma outra hipótese que justificaria tais concentrações em pacientes seria a imunossupressão gerada pelo uso de corticoides. No entanto, foi visto que as baixas concentrações da proteína no grupo dos pacientes são independentes da presença ou ausência do tratamento. O padrão observado indica que o tratamento para o PF aumenta a expressão do gene *MASP2* pela presença de elementos responsivos a glicocorticoides no promotor do gene (fator nuclear de hepatócito) (ENDO et al., 2002; GRANGE et al., 1991). Por essa razão, o grupo formado por indivíduos com pênfigo foliáceo e sem tratamento tende a apresentar menores concentrações de MASP-2. Supõe-se que, após iniciado o tratamento, as concentrações da proteína aumentariam de forma a tentar mimetizar o que acontece em situações basais, visto que indivíduos controles possuem maiores concentrações da proteína quando comparados ao grupo de pacientes. Logo, a associação entre as concentrações da proteína e os genótipos de *MASP2* são independentes, o que fortalece a hipótese de consumo da proteína MASP-2 na doença.

Polimorfismos intrônicos e em regiões não traduzidas podem interferir no processamento e na eficiência da tradução do mRNA, pois são importantes regiões de reconhecimento para proteínas ligadoras de RNA (RNAbp) e microRNAs. Dessa forma, embora não afetem a sequência de aminoácidos, podem interferir na regulação da expressão gênica. Na formação da proteína MASP-2, o exon 5 deve ser removido, pois possui um códon de parada. Caso contrário, há formação da proteína MAp19. Nossa hipótese é que polimorfismos nos introns 4 e 5, por flanquearem o exon 5, interferem no reconhecimento de RNAbps envolvidas na remoção do exon 5, evento necessário para a formação da proteína funcional. Um estudo *in silico* com pacientes de hanseníase demonstrou que a presença da variante GA cria um motivo silenciador 5'-GGGCCA-3', podendo ser o responsável pelo escape do exon 5 no splicing alternativo do mRNA do gene *MASP2* (BOLDT et al., 2013). Nesse trabalho vimos que portadores do genótipo GA/GA apresentam maiores concentrações da proteína MASP-2, tanto pacientes quanto controles. Como esse genótipo está associado positivamente à doença, sugere-se que indivíduos alto produtores de MASP-2 seriam mais susceptíveis ao PF, visto que maiores concentrações da proteína estão relacionadas a um alto risco de desordens inflamatórias, resultado de um excesso de ativação do sistema complemento.

Da mesma forma, indivíduos portadores do genótipo CV/TV dos polimorfismos rs17409276 e rs2273346 apresentam altas concentrações da proteína em relação aos outros, com exceção do genótipo TV/TV. Estes heterozigotos CV/TV mostraram associação positiva com a doença, o que fortalece a hipótese de que altas concentrações da proteína MASP-2 podem ativar de forma desordenada o sistema complemento, aumentando a susceptibilidade ao PF. O genótipo TV/TV não apresentou associação, o que pode ser justificado pelo pequeno número de indivíduos com esse genótipo (apenas 2,0% dos pacientes e 2,5% dos controles). Quando somados os indivíduos homozigotos TV/TV e heterozigotos CV/TV e CA/TV, os pacientes encontram-se em maior número quando comparados aos controles, o que reflete uma associação entre a presença da variante TV e a doença.

A associação positiva entre GACV/GATV e altas concentrações séricas da proteína MASP-2 reforça nossa hipótese de que indivíduos alto produtores são mais susceptíveis ao pênfigo foliáceo. No entanto, apesar dessa associação, tais polimorfismos parecem estar diferentemente relacionados à doença, visto que a árvore filogenética elaborada para *MASP2* sugere blocos haplotípicos para esse gene, separando os polimorfismos rs2273344 e rs9430347 e rs17409276 e rs2273346 em dois grupos diferentes. Isso se confirma nesse estudo, pois esta não foi a única associação encontrada quando o haplótipo é formado (AGCV/AGCV e AGCV/AGTV também mostraram-se associados). Dessa forma, por mais que tais polimorfismos pareçam ter algum efeito aditivo na susceptibilidade ou proteção ao pênfigo foliáceo, devem ser analisados separadamente. Boldt e colaboradores em 2013 sugerem que as três variações intrônicas

Intron4_G, *Intron5_A* e *Intron9_T* estão fortemente ligadas, e que a associação com a variante *Intron9*T* possa ser um efeito carona desse polimorfismo.

A associação com os polimorfismos estudados e as concentrações séricas da proteína MASP-2 nos sugerem que a redução da concentração da proteína no soro dos pacientes poderia ser um alvo terapêutico no tratamento do PF. Alguns inibidores de MASP-2 já foram estudados, como inibidores de serina-proteases (serpinas) e antitrombina III (PARÉJ et al., 2013). KEIZER e coautores discutem sobre um inibidor exclusivo de MASP-2, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), um regulador da via extrínseca da coagulação que se mostrou eficaz em inibir MASP-2 seletivamente, sem influenciar outros componentes do sistema complemento como MASP-1, C1s e C1r (KEIZER et al., 2015).

6. REFERÊNCIAS

- AMEYE, L. et al. M-ficolin levels are associated with the occurrence of severe infections in patients with haematological cancer undergoing chemotherapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 303–308, 2012.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, tradução da 6ª edição, 2008.
- ALI, Y.M. et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS Pathog**, v.8, n.7. 2012.
- AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. **The Journal of Dermatology**, v. 42, n. 1, p. 18–26, 2015.
- AUGUSTO, D. G. et al. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- BELTRAME, M. H. et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Molecular Immunology**, v. 3, p. 1–16, 2015.
- BOLDT, A. B. W. et al. Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MAp19 serum levels. **Human Immunology**, v. 72, n. 9, p. 753–760, 2011.
- BOLDT, A. B. W. et al. Leprosy Association with Low MASP-2 Levels Generated by MASP2 Haplotypes and Polymorphisms Flanking MAp19 Exon 5. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
- BOLDT, A. B. W. et al. Genetically defined low MASP-2 serum levels increase the susceptibility to HIV infection, 2014. **In prep**.
- BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; DE MESSIAS-REASON, I. J. T. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. v. 56, 2012.
- BOLDT, A.B.W.; LUZ, P.R.; MESSIAS-REASON, I.T.J. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy chronic Chagas disease. **Clinical immunology**, v.140, n.1, p.63-70, 2011.
- CAMPBELL, I. et al. Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem Endemic pemphigus foliaceus/fogo selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, n. 1, p. 13–33, 2001.

CHIDGEY, M. A. Desmosomes and disease: An update. **Histology and Histopathology**, v. 17, n. 4, p. 1179–1192, 2002.

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

DALLA-COSTA, R. et al. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, n. 8, p. 809–817, 2010.

DE ROOIJ, B. J. F. et al. Lectin complement pathway gene profile of donor and recipient determine the risk of bacterial infections after orthotopic liver transplantation. **Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 1100–1110, 2010.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 6, p. 689–705, 2011.

DIAZ, L.A. et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **The Journal of Investigative dermatology**, v.92, n.1, p.4-12, 1989.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010.

EATON, D.P. et al., Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **Journal of medical entomology**, v.35, n.2, p.120-131,1998.

ENDO, Y. et al. Functional characterization of human protease (MASP) -1 / 3 and MASP-2 promoters , and comparison with the C1s promoter. **International immunology**, v. 14, n. 10, p. 1193–1201, 2002.

FLORES, G. et al. IgG Autoantibody response against keratinocyte cadherins in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of investigative dermatology**, v. 27, n. 5, p. 417–428, 2012.

FRIEDMAN, H. et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.32, n.6, p.949-956, 1995.

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

GÁL, P. et al. A true autoactivating enzyme: Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33435–33444, 2005.

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

GRANDO, S. A. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. **Autoimmunity**, v. 45, n. 1, p. 7–35, 2012.

GRANGE, T. et al. Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 1, p. 131–139, 1991.

HANS-FILHO, G. et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. "Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". **The Journal of investigative dermatology**, 1996.

HILARIO-VARGAS, J. et al. Prevalence of anti-desmoglein-3 antibodies in endemic regions of Fogo selvagem in Brazil. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 9, p. 2044–2048, 2006.

HIROSE, M. et al. Polymorphisms in the mitochondrially encoded ATP synthase 8 gene are associated with susceptibility to bullous pemphigoid in the German population. **Experimental Dermatology**, p. 1-3, 2015.

HOFFMANN, J.A. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v.284, p.1313-1318, 1999.

HUANG, X.X. The mechanism and clinical application of traditional Chinese immunosuppressant. **LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research**, v.16, n.12, p. 1296, 2005.

NGELS, C. et al. Lectin pathway of complement activation and relation with clinical complications in critically ill children. **Pediatric research**, v. 75, n. 1-1, p. 99–108, 2014.

IWAKI, D. et al. Small Mannose-Binding Lectin-Associated Proteins Plays a Regulatory Role in the Lectin Complement Pathway. **The journal of immunology**, v.177, p.8626-8632, 2006.

JONES, J. C. et al. Human autoantibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2781–2785, 1984.

KALANTARI-DEHAGHI, M. et al. Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

KAWANA, S., GEOGHEGAN, W.D., JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. III. Altered epidermal cell membrane integrity mediated by pemphigus antibody and complement. **J. invest. Dermatol.** V. 86, n. 29. 1986

KEER, F.K. et al., Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor. **Molecular Immunology**, v.45, n.3, p.670-677, 2008.

KEIZER, M. P. et al. TFPI inhibits lectin pathway of complement activation by direct interaction with MASP-2. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 544–550, 2015.

KRARUP, A. et al. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. 1–8, 2007.

LESHEM, Y.A. et al. Opportunistic infections in patients with pemphigus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.71, n.2, p.284-292, 2014.

LI, N. et al. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501–1510, 2003.

LOMBARDI, C. et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). “The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research”. **The Journal of investigative dermatology**, v. 98, n. 6, p. 847–850, 1992.

MA, Y.J.; SKJOEDT, M.O.; GARRED, P. Collectin-11/MASP complex formation triggers activation of the lectin complement pathway the fifth lectin pathway initiation complex. **J Innate Immunol**, v.5, n.3, 2013.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M.L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and immunity**, v.10, n.6, p.547-558, 2009.

MARCHENKO, S. et al. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: A missing link in disease pathophysiology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 6, p. 3695–3704, 2010.

MESSIAS IT, et al. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.14 p.51–55, 1989.

MESSIAS-REASON, I. et al. Circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 in endemic pemphigus foliaceus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 33, n. 4, p. 495–497, 2008.

MESSIAS-REASON, I. J. T.; NISHIHARA, R. M.; MOCELIN, V. Mannan-binding lectin and Ficolin deposition in skin lesions of pemphigus. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 7, p. 521–525, 2011.

MORAES, M.E. et al. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue antigens**, v.49, n.1, p.35-40, 1997.

MØLLER-KRISTENSEN, M. et al. Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. **Journal of Immunological Methods**, v. 282, n. 1-2, p. 159–167, 2003.

PARÉJ, K. et al. The control of the complement lectin pathway activation revisited: Both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, While α 2-macroglobulin is not. **Molecular Immunology**, v. 54, n. 3-4, p. 415–422, 2013.

PEREIRA, N.F. et al. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variantes. **Cytokine**, v.28, n.6, p.233-241, 2004.

PRÜSSMAN, W. et al. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. **orphanet journal of rare diseases**, p. 1–8, 2015.

RICKLIN, D. et al. Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010.

SALLENBACH, S. et al. Serum Concentrations Of Lectin-Pathway Components In Healthy Neonates, Children And Adults: Mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 22, n. 4, p. 424–430, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - a laboratory manual. 2 ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHWAEBLE, W. J. et al. Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 18, p. 7523–7528, 2011.

STENGAARD-PEDERSEN, K. et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 6, p. 554–560, 2003.

STOVER, C.M. et al. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **Journal Immunology**, v.162, p.3481-3490, 1999.

STOVER, C.M. et al. Assignment of the gene encoding mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP2) to human chromosome 1p36.3-->p36.2 by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.84, p.148-9, 1999.

THIEL, S. et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v.386, p.6624, 1997.

THIEL, S. et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes and immunity**, v. 8, n. 2, p. 154–163, 2007.

VIEIRA, J.P. Pemphigus foliaceus (fogo selvagem). Na endemic disease of the state of São Paulo (Brazil). **Archives of Dermatology**, v.41, p.858-863.

TULIO, S. et al. MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, v. 72, n. 10, p. 912–915, 2011.

WANG, H. et al. Efficacy of Rituximab for Pemphigus: A Systematic Review and Meta-analysis of Different Regimens. **Acta Dermato Venereologica**, n. 3, p. 0, 2014.

WU, M.Q., HAN, Q.Y., PU, Z.H. A review on treating pemphigus in the integrative medicine. **Clinical Journal of Chinese Medicine**, v. 4, n. 15, p. 120–122, 2012.

YIITING, H. et al. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.66, n.4, 2007.

YU, L.P., XUN, H., TAND, D.F. The clinical research of the combination of corticosteroids and tripterygium glycoside in treatment of pemphigus. **Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine**, v.18, n.3, p.268, 2009.