



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HIV-1 E DA
PROGRESSÃO DA AIDS EM ASSOCIAÇÃO AO POLIMORFISMO
NO GENE *Mbl* (LECTINA LIGADORA DE MANOSE)

MARCOS ROGÉRIO MENEZES DA COSTA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos R. Vallinoto

Belém - Pará
2004

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do CCB-UFPA – Belém (PA)

Costa, Marcos Rogério Menezes da

Estudo da susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e da progressão da AIDS em associação ao polimorfismo no gene *Mbl* (Lectina Ligadora de Manose)/Marcos Rogério Menezes da Costa; orientador, Antonio Carlos R. Vallinoto - 2004

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2004.

1.HIV (vírus). 2.AIDS (doença). 3. Lectinas. 4. Polimorfismo (genética). I.Título.

CDD – 21. ed. 616.9792

MARCOS ROGÉRIO MENEZES DA COSTA

**ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HIV-1 E
DA PROGRESSÃO DA AIDS EM ASSOCIAÇÃO AO
POLIMORFISMO
DO GENE *Mbl* (*MANNOSE-BINDING LECTIN*).**

Dissertação de mestrado aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto
Departamento de Patologia, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos
Departamento de Patologia, UFPA

Profa. Dra. Marluísa Oliveira Guimarães Ishak
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado (suplente)
Departamento de Patologia, UFPA

Belém, 12 de Setembro de 2004

“ Os humanos têm o potencial não só para criar vidas felizes para si mesmos, mas também para ajudar outros seres. Nós dispomos de uma capacidade criativa natural e é importantíssimo ter consciência desse fato.”

Sua Santidade, o 14º Dalai-lama, O Livro da Sabedoria, pág. 7.

Aos meus pais, meus fãs e heróis;
Aos meus irmãos, grandes companheiros.

AGRADECIMENTOS

È com imenso prazer que expresso meus sinceros agradecimentos **ao Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto**, que além de orientador é um grande amigo que, com sua capacidade e integridade, é referência para quem faz e quer fazer parte da pesquisa científica.

À **Profa. Izaura Cayres Vallinoto**, pelo incentivo e pela análise crítica e correções gramaticais realizadas no decorrer deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ishak** e a **Profa. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak** que, com sua disciplina, amizade e seus conhecimentos, auxiliaram-me na elaboração deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos** e a **Profa. Dra. Ândrea Kelly Campos Ribeiro dos Santos**, do Laboratório de Genética Humana e Médica – CCB/UFPA pelas análises e sugestões referendadas neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luís Fernando Machado** e a **Profa. Vânia Nakauth Azevedo**, que desde o início de minha vida acadêmica são grandes amigos, e realizaram várias revisões neste trabalho.

A **MSc. Talita Monteiro** que me orientou e me conduziu, com muita sabedoria e responsabilidade, durante a iniciação científica.

A amiga graduanda **Anna Elizabeth Alves**, que com sua imensa dedicação e capacidade, participou desde o início na análise das amostras e elaboração deste trabalho.

Aos amigos, graduandos e pós-graduandos, do Laboratório de Virologia do CCB/UFPA, **Ivina Gesele Lopes, Fernando Augusto da Costa, Maria Izete**

Machado, Lilian Marinho, Lucimar Di Paula Madeira, Paula do Socorro Costa, Renato Fernandes, Lilian Keila Pinheiro, Rosimar Neris Martins, Maurimélia Mesquita, Rogério Valois Laurentino, Gemilson Pontes, Luciana Mendes Fernandes e Nilton Akio Muto, pois todos, sem exceção, de alguma maneira participaram deste trabalho.

A todos os **pacientes da URE-DIPE** e do **LACEN (Macapá-AP)**, que concordaram em colaborar para a realização deste trabalho, pois sem eles, nada disso seria possível.

À médica **Lia Lobato Batista de Sousa**, Coordenadora do Programa Estadual de DST/AIDS do Estado do Pará, responsável pela coleta de dados e acompanhamento dos pacientes envolvidos na pesquisa.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, da Universidade Federal do Pará, pelo suporte dispensado durante o curso.

A **CAPES** pelo suporte financeiro concedido por meio de bolsa de mestrado.

À **Universidade Federal do Pará**, pelo apoio prestado à realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1).....	2
1.1.1 A Família <i>Retroviridae</i>	2
1.1.2 A Estrutura do HIV-1.....	3
1.1.3 O Ciclo de Replicação do HIV-1.....	6
1.2 A INFECÇÃO PELO HIV-1 E OS FATORES IMUNOGENÉTICOS DO HOSPEDEIRO.....	8
1.3 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL).....	16
1.3.1 A Estrutura e Função da Lectina Ligadora de Manose.....	17
1.3.2 Mutações Estruturais no Gene <i>Mbl</i>	19
1.3.3 Polimorfismo na Região Promotora do Gene <i>Mbl</i>	22
1.3.4 Níveis Plasmáticos da Lectina Ligadora de Manose.....	23
1.3.5 Proteases Serina Associadas a MBL (MASP).....	24
1.3.6 Atividade Proteolítica da MBL Associada com a MASP.....	24
1.3.7 Complexos de Protease Serina Associadas a MBL.....	25
1.3.8 Ativação do Sistema Complemento via MBL.....	26
1.3.8.1 Implicações da Estrutura Quaternária.....	26
1.3.8.2 Implicações dos Alotipos da MBL.....	27
1.3.9 A Atividade da MBL Mediada por Interação com Receptor.....	28

1.3.9.1	Oponização Direta Mediada pela MBL.....	28
1.3.9.2	Citotoxicidade Celular Dependente de MBL.....	30
1.4	A VIA DA MBL E A ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS.....	31
1.4.1	A Deficiência da MBL Associada ao Risco de Infecção.....	32
1.4.2	MBL: Uma Porta de Entrada para Patógenos Intracelulares.....	33
1.4.3	A Infecção por Microorganismos Patogênicos Associados a MBL.....	34
1.4.4	A Ação da MBL na Infecção pelo HIV-1.....	35
1.5	OBJETIVOS.....	38
1.5.1	Objetivo Geral.....	38
1.5.2	Objetivos Específicos.....	38
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1	CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
2.1.1	Pacientes soropositivos HIV-1.....	39
2.1.2	Grupo Controle Soronegativo para HIV-1.....	39
2.2	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA.....	40
2.3	QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4+.....	40
2.4	MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	41
2.4.1	Extração do DNA.....	41
2.4.2	Investigação Molecular das Formas Alélicas da MBL (PCR e RFLP).....	41
2.4.2.1	Determinação dos Alelos <i>Mbl</i> -*A, <i>Mbl</i> -*B e <i>Mbl</i> -*C.....	41
2.4.2.2	Determinação do Alelo <i>Mbl</i> -*D.....	42
2.4.2.3	Eletroforese.....	42

2.5	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	43
3	RESULTADOS.....	44
3.1	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS.....	44
3.2	NÍVEIS DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E O POLIMORFISMO NO GENE <i>Mbl</i>	47
3.3	DISTRIBUIÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA E O POLIMORFISMO NO GENE <i>Mbl</i>	50
4	DISCUSSÃO.....	54
4.1	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS.....	54
4.2	POLIMORFISMO GENÉTICO E SEU IMPACTO NA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	56
5	CONCLUSÕES.....	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1	Estrutura morfológica do <i>Vírus da imunodeficiência humana 1</i>	3
Figura 2	O ciclo de replicação do <i>Vírus da imunodeficiência humana 1</i>	6
Figura 3	Estrutura bioquímica da Lectina Ligadora de Manose.....	18
Figura 4	Localização genômica das mutações no gene <i>Mbl</i>	20
Figura 5	Distribuição dos valores médios da 1ª contagem de linfócitos T CD4+, de acordo com o polimorfismo no gene <i>Mbl</i>	48
Figura 6	Distribuição dos valores médios da 2ª contagem de linfócitos T CD4+, de acordo com o polimorfismo no gene <i>Mbl</i>	49
Figura 7	Média da 1ª determinação de carga viral plasmática, de acordo com os alelos do gene <i>Mbl</i>	51
Figura 8	Média da 2ª determinação de carga viral plasmática, de acordo com os genótipos do exon 1 do gene <i>Mbl</i>	52
Tabela 1	Freqüência dos alelos <i>Mbl</i> -*A e <i>Mbl</i> -*O do gene <i>Mbl</i> nos grupos investigados.....	45
Tabela 2	Freqüência dos alelos <i>Mbl</i> -*A, <i>Mbl</i> -*B e <i>Mbl</i> -*D do gene <i>Mbl</i> nos grupos investigados.....	45
Tabela 3	Distribuição das freqüências genotípicas entre os grupos investigados.....	46
Tabela 4	Valores médios de linfócitos T CD4+ (1ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene <i>Mbl</i>	48
Tabela 5	Valores médios de linfócitos T CD4+ (2ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene <i>Mbl</i>	49

Tabela 6	Análise Comparativa entre 1ª e 2ª avaliações de linfócitos T CD4+ de acordo com o polimorfismo no exon 1 do gene <i>Mbl</i>	50
Tabela 7	Média dos valores de carga viral plasmática (1ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene <i>Mbl</i>	51
Tabela 8	Média dos valores de carga viral plasmática (2ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene <i>Mbl</i>	51
Tabela 9	Análise Comparativa entre 1ª e 2ª avaliações de carga viral plasmáticas de acordo com o polimorfismo do exon 1 do gene <i>Mbl</i>	53

RESUMO

As baixas concentrações séricas de Lecitina Ligante de Manose (MBL) estão associadas com a presença das variantes alélicas *Mbl*-**B*, *Mbl*-**C* e *Mbl*-**D*, e resultam em um aumento na susceptibilidade a infecções recorrentes. No presente estudo foi investigada a associação entre o polimorfismo no gene *Mbl* e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. Um fragmento de 349 pb do exon 1 do gene *Mbl* foi amplificado por PCR e, posteriormente, submetido à análise de restrição com as endonucleases *Ban*I e *Mbo*II, para a identificação dos alelos. A avaliação de 145 pacientes soropositivos e de 99 controles mostrou a presença dos alelos *Mbl*-**A*, *Mbl*-**B* e *Mbl*-**D*, cujas freqüências foram de 69%, 22% e 9% no grupo de pacientes e de 70,2%, 13,6% e 16,2% entre os controles. A análise das freqüências genótípicas mostrou uma maior prevalência dos genótipos com a variante alélica *Mbl*-**B* entre os pacientes soropositivos quando comparadas à do grupo controle. Ademais, o genótipo *B/B* foi seis vezes mais freqüente no grupo de pacientes infectados ($\chi^2=4,042$; $p=0,044$). A média da carga viral plasmática foi menor nos pacientes HIV-1 soropositivos, portadores do alelo *Mbl*-**A*, quando comparado aos pacientes soropositivos apresentando a variante alélica *Mbl*-**B* (5.821 cópias/mL x 52.253 cópias/mL; $p= 0,05$). Ademais os pacientes portadores do alelo *Mbl*-**A* apresentaram uma significativa redução da viremia plasmática ($p<0,001$), o que não foi observado para os portadores da variante *Mbl*-**B* ($p=0,999$). Esses resultados sugerem a importância do polimorfismo no gene *Mbl* na evolução clínica do paciente infectado pelo HIV-1 e que a identificação do perfil genético do gene *Mbl*, em portadores da infecção pelo HIV-1, pode ser importante na avaliação da evolução e do prognóstico da doença.

ABSTRACT

The low serum concentration of Mannose-Binding Lectin (MBL) is associated to the presence of variant alleles *Mbl*-*B, *Mbl*-*C and *Mbl*-*D, and it results in an increased susceptibility to recurrent infections. The present study investigated the association between the *Mbl* gene polymorphism and the susceptibility to HIV-1 infection. A fragment of 349 bp from the exon 1 of the *Mbl* gene was amplified by PCR and then submitted to RFLP analysis using the endonucleases *Ban*I and *Mbo*II, aiming the identification of the variant alleles. The study of 145 seropositive patients and 99 healthy controls showed the presence of alleles *Mbl*-*A, *Mbl*-*B and *Mbl*-*D, with frequencies of 69%, 22% and 9% among patients and 70.2%, 13.6% and 16.2% among healthy controls, respectively. The analysis of the genotype frequencies showed a high prevalence of the genotypes carriers of variant *Mbl*-*B among patients seropositive as compared to the healthy controls. Furthermore, the genotype *B/B* was six times more frequent among patients than the observed to the healthy controls ($\chi^2=4.042$; $p=0.044$). The mean viral load was lower in HIV-1 seropositive patient carrying the *Mbl*-*A allele than those carrying the variant *Mbl*-*B allele (5,821 copies/mL vs. 52,253 copies/mL; $p= 0.05$). Furthermore, patients carrying the allele *Mbl*-*A showed a significant reduction of the viral load ($p<0.001$), that was not observed among those carrying the variant *Mbl*-*B ($p=0.999$). The results suggest the importance of the *Mbl* gene polymorphism on the clinical evolution of the patients infected by HIV-1 and that the identification of the *Mbl* genetic profile, among HIV-1 infected patients, may be an important tool to monitor the evolution and the prognosis of diseases.

1 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista etiológico, as doenças podem ser classificadas de acordo com a contribuição de fatores de natureza genética do hospedeiro, do agente etiológico e do ambiente. Além disso, há um amplo número de doenças classificadas como complexas, em razão de sua etiologia não definida, que inclui a interação de fatores genéticos e ambientais (Petzl-Erler, 1999).

A identificação dos fatores que causam as doenças de etiologia complexa contribui para o entendimento da fisiopatologia, para a geração de novos métodos de diagnóstico, para o controle, para a prevenção e para o tratamento dessas patologias.

Genes polimórficos, cujos produtos participam em mecanismos da resposta imunológica inespecífica e/ou específica, compõem o que se considera como as diferenças interindividuais e interpopulacionais de susceptibilidade às doenças de etiologia e de patogênese complexa (Petzl-Erler, 1999).

Nos últimos anos, um crescente número de estudos tem focado a análise de genes polimórficos, especialmente aqueles pertencentes ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP-I e CHP-II) em humanos (Itescu *et al.*, 1998). Esses estudos foram facilitados, sobremaneira, pelo aumento de recursos financeiros, de informações acerca do genoma humano e da análise de diversidade genética em populações humanas de várias etnias e áreas geográficas (Kroner *et al.*, 1995).

O estudo sistemático de genes polimórficos em populações brasileiras vem contribuindo com melhor conhecimento da variabilidade genética dessas populações, bem como, com o reconhecimento e o entendimento dos genes associados à susceptibilidade às doenças endêmicas no Brasil. A continuidade dos estudos de polimorfismos genéticos, se explorado de forma correta, acrescentará novas e

importantes informações para a compreensão das causas das doenças de etiologia complexa (Petzl-Erler, 1999).

As informações acerca dos fatores de natureza viral e do perfil genético do hospedeiro podem ser aproveitadas na manutenção e no tratamento clínico dos pacientes, gerando uma sobrevida, consideravelmente, melhor.

1.1 O Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)

1.1.1 A Família *Retroviridae*

A dispersão da infecção pelo HIV-1, em países desenvolvidos, é uma conseqüência do comportamento sexual, do uso de drogas endovenosas e, em menor escala, da transfusão de sangue contaminado e do tratamento com produtos derivados de sangue. No Brasil, os primeiros casos da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) datam de 1982 e são oriundos da região Sudeste, a qual, ainda, apresenta o maior número de casos notificados da doença (AIDS Boletim Epidemiológico, 2003). Na região Norte, o Pará contribui com metade dos casos notificados (AIDS Boletim Epidemiológico, 2003). Até dezembro de 2003, foram notificados 2.805 indivíduos infectados pelo HIV-1, no estado do Pará, sendo 72,6% homens e 27,4% mulheres, com idades entre 20 e 49 anos (SESPA, 2004).

Baseado nas propriedades estruturais, genômicas, físico-químicas e replicação, os retrovírus são classificados em sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus* (Coffin *et al.*, 1996).

Os retrovírus patogênicos ao homem incluem os (i) *Vírus linfotrópico de células T humanas* (HTLV), relacionados a distúrbios neurológicos e hematológicos,

classificados no gênero *Deltaretrovirus* e os (ii) *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV), classificados no gênero *Lentivirus* (Gallo, 1991; Coffin *et al.*, 1996; Liu, 1996).

1.1.2 A Estrutura do HIV-1

Os modelos de estrutura do HIV são baseados na combinação de microscopia eletrônica de alta resolução de partículas virais e de análises de imunohistoquímica e bioquímica dos componentes virais (Gelderblom, 1991).

O HIV é uma partícula esférica, com, aproximadamente, 100 nm de diâmetro, apresentando o genoma e enzimas virais envolvidos por um capsídio protéico, circundado por um envelope externo, composto por uma membrana lipopróteica oriunda da célula hospedeira, acrescido de glicoproteínas virais (Wong-Staal & Gallo, 1985; Figura 1).

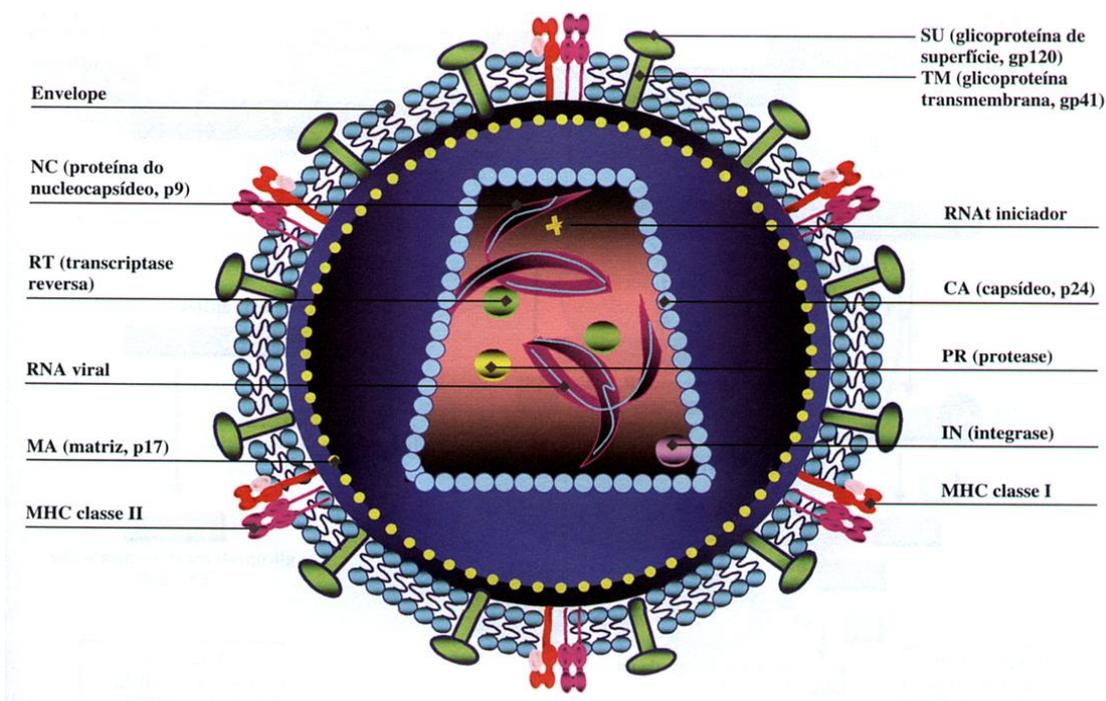


Figura 1 – Estrutura morfológica do *Vírus da imunodeficiência humana 1* (Wigg, 2002).

O genoma do *HIV* é formado por dois filamentos idênticos de RNA de fita simples e de polaridade positiva, contendo nove genes delimitados por duas regiões terminais longas e repetitivas chamadas *LTR* (*Long Terminal Repeats*). Estes genes são classificados em estruturais (*gag*, *pol* e *env*), típicos dos retrovírus, e em regulatórios (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*) (Turner & Summers, 1999).

O gene *gag* codifica um precursor que, ao ser clivado por uma protease viral durante a maturação, origina várias proteínas estruturais que compõem o cerne viral, como a matriz protéica (p27), o capsídeo viral (p24) e as proteínas mais internas do nucleocapsídeo (p7 e p9) (Ratner *et al.*, 1985). O produto do gene *pol* é clivado pela protease viral gerando a transcriptase reversa, o qual contém as atividades necessárias para a síntese do DNA proviral (RNA e DNA-polimerase, ribonuclease H), a integrase e a protease (Wu *et al.*, 1996).

A proteína glicosilada do envelope viral, codificada pelo gene *env*, é clivada por proteases celulares em glicoproteína de superfície (gp120 ou SU) e em glicoproteína transmembrana (gp41 ou TM), que interagem, entre si, por meio de forças não-covalentes (Robey *et al.*, 1985).

As glicoproteínas localizadas na superfície viral ligam-se aos receptores CD4, localizados na membrana citoplasmática de linfócitos T auxiliares, de monócitos, de macrófagos e de células dendríticas foliculares (Weis *et al.*, 1992).

O gene *env* apresenta uma grande diversidade na seqüência de nucleotídeos observada em diferentes cepas. A análise molecular deste gene revelou a

presença de cinco domínios variáveis (V1-V5), intercalados por quatro regiões conservadas (C1-C4) (Myers *et al.*, 1993).

Variações na seqüência do gene *env* têm grande implicação, não somente para a resposta imune antiviral, mas, também, para funções adicionais mediadas pela glicoproteína do envelope, tais como ligação ao CD4, tropismo celular e citopatogenicidade (Diaz, 1997).

A análise de mutações sítio-específicas no gene *env* demonstra que um número limitado de aminoácidos, conservados em diferentes regiões da gp120, são requeridos para uma eficiente ligação ao CD4 (Kowalski *et al.*, 1987). O estudo molecular da região C2V3 permitiu estabelecer uma classificação genotípica para as diversas cepas do HIV-1 (WHO, 1994; Kostrikis *et al.*, 1995).

Os genes não-estruturais compreendem os genes reguladores (*tat* e *rev*) que são essenciais para a replicação viral e os genes “acessórios” ou “auxiliares” (*vif*, *vpr*, *vpu*, e *nef*), que não são essenciais para a replicação viral em cultivo celular (Desrosiers, 1992).

1.1.3 O Ciclo de Replicação do HIV-1

A fase inicial da replicação do HIV-1 inicia com a ligação do vírus, por meio da gp120, ao receptor celular CD4, na superfície da célula-alvo (Klatzmann *et al.*, 1984). O processo de ligação é continuado pela associação da gp120 a receptores de quimiocinas (α e β), indicando, assim, o tropismo das cepas em M-trópicas (ligam-se aos receptores de β -quimiocinas CCR5) e T-trópicas (ligam-se aos receptores de α -quimiocinas CXCR4) (Kuritzkes, 2000; Figura 2).

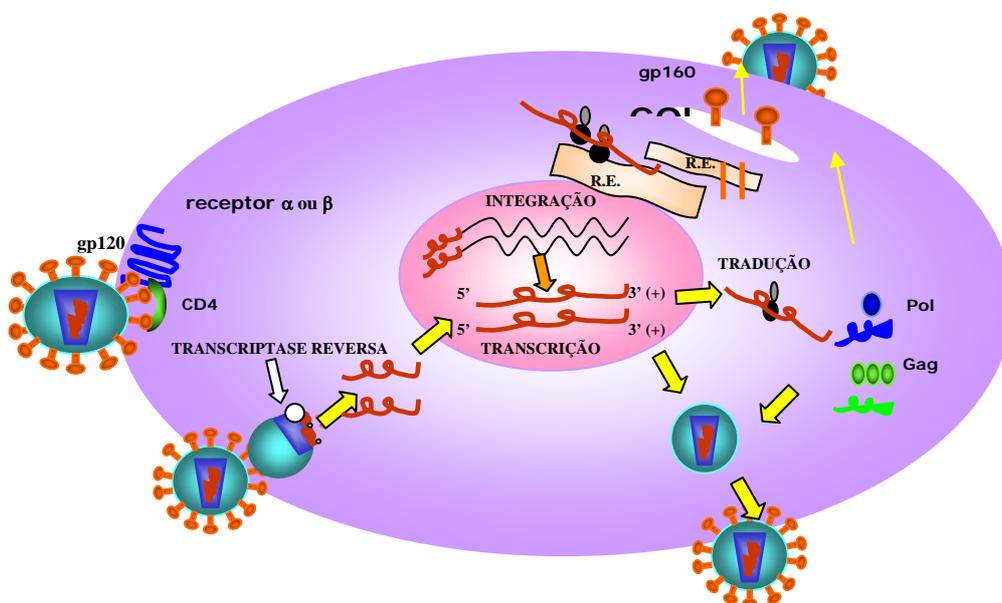


Figura 2 – O ciclo de replicação do *Vírus da imunodeficiência humana 1*.

O início do ciclo de replicação do HIV-1 compreende a interação de proteínas do envelope viral aos receptores da superfície da célula, através da ligação da glicoproteína do envelope, gp120, ao receptor CD4 de linfócitos T auxiliares. Por intermédio de um segundo receptor ou co-receptor, que é representado por algumas moléculas receptoras para quimiocinas (principalmente, CCR5 e CXCR4) o HIV-1

realiza o processo de adsorção e, conseqüente, fusão do seu envelope à membrana citoplasmática da célula infectada, por exposição do domínio hidrofóbico da gp41. Após a fusão do envelope viral com a membrana da célula, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma (Chan & Kim, 1998).

Ainda no citoplasma, ocorre a transcrição das fitas de RNA em uma fita negativa complementar de DNA, através da enzima transcriptase reversa, que utiliza um RNA transportador (tRNA) presente no vírus, como iniciador. A transcriptase reversa, também, atua como ribonuclease H, degradando a fita de RNA e, a seguir, sintetizando a fita positiva de DNA, originando, assim, um DNA de duplo filamento (Chan & Kim, 1998).

A fita de DNA de duplo filamento é transportada para o núcleo da célula, onde pode haver a integração ao genoma da célula (provírus), através da enzima viral integrase, ou a permanência, na forma circular não integrada (Levy, 1994; Chan & Kim, 1998).

Ativado por fatores de transcrição celulares, o provírus é transcrito, pela RNA polimerase II celular, em RNA mensageiro viral, que vão para o citoplasma. Esses RNA darão origem à proteínas não-estruturais que serão responsáveis pela regulação da transcrição de outros RNA mensageiros, envolvidos na síntese das proteínas estruturais do vírus.

Tat é uma proteína regulatória transativadora que, juntamente com certas proteínas celulares, interage com a região TAR (*Tat responsive element*) do RNA mensageiro viral. Tat é a principal proteína envolvida na ativação do HIV. Uma segunda proteína regulatória, a Rev, interage com uma outra região do RNA mensageiro viral chamada RRE (*Rev responsive element*). Essa interação envolve proteínas

celulares e permite que o RNA mensageiro não processado (*spliced*) saia do núcleo e siga para o citoplasma, a fim de ser traduzido em proteínas virais estruturais precursoras. Em paralelo, ocorre a transcrição dos RNA genômicos, que serão incorporados à partícula viral. O transcrito primário do HIV é um RNA mensageiro idêntico ao RNA viral que é traduzido nas proteínas Gag e Gag-Pol (Chan & Kim, 1998).

As proteínas do envelope, gp120 e gp41, são produzidas a partir de um precursor gp160, produto da tradução de um RNA mensageiro que sofreu um único processamento. Produtos de outros RNA mensageiros processados (*spliced*) originam várias proteínas regulatórias e acessórias que podem afetar a replicação do HIV-1 em diferentes tipos de células. As proteínas do envelope, sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e glicosiladas no complexo de Golgi, são transportadas para a membrana citoplasmática. As poliproteínas estruturais, sintetizadas por ribossomas livres, reúnem-se no citoplasma juntamente com os RNA virais e migram para a membrana, em regiões onde há acúmulo das glicoproteínas virais. A saída do vírus da célula hospedeira ocorre por mecanismo de brotamento, nesse momento, ainda como partículas virais imaturas e não infecciosas (Chan & Kim, 1998).

Após a liberação das partículas no meio extracelular, a protease viral sofre uma auto-ativação, passando a clivar as poliproteínas geradas pelos genes *gag* e *gag-pol*, de modo que a partícula viral toma a sua forma característica, sendo, então, infecciosa (Chan & Kim, 1998).

A associação do HIV-1 a um tipo específico de receptores indica não apenas o tropismo para um determinado tipo celular, assim como tem servido como um indicador confiável de maior ou de menor susceptibilidade genética do hospedeiro ao

virus (Winkley *et al.*, 1998). A presença de determinadas mutações nos genes dos receptores de α e β -quimiocinas determina a infecção pelo e a progressão para o quadro de SIDA/AIDS (Smith *et al.*, 1997; Kuritzkes, 2000). Por outro lado, as co-infecções com agentes bacterianos e virais têm servido, também, como fator adicional e complicador do quadro clínico do paciente portador do HIV-1 e, conseqüentemente, podem interferir na progressão para SIDA/AIDS.

1.2 A Infecção pelo HIV-1 e os Fatores Imunogenéticos do Hospedeiro

O conhecimento da patogênese do HIV-1 associada ao papel exercido pelos fatores do hospedeiro na susceptibilidade à infecção, bem como na progressão da SIDA/AIDS foi ampliado com a descoberta de receptores de quimiocinas que funcionam como co-receptores para a entrada do HIV-1 nos linfócitos T CD4⁺ (Luster, 1998).

A presença da molécula CD4 na superfície celular é necessária, mas não suficiente, para a entrada do HIV-1 na célula hospedeira. Além disso, foi descoberto que as células CD8⁺ segregam substâncias que interferem com a habilidade do HIV em infectá-las, sendo essas substâncias identificadas como: (i) RANTES (reguladores em ativação, expressos e segregados em célula T normais) e (ii) Proteína-1 Inflamatória de Macrófagos (MIP-1 α e MIP-1 β).

Um grupo de citocinas pode ter função estimulatória ou inibitória ou, ainda, ambas, ajudando a determinar o equilíbrio de replicação do HIV-1 dentro do hospedeiro (Aggarwal & Puri, 1995; Vicenzi *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados indicam que estas citocinas controlam a replicação do HIV-1. Por exemplo, o fator- α de necrose tumoral (TNF- α), o fator- β de necrose tumoral (TNF- β), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) são citocinas pró-inflamatórias, cujos níveis são elevados em pessoas infectadas pelo HIV-1 (Moriuchi *et al.*, 1996). O TNF- α , é uma importante e potente citocina indutora da replicação do HIV-1, ativa NF- κ B, um fator de transcrição celular, que induz e regula a expressão do genoma viral (Duh *et al.*, 1989; Osborn *et al.*, 1989). Em contraste, a IL-1, a IL-6 e a IL-16 têm ação supressora na replicação do HIV-1 (Baier *et al.*, 1995).

Feng *et al.* (1996) isolaram um receptor de quimiocinas denominado de CXCR4, localizado na superfície dos linfócitos T auxiliares, e que o HIV T-trópico usa como um co-receptor junto com CD4. Posteriormente, foi identificado que as RANTES, a MIP-1 α e a MIP-1 β apresentavam a capacidade de suprimir a infecção por HIV M-trópico, mas não por vírus de T-trópico. No mesmo ano, vários grupos publicaram resultados que mostraram que o receptor para RANTES, MIP-1a e MIP-1b era um receptor de quimiocina chamado CCR5, que está presente em macrófagos, em monócitos e em alguns linfócitos T (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996).

O HIV-1 usa estes receptores de quimiocinas como co-receptores para entrar na célula. A interação entre as glicoproteínas do envelope viral (gp120 e gp41) e o CD4 induz a uma mudança conformacional na gp120, que permite sua interação com

o receptor de quimiocinas e, por último, a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira, por ação da gp41 (Wu *et al.*, 1996; Kwong *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998).

Assim, no modelo de infecção por vírus M-trópico, as cepas do HIV-1 infectam macrófagos, monócitos e células T, usando a expressão de CD4 e de CCR5 do hospedeiro como receptor e co-receptor, respectivamente. Por outro lado, cepas do HIV T-trópico infectam linfócitos T auxiliares, usando o CD4 e o CXCR4 como receptor e co-receptor, respectivamente (Berger *et al.*, 1998).

O CCR5 liga-se aos membros da família das β -quimiocinas: RANTES, MIP-1 α , e MIP-1 β . O CXCR4 liga-se a um membro da família das α -quimiocinas, o fator-1 de células do estroma (SDF-1). O CCR2 liga-se, quimiotaticamente, à proteína-1 de monócitos (MCP-1) e o CCR3 liga-se a MCP-3, a MCP-4 e as eotoxinas 1 e 2 (Luster, 1998). Os demais receptores de quimiocinas servem tanto como co-receptores para o HIV quanto para o *Vírus da imunodeficiência de símios* (SIV).

Os ligantes para os receptores de quimiocinas podem bloquear a entrada do vírus, interferindo com a ligação do vírus ao receptor de quimiocina ou através de baixa regulação do receptor, impedindo a ligação de citocinas que podem induzir a replicação do HIV-1 (Amara *et al.*, 1997). O CCR5, usando as quimiocinas RANTES, MIP-1a e MIP-1b pode bloquear cepas de HIV M-trópico, considerando que o SDF-1 bloqueia as cepas de vírus T-trópico. Linfócitos T CD4⁺ de indivíduos que, ainda, não foram expostos à infecção, produzem níveis aumentados de RANTES, de MIP-1a e de MIP-1b, em quantidades capazes de suprimir a replicação de cepas de HIV-1 M-trópicas (Paxton *et al.*, 1996; Furci *et al.*, 1997).

Alguns fatores genéticos do hospedeiro podem afetar a suscetibilidade ao HIV-1 ou estabelecer a taxa de progressão da infecção. O melhor exemplo destas características genéticas é a mutação CCR5- Δ 32. Essa mutação caracteriza-se pela ocorrência de uma deleção de 32pb no gene CCR5, resultando em uma proteína mais curta (Dean *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996).

Nos Estados Unidos, a frequência da mutação CCR5- Δ 32 é de 11% em caucasóides e de 1,7% em negros. Indivíduos homocigotos para a deleção apresentaram diminuição na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, embora eles, ainda, possam ser infectados por cepas do vírus T-tropical, que usa o CXCR4 como co-receptor para entrada na célula (Dean *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1997).

Com poucas exceções (Samson *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 1997), a maioria dos estudos evidenciou que indivíduos heterocigotos para a mutação CCR5- Δ 32 não são menos susceptíveis à infecção pelo HIV (Dean *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1997). Os dados sugerem, porém, que indivíduos heterocigotos para esta mutação apresentaram uma taxa menor de progressão da SIDA/AIDS (De Roda Husman *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Zimmerman *et al.*, 1997; Ioannidis *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999).

No estudo de Dean *et al.* (1996), a frequência de heterocigotos foi significativamente maior entre os progressores de longo prazo (que desenvolveram SIDA/AIDS com 5 anos ou mais após a infecção) quando comparado aos progressores rápidos (que desenvolveram SIDA/AIDS com 2 ou 3 anos após a infecção). Liu *et al.* (1996) encontraram que células mononucleares do sangue periférico dos pais de indivíduos homocigotos, não infectados, reproduziram o vírus de forma menos eficaz. Presumivelmente, a heterocigosidade limita o número de co-receptores disponíveis para

ligação do HIV-1. A densidade de CCR5 na superfície dos linfócitos T CD4⁺ foi correlacionada com a carga viral em pessoas que não fizeram tratamento para a infecção (Reynes *et al.*, 2000). Estudos do fenótipo viral sugeriram que o efeito protetor do heterozigoto para a mutação CCR5-Δ32, na progressão da doença é pequeno, se o vírus infectante é indutor de sincício ou T-trópico (Michael *et al.*, 1997; Schonning *et al.*, 1998), entretanto, esse resultado não tem sido confirmado em outros estudos (De Roda Husman *et al.*, 1997), possivelmente as discrepâncias estão associadas ao duplo tropismo celular.

Diferente da mutação CCR5-Δ32, que é encontrada, principalmente, em caucasóides, a frequência da mutação CCR2-V641 varia de 10% a 25% em negros, em caucasóides e em todos os outros grupos étnicos já estudados. Estudos em trabalhadoras do sexo infectadas de Náirobi, Quênia, sugeriram que a presença desta mutação poderia explicar a progressão lenta em 21% a 46% dos pacientes progressores lentos (Anzala *et al.*, 1998).

A forma como a heterozigosidade para mutação CCR2-V641 pode afetar a entrada das cepas de HIV-1 na célula hospedeira e a progressão da doença, ainda não é conhecida. A mutação está associada a um co-receptor funcional e o fato de que o efeito protetor pode envolver regulação cruzada com outros co-receptores (Lee *et al.*, 1998) levou a sugestão de que a mutação de CCR2-V641 encontra-se em desequilíbrio de ligação com outra mutação, particularmente nas regiões reguladora ou promotora do CCR5 (Smith *et al.*, 1997; Kostrikis *et al.*, 1998; Mummidi *et al.*, 1998). Essa hipótese foi confirmada com a identificação de um polimorfismo dentro da região reguladora de CCR5, 59653-T, que está em desequilíbrio de ligação com a mutação de CCR2-V641,

mas o significado funcional deste achado, ainda, não se tem conhecimento (Kostrikis *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Mummidi *et al.*, 1998).

Um terço das características genéticas que podem afetar a progressão da SIDA/AIDS envolve o SDF-1, o principal ligante para CXCR4. O Fator-1 de Células do Estroma foi identificado por bloquear a infecção com a variante X4 do HIV-1 (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). O gene transformado, SDF-1 39a, envolve uma mutação em uma região gênica não transcrita e pode regular a síntese de SDF-1 e, assim, competitivamente, inibe a ligação de cepas de HIV T-trópico. Indivíduos portadores da infecção pelo HIV-1 e que são homozigotos para esta mutação mostraram uma progressão mais lenta para a SIDA/AIDS, mas não exibem susceptibilidade diminuída à infecção pelo vírus (Martin *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1998). Em contraste, outros estudos demonstraram que a homozigose para SDF-1 39a está associada à progressão acelerada da doença (Mummidi *et al.*, 1998; Van Rij *et al.*, 1998; Brambilla *et al.*, 2000; Lathey *et al.*, 2000), à replicação viral aumentada (Balotta *et al.*, 1999) ou a nenhum efeito na progressão da doença (Meyer *et al.*, 1999). Porém, um destes estudos mostrou que a sobrevivência prolongada depois do diagnóstico de SIDA/AIDS estaria associada a um efeito protetor da homozigose (Van Rij *et al.*, 1998).

Outras citocinas, como a interleucina-2 (IL-2), a interleucina-4 (IL-4), a interleucina-10 (IL-10) e o interferon- γ (IFN- γ) foram mostradas induzir ou suprimir a expressão do HIV-1 mas, dependendo das condições experimentais *in vivo*, ainda não se obteve resultados satisfatórios (Kinter *et al.*, 1995; Weissman *et al.*, 1995; Valentin *et al.*, 1998). Interações importantes acontecem entre estas citocinas. A IL-10 inibe a replicação do HIV-1, bloqueando a secreção do TNF- α e da IL-6 (Weissman *et al.*, 1994).

A variabilidade do hospedeiro em determinar o equilíbrio destas citocinas pode, também, afetar a progressão da doença relacionada à infecção pelo HIV-1 (Goletti *et al.*, 1996).

Pacientes infectados pelo HIV-1 podem experimentar um elevado nível de viremia no decorrer de quadros de infecções oportunistas (Claydon *et al.*, 1991). Um estímulo exógeno, como uma infecção oportunista, pode ativar o sistema imune e, assim, intensificar a replicação do HIV, aumentando a expressão de CD4 na superfície de células ativadas. Estes patógenos oportunistas, também, podem conduzir a expressão de citocinas indutoras do HIV-1, como o TNF- α , a IL-6 e a IL-1 (Wahl *et al.*, 1999).

A ativação do sistema imune devido à ocorrência de doenças parasitárias crônicas, acelera o curso da infecção pelo HIV-1. Isso pode explicar, parcialmente, a rápida progressão da doença associada ao HIV-1, na África (Bentwich *et al.*, 1995). Um recente estudo, na Etiópia, demonstrou uma diminuição de carga viral do HIV após a erradicação de infecções helmínticas (Wolday *et al.*, 2000).

Vários estudos sugeriram que alelos específicos dos *loci* de CHP-I (Complexo de histocompatibilidade principal de classe I) estão associados a diferentes taxas de progressão (Kroner *et al.*, 1995; Kaslow *et al.*, 1996; Itescu *et al.*, 1998; Keet *et al.*, 1999) e à susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 (Hill, 1996; Rowland-Jones *et al.*, 1998; Kaul *et al.*, 1999; Plummer *et al.*, 1999). Os alelos *HLA*-*B35 e *HLA*-*Cw4 têm sido, constantemente, associados à progressão acelerada da doença (Jeannet *et al.*, 1989; Itescu *et al.*, 1992; Tomiyama *et al.*, 1996). Os alelos *HLA*-*B57 (Goulder *et al.*, 1996; Kaslow *et al.*, 1996), *HLA*-*B27 e *HLA*-*Bv4 (Kaslow *et al.*, 1996; McNeil *et al.*, 1996; Goulder *et al.*, 1997; Goldfeld *et al.*, 2000) foram relacionados com quadro de progressão rápida.

1.3 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

O sistema inato é considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos que penetram as barreiras mecânicas. Este é composto por proteínas solúveis e ligadas à membrana, com especificidade pré-definida e, em muitos casos, envolvendo o reconhecimento de moléculas de carboidratos presentes em diversos microrganismos. O sistema imune adaptativo, por outro lado, funciona, subsequente, como uma importante ferramenta na geração de respostas específicas contra agentes infecciosos. Embora sejam considerados como sistemas separados, os componentes dos sistemas imune inato e adaptativo interagem, freqüentemente, objetivando a eliminação do agente infeccioso (Fearon & Lockley, 1996).

Muitas evidências laboratoriais sustentam a importância da Lectina Ligadora de Manose (MBL) na ativação do sistema complemento, via imunidade inata (Petersen *et al.*, 2001). A MBL plasmática, liga-se às estruturas de carboidratos presentes em vários agentes infecciosos, levando à formação de complexos de MBL e de MASPs (Proteínas Serinas Associadas à MBL). Esse complexo inicia uma reação em cascata de ativação do sistema complemento culminando com a formação de complexos de ataque à membrana (MAC) que levam, em última análise, à lise do agente infeccioso (Gadjeva *et al.*, 2001).

O envolvimento da MBL, como primeira linha de defesa do hospedeiro, é indicado por achados de indivíduos com infecções severas e repetidas com deficiência dos níveis séricos de MBL (Sastry *et al.*, 1991).

O gene codificador da MBL está localizado no cromossomo 10q21 humano (Sastry *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989) e a presença de polimorfismo na região

promotora e no exon 1 do gene *Mbl* resulta em uma pronunciada variação nos níveis plasmáticos da MBL, tendo sido demonstrado que baixos níveis podem constituir uma importante forma de imunodeficiência (Garred *et al.*, 1999a).

Embora estudos tenham produzido informações detalhadas da estrutura da MBL, a compreensão da estrutura e da função do complexo MBL ainda é incompleta.

1.3.1 A Estrutura e Função da Lectina Ligadora de Manose

As colectinas constituem uma família de proteínas contendo uma região de colágeno e um domínio de lectina ligante de carboidrato (Holmskov *et al.*, 1994). Em humanos, quatro membros deste grupo de proteínas são conhecidos: a proteína MBL, as proteínas do pulmão SP-A e SP-D e a CL-L1, que está localizada dentro do citoplasma de hepatócitos (Hakansson & Reid, 2000).

Proteínas da família das colectinas são compostas de subunidades produzidas a partir de três cadeias polipeptídicas idênticas (Figura 3). Cada polipeptídeo apresenta uma região de ligação cruzada (*cross-linking*), contendo dois ou três resíduos de cisteínas, seguidas por uma região de tamanho variável semelhante ao colágeno (*Collagen-Like*), uma região de flexão (*Neck region*) e uma região de lectina C-terminal ou domínio de reconhecimento de carboidrato - CRD (Petersen *et al.*, 2001).

A região semelhante ao colágeno contém oito potenciais sítios de hidroxilação e quatro sítios de *O*-glicosilação. Para a formação de uma estrutura em espiral, a região de flexão inicia a trimerização de um polipeptídeo para formar uma subunidade estrutural, contendo uma região de colágeno e três domínios de lectina C-terminal. A subunidade é estabilizada por interação hidrofóbica e por ligações

dissulfídricas entre as cadeias na região de ligação cruzada N-terminal (Wallis & Drickamer, 1999; Petersen *et al.*, 2001).

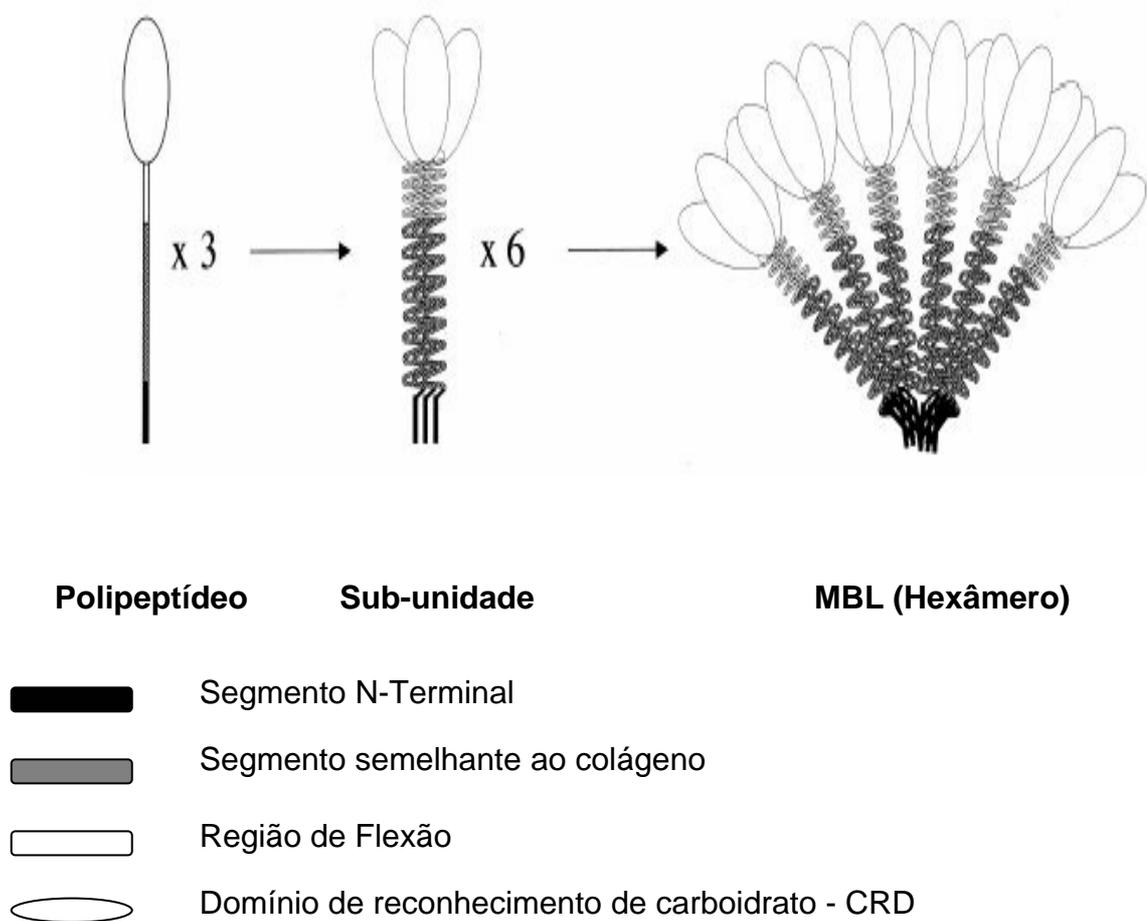


Figura 3 – Estrutura bioquímica da Lectina Ligadora de Manose (Adaptado de Laursen & Nielsen, 2000).

Na circulação sanguínea, a subunidade estrutural da MBL humana é encontrada na forma de dímeros a hexâmeros, conferindo uma aparência de flecha, quando visualizado ao microscópio eletrônico (Lu *et al.*, 1990).

A MBL, também, pode ligar-se a vários resíduos de monossacarídeos, por exemplo: *N*-acetilglucosamina, manose, *N*-acetilmanoseamina, L-fucose e glucose, não se ligando à galactose. A constante de dissociação da interação entre um CRD e um carboidrato é muito fraca (10^{-3} M) (Iobst *et al.*, 1994). Entretanto, múltiplos CRD estão presentes na estrutura quaternária da molécula de MBL, permitindo uma elevada avidéz por ligações de carboidratos repetitivos ou por regiões com elevada concentração de carboidratos (Sheriff *et al.*, 1994).

Tem sido mostrado que a MBL liga-se a um largo espectro de microrganismos de importância clínica, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, os quais exibem, em sua superfície, moléculas repetidas de carboidratos (Holmskov *et al.*, 1994; Neth *et al.*, 2000). A MBL não se liga, em condições fisiológicas normais, à superfície das células próprias do hospedeiro. Isso deve ser em razão: (i) da presença de ácido siálico na terminação dos resíduos de glicanos da superfície celular ou talvez devido (ii) a falta de estruturas repetitivas de carboidratos na superfície de células animais (Neth *et al.*, 2000).

1.3.2 Mutações Estruturais no Gene *Mbl*

O nível da MBL na circulação sanguínea é muito estável (Nielsen *et al.*, 1995), por outro lado, os níveis em diferentes indivíduos variam desde 50 ng/mL até cerca de 3µg/mL. Esta ampla variação é decorrente da existência de quatro alotipos

oriundos de mutações no exon 1 do gene que codifica o polipeptídeo MBL, bem como de vários polimorfismos na região promotora (Steffensen *et al.*, 2000; Figura 4).

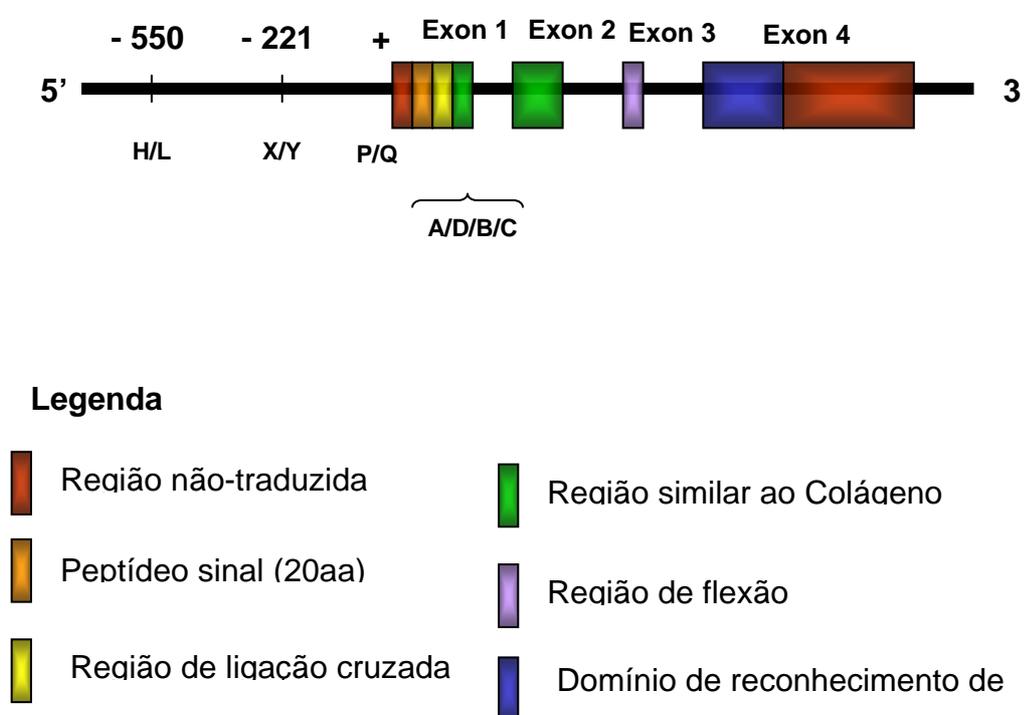


Figura 4 – Localização genômica das mutações no gene *Mbl* (Adaptado de Lausern & Nielsen, 2000).

Esses polimorfismos resultam em um número diferente de genótipos, alguns dos quais são associados ao decréscimo do nível de MBL. Mutações simples de base nos códons 54 e 57 do exon 1 conferem uma substituição de glicina por ácido aspártico e de glicina por ácido glutâmico, nas posições residuais 34 e 37 da proteína madura, respectivamente (Sumiya *et al.*, 1991; Lipscombe *et al.*, 1992). Estas mutações rompem uma repetição Gly-X-Y na região de colágeno. Estudos conduzidos em ratos recombinantes MBL-A com mutações homólogas indicam que essas mudanças alteram as ligações dissulfídicas entre cadeias dentro da região de ligação cruzada N-terminal (Wallis & Cheng, 1999).

Experimentos mostram que estas duas formas mutantes estão associadas aos baixos níveis séricos de MBL, em decorrência da diminuição na secreção da proteína (Heise *et al.*, 2000). Outros estudos, usando MBL humana recombinante em sistemas de expressão, demonstraram que a MBL com a mutação no codón 54 e a MBL selvagem são secretadas em taxas similares (Super *et al.*, 1992; Kurata *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1997), sugerindo que os baixos níveis de MBL circulante, em indivíduos que possuem a mutação no codón 54, devem ser decorrentes de uma taxa de *turnover* maior no soro da forma mutante quando comparado ao MBL tipo selvagem.

Uma terceira mutação no exon 1 resulta na substituição de cisteína por uma arginina na posição 32 da proteína madura (é referida como mutação no codón 52). Enquanto esta substituição não interrompe a seqüência Gly-X-Y, a presença desse resíduo adicional de cisteína parece romper a formação do oligômero pela geração de pontes dissulfídicas adicionais, envolvendo o resíduo de cisteína introduzido (Wallis & Cheng, 1999). O padrão de pontes dissulfídicas na região N-terminal não é afetado por esta substituição.

As baixas quantidades de MBL encontradas na circulação de indivíduos homocigotos para qualquer uma destas três mutações ou pela combinação entre elas é, predominantemente, composta por moléculas de baixo peso molecular. Heterocigotos produzem, primariamente, o MBL tipo normal, de alto peso molecular, mas, também, pequenas quantidades da forma de baixo peso molecular (Lipscombe *et al.*, 1995).

Os alelos contendo as mutações dos códons 52, 54 ou 57 são designados *Mbl*-*D, *Mbl*-*B e *Mbl*-*C, respectivamente, enquanto o alelo normal é designado *Mbl*-*A (Madsen *et al.*, 1994). A frequência dessas mutações, na população humana, varia entre grupos étnicos (revisado por Turner & Hamvas, 2000), como exemplo, em caucasóides dinamaqueses, os alelos *B e *C são encontrados com frequências de 13% e de 12%, respectivamente, enquanto que as frequências em Africanos da região Subsaariana (Quênia) variam de 3% a 23%. A frequência do alelo *Mbl*-*D é de 5% em ambas as populações.

1.3.3 Polimorfismo na Região Promotora do Gene *Mbl*

A identificação de mutações na região promotora mostrou que os níveis plasmáticos de MBL são, também, modulados em nível de transcrição (Madsen *et al.*, 1995). Substituições nucleotídicas nas posições -550 (G→C) e -221 (G→C) dão origem às variantes H(G)/L(C) e Y(G)/X(C), respectivamente. Outra substituição na região 5' não traduzida do exon 1 (posição +4) dá origem à variante P(C)/Q(T). Diversas outras variantes do promotor foram descritas, mas não foi descoberta qualquer influência nos níveis de MBL (Madsen *et al.*, 1998). Os haplótipos HY, LY e LX estão associados com níveis alto, médio e baixo de MBL no plasma, respectivamente (Madsen *et al.*, 1995). Por causa do desequilíbrio de ligação, entre algumas das variantes, apenas sete

haplótipos de MBL (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD) foram identificados (Madsen *et al.*, 1998). Entretanto, a ocorrência do haplótipo HXPA foi relatada em três pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE) (Sullivan *et al.*, 1996).

1.3.4 Níveis Plasmáticos da Lectina Ligadora de Manose

O nível plasmático médio da MBL na população caucasóide dinarmquesa foi relatado ser de 1,2 µg/mL, em indivíduos homozigotos para o alelo nominal *A (Garred *et al.*, 1992); contudo, os níveis podem variar de 0 a 5 µg/mL. No mesmo estudo, o nível médio em indivíduos heterozigotos para a mutação do códon 54 era de 0,2 µg MBL/mL (0–1,2 µg/mL). Níveis similares foram, também, obtidos em estudos anteriores (Lipscombe *et al.*, 1992).

Esta grande variação entre indivíduos com estrutura haplotípica idêntica pode ser em parte, atribuída à presença de mutações na região promotora. Interessante, é que foi demonstrado que o haplótipo LX tem um efeito dominante nos níveis de MBL e, conseqüentemente, indivíduos homozigotos com haplótipo LXA mostraram um nível médio de MBL circulante comparável àquele do genótipo com duas mutações estruturais (Madsen *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 2000), embora o primeiro grupo não tenha confirmado esse resultado, em estudos posteriores (Garred *et al.*, 1999b). Devemos notar que, levando em conta todos os alotipos, há, ainda, uma variação considerável (mais de seis vezes) entre indivíduos com genótipos idênticos (Steffensen *et al.*, 2000). Isto corrobora a diferença interindividual de 2,5 vezes, observada em camundongo de mesma linhagem (Liu *et al.*, 2001).

1.3.5 Proteases Serina Associadas a MBL (MASP)

As proteases serina, da via MBL, são proteínas moduladoras, com uma composição do domínio catalítico idêntica a dos elementos C1r e C1s, da via clássica do complemento (Sato *et al.*, 1994; Takayama *et al.*, 1994; Thiel *et al.*, 1997).

A análise inicial de afinidade da MBL purificada, tanto em soro humano quanto de camundongos, revelou a presença de uma MASP referida como P100 em camundongos (Matsushita & Fujita, 1992; Takada *et al.*, 1993). Posteriormente, uma outra protease serina associada à MBL, chamada de MASP-2 (Thiel *et al.*, 1997), assim como uma proteína de menor peso molecular (19 kDa), denominada de proteína 19 kDa associada à MBL (Map 19) (Stover *et al.*, 1999b) ou peptídeo menor associado a MBL (MAPs) (Takahashi *et al.*, 1999), foram identificadas como componentes do complexo MBL. A complexidade do primeiro componente da via MBL na ativação do complemento foi salientada, posteriormente, quando uma terceira protease serina (MASP-3) foi clonada (Dahl *et al.*, 2001).

1.3.6 Atividade Proteolítica da MBL Associada com a MASP

Inicialmente foi mostrado que a MBL purificada (referida como fator reativo Ra - RaRF) a partir de soro de camundongos, de ratos, de coelhos e de soro humano era capaz de consumir, completamente, os componentes C4 e C2 do sistema complemento (Ikeda *et al.*, 1987; Ji *et al.*, 1988).

Baseado na similaridade estrutural entre o componente C1q do complemento e a MBL, foi hipotetizado que a MBL poderia ligar-se e ativar C1r₂C1s₂ da via clássica (Ikeda *et al.*, 1987). Usando diferentes sistemas, *in vitro*, foi mostrado que a MBL humana purificada poderia ligar e facilitar a ativação de C1r₂C1s₂ (Lu *et al.*,

1990; Ohta *et al.*, 1990). Entretanto, análises posteriores de preparações de MBL de humanos e de camundongos revelaram a presença de uma protease serina específica, que necessita de um substrato específico, tal como C1s (Matsushita & Fujita, 1992; Ji *et al.*, 1993). Thiel *et al.* (2000), ao analisarem soro total, estabeleceram que a MBL circulava complexada com suas proteases específicas (MASP), enquanto que C1r e C1s encontravam-se associados somente a C1q.

Matsushita & Fujita (1995) mostraram que a MASP humana, também, poderia clivar C3, quando associada à MBL. Com a identificação da MASP-2, foi revelado que o C4 é clivado por ação da MASP-2 e não da MASP-1 (Thiel *et al.*, 1997). Estudos posteriores, realizados com MASP-2 humana recombinante expressa em células de mamíferos, mostraram, claramente, que MASP-2 cliva C4 e C2, desse modo gerando a C3-convertase, C4b2a (Vorup-Jensen *et al.*, 2000).

Uma recente análise de cromatografia por afinidade, para isolar MASP-1 e MASP-2 do soro humano, confirmou que a MASP-1 e MASP-2 clivam C3 e C4, respectivamente, tendo sido, mais tarde, evidenciado que ambas têm a capacidade de clivar o componente C2 da cascata do complemento (Matsushita *et al.*, 2000).

Recentemente, uma terceira proteína serina (MASP-3) foi caracterizada (Dahl *et al.*, 2001). MASP-1 e MASP-3 são produzidas como consequência de *splicing* alternativo em transcritos primários de mRNA (RNA mensageiro). A atividade fisiológica da MASP-3 permanece por ser determinada.

1.3.7 Complexos de Protease Serina Associadas a MBL

A existência do complexo circulante de MBL e de MASP-2 foi comprovada a partir da análise da MBL purificada do plasma. Com o uso da

cromatografia ou de centrifugação em gradiente de densidade de sucrose, Dahl *et al.* (2001) foram capazes de separar o complexo circulante MBL/MASP em duas formas: a MBL-I e a MBL-II. As MASP-2 e MASP-3 são encontradas em associação, principalmente, com o complexo MBL-II, enquanto Map19 está presente no complexo MBL-I. MASP-I foi encontrada em ambos os complexos, mas, predominantemente, no complexo MBL-I. As atividades biológicas destes complexos sugerem que C4 e C2 são ativados pelo complexo MBL/MASP-2/MASP-3 e C3 pela ação direta do complexo MBL-I/MASP-1/Map19 (Terai *et al.*, 1997; Thiel *et al.*, 2000; Dahl *et al.*, 2001).

1.3.8 Ativação do Sistema Complemento via MBL

1.3.8.1 Implicações da Estrutura Quaternária

Super *et al.* (1989) mostraram que a capacidade do soro para depósito de componentes C3b e C4b sobre uma superfície coberta de manose estava correlacionada com os níveis de MBL na circulação. O defeito de opsonização em soro deficiente de MBL foi, subseqüentemente, associado à mutação no códon 54 (Sumiya *et al.*, 1991).

Análises de cromatografia e de centrifugação em gradiente de densidade de sucrose mostraram que indivíduos homocigotos para as mutações estruturais produzem uma pequena quantidade de MBL, com um peso molecular mais baixo do que o MBL normal e que os indivíduos heterocigotos produzem, primariamente, MBL de elevado peso molecular, mas, também, alguns de baixo peso molecular (Lipscombe *et al.*, 1995). Vários estudos têm indicado que a capacidade da MBL em ativar o sistema complemento é altamente elevada, dependendo da forma oligomérica (Ikeda *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1990; Yokota *et al.*, 1995). A MBL de elevado peso molecular, isto é, tetrâmeros, pentâmeros ou hexâmeros das subunidades estruturais, foi estabelecida

como sendo capazes de ativar o complemento, considerando que MBL de baixo peso molecular não poderia ativar.

Quando células COS-1 apresentando as mutações nos códons 54 e 57 foram expressas, Kurata *et al.* (1993) mostraram que as proteínas mutantes secretadas apresentavam, em média, níveis similares ao da MBL normal. Entretanto, eles encontraram que a quantidade das formas oligoméricas produzidas por células expressando MBL mutante foi significativamente inferior àquela expressa por células sem as mutações. Os autores observaram que esta distribuição alterada dos oligômeros reduziu, significativamente, a capacidade de ativação do complemento.

1.3.8.2 Implicações dos Alotipos da MBL

Super *et al.* (1992) demonstraram que a MBL humana expressando a mutação no códon 54 (alotipo B) não poderia mediar a ativação de C4 e de C3. Uma explicação plausível para este fenômeno foi apresentada quando mostrado que MASP purificadas não podiam associar-se com *Mbl*-*B, devido à mutação no códon 54 (Matsushita *et al.*, 1995). Estas observações foram interpretadas como indicativo de que o local de interação entre MASP e MBL pudesse estar localizado na quinta repetição de colágeno contendo o aminoácido 54. Isto, simplesmente, reflete um fracasso na formação de oligômeros estáveis, os quais são facilmente dissociados.

Wallis & Cheng (1999) introduziram as três mutações estruturais de MBL humano em ratos recombinantes MBL-A. A análise da mutação no códon 52 (Arg→Cys) revelou que a formação do oligômero foi rompida como resultado de pontes dissulfídicas aberrantes, geradas como consequência de uma cisteína extra. Alguns estudos indicam que esta MBL mutante circula, principalmente, como monômeros da

unidade estrutural. Assim, a perda da capacidade de ativação do complemento deste mutante ocorre, provavelmente, devido à falha na formação dos oligômeros maiores.

Quando as mutações nos códons 54 e 57 foram introduzidas na MBL-A em ratos revelaram apenas uma diminuição leve no oligômero de maior peso e um aumento do número das formas moleculares de baixo peso molecular. Mais adiante, a análise deste material indicou que o padrão de pontes dissulfídicas na região N-terminal havia sido alterado. Foi sugerido que essas alterações poderiam ter rompido o sitio de interação com a MASP, o qual foi sugerido estar localizado dentro da região N-terminal rica em cisteína e na primeira metade do domínio de colágeno (Wallis & Drickamer, 1999). Estes resultados corroboram com a observação de que a MBL que apresenta a mutação no códon 54 não pode associar-se com MASP humana purificada (Matsushita *et al.*, 1995).

Considerando o resultado de outros estudos, as três mutações estruturais encontradas na MBL humana causam defeito na ativação do sistema complemento, como consequência da distribuição de oligômeros alterados e da incapacidade de associar-se com proteases serinas, incluindo a unidade catalítica do complexo.

1.3.9 A Atividade da MBL Mediada por Interação com Receptor

1.3.9.1 Oponização Direta Mediada pela MBL

Além da oponização por deposição de componentes do sistema complemento ativado pela via da MBL, a própria MBL pode agir diretamente como uma oponina (Kuhlman *et al.*, 1989).

Super *et al.* (1992) usando a MBL humana recombinante (rMBL) mostraram que ambas as formas de rMBL tiveram um potencial semelhante de

opsonização de *Salmonella montevideo* e posterior captação através de neutrófilos humano. Estes estudos indicam que tanto o tipo normal da MBL como as formas mutantes interagem com o receptor presente nas superfícies dos monócitos e dos neutrófilos.

Foram apresentados vários candidatos a receptor de MBL, de acordo com a literatura (revisado por Eggleton *et al.*, 1998). Um receptor, o C1qRc (“c” para colágeno) foi identificado como idêntico à proteína intracelular calreticulina. Outro receptor descrito, o C1qRg (“g” para cabeça globular) foi identificado, subseqüentemente, como sendo uma proteína mitocondrial. A localização celular destes receptores faz a interação fisiológica com a MBL algo questionável. Um terceiro receptor, C1qRp (“p” para fagócitos, em inglês *phagocytic*) foi identificado em um marcador de célula tronco fetal (AA4), proteína envolvida na adesão célula-célula. Uma recente publicação sugeriu que o receptor de complemento 1 (CR1), além de agir como um receptor para C3b, age, também, como um receptor de MBL (Ghiran *et al.*, 2000).

Foi mostrado que a MBL, em concentração acima dos valores fisiológicos (20 µg/mL), não pode estimular a fagocitose da *S. montevideo* por leucócitos polimorfonucleares não ativados (PMN), entretanto, quando os PMN eram ativados por tratamento com fibronectina, a fagocitose ocorria mediante a opsonização da bactéria por MBL em concentrações fisiológicas (1µg/mL). Estes resultados são análogos aos obtidos pela interação de CR1 com as opsoninas C4b e C3b e deste modo, sustentam a relevância das concentrações fisiológica nesta interação (Ghiran *et al.*, 2000).

Bajtay *et al.* (2000) analisaram a interação entre a MBL e o C1q em várias linhagens de células. Usando citometria de fluxo foi possível demonstrar que o C1q liga-se a linfócitos B e T, o que não ocorre para a MBL. Esse resultado contrasta com aqueles de Ghiran *et al.* (2000), que atribuem a ocorrência de CR1 em linfócitos B. A análise de ligação da MBL e de C1q aos monócitos, através de citometria de fluxo, mostrou que não há nenhuma competição entre os ligantes, sugerindo a presença de receptores diferentes para C1q e para MBL na superfície de monócitos (Bajtay *et al.*, 2000). Isto, também, contrasta com os resultados de Ghiran *et al.* (2000), onde foi evidenciado que C1q e MBL competem pelos locais de ligação em CR1 solúvel imobilizado. Claramente, estudos adicionais são necessários para esclarecer a estrutura e a importância dos receptores de MBL.

1.3.9.2 Citotoxicidade Celular Dependente de MBL

Estudos de Fujita *et al.* (1995) demonstraram que várias linhagens de células de glioma poderiam se ligar à MBL humana de uma forma dose dependente. Em algumas destas linhagens de células (1321N1), a ligação da MBL poderia ser inibida através de manose (40 mM) ou de EDTA (10 mM). Para isto, porém, foi mostrado que complexos de MBL purificados (contendo MASP) ligados às células 1321N1 poderiam consumir componentes do sistema complemento como C3 e C4. De forma interessante, foi também evidenciado que a MBL liga-se a uma linhagem celular, consumindo C4 na dependência de EDTA. Estes dados sugerem que MBL pode ligar-se à superfície de células malignas, facilitando a ativação de complemento.

Ma *et al.* (1999) observaram a inibição do crescimento tumoral ao estudarem ratos transplantados com linhagem celular de carcinoma de colórectal

humano, SW1116. Quando o *Vírus vaccinia*, expressando o tipo normal de MBL, foi injetado diretamente nos tumores, uma regressão do crescimento tumoral foi observada. A inibição do crescimento do tumor, mas não a regressão, foi vista quando o *Vírus vaccinia* recombinante foi injetado via subcutânea em um local distante. Surpreendentemente, um efeito semelhante foi observado usando *Vírus vaccinia* expressando a variante *Mbl-*B*. Como esta forma mutante é conhecida por ter uma dificuldade na capacidade de ativação do complemento, alguns autores sugeriram que o efeito no tumor era devido a um mecanismo efetor de morte de células tumorais que ligam MBL, como consequência de uma expressão aberrante de carboidratos na sua superfície. Esta atividade foi chamada de Citotoxicidade Celular Dependente de MBL, MDCC.

Usando um modelo, *in vitro*, Kawasaki *et al.* (2000) mostraram a ligação de MBL aos neutrófilos. Esta ligação resulta em uma produção aumentada de superóxido em leucócitos, um radical de oxigênio altamente reativo. Foi mostrado, também, que a MBL mutante poderia apresentar o mesmo efeito, de acordo com outros resultados obtidos usando um modelo *in vivo*. Estes dados sugerem, com base nos estudos discutidos acima, a presença de um receptor para MBL na superfície de leucócitos.

1.4 A VIA DA MBL E A ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

Alguns estudos têm relatado a associação entre a deficiência de MBL e o aumento de suscetibilidade a infecções, assim como doenças auto-imunes (Turner, 1998; Turner & Hamvas, 2000). Foi mostrado que 90% dos indivíduos com deficiência de MBL não adquirem infecções repetidas. Isto é, provavelmente, devido compensação

pelas outras vias do sistema complemento. Conseqüentemente, poderia ser especulado que a manifestação fenotípica da deficiência de MBL só é observada quando combinada com outra imunodeficiência humoral, que pode ser adquirida ou geneticamente determinada. Em defesa desta hipótese, Aittoniemi *et al.* (1998) relataram que a deficiência de MBL em crianças com infecções periódicas tem coincidido com a deficiência de subclasses de IgG.

Até agora, a correlação entre a deficiência da MBL e a suscetibilidade a infecções foi avaliada a partir de um valor arbitrário para a deficiência (normalmente pela baixa sensibilidade nos testes utilizados). Não há nenhum dado clínico que apoie esta definição de deficiência de MBL associada a um aumento de suscetibilidade para diferentes doenças. Outros trabalhos avaliam a freqüência dos alelos variante da MBL em estudos de caso controle (Garred *et al.*, 1997a). Entretanto, esta aproximação é difícil de ser feita, devido a grande variação do nível de MBL entre indivíduos de genótipos idênticos (Steffensen *et al.*, 2000).

1.4.1 A Deficiência da MBL Associada ao Risco de Infecção

Garred *et al.* (1995) estudaram 228 pacientes com suspeita de imunodeficiência. Estes pacientes apresentaram sintomas clínicos, como: infecções pulmonares periódicas, otites média recorrentes, diarreia e septicemia. Quando o perfil genotípico para MBL foi analisado nestes pacientes, encontrou-se uma freqüência aumentada de indivíduos homozigotos para as mutações estruturais (8,3% em pacientes contra 0,8% no grupo de controle), não havendo nenhum aumento na freqüência de indivíduos heterozigotos entre os pacientes quando comparado ao grupo controle.

Summerfield *et al.* (1997) avaliaram o perfil genético para MBL em 345 crianças com infecções e em 272 crianças consultadas por outras razões. Os resultados demonstraram uma frequência mais elevada de crianças heterozigotas (133/345 contra 60/272) ou homozigotas (146/345 contra 64/272) para os alelos *Mbl*-*B, *Mbl*-*C e *Mbl*-*D da MBL no grupo de pacientes infectados, concluindo que há um aumento na suscetibilidade para doenças infecciosas em crianças heterozigotas e homozigotas para os alelos mutantes da MBL.

1.4.2 MBL: Uma Porta de Entrada para Patógenos Intracelulares

Por causa da alta frequência de alelos variantes de MBL em diferentes populações, foi especulado se a deficiência de MBL poderia conferir algum grau de proteção contra certas doenças infecciosas. Vários estudos mostraram que a MBL liga-se a microrganismos como *Leishmania* sp. e *L. mexicana* (Garred *et al.*, 1994), *Trypanosoma cruzi* (Kahn *et al.*, 1996), *Schistosoma mansoni* (Klabunde *et al.*, 2000), *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Garred *et al.*, 1994). Além disso, a MBL pode ligar-se a proteofosfolipídeos segregados pela *L. mexicana* intracelular (Green *et al.*, 1994).

A presença da MBL na superfície de parasitas poderia permitir a captação celular direta por um receptor de MBL ou por receptores para fragmentos de complemento depositados no parasita como resultado de ativação do complemento, pela via da MBL (Garred *et al.*, 1994).

Em defesa do efeito protetor de deficiência de MBL, foi mostrado que etíopes infectados pelo *M. leprae* tinham um nível de MBL significativamente mais alto do que os controles não infectados (Garred *et al.*, 1994). Estudos subsequentes, também,

demonstraram que os indivíduos com tuberculose tinham um nível significativamente mais alto de MBL do que os controles (Garred *et al.*, 1997b). Outros estudos apoiaram a hipótese de um possível papel protetor do alelo *Mbl*-*D, que pode ser em decorrência do fato do produto desta mutação poder ser incorporado, parcialmente, na forma oligomérica estável da molécula de MBL, na infecção por microrganismos intracelulares (Bellamy *et al.*, 1998; Hoal-Van *et al.*, 1999).

1.4.3 A Infecção por Microorganismos Patogênicos Associados a MBL

Em um estudo realizado com grupos de pacientes vietnamitas apresentando quadro clínico de Hepatite B, foi verificada frequência significativamente mais alta da mutação do gene *Mbl* em comparação ao grupo controle saudável (0.25 contra 0.08, $p=0.01$), estando a presença dessa variante associada com níveis mais altos de transaminases no soro. Esses resultados indicam que as mutações no gene *Mbl* podem influenciar o resultado de carga viral plasmática na infecção pelo *Vírus da hepatite B* (Song *et al.*, 2003).

Kelly *et al.* (2000) evidenciaram que indivíduos homocigotos para mutações estruturais no gene *Mbl* apresentavam um risco aumentado para criptosporidiose. Uma associação dependente da concentração da MBL foi encontrada com a presença de esporozoítas. Além disso, o risco aumentado de criptosporidiose na deficiência da MBL parece incluir os pacientes com SIDA/AIDS. O funcionamento parece ocorrer por ativação do complemento mediado por MBL, em esporozoítas.

Um outro estudo investigou a interação entre a MBL e as proteínas de eritrócitos infectados com o *Plasmodium falciparum* e mostrou que a MBL reconhece proteínas do *P. falciparum*, que são imunogênicas em humanos, em eritrócitos

infectados e seria responsável pela detoxificação de produtos do parasita no sangue de pacientes com malária (Klabunde *et al.*, 2002).

Nagy *et al.* (2003), encontraram uma maior prevalência dos alelos variantes para MBL em crianças infectadas por *Chlamydia pneumoniae* associando à elevada susceptibilidade a asma.

1.4.4 A Ação da MBL na Infecção pelo HIV-1

Uma possível correlação entre a infecção pelo HIV-1 e a MBL foi avaliada em vários estudos. Foi descoberto, inicialmente, dentro de um modelo *in vitro*, que a infecção de linfócitos T CD4⁺ pelo HIV-1 poderia ser inibida, parcialmente, em 25%, por concentração em solução fisiológica de MBL (1 µg/mL), enquanto que 100% de inibição foi observada a 50 µg/mL (Ezekowitz *et al.*, 1989). Haurum *et al.* (1993) mostraram que o sistema complemento pode ser ativado através da ligação da gp110 (HIV-2) e da gp120 (HIV-1) à MBL. As implicações deste achado são duas: (i) a deposição do complemento na superfície do HIV pode promover a eliminação do vírus, mas por outro lado, poderia mediar, também, (ii) uma captação do vírus, independente de CD4, em células que expressam receptores de complemento. Ying *et al.* (2004) mostraram que a MBL é capaz de opsonizar o HIV-1, por meio de interação com a gp120, que contém em sua estrutura, resíduos de oligosacarídeos de manose.

Nielsen *et al.* (1995) determinaram o nível de MBL circulante em 80 indivíduos infectados pelo HIV-1, em 10% (8/80) foram detectados baixos níveis de MBL (abaixo do limite de detecção do teste), com uma frequência significativamente mais alta que no grupo controle 2,4% (3/123). Por outro lado, nenhuma correlação foi vista entre o nível de MBL e o tempo decorrido entre a detecção de anticorpos anti-HIV

e o desenvolvimento da SIDA/AIDS ou de diagnóstico de SIDA/AIDS por ocorrência de morte. Esses achados foram apoiados em um estudo posterior, em que foi realizada a avaliação do perfil genotípico e do nível de MBL em pacientes HIV-1 soropositivos (McBride *et al.*, 1998).

Em contraste aos resultados de Nielsen *et al.* (1995), outros estudos concluem que os indivíduos infectados pelo HIV-1, com baixos níveis de MBL, podem ter um tempo de sobrevivência significativamente reduzido depois do diagnóstico de SIDA/AIDS (Garred *et al.*, 1997a) ou o tempo compreendido entre a soroconversão e o desenvolvimento da SIDA/AIDS pode diminuir rapidamente (Maas *et al.*, 1998; Amoroso *et al.*, 1999).

Um aumento na frequência de deficiência de MBL em pacientes portadores do HIV-1, também foi encontrado em africanos do Sub-Saara (Garred *et al.*, 1997b) e em húngaros (Prohaszka *et al.*, 1997). Outros estudos não têm mostrado qualquer aumento significativo da deficiência de MBL em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Senaldi *et al.*, 1999).

Em outro estudo, Garred *et al.* (1997a) determinaram os genótipos para MBL em 96 homens infectados pelo HIV-1, sendo encontrados 8% (8/96) homocigotos para os alelos mutantes da MBL (denominados, genericamente, de *Mbl*-*O), sendo esse valor significativamente mais elevado do que o observado para o grupo controle. Segundo estes autores, não é possível concluir se a presença dos alelos mutantes pode refletir numa susceptibilidade aumentada à infecção pelo HIV-1 ou numa predisposição à infecção, como consequência de outras infecções.

A influência da MBL na suscetibilidade à infecção pelo HIV-1, na progressão da infecção e no desenvolvimento da SIDA/AIDS não foi, ainda, totalmente

esclarecida, havendo a necessidade de novos estudos envolvendo o controle de variáveis laboratoriais de indicação do estágio de progressão clínica dos pacientes soropositivos.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Investigar o polimorfismo no exon 1 do gene *Mbl* nos grupos controle e em pacientes portadores da infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana 1* e a sua influência no curso da infecção.

1.5.2 Objetivos Específicos

- i) Descrever a prevalência das mutações no exon 1 do gene *Mbl*, na população de pacientes infectados pelo HIV-1;
- ii) Descrever a prevalência das mutações no exon 1 do gene *Mbl*, na população controle de pacientes saudáveis, não portadores da infecção pelo HIV-1;
- iii) Estabelecer possíveis associações entre a prevalência das variantes alélicas do *Mbl* e os valores pré-estabelecidos de contagem de linfócitos T CD4⁺;
- iv) Estabelecer possíveis associações entre a prevalência das variantes alélicas do *Mbl* e os valores pré-estabelecidos de carga viral plasmática do HIV-1.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

2.1.1 Pacientes soropositivos HIV-1

No presente trabalho foi avaliado o perfil do polimorfismo genético no exon 1 do gene *Mbl* de 145 indivíduos portadores da infecção pelo HIV-1, sendo 101 pacientes (69 homens e 32 mulheres) atendidos na Unidade de Referência Especializada em Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais (URE-DIPE), residentes no Estado do Pará e de 44 indivíduos (21 homens, 10 mulheres e 13 sem informação de sexo) procedentes do Laboratório Central do Amapá (LACEN-AP).

As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas durante o ano de 2001, por meio de um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para a realização de testes de contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral plasmática, como parte integrante da Rede Nacional de Contagem de linfócitos T CD4⁺ e da Rede Nacional de Carga Viral Plasmática, do Ministério da Saúde. As amostras de plasma e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas e congeladas à -20°C até o momento do uso.

2.1.2 Grupo Controle Soronegativo para HIV-1

No presente estudo, amostras de sangue de 99 indivíduos, soronegativos para o HIV-1 (22 homens e 77 mulheres), previamente coletadas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante, no laboratório de

análises clínicas da Universidade Federal do Pará, foram utilizadas como grupo controle. As amostras de plasma e de PBMC foram separadas e congeladas à -20°C até o momento do uso.

Os soros foram testados para a presença de anticorpos anti HIV-1, utilizando-se um ensaio imunoenzimático, ELISA (Ortho Diagnostic System Inc., USA). As amostras reativas foram submetidas a confirmação por meio de reação em cadeia mediada pela polimerase.

2.2 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA

A carga viral plasmática dos pacientes soropositivos para o HIV-1 foi determinada por meio de duas dosagens usando o método *Nasba*. Utilizou-se o equipamento de leitura *Nuclisens* e o kit de diagnóstico *Nuclisens™ Nasba* (*Organon Teknika, Boxtel, Netherland*). As dosagens foram feitas com intervalo médio de seis meses entre a primeira e a segunda avaliação.

2.3 QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4+

As amostras de sangue dos pacientes soropositivos para o HIV-1 foram processadas dentro de 4 horas após a coleta das amostras de sangue e a contagem de linfócitos T CD8+ foi determinada por Citometria de Fluxo (*FacsCount, Becton & Dickinson, USA*) usando o kit de imunomonitoramento da *FacsCount™ Reagents* de acordo com o protocolo padrão recomendado pelo fabricante (*Becton Dickinson, USA*). As quantificações foram feitas com intervalo médio de seis meses entre a primeira e a segunda avaliação.

2.4 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.4.1 Extração do DNA

Foi utilizado o método de extração de DNA total, a partir das PBMC, de acordo com o protocolo dos reagentes de isolamento de ácido nucléico da *Puregene*, *Genra Systems, Inc., USA*. O procedimento ocorreu seguindo-se as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

2.4.2 Investigação Molecular das Formas Alélicas da MBL (PCR e RFLP)

2.4.2.1 Determinação dos Alelos *Mbl*-*A, *Mbl*-*B e *Mbl*-*C

No presente trabalho foi utilizada a Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) para a amplificação de 349 pb do exon 1 do gene *Mbl*, a partir do DNA de indivíduos soropositivos para o HIV-1 e de indivíduos controle soronegativos. As amplificações foram realizadas no termo-ciclador *Mastercycler Personal*, *Eppendorf*.

A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 50 µL contendo 500 ng de DNA extraído, 225 µM de cada dNTP, 5 µM de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. O par de iniciadores envolvido nesta reação foi: (mbIE01) 5'-AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' e (mbIE02) 5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3' (Madsen *et al.*, 1995).

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, foram efetivados 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 58°C e 120 segundos a 72°C.

A identificação dos alelos *Mbl*-*A, *Mbl*-*B e *Mbl*-*C foi realizada pela digestão enzimática do produto amplificado (349 pb), utilizando-se as endonucleases de

restrição *BanI* e *MboII*. A *BanI* cliva o alelo *Mbl*-*A em dois fragmentos (260 pb e 89 pb) e o alelo *Mbl*-*B não é digerido. A *MboII* cliva, especificamente, o alelo *Mbl*-*C em dois fragmentos (279 pb e 70 pb).

2.4.2.2 Determinação do Alelo *Mbl*-*D

Para a determinação do alelo *D em homo ou em heterozigose, foi utilizada a técnica da PCR, utilizando-se seqüências de iniciadores específicos para a mutação *Mbl*-*D e para os alelos *Mbl*-*A/*B/*C. A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 25 µL, contendo 500 ng de DNA extraído, 225 µM de cada dNTP, 5 µM de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,1 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. O par de iniciadores envolvido na primeira reação foi: (sspMBP1a) 5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' (617nt-640nt) e (52-D) 5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACA-3' (887nt-868nt). Na segunda reação foi utilizada a seguinte combinação de iniciadores: (sspMBP1a) 5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' (617nt-640nt) e (52-ABC) 5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACG-3' (887nt-868nt) (Steffensen *et al.*, 2000), sendo a freqüência da variante *D determinada pela presença ou pela ausência do fragmento de DNA.

Na reação de amplificação, após a desnaturação inicial à 94°C por 2 minutos, foram efetivados 30 ciclos de: 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C e 30 segundos a 72°C, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

2.4.2.3 Eletroforese

Os produtos das amplificações e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2%, em tampão

TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água desionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10 mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

2.5 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O cálculo do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e a comparação das frequências alélicas e genotípicas do gene *Mbl*, entre os grupos controle e de pacientes portadores do HIV-1, foram efetuadas por meio do teste de qui-quadrado (χ^2) seguido da correção de Yates, usando-se os programas *Tools For Population Genetic Analyses – TFPGA 1.3v* (Miller, 1997) e *BIOSTAT 3.0 v* (Ayres *et al.*, 2003).

A avaliação de possíveis associações entre a prevalência das variantes alélicas no gene *Mbl* e as variáveis laboratoriais (contagem de linfócitos T CD4+ e contagem de carga viral plasmática) foi efetuada por meio de análise de variância (*ANOVA* um critério e Teste de Bonferroni), usando-se o programa *BIOSTAT 3.0v* (Ayres *et al.*, 2003). A estimativa de *odds ratio* para cada alelo foi realizada por meio do programa *BIOSTAT 3.0v* (Ayres *et al.*, 2003).

3 RESULTADOS

Um total de 145 pacientes HIV-1 soropositivos e de 99 indivíduos controle soronegativos foi avaliado quanto ao polimorfismo no exon 1 do gene *Mbl*. A possível influência desse polimorfismo na evolução da infecção nos pacientes soropositivos pôde ser avaliada por meio da contagem de linfócito TCD4⁺ e da carga viral plasmática.

3.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS

A frequência do alelo *Mbl*-*A no grupo de pacientes infectados e no de controles foi de 70,2% e de 69%, respectivamente. Considerando as mutações *Mbl*-*B e *Mbl*-*D como um grupo, denominado de *Mbl*-*O, pôde-se observar que essas variantes tiveram, juntas, uma frequência de 31% entre os pacientes e de 29,8% no grupo controle. As análises mostraram que essas diferenças na distribuição dos alelos *Mbl*-*A e *Mbl*-*O não diferiram significativamente em nível de 5% ($\chi^2=0,085$; $p=0,848$; Tabela 1).

Apenas as formas alélicas *Mbl*-*A, *Mbl*-*B e *Mbl*-*D foram identificadas nos dois grupos amostrais, não havendo sido observada a ocorrência da mutação *Mbl*-*C (Tabela 2). A mutação *Mbl*-*B foi observada, com frequência de 22% no grupo de pacientes portadores da infecção pelo HIV-1 e de 13,6% no grupo controle ($p=0,55$).

A variante *Mbl*-*D esteve presente em 9% dos pacientes soropositivos e em 16% no grupo controle. A diferença observada nas frequências desses alelos, entre os dois grupos populacionais, foi estatisticamente significativa ($\chi^2=8,767$; $p=0,0125$). Além disso, foi possível observar, por meio da análise de *odds ratio*, associações

positivas e negativas para os alelos *Mbl*-*B e *Mbl*-*D, respectivamente, sendo apenas a última estatisticamente significativa (Tabela 2).

Tabela 1 - Frequência dos alelos *Mbl*-*A e *Mbl*-*O do gene *Mbl* nos grupos investigados.

Alelos	Controle (%)	Pacientes (%)	χ^2	<i>p</i>
<i>Mbl</i> -*A	139 (70,2)	200 (69,0)		
<i>Mbl</i> -*O	59 (29,8)	90 (31,0)		
N	198	290	0,085	0,848

N: número de cromossomos investigados; *Mbl*-*O: representa as variantes *Mbl*-*B e *Mbl*-*D

Tabela 2 - Frequência dos alelos *Mbl*-*A, *Mbl*-*B e *Mbl*-*D do gene *Mbl* nos grupos investigados.

Alelos	Controle (%)	Pacientes (%)	χ^2	<i>p</i>	OR	IC	<i>p</i>
<i>MBL</i> *A	139 (70,2)	200 (69,0)			0,98	0,74-1,30	0,95
<i>MBL</i> *B	27 (13,6)	63 (22,0)			1,20	0,72-1,98	0,55
<i>MBL</i> *D	32 (16,2)	27 (9,0)			0,53	0,30-0,92	0,03
N	198	290	8,767	0,0125	-	-	-

N: número de cromossomos investigados; OR: *Odds Ratio*, IC: intervalo de confiança (95%).

A análise das frequências genóticas (Tabela 3) entre os dois grupos mostrou a presença do genótipo A/A em 49,5% dos controles e em 51,7% dos pacientes. O genótipo A/O foi observado em 41,4% dos controles e em 34,5% dos pacientes. A frequência do genótipo O/O foi de 9,1% entre os indivíduos do grupo controle e de

13,8% entre os pacientes. Entretanto essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($\chi^2=1,91$; $p=0,38$). O desvio das proporções genótípicas observadas em relação às esperadas, em ambos grupos populacionais, não foi estatisticamente significante em nível de 5%.

Quando a análise dos genótipos considerou as variantes *Mbl*-**B* e *Mbl*-**D*, separadamente (Tabela 3), foi possível observar uma maior prevalência dos genótipos apresentando a mutação *Mbl*-**B* entre os pacientes soropositivos, quando comparada ao grupo de controles ($\chi^2=2,739$; $p=0,098$), sendo o genótipo *B/B* seis vezes mais freqüente no grupo de pacientes infectados ($\chi^2=4,042$; $p=0,044$). Por outro lado, o genótipo *A/D* esteve presente, com maior freqüência entre o grupo controle ($\chi^2=6,372$; $p=0,0116$).

Tabela 3 - Distribuição das freqüências genótípicas entre os grupos investigados.

Genótipos	Controle (%)	Pacientes (%)	χ^2	<i>p</i>
Homozigoto normal (A/A)	49 (49,5)	75(51,7)		
Heterozigoto (A/O)	41 (41,4)	50 (34,5)		
<i>A/B</i>	20 (20,2)	37 (25,5)		
<i>A/D</i>	21 (21,2)	13 (9,0)		
Homozigoto variante (O/O)	09 (9,1)	20 (13,8)		
<i>B/B</i>	01 (1,0)	09 (6,2)		
<i>B/D</i>	05 (5,1)	08 (5,5)		
<i>D/D</i>	03 (3,0)	03 (2,1)		
Total	99	145	1,91	0,38

3.2 NÍVEIS DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E O POLIMORFISMO NO GENE *Mbl*

Para efeito de avaliação da possível associação entre os níveis de linfócitos T CD4⁺ e o polimorfismo no gene *Mbl*, os pacientes foram reunidos em três grupos: o de homozigotos para o alelo *Mbl*-*A, o de portadores da variante *Mbl*-*B (*A/B*, *B/B* e *B/D*) e o de portadores da mutação *Mbl*-*D (*A/D* e *D/D*). Esse critério foi adotado considerando os resultados de estudos que mostram que indivíduos que apresentam a mutação *Mbl*-*B, mesmo em heterozigose com o alelo *Mbl*-*A, apresentam baixos níveis de MBL no plasma (Garred *et al.*, 2003). Na análise comparativa, excluiu-se o grupo de portadores da mutação *Mbl*-*D, por apresentar um reduzido tamanho amostral. A análise utilizou o teste ANOVA, com posterior teste de múltipla comparação de Bonferroni.

A primeira avaliação (1^a coleta) do número médio de linfócitos T CD4⁺ mostrou níveis mais baixos entre os pacientes soropositivos que apresentavam genótipo portador do alelo *Mbl*-*B, quando comparado aos pacientes soropositivos apresentando o alelo *Mbl*-*A em homozigose (341 linfócitos/mL vs. 370 linfócitos/mL; $p=0,992$; Tabela 4; Figura 5). Resultados semelhantes foram, também, observados na segunda avaliação (2^a coleta) laboratorial (345 linfócitos/mL vs. 406 linfócitos/mL; $p=0,069$; Tabela 5; Figura 6).

A análise comparativa entre a primeira e a segunda avaliação dos níveis de linfócitos T CD4⁺ (Tabela 6), mostrou que os portadores do alelo *Mbl*-*A apresentaram, em média, um aumento nos níveis de linfócitos T CD4⁺ ($p<0,001$), fato não observado entre os portadores do alelo *Mbl*-*B ($p=1,000$).

Tabela 4 - Valores médios de linfócitos T CD4+ (1ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene *Mbl*.

GRUPOS	N	MÉDIA	CD4/CD8	Comparação	<i>p</i>
<i>Teste de ANOVA</i>					
A	36	370 linfócitos/mL	0,45		
B	35	341 linfócitos/mL	0,38		
D	04	544 linfócitos/mL	0,42	<i>Grupo A vs. Grupo B</i>	0,992

Grupo-A (A/A), Grupo-B (A/B, B/B e B/D) e Grupo-D (A/D e D/D).

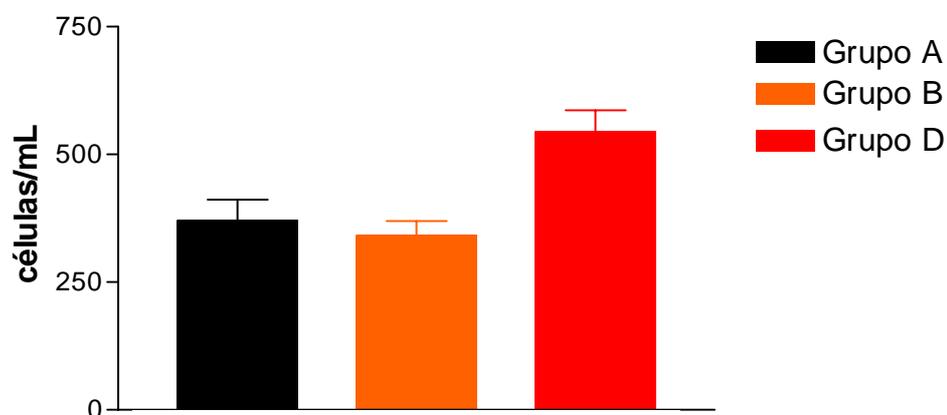


Figura 5 – Distribuição dos valores médios da 1ª contagem de linfócitos T CD4+, de acordo com o polimorfismo no gene *Mbl*.

Tabela 5 - Valores médios de linfócitos T CD4+ (2ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene *Mbl*.

GRUPOS	N	MÉDIA	CD4/CD8	Comparação	<i>p</i>
<i>Teste de ANOVA</i>					
A	36	406 linfócitos/mL	0,48		
B	35	345 linfócitos/mL	0,33		
D	04	597 linfócitos/mL	0,44	<i>Grupo A vs. Grupo B</i>	0,069

Grupo-A (A/A), Grupo-B (A/B, B/B e B/D) e Grupo-D (A/D e D/D).

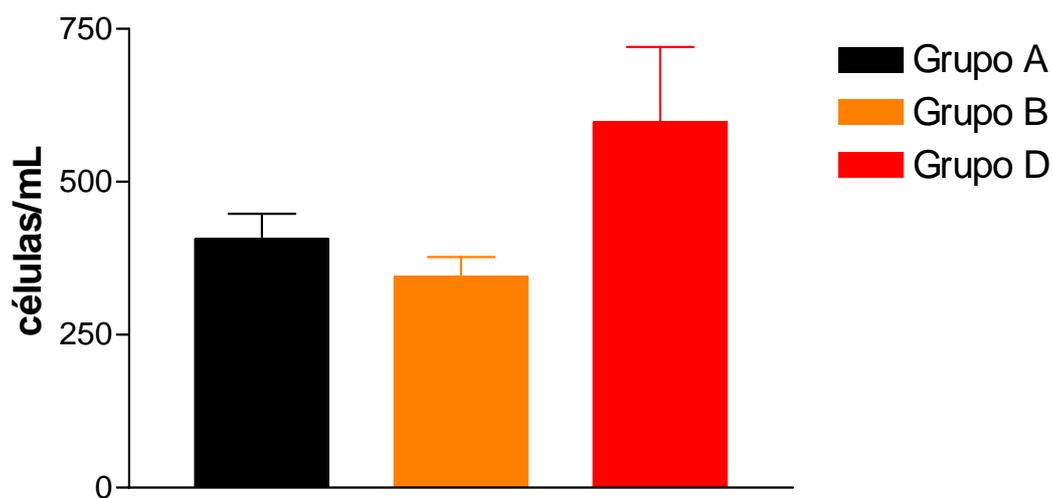


Figura 6 – Distribuição dos valores médios da 2ª contagem de linfócitos T CD4+, de acordo com o polimorfismo no gene *Mbl*.

Tabela 6 - Análise Comparativa entre 1ª e 2ª avaliações de linfócitos T CD4+ de acordo com o polimorfismo no exon 1 do gene *Mbl*.

Grupos	N	AVALIAÇÃO		Comparação <i>Teste de Anova</i>	<i>p</i>
		1ª	2ª		
A	36	370	406	1ª vs. 2ª	< 0,001
B	35	341	345	1ª vs. 2ª	1,000

Grupo-A (A/A) e Grupo-B (A/B, B/B e B/D) Carga viral expressa em cópias/mL.

3.3 DISTRIBUIÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA E O POLIMORFISMO NO GENE *Mbl*

Na análise comparativa da carga viral plasmática entre os pacientes soropositivos foram adotados os mesmos critérios para a distribuição dos genótipos em três grupos, como descrito no item 3.2.

Na primeira avaliação, a média de carga viral plasmática entre os pacientes soropositivos e portadores do alelo *Mbl*-*A foi menor quando comparada aos pacientes soropositivos apresentando o alelo *Mbl*-*B (26.388 cópias/mL x 33.883 cópias/mL; $p=0,68$; Tabela 7; Figura 7). Na segunda avaliação, esse valor foi, em média, 9,8 vezes maior nos portadores do alelo *Mbl*-*B, estando as diferenças no limite de significância (5.821 cópias/mL x 52.253 cópias/mL; $p=0,05$; Tabela 8; Figura 8).

A análise comparativa entre a primeira e a segunda avaliação dos níveis de carga viral plasmática (Tabela 9), mostrou que os portadores do alelo *Mbl*-*A apresentaram, em média, uma redução significativa dos níveis de carga viral ($p<0,001$), fato não observado entre os portadores do alelo *Mbl*-*B ($p=0,999$).

Tabela 7 - Média dos valores de carga viral plasmática (1ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene *Mbl*.

GRUPOS	N	MÉDIA	Log10	Comparação	<i>p</i>
<i>Teste de ANOVA</i>					
A	35	26.388 cópias/mL	4,42		
B	30	33.883 cópias/mL	4,52		
D	03	17.756 cópias/mL	4,24	Grupo A vs. Grupo B	0,6805

Grupo-A (A/A), Grupo-B (A/B, B/B e B/D) e Grupo-D (A/D e D/D).

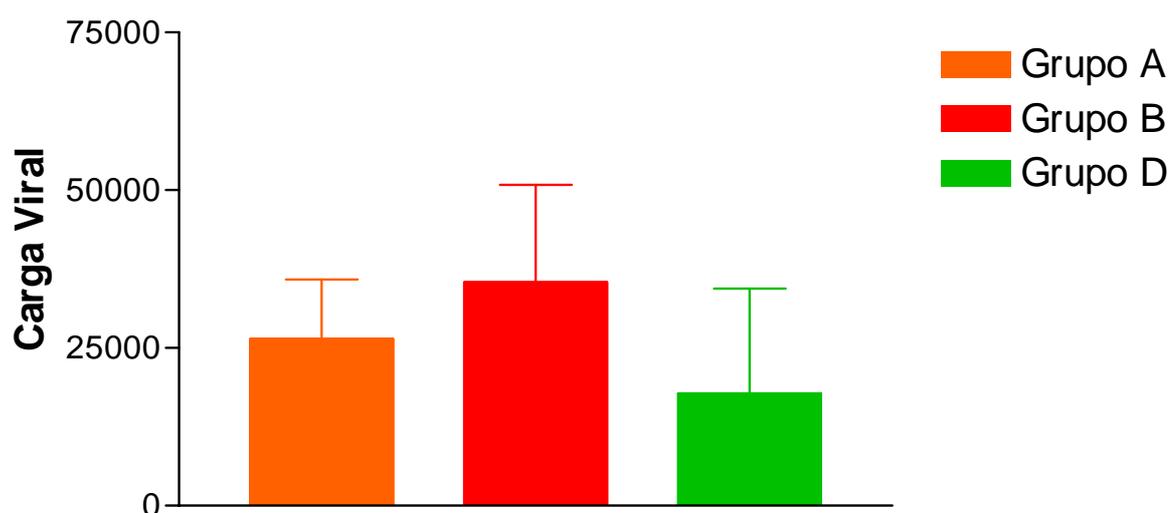


Figura 7 - Média da 1ª determinação de carga viral plasmática, de acordo com os alelos do gene *Mbl*.

Tabela 8 - Média dos valores de carga viral plasmática (2ª avaliação), de acordo com o polimorfismo no gene *Mbl*.

GRUPO	N	MÉDIA	Log10	Comparação	<i>p</i>
<i>Teste de ANOVA</i>					
A	35	5.821 cópias/mL	3,76		
B	31	52.253 cópias/mL	4,71		
D	03	1.633 cópias/mL	3,21	<i>Grupo A vs. Grupo B</i>	0,05

Grupo-A (A/A), Grupo-B (A/B, B/B e B/D) e Grupo-D (A/D e D/D).

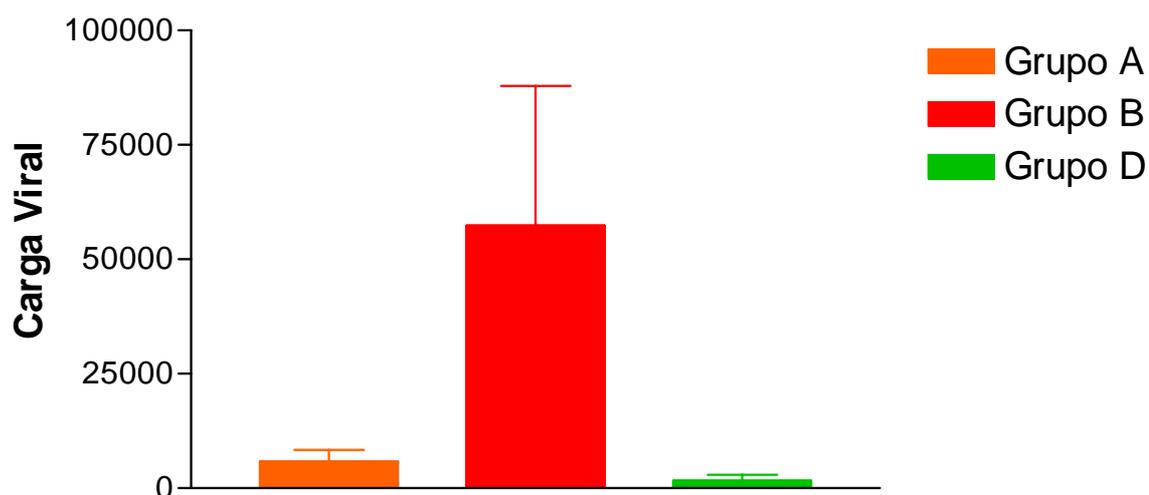


Figura 8 – Média da 2ª determinação de carga viral plasmática, de acordo com os genótipos do exon 1 do gene *Mbl*.

Tabela 9 - Análise Comparativa entre 1ª e 2ª avaliações de carga viral plasmáticas de acordo com o polimorfismo do exon 1 do gene *Mbl*.

Grupos	N	AVALIAÇÃO		Comparação <i>Teste de Anova</i>	<i>p</i>
		1ª	2ª		
A	35	26.388	5.821	1ª vs. 2ª	< 0,001
B	31	33.883	52.253	1ª vs. 2ª	0,999

Grupo-A (A/A) e Grupo-B (A/B, B/B e B/D) Carga viral expressa em cópias/mL.

4 DISCUSSÃO

A proteína MBL é importante como primeira linha de defesa do sistema imunológico, devido suas habilidades de agir como proteína de fase aguda e de ativar o sistema complemento (Kilpatrick, 2002; Turner, 2003). Alguns estudos mostram, claramente, uma associação entre a presença de variantes alélicas do gene *Mbl* e a ocorrência de imunodeficiência associada a infecções crônicas, principalmente em crianças nos primeiros anos de vida, onde a resposta imune humoral é, ainda, insatisfatória e em indivíduos imunodeprimidos (Garred *et al.*, 1997a; Turner, 1998; Turner & Hamvas, 2000).

No presente estudo foi avaliado o polimorfismo no gene *Mbl* em um grupo de pacientes infectados pelo HIV-1 e em outro de controles não infectados, objetivando investigar o impacto deste polimorfismo na infecção pelo HIV-1. Este é o primeiro estudo no Brasil, associando o polimorfismo no exon 1 do gene *Mbl* na infecção pelo HIV-1, com a utilização de dados como: dosagem de carga viral plasmática e de linfócitos T CD4⁺.

4.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS

A distribuição das três mutações do exon 1 no gene *Mbl* tem sido descrita em populações da Europa, da África, da Ásia, da América do Sul e da Melanésia (Garred *et al.*, 1997a; 1997b; Madsen *et al.*, 1998; Jülicher *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2003).

A variante *MBL*B* foi descrita com prevalências variando de 13% a 23% em europeus. Na Inglaterra a frequência do alelo *Mbl-*B* está em torno de 23%, em

Budapeste a frequência deste alelo é de 15% e de 13% na Dinamarca (Roy *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2003; Turner & Hamvas, 2000).

Em asiáticos a frequência da variante *Mbl*-**B* varia de 9% a 22%. Em japoneses a frequência deste alelo está em torno de 25%, no Vietnã o alelo *Mbl*-**B* está presente em 18% da população, enquanto que na China a frequência é de 11% (Tsutsumi *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Kilpatrick, 2002). Na população africana a frequência desta mutação varia de 0% a 3% (Madsen *et al.*, 1995; Turner, 1996; Matsushita *et al.*, 1998).

Na América do Sul a frequência da mutação *Mbl*-**B* varia de 18% a 44%. Na Colômbia, essa variante ocorre com frequências de 32% e 38% nos grupos de pacientes soropositivos para o HIV-1 e de controle soronegativos, respectivamente (Malik *et al.*, 2003). Em indígenas argentinos a variante *Mbl*-**B* apresenta frequência de 44% (Kilpatrick, 2002). No presente estudo, esta variante alélica apresentou prevalência de 13,6% e de 22% entre os grupos controle e de pacientes, respectivamente.

O alelo *Mbl*-**D* tem sido encontrado entre europeus com frequência de até 14%. Em Budapeste e na Inglaterra, a frequência do alelo *Mbl*-**D* é de 7% e 13%, respectivamente, podendo ser menor (5%) em populações africanas (Turner, 1996; Roy *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2003). Na Colômbia a frequência da mutação *Mbl*-**D* foi de 6% tanto no grupo controle como nos indivíduos infectados pelo HIV-1 (Malik *et al.*, 2003). No nosso estudo a variante *Mbl*-**D* foi mais freqüente entre o grupo controle (16,2%), quando comparado ao grupo de pacientes soropositivos (9%).

Durante a formação das populações brasileiras, houve uma significativa mistura interétnica envolvendo o branco colonizador, o índio e o negro africano (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Esse processo foi intenso em populações da Amazônia

brasileira, em especial na cidade de Belém, onde o estudo do perfil genético da atual população revela 47% de contribuição caucasóide, 41% de indígena e 12% de negróide (Santos & Guerreiro, 1995). Considerando que as mutações *Mbl*-*B e *Mbl*-*D estão presentes entre povos europeus, africanos e asiáticos (Madsen *et al.*, 1995; Turner, 1996), a presença dessas variantes, na população de Belém, deve ser reflexo da miscigenação interétnica que deu origem à atual população.

A mutação *Mbl*-*C apresenta freqüências variando de 23% a 29% em populações Sub-Saarianas (Turner, 1996). Na Inglaterra e na Dinamarca a freqüência deste alelo é de 2% e 5%, respectivamente (Roy *et al.*, 2002; Turner & Hamvas, 2000). Em Budapeste, este alelo apresenta freqüência de 3% (Nagy *et al.*, 2003). Na Colômbia a freqüência do alelo *MBL**C é de 1% e 5% nos grupos de pacientes soropositivos para o HIV-1 e de controle soronegativos, respectivamente (Malik *et al.*, 2003). A ausência da variante *Mbl*-*C, nos dois grupos investigados, pode ter sido observado pelo fato de que a origem da população negra brasileira é oriunda principalmente de Angola e Costa do Marfim, onde provavelmente a presença da variante *Mbl*-*C ocorra em menor freqüência quando comparado com populações Sub-Saarianas.

4.2 POLIMORFISMO GENÉTICO E SEU IMPACTO NA INFECÇÃO PELO HIV-1

Vários estudos têm sugerido um papel importante da MBL durante a infecção pelo HIV-1 (Garred *et al.*, 1997a; Prohaszka *et al.*, 1997).

Por causa da alta freqüência de alelos variantes de MBL em diferentes populações, foi especulado que a deficiência de MBL poderia conferir algum grau de proteção ou de susceptibilidade a certas doenças infecciosas (Turner, 2003). Garred *et*

al. (1997a) observaram uma maior prevalência de homozigotos para os alelos variantes (*O*) entre os portadores da infecção pelo HIV-1, sugerindo que os indivíduos homozigotos *O/O* apresentariam elevado risco à infecção pelo HIV-1. Resultados semelhantes foram observados por Pastinen *et al.* (1998) em uma amostra de 300 finlandeses soropositivos para o HIV-1. Por outro lado, Malik *et al.* (2003) não encontraram qualquer associação entre a presença das variantes alélicas de MBL e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, na Colômbia.

No presente estudo, a distribuição das frequências genóticas observada entre os grupos investigados está de acordo com os achados de Malik *et al.* (2003) e discorda dos resultados de Garred *et al.* (1997a), uma vez que não houve diferenças significativas na distribuição dos genótipos *A/A*, *A/O* e *O/O*. Possivelmente, a discrepância observada entre os nossos resultados e aqueles de Garred *et al.* (1997a) seja reflexo do ambiente, das condições sociais e/ou da origem étnica das populações, uma vez que a população de Belém é de constituição tri-híbrida, diferindo daquela analisada por Garred *et al.* (1997a), a qual é formada, exclusivamente, por caucasóides dinamarqueses.

Embora os resultados de Garred *et al.* (1997a) não tenham revelado qualquer associação entre os alelos variantes e o tempo compreendido entre a detecção da infecção e o surgimento da SIDA/AIDS, a avaliação dos pacientes infectados e que desenvolveram a síndrome mostrou que o tempo médio de sobrevivência foi significativamente menor, após o diagnóstico da SIDA/AIDS, para aqueles pacientes que expressavam as variantes alélicas em homozigose e em heterozigose.

No presente estudo, a análise das frequências genóticas entre os dois grupos mostrou uma maior prevalência dos genótipos com a variante alélica *Mbl-*B*

entre os pacientes soropositivos quando comparados ao grupo de controles sadios, sendo o genótipo *B/B* seis vezes mais freqüente no grupo de pacientes infectados. Por outro lado, foi verificada uma maior prevalência do genótipo *A/D* entre o grupo controle, resultado, também, observado nos estudos de Garred *et al.* (1997a). Além disso, os resultados mostram associações positiva e negativa atribuídas aos alelos *Mbl-*B* e *Mbl-*D*, respectivamente. Contudo, é prematuro afirmar ou inferir que a presença dos alelos *Mbl-*B* e *Mbl-*D* ou mesmo dos genótipos *B/B* e *A/D*, possa contribuir, respectivamente, para a susceptibilidade e à resistência à infecção pelo HIV-1, sendo necessário, para ratificar ou retificar esses achados, um estudo prospectivo envolvendo um grupo maior de indivíduos com comportamento de alto risco para a infecção pelo HIV-1.

As variantes alélicas do gene *Mbl* podem ter um papel direto na infecção pelo HIV-1 (Garred *et al.*, 1997a), devido ao fato de que os oligossacarídeos, com altas concentrações de manose, componentes das glicoproteínas de superfície do HIV-1 são ligantes para a MBL (Saifuddin *et al.*, 2000). A ligação efetiva-se de forma seletiva ao vírus ou às células infectadas pelo HIV-1, ativando, assim, a ação do sistema complemento, o que leva à inibição da infecção de linfócitos T CD4+. Dessa maneira, a ocorrência de mutações estruturais associadas às baixas concentrações séricas, o que não permitiu a estabilização da forma oligomérica ativa da MBL, com subsequente redução da ativação do sistema complemento, pode contribuir para o aumento da carga viral plasmática (Garred *et al.*, 1997a).

Vários estudos têm indicado que a capacidade da MBL em ativar o sistema complemento é altamente elevada, dependendo da forma oligomérica (Ikeda *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1990; Yokota *et al.*, 1995). Os resultados obtidos no presente estudo

apóiam essa hipótese, uma vez que mostram valores maiores de carga viral plasmática entre os pacientes soropositivos, portadores da variante alélica *Mbl*-**B*. Resultado semelhante, também, foi descrito na infecção pelo *Vírus da hepatite B* (Song *et al.*, 2003), embora uma associação inversa tenha sido evidenciada na infecção pelo HTLV (Nishimura *et al.*, 2003).

O estudo de Saifuddin *et al.* (2000) mostrou que o isolado primário do HIV-1 pode ligar-se à MBL, sugerindo, assim, uma ação, *in vivo*, seletiva desta molécula com o vírus, via estruturas ricas em carboidratos presentes na gp120 e na gp41. Os resultados do presente estudo sugerem que os baixos níveis séricos de MBL, nos pacientes portadores da mutação *Mbl*-**B*, possam levar a uma eliminação ineficaz do vírus na circulação e, conseqüentemente, ao aumento da carga viral plasmática, enfatizando a possível influência da presença dessa mutação como mais um fator determinante do aumento da viremia plasmática.

A concentração sérica de MBL em pacientes portadores das variantes alélicas tem sido observada ser maior em pacientes portadores da mutação *Mbl*-**D*, sugerindo que o efeito deste alelo possa ser diferente daquele das variantes *Mbl*-**B* e *Mbl*-**C* (Madsen *et al.*, 1995). Garred *et al.* (2003) sugerem que a proteína derivada da variante *Mbl*-**D* pode ser, parcialmente, incorporada na forma oligomérica estável da molécula de MBL, o que não é observado para as cadeias protéicas derivadas das mutações *Mbl*-**B* e *Mbl*-**C*. Além disso, Madsen *et al.* (1995), têm observado a ocorrência da mutação *Mbl*-**D* em desequilíbrio de ligação com o haplótipo HY da região promotora do gene *Mbl*, que está associado a altos níveis de MBL no soro. Esses achados podem explicar, assim, a ocorrência de elevados níveis séricos de MBL em indivíduos heterozigotos *A/D* (Garred *et al.*, 2003), o que justificaria o fato de que, no

presente estudo, não foram observados valores elevados de carga viral plasmática nos pacientes portadores da variante *Mbl*-**D*. Entretanto, o reduzido tamanho amostral de indivíduos apresentando essa mutação e que tiveram quantificado os níveis de viremia plasmática sugere a necessidade futura de se aumentar o número de pacientes analisados, para confirmar essa hipótese.

Assim como Garred *et al.*, (1997a), no nosso estudo não houve associação entre as mutações no éxon 1 do gene *Mbl* e a infecção pelo HIV-1 quando comparadas as primeiras e segundas contagens de linfócitos T CD4⁺ respectivamente, não ocorrendo diferenças estatisticamente significativas. Apenas foi observada uma melhora nos níveis de linfócitos T CD4⁺, nos indivíduos portadores do alelo *Mbl*-**A*, fato não observado entre os indivíduos portadores do alelo *Mbl*-**B*.

A ocorrência de mutações específicas nos genes *pro* e *env* do HIV-1 tem sido associada a elevados níveis de viremia plasmática, como consequência da geração de cepas apresentando resistência aos anti-retrovirais (Tanuri *et al.*, 2002).

A partir da análise comparativa dos resultados obtidos por Machado (2004), que investigou a ocorrência de tais mutações entre as cepas de HIV-1 circulantes nas amostras aqui investigadas, pode-se observar que entre os pacientes que apresentavam o genótipo *A/B*, apenas um indivíduo poderia ter sua carga viral elevada atribuída à ocorrência de mutação de resistência, enquanto que nenhum dos pacientes portadores do genótipo *B/B* apresentou tal característica. Ademais, considerando o fato do paciente com o genótipo *A/B*, portador vírus com mutação de resistência, não ter sido incluído no grupo B durante a análise associativa entre o perfil genético e os níveis de viremia plasmática, pode-se descartar a hipótese da existência de cepas de HIV-1

resistentes aos anti-retrovirais, como responsáveis pelo alto nível de carga viral observado nesse grupo.

Por fim, a caracterização do perfil genético para o gene *Mbl*, em pacientes soropositivos para o HIV-1, é de grande importância na avaliação do prognóstico de evolução da SIDA/AIDS, funcionando como fator adicional, aliada à quantificação da carga viral e à contagem de linfócitos T CD4+, na determinação do início da terapia anti-retroviral, possibilitando, dessa forma, uma maior sobrevida para o paciente.

5 CONCLUSÕES

1. A presença das formas alélicas *Mbl*-*A, *Mbl*-*B e *Mbl*-*D, na população de Belém, deve ser reflexo do processo de miscigenação interétnica que deu origem à atual população;
2. A ausência da variante *Mbl*-*C, nos dois grupos investigados, pode ter sido observado pelo fato de que a origem da população negra brasileira é oriunda principalmente de Angola e Costa do Marfim, onde provavelmente a presença da variante *Mbl*-*C do éxon 1 do gene *Mbl* ocorra em menor frequência quando comparado com populações Sub-Saarianas.
3. A distribuição genotípica observada, nos dois grupos investigados, não corrobora resultados anteriores, que mostram um aumento do genótipo *O/O* entre pacientes portadores do HIV-1;
4. No presente estudo, a análise das frequências genotípicas, entre os dois grupos, mostrou uma maior prevalência dos genótipos com a variante alélica *Mbl*-*B entre os pacientes soropositivos, quando comparado ao grupo controle de indivíduos saudáveis;
5. É prematuro afirmar que a presença dos alelos *Mbl*-*B e *Mbl*-*D ou mesmo dos genótipos *B/B* e *A/D* pode ser um fator de susceptibilidade e de resistência à infecção pelo HIV-1, respectivamente, fazendo-se necessária uma análise

prospectiva envolvendo um grupo de indivíduos soronegativos que apresentem comportamento de risco à infecção;

6. O elevado nível da carga viral plasmática, nos pacientes portadores da mutação *Mbl*-*B, pode ser reflexo dos baixos níveis séricos de MBL, como consequência de uma eliminação ineficaz do vírus na circulação, sendo descartada a hipótese da existência de cepas de HIV-1 resistentes aos anti-retrovirais;
7. A não observação de elevados níveis de carga viral plasmática, nos pacientes portadores da variante *Mbl*-*D, pode ser em decorrência do fato do produto desta mutação poder ser incorporado, parcialmente, na forma oligomérica estável da molécula de MBL ou ao desequilíbrio de ligação com o haplótipo HY da região promotora do gene *Mbl*. Entretanto, o reduzido tamanho amostral sugere a necessidade futura de se aumentar o número de pacientes analisados, para confirmar essa hipótese.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B.B., PURI, R.K. Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy. Cambridge, MA: **Blackwell Scientific**, 1995.
- AIDS BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, Ministério da Saúde. Ano XVII, nº 01, 2003.
- AITTONIEMI, J., BAER, M., SOPPI, E., VESIKARI, T., MIETTINEN, A. Mannan binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. **Archives of Diseases in Childhood**, **78**: 245–248, 1998.
- AMARA, A., GALL, S.L., SCHWARTZ, O., SALAMERO, J., MONTES, M., LOETSCHER, P. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. **Journal of Experimental Medicine**, **186**: 139-46, 1997.
- AMOROSO, A., BERRINO, M., BONIOTTO, M., CROVELLA, S., PALOMBA, E., SCARLATTI, G., SERRA, C., TOVO, P.A., VATTA, S. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. **AIDS**, **13**: 863–864, 1999.
- ANZALA, A.O., BALL, T.B., ROSTRON, T., O'BRIEN, S.J., PLUMMER, F.A., ROWLAND-JONES, S.L. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research [Letter]. **Lancet**, **351**: 1632-3, 1998.
- AYRES, M., AYRES, Jr. M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BIOSTAT 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq/Conservation International, 291p., 2003.

- BAIER, M., WERNER, A., BANNERT, N., METZNER, K., KURTH, R. HIV suppression by interleukin-16 [Letter]. **Nature**, **378**: 563, 1995.
- BAJTAY, Z., JOZSI, M., BANKI, Z., THIEL, S., THIELENS, N., ERDEI, A. Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. **European Journal of Immunology**, **30**: 1706–1713, 2000.
- BALOTTA, C., BAGNARELLI, P., CORVASCE, S., MAZZUCHELLI, R., COLOMBO, M.C., PAPAGNO, L. Identification of two distinct subsets of long-term nonprogressors with divergent viral activity by stromal-derived factor 1 chemokine gene polymorphism analysis. **Journal of Infectious Diseases**, **180**: 285-9, 1999.
- BELLAMY, R., RUWENDE, C., MCADAM, K.P., THURSZ, M., SUMIYA, M., SUMMERFIELD, J., GILBERT, S.C., CORRAH, T., KWIATKOWSKI, D., WHITTLE, H.C., HILL, A.V. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. **Quarterly Journal of Medicine**, **91**: 13–18, 1998.
- BENTWICH, Z., KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z. Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of AIDS. **Immunology Today**, **16**: 187-91, 1995.
- BERGER, E.A., DOMS, R.W., FENYO, E.M., KORBER, B.T., LITTMAN, D.R., MOORE, J.P. A new classification for HIV-1 [Letter]. **Nature**, **391**: 240, 1998.
- BLEUL, C.C., FARZAN, M., CHOE, H., PAROLIN, C., CLARK-LEWIS, I., SODROSKI, J. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. **Nature**, **382**: 829-33, 1996.

- BRAMBILLA, A., VILLA, C., RIZZARDI, G., VEGLIA, F., GHEZZI, S., LAZZARIN, A. Shorter survival of SDF1-39A/39A homozygotes linked to CD41 T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Infectious Diseases**, **182**: 311-5, 2000.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M., GRATTAPAGLIA, D., SALZANO, F.M., SALAMONI, S.P., CROSSETTI, S.G., FERREIRA, M.E., HUTZ, M.H. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, **15**: 824-834, 2003.
- CHAN D. C., KIM P. S.: HIV entry and its inhibition. **CELL**, **93**: 681-684, 1998.
- CLAYDON, E.J., BENNETT, J., GOR, D., FORSTER, S.M. Transient elevation of serum HIV antigen levels associated with intercurrent infection [Letter]. **AIDS**, **5**: 113-4, 1991.
- COFFIN, J. M., VIROLOGY, FIELDS, B., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (Eds.). Lippincott Raven, Philadelphia, PA. ed. 3, 1996, pp.1768-1848 on <http://www.micro.msb.te.ac.uk/335/retroviruses.html>, for descriptions of the general retroviral lifecycle.
- DAHL, M.R., THIEL, S., MATSUSHITA, M., FUJITA, T., WILLIS, A.C., CHRISTENSEN, T., VORUP-JENSEN, T., JENSENIUS, J.C. A new mannan-binding lectin associated serine protease, MASP-3, and its association with distinct complexes of the MBL complement activation pathway. **Immunity**, **15**: 1–10, 2001.
- DE RODA HUSMAN, A.M., KOOT, M., CORNELISSEN, M., KEET, I.P., BROUWER, M., BROERSEN, S.M. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. **Annals of Internal Medicine**, **127**: 882-90, 1997.

- DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C., HUTTLEY, G.A., SMITH, M.W., ALLIKMETS, R. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. **Science**, **273**: 1856-62, 1996.
- DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, **381**: 661-6, 1996.
- DESROSIERS, R. C. HIV with multiple genes deletions as a live attenuated vaccine for AIDS. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **8**: 411-421, 1992.
- DIAZ, R. S. Genetic diversity of HIV. **Revista de Microbiologia**, **28**: 69-75, 1997.
- DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G.P., MARTIN, S.R., HUANG, Y., NAGASHIMA, K.A. HIV-1 entry into CD41 cells is mediated by the chemokine receptor CCR-5. Nature, 381: 667-73, 1996.**
- DUH, E.J., MAURY, W.J., FOLKS, T.M., FAUCI, A.S., RABSON, A.B. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **86**: 5974-8, 1989.
- EGGLETON, P., REID, K.B., TENNER, A.J., 1998. C1q – how many functions? How many receptors? **Trends in Cell Biology**, **8**: 428–431, 1998.

- EZEKOWITZ, R.A., KUHLMAN, M., GROOPMAN, J.E., BYRN, R.A. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. **Journal of Experimental Medicine**, **169**: 185–196, 1989.
- FEARON, D.T., LOCKEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, **272**: 50–53, 1996.
- FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, **272**: 872-7, 1996.
- FUJITA, T., TAIRA, S., KODAMA, N., MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Mannose-binding protein recognizes glioma cells: in vitro analysis of complement activation on glioma cells via the lectin pathway. **Japanese Journal of Cancer Research**, **86**: 187–192, 1995.
- FURCI, L., SCARLATTI, G., BURASTERO, S., TAMBUSI, G., COLOGNESI, C., QUILLET, C. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(1) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. **Journal of Experimental Medicine**, **186**: 455-60, 1997.
- GADJEVA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, **13**: 74–78, 2001.
- GALLO, R. C. Human Retroviruses: a decade of discovery and link with human disease. **Journal of Infectious Disease**, **164**: 235-243, 1991.
- GARRED, P., HARBOE, M., OETTINGER, T., KOCH, C., SVEJGAARD, A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? **European Journal of Immunogenetics**, **21**: 125–131, 1994.

- GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN, H.O., KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency – revised. **Molecular Immunology**, **40**: 73-84, 2003.
- GARRED, P., MADSEN, H.O., BALSLEV, U., HOFMANN, B., PEDERSEN, C., GERSTOFT, J., SVEJGAARD, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, **349**: 236–240, 1997a.
- GARRED, P., MADSEN, H.O., HALBERG, P., PETERSEN, J., KRONBORG, G., SVEJGAARD, A., ANDERSEN, V., JACOBSEN, S. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, **42**:2145–2152, 1999b.
- GARRED, P., MADSEN, H.O., HOFMANN, B., SVEJGAARD, A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-bindingprotein alleles in patients with suspected immunodeficiency. **Lancet**, **346**: 941–943, 1995.
- GARRED, P., PRESSLER, T., MADSEN, H.O., FREDERIKSEN, B., SVEJGAARD, A., HOIBY, N., SCHWARTZ, M., KOCH, C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, **104**: 431–437, 1999a.
- GARRED, P., RICHTER, C., ANDERSEN, A.B., MADSEN, H.O., MTONI, I., SVEJGAARD, A., SHAO, J. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. **Scandinavian Journal of Immunology**, **46**: 204–208, 1997b.
- GARRED, P., THIEL, S., MADSEN, H.O., RYDER, L.P., JENSENIUS, J.C., SVEJGAARD, A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic

variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations.

Clinical and Experimental Immunology, **90**: 517–521, 1992.

GELDERBLOM, H. R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. **AIDS**, **5**: 671-678, 1991.

GHIRAN, I., BARBASHOV, S.F., KLINKSTEIN, L.B., TAS, S.W., JENSENIUS, J.C., NICHOLSON-WELLER, A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **Journal of Experimental Medicine**, **192**: 1797–1808, 2000.

GOLDFELD, A.E., FLORES-VILLANUEVA, P., VITTINGHOFF, E., BUCHBINDER, S., DELGADO, J.C., LEUNG J.Y. HLA-Bv4 homozygosity is associated with profound suppression of HIV-1 viremia and long-term non-progression to AIDS [Abstract]. In: **7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**. San Francisco, California, 30 January–2 February 2000. Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health. Late Breaker Abstract no. 4, 2000.

GOLETTI, D., WEISSMAN, D., JACKSON, R., GRAHAM, N., VLAHOV, D., KLEIN, R. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. **Journal of Immunology**, **157**: 1271-8, 1996.

GOULDER, P.J., BUNCE, M., KRAUSA, P., MCINTYRE, K., CROWLEY, S., MORGAN, B. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **12**: 1691-8, 1996.

- GOULDER, P.J., PHILLIPS, R.E., COLBERT, R.A., MCADAM, S., OGG, G., NOWAK, M.A. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. **Nature Medicine**, **3**: 212-7, 1997.
- GREEN, P.J., FEIZI, T., STOLL, M.S., THIEL, S., PRESCOTT, A., MCCONVILLE, M.J. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **66**: 319–328, 1994.
- HAKANSSON, K., REID, K.B. Collectin structure: a review. **Protein Science**, **9**:1607–1617, 2000.
- HAURUM, J.S., THIEL, S., JONES, I.M., FISCHER, P.B., LAURSEN, S.B., JENSENIUS, J.C. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**, **7**: 1307–1313, 1993.
- HEISE, C.T., NICHOLLS, J.R., LEAMY, C.E., WALLIS, R. Impaired secretion of rat mannose-binding protein resulting from mutations in the collagen-like domain. **Journal of Immunology**. **165**: 1403–1409, 2000.
- HILL, A.V. HIV and HLA: confusion or complexity? **Nature Medicine**, **2**: 395-6, 1996.
- HOAL-VAN, HELDEN, E.G., EPSTEIN, J., VICTOR, T.C., HON, D., LEWIS, L.A., BEYERS, N., ZURAKOWSKI, D., EZEKOWITZ, A.B., VAN HELDEN, P.D. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. **Pediatrics Research**, **45**: 459–464, 1999.
- HOFFMAN, T.L., MACGREGOR, R.R., BURGER, H., MICK, R., DOMS, R.W., COLLMAN, R.G. CCR5 genotypes in sexually active couples discordant for human

- immunodeficiency virus type 1 infection status. **Journal of Infectious Diseases**, **176**: 1093-6, 1997.
- HOLMSKOV, U., MALHOTRA, R., SIM, R.B., JENSENIUS, J.C. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. **Immunology Today**, **15**: 67-74, 1994.
- IKEDA, K., SANNOH, T., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T., YAMASHINA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **Journal of Biological Chemistry**, **262**: 7451-7454, 1987.
- IOANNIDIS, J.P., O'BRIEN, T.R., ROSENBERG P.S., CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D.G., GOEDERT, J.J. Genetic effects on HIV disease progression [Letter]. **Nature Medicine**, **4**: 536, 1998.
- IOBST, S.T., WORMALD, M.R., WEIS, W.I., DWEK, R.A., DRICKAMER, K. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 15505-15511, 1994.
- ITESCU, S., MATHUR-WAGH, U., SKOVRON, M.L., BRANCATO, L.J., MARMOR, M., ZELENIUCH-JACQUOTTE, A. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **5**: 37-45, 1992.
- ITESCU, S., ROSE, S., DWYER, E., WINCHESTER, R. Certain HLA-DR5 and -DR6 major histocompatibility complex class II alleles are associated with a CD8 lymphocytic host response to human immunodeficiency virus type 1 characterized by low lymphocyte viral strain heterogeneity and slow disease progression.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **91**: 11472-6, 1998.
- JEANNET, M., SZTAJZEL, R., CARPENTIER, N., HIRSCHL, B., TIERCY, J.M. HLA antigens are risk factors for development of AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **2**: 28-32, 1989.
- JI, Y.H., FUJITA, T., HATSUSE, H., TAKAHASHI, A., MATSUSHITA, M., KAWAKAMI, M. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. **Journal of Immunology**, **150**: 571–578, 1993.
- JI, Y.H., MATSUSHITA, M., OKADA, H., FUJITA, T., KAWAKAMI, M. The C4 and C2 but not C1 components of complement are responsible for the complement activation triggered by the Ra-reactive factor. **Journal of Immunology**, **141**: 4271–4275, 1988.
- JÜLIGER, S., KREMSNER, P.G., ALPERS, M.P., REEDER, J.C., KUN, J.F.J. Restricted polymorphisms of the mannose-binding lectin gene in a population of Papua New Guinea. **Mutation Research**, **505**: 87-91, 2002.
- KAHN, S.J., WLEKLINSKI, M., EZEKOWITZ, R.A., CODER, D., ARUFFO, A., FARR, A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infection and Immunity**, **64**: 2649–2656, 1996.
- KASLOW, R.A., CARRINGTON, M., APPLE, R., PARK, L., MUNOZ, A., SAAH, A.J. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. **Nature Medicine**, **2**: 405-11, 1996.

- KAUL, R., TRABATTONI, D., BWAYO, J.J., ARIENTI, D., ZAGLIANI, A., MWANGI, F.M. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. **AIDS**, **13**: 23-9, 1999.
- KAWASAKI, T., MA, Y., UEMURA, K., KAWASAKI, N. Mannan binding protein (MBP)-dependent cell-mediated cytotoxicity (MDCC). **Molecular Immunology**, **49**: 85, 2000.
- KEET, I.P., TANG, J., KLEIN, M.R., LEBLANC, S., ENGER, C., RIVERS, C. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. **Journal of Infectious Diseases**, **180**: 299-309, 1999.
- KELLY, P., JACK, D.L., NAEEM, A., MANDANDA, B., POLLOK, R.C., KLEIN, N.J., TURNER, M.W., FARTHING, M.J. Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. **Gastroenterology**, **119**: 1236-42, 2000.
- KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**, **12**: 335-351, 2002.
- KINTER, A.L., POLI, G., FOX, L., HARDY, E., FAUCI, A. HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. **Journal of Immunology**, **154**: 2448-59, 1995.
- KLABUNDE, J., BERGER, J., JENSENIUS, J.C., KLINKERT, M.Q., ZELCK, U.E., KREMSNER, P.G., KUN, J.F. *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. **Experimental Parasitology**, **95**: 231-239, 2000.

- KLABUNDE, J., UHLEMANN, A.C., TEBO, A.E., KIMMEL, J., SCHWARZ, R.T., KREMSNER, P.G., KUN, J.F. Recognition of plasmodium falciparum proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. **Parasitology Research**, **88**: 113-7, 2002.
- KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CJAMARET, S. GRUEST, J., GUETARD, D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J. D., MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T-4 molecule behaves as the receptor for human retroviral LAV. **Nature**, **312**: 767-768, 1984.
- KOSTRIKIS, L. G., BAGDADES, E., CAO, Y., ZHANG, L., DIMITRIOU, D., HO, D. D. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. **Journal of Virology**, **69**: 6122-6130, 1995.
- KOSTRIKIS, L.G., HUANG, Y., MOORE, J.P., WOLINSKY, S.M., ZHANG, L., GUO, Y. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. **Nature Medicine**, **4**:350-3, 1998.
- KOWALSKI, M., POTZ, J., BASIRIPOUR, L., DORFMAN, T., GOH, W. C., TERWILLIGER, E., DAYTON, A. ROSEN, C., HASELTINE, W., SODROSKI, J. Functional regions of the envelope protein of human immunodeficiency virus type 1. **Science**, **237**: 1351-1355, 1987.
- KRONER, B.L., GOEDERT, J.J., BLATTNER, W.A., WILSON, S.E., CARRINGTON, M.N., MANN, D.L. Concordance of human leukocyte antigen haplotype-sharing, CD4 decline and AIDS in hemophilic siblings. Multicenter Hemophilia Cohort and Hemophilia Growth and Development Studies. **AIDS**, **9**: 275-80, 1995.

- KUHLMAN, M., JOINER, K., EZEKOWITZ, R.A. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. **Journal of Experimental Medicine**, **169**: 1733–1745, 1989.
- KURATA, H., CHENG, H.M., KOZUTSUMI, Y., YOKOTA, Y., KAWASAKI, T. Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **191**: 1204–1210, 1993.
- KURITZKES, D.R. HIV pathogenesis and viral markers. **HIV/AIDS Clinical Management 2**: 1-27, 2000.
- KWONG, P.D., WYATT, R., ROBINSON, J., SWEET, R.W., SODROSKI, J., HENDRICKSON, W.A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. **Nature**, **393**: 648-59, 1998.
- LATHEY, J., TIERNEY, C., CHANG, S., D'AQUILA, R., HAMMER, S., KATZENSTEIN D. Homozygous mutations in 39A SDF-1 are associated with more rapid disease progression. ACTG 175 Genotype Team [Abstract]. In: **7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**. San Francisco, California, 30 January–2 February 2000. Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health; Abstract no. 853, 2000.
- LAURSEN S. B. A., NIELSEN O. L. B. Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. **Developmental and Comparative Immunology**, **24**: 85-101, 2000.
- LEE, B., RUCKER, J., DOMS, R.W., TSANG, M., HU, X., DIETZ, M. B-chemokine MDC and HIV-1 infection. **Science**, **281**: 487, 1998.

- LEVY, J. A. HIV and the pathogenesis of AIDS. **ASM press**, Washington, DC, p. 9, 1994.
- LIPSCOMBE, R.J., SUMIYA, M., HILL, A.V., LAU, Y.L., LEVINSKY, R.J., SUMMERFIELD, J.A., TURNER, M.W., 1992. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Human Molecular Genetics**, **1**: 709–715, 1992.
- LIPSCOMBE, R.J., SUMIYA, M., SUMMERFIELD, J.A., TURNER, M.W. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. **Immunology**, **85**: 660–667, 1995.
- LIU, H., JENSEN, L., HANSEN, S., PETERSEN, S.V., TAKAHASHI, K., EZEKOWITZ, A.B., HANSEN, F.D., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses. **Scandinavian Journal of Immunology**. **53**: 489–497, 2001.
- LIU, H-F. Genomic diversity and molecular phylogeny of human and simian T-cell lymphotropic viruses. Katholieke University Leuven, 105p, 1996.
- LIU, R., PAXTON, W.A., CHOE, S., CERADINI, D., MARTIN, S.R., HORUK, R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, **86**: 367-77, 1996.
- LU, J.H., THIEL, S., WIEDEMANN, H., TIMPL, R., REID, K.B. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. **Journal of Immunology**, **144**: 2287–2294, 1990.

- LUSTER, A.D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal of Medicine**, **338**: 436-45, 1998.
- MA, Y., SHIDA, H., KAWASAKI, T. Functional expression of human mannan-binding proteins (MBPs) in human hepatoma cell lines infected by recombinant vaccinia virus: post-translational modification, molecular assembly, and differentiation of serum and liver MBP. **Journal of Biochemistry**, **122**: 810–818, 1997.
- MA, Y., UEMURA, K., OKA, S., KOZUTSUMI, Y., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. Antitumor activity of mannan-binding protein in vivo as revealed by a virus expression system: mannan-binding protein-independent cell-mediated cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **96**: 371–375, 1999.
- MAAS, J., RODA HUSMAN, A.M., BROUWER, M., KROL, A., COUTINHO, R., KEET, I., VAN LEEUWEN, R., SCHUITEMAKER, H. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. **AIDS**, **12**: 2275– 2280, 1998.
- MACHADO, L.F.A. **Epidemiologia molecular do Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) nas cidades de Belém (Pará) e de Macapá (Amapá), Brasil**. Tese de Doutorado. Belém, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará., 2004. 182p.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., KURTZHALS, J.A., LAMM, L.U., RYDER, L.P., THIEL, S., SVEJGAARD, A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, **40**: 37–44, 1994.

- MADSEN, H.O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J.A.L., LAMM, L.U., RYDER, L.P., SVEJGAARD, A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of Mannan-Binding Protein. **Journal of Immunology**, **155**: 3013-3020, 1995.
- MADSEN, H.O., SATZ, M.L., HOGH, B., SVEJGAARD, A., GARRED, P. Different molecular events result in low protein levels of mannan binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **Journal of Immunology**, **161**:3169–3175, 1998.
- MALIK, S., ARIAS, M., DI FLUMERI, C., GARCIA, L.F., SCHURR E. Absence of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. **Immunogenetics**, **55**: 49–52, 2003.
- MARTIN, M.P., DEAN, M., SMITH, M.W., WINKLER, C., GERRARD, B., MICHAEL, N.L. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. **Science**, **282**: 1907-11, 1998.
- MATSUSHITA, M., EZEKOWITZ, R.A., FUJITA, T., 1995. The Gly-54_Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. **Biochemical Journal**, **311**: 1021–1023, 1995.
- MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **Journal of Experimental Medicine**, **176**: 1497–1502, 1992.
- MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. **Immunobiology** **194**: 443–448, 1995.

- MATSUSHITA, M., HIJIKATA, M., MATSUSHITA, M., OHTA, Y., MISHIRO, S.
Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with
interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. **Journal of
Hepatology**, **29**: 695-700, 1998.
- MATSUSHITA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J.C., TERAJ, I., FUJITA, T. Proteolytic
activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. **Journal
of Immunology**, **165**: 2637–2642, 2000.
- MCBRIDE, M.O., FISCHER, P.B., SUMIYA, M., MCCLURE, M.O., TURNER,
M.W., SKINNER, C.J., WEBER, J.N., SUMMERFIELD, J.A. Mannose-binding
protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or
bacterial infections. **International Journal of STD & AIDS**, **9**: 683–688, 1998.
- MCNEIL, A.J., YAP, P.L., GORE, S.M., BRETTE, R.P., MCCOLL, M., WYLD, R.
Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of
HIV disease. **Quarterly Journal of Medicine**, **89**: 177-85, 1996.
- MEYER, L., MAGIEROWSKA, M., HUBERT, J.B., THEODOROU, I., VAN RIJ, R.,
PRINS, M. CC-chemokine receptor variants, SDF-1 polymorphism, and disease
progression in 720 HIV-infected patients. SEROCO Cohort. Amsterdam Cohort
Studies on AIDS [Letter]. **AIDS**, **13**: 624-6, 1999.
- MICHAEL, N.L., LOUIE, L.G., ROHRBAUGH, A.L., SCHULTZ, K.A., DAYHOFF,
D.E., WANG, C.E. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1
transmission and disease progression. **Nature Medicine**, **3**: 1160-2, 1997.
- MILLER, M. P. *Tools For Population genetic Analyses* – TFGPA, 1.3v, Department
of Biological Sciences, Northern Arizona University, UFA, 1997.

- MORIUCHI, H., MORIUCHI, M., COMBADIÈRE, C., MURPHY, P.M., FAUCI, A.S. CD81 T-cell-derived soluble factor(s), but not b-chemokines RANTES, MIP-1 a, and MIP-1 b, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **93**: 15341-5, 1996.
- MUMMIDI, S., AHUJA, S.S., GONZALEZ, E., ANDERSON, S.A., SANTIAGO, E.N., STEPHAN, K.T. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. **Nature Medicine**, **4**: 786-93, 1998.
- MYERS, G., BERZOFSKY, J. A., KORBER, B., SMITH, R. F., PAVLAKIS, G. N. In: **Human Retroviruses and AIDS 1992: a compilation and analysis of acid nucleic and aminoacid sequences**. Los Alamos, NM, Los Alamos National Laboratory, 1993.
- NAGY, A., KOZMA G. T., KESZEI M., TRESZI, A., FALUS A., SZALAI, C. The development of asthma in children infected with *Chlamydia pneumoniae* is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, **112 (4)**: 729-36, 2003.
- NETH, O., JACK, D.L., DODDS, A.W., HOLZEL, H., KLEIN, N.J., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infection and Immunity**, **68**: 688–693, 2000.
- NIELSEN, S.L., ANDERSEN, P.L., KOCH, C., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. **Clinical and Experimental Immunology**, **100**: 219–222, 1995.
- NISHIMURA, M., MAEDA, M., YASUNAGA, J., KAWAKAMI, H., KAJI, R., ADACHI, A., UCHIYAMA, T., MATSUOKA, M. Influence of cytokine and

- Mannose Binding Protein gene polymorphisms on Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus load in HTLV-I asymptomatic carriers. **Human Immunology**, 64: 453-457, 2003.
- OBERLIN, E., AMARA, A., BACHELERIE, F., BESSIA, C., VIRELIZIER, J.L., ARENZANA-SEISDEDOS, F. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. **Nature**, 382: 833-5, 1996.
- OHTA, M., OKADA, M., YAMASHINA, I., KAWASAKI, T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. **Journal Biological Chemistry**, 265: 1980-1984, 1990.
- OSBORN, L., KUNKEL, S., NABEL, G.J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 86: 2336-40, 1989
- PASTINEN, T., LIITISOLA, K., NIINI, P., SALMINEN, M., SYVANEN, A.C. Contribution of the *CCR5* and *MBL* genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14: 695-698, 1998.
- PAXTON, W.A., MARTIN, S.R., TSE, D., O'BRIEN, T.R., SKURNICK, J., VANDEVANTER, N. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. **Nature Medicine**, 2: 412-7, 1996.

- PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSEN, L., VORUP-JENSEN, T., KOCH, C., JENSENIUS, J.C. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. **Journal of Immunology Methods**, **257**: 107–116, 2001.
- PETZL-ERLER, M.A. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura**, **51**: 199-210, 1999.
- PLUMMER, F.A., BALL, T.B., KIMANI, J., FOWKE, K.R. Resistance to HIV-1 infection among highly exposed sex workers in Nairobi: what mediates protection and why does it develop? **Immunology [Letter]**, **66**: 27-34, 1999.
- PROHASZKA, Z., THIEL, S., UJHELYI, E., SZLAVIK, J., BANHEGYI, D., FUST, G. Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of disease. **Immunology [Letter]**, **58**: 171–175, 1997.
- RATNER, L., GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F. HTLV-III, LAV, ARV are variants of the same AIDS virus. **Nature**, **313**: 636-637, 1985.
- REYNES, J., PORTALES, P., SEGONDY, M., BAILLAT, V., ANDRE, P., RE'ANT, B. CD41 T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Infectious Diseases**, **181**: 927-32, 2000.
- RIZZUTO, C.D., WYATT, R., HERNA'NDEZ-RAMOS, N., SUN, Y., KWONG P.D., HENDRICKSON, W.A. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. **Science**, **280**: 1949-53, 1998.
- ROBEY, W. G., SAFAI, B., OROZLAN, S., ARTHUR, L. O., GONDA, M. A., GALLO, R. C., FISCHINGER, P. J. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. **Science**, **228**: 593-595, 1985.

- ROWLAND-JONES, S.L., DONG, T., FOWKE, K.R., KIMANI, J., KRAUSA, P., NEWELL, H. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV resistant prostitutes in Nairobi. **The Journal of Clinical Investigation**, **102**: 1758-65, 1998.
- ROY S., KNOX K., SEGAL S., GRIFITHS D., MOORE C. E., WELSH K. I., SMARASON A., DAY N. P., MCPHEAT W. L., CROOK D. W., HILL A. V. S. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: A case-control study. **The Lancet**, **359**: 1569-73, 2002.
- SAIFUDDIN, M., HART, M.L., GEWURZ, H., ZHANG, Y., SPEAR, G. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type1. **Journal of General Virology**, **81**: 949-955, 2000.
- SAMSON, M., LIBERT, F., DORANZ, B.J., RUCKER, J., LIESNARD, C., FARBER, C.M. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, **382**: 722-5, 1996.
- SANTOS S.E.B, GUERREIRO J.F. The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon Region. **Revista Brasileira de Genética**, **18**: 311-315, 1995.
- SASTRY, K., HERMAN, G.A., DAY, L., DEIGNAN, E., BRUNS, G., MORTON, C.C., EZEKOWITZ, R.A. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **Journal of Experimental Medicine**, **170**: 1175–1189, 1989.
- SASTRY, K., ZAHEDI, K., LELIAS, J.M., WHITEHEAD, A.S., EZEKOWITZ, R.A. Molecular characterization of the mouse mannose binding proteins. The mannose-

- binding protein A but not C is an acute phase reactant. **Journal of Immunology**, **147**: 692–697, 1991.
- SATO, T., ENDO, Y., MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. **International Immunology**, **6**: 665–669, 1994.
- SCHONNING, K., JOOST, M., GRAM, G., MACHUCA, R., NIELSEN, C., NIELSEN, J. Chemokine receptor polymorphism and autologous neutralizing antibody response in long-term HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **18**: 195–202, 1998.
- SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA (SESPA), SET., 2004.
- SENALDI, G., DAVIES, E.T., MAHALINGAM, M., LU, J., POZNIAK, A., PEAKMAN, M., REID, K.B., VERGANI, D. Circulating levels of mannose binding protein in human immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infection**, **31**: 145–148, 1999.
- SHERIFF, S., CHANG, C.Y., EZEKOWITZ, R.A. Human mannosebinding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. **Nature Structural Biology**, **1**: 789–794, 1994.
- SMITH, M.W., DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C., HUTTLEY, G.A., LOMB, D.A. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. **Science**, **277**: 959–65, 1997

- SONG, L.H., BINH, V.Q., DUY, D.N., JULIGER, S., BOCK, T.C., LUTY, A.J., KREMSNER, P.G., KUN, J.F. Mannose-binding lectin gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. **Mutation Research**, **28**: 522(1-2):119-25, 2003.
- STEFFENSEN, R., THIEL, S., VARMING, K., JERSILD, C., JENSENIUS, J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Journal of Immunological Methods**, **241**: 33–42, 2000.
- STOVER, C.M., THIEL, S., LYNCH, N. J., SCHWAEBLE, W.J. The rat and mouse homologues of MASP-2 and MAp19, components of the lectin activation pathway of complement. **Journal of Immunology**, **163**: 6848–6859, 1999b.
- SULLIVAN, K.E., WOOTEN, C., GOLDMAN, D., PETRI, M. Mannosebinding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, **39**: 2046–2051, 1996.
- SUMIYA, M., SUPER, M., TABONA, P., LEVINSKY, R.J., ARAI, T., TURNER, M.W., SUMMERFIELD, J.A. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, **337**:1569–1570, 1991.
- SUMMERFIELD, J.A., SUMIYA, M., LEVIN, M., TURNER, M.W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **British Medical Journal**, **314**: 1229–1232, 1997.
- SUPER, M., GILLIES, S.D., FOLEY, S., SASTRY, K., SCHWEINLE, J.E., SILVERMAN, V.J., EZEKOWITZ, R.A. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. **Nature Genetics**, **2**: 50–55, 1992.

- SUPER, M., THIEL, S., LU, J., LEVINSKY, R.J., TURNER, M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet**, **2**: 1236–1239, 1989.
- TAKADA, F., TAKAYAMA, Y., HATSUSE, H., KAWAKAMI, M. A new member of the C1s family of complement proteins found in a bactericidal factor, Ra-reactive factor, in human serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **196**: 1003–1009, 1993.
- TAKAHASHI, M., ENDO, Y., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. **International Immunology**, **11**: 859–863, 1999.
- TAKAYAMA, Y., TAKADA, F., TAKAHASHI, A., KAWAKAMI, M. A 100-kDa protein in the C4-activating component of Ra-reactive factor is a new serine protease having module organization similar to C1r and C1s. **Journal of Immunology**, **152**: 2308–2316, 1994.
- TANURI, A., CARIDEA, E., DANTAS, M.C., MORGADO, M., MELLO, D.L.C., BORGES, S., TAVARES, M., FERREIRA, S.B., SANTORO-LOPES, G., MARTINS, C.R.F., ESTEVES, A.L.C., DIAZ, R.S., ANDREO, S.M.S., FERREIRA, L.A.P., RODRIGUES, R., REUTER, T., CAVALCANTI, A.M.S., OLIVEIRA, S.M., BARBOSA, H.B., TEIXEIRA, P.R., CHEQUER, P.N. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. **Journal of Clinical Virology**, **25**: 39-46, 2002.

- TAYLOR, M.E., BRICKELL, P.M., CRAIG, R.K., SUMMERFIELD, J.A. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **Biochemical Journal**, **262**: 763–771, 1989.
- TERAI, I., KOBAYASHI, K., MATSUSHITA, M., FUJITA, T. 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**, **110**: 317–323, 1997.
- THIEL, S., PETERSEN, S.V., VORUP-JENSEN, T., MATSUSHITA, M., FUJITA, T., STOVER, C.M., SCHWAEBLE, W.J., JENSENIUS, J.C. Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAp19. **Journal of Immunology**. **165**: 878–887, 2000.
- THIEL, S., VORUP JENSEN, T., STOVER, C.M., SCHWAEBLE, W., LAURSEN, S.B., POULSEN, K., WILLIS, A.C., EGGLETON, P., HANSEN, S., HOLMSKOV, U., REID, K.B., JENSENIUS, J.C. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, **386**:506–510, 1997.
- TOMIYAMA, H., MIWA, K., SHIGA, H., MOORE, Y.I., OKA, S., IWAMOTO, A. Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. **Journal of Immunology**, **158**: 5026-34, 1996.
- TSUTSUMI A., IREGAMI H., TAKAHASHI R., MURATA H., GOTO D., MATSUMOTO I., FUJIOSAWA T., SUMIDA T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Human Immunology* 64, 621-624, 2003.

- TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, **17**: 532-540, 1996.
- TURNER, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. **Immunobiology**, **199**: 327-339, 1998.
- TURNER, M.W., HAMVAS, R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. **Reviews in Immunogenetics**, **2**: 305-322, 2000.
- TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, **40**: 423-429, 2003.
- TURNER B. G., SUMMERS M. F. Structural Biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**, **285**: 1-32, 1999.
- VALENTIN, A., LU, W., ROSATI, M., SCHNEIDER, R., ALBERT, J., KARLSSON, A. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **95**: 8886-91, 1998.
- VAN RIJ, R., BROERSEN, S., GOUDSMIT, J., COUTINHO, R., SCHUITEMAKER, H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. **AIDS**, **12**: F85-90, 1998.
- VICENZI, E., BISWAS, P., MENGOZZI, M., POLI, G. Role of pro-inflammatory cytokines and beta-chemokines in controlling HIV replication. **Journal of Leukocyte Biology**, **62**: 34-40, 1997.
- VORUP-JENSEN, T., PETERSEN, S.V., HANSEN, A.G., POULSEN, K., SCHWAEBLE, W., SIM, R.B., REID, K.B., DAVIS, S.J., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex

- autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. **Journal of Immunology**, **165**: 2093–2100, 2000.
- WAHL, S.M., GREENWELL-WILD, T., PENG, G., HALE-DONZE, H., ORENSTEIN, J.M. Co-infection with opportunistic pathogens promotes human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages. **Journal Infectious Diseases**, **179** Suppl: S457-60, 1999.
- WALLIS, R., CHENG, J.Y. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. **Journal of Immunology**, **163**: 4953–4959, 1999.
- WALLIS, R., DRICKAMER, K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, **274**: 3580–3589, 1999.
- WEIS, W.I., DRICKAMER, K., HENDRICKSON, W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature** **360**: 127–134, 1992.
- WEISSMAN, D., POLI, G., FAUCI, A.S. IL-10 synergizes with multiple cytokines in enhancing HIV production in cells of monocytic lineage. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **9**: 442-9, 1995.
- WEISSMAN, D., POLI, G., FAUCI, A.S. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. **AIDS Research Human Retroviruses**, **10**: 1199-206, 1994.

WIGG, M.D. Vírus da Imunodeficiência Humana. In: Introdução a Virologia Humana.

SANTOS NOS, ROMANOS MTV, WIGG MD. (eds.) **Guanabara Koogan**, 2002.
p.183-197.

WINKLER, C., MODI, W., SMITH, M.W., NELSON G.W., WU, X., CARRINGTON, M. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, **279**: 389-93, 1998.

WINKLEY, C., MODI, W., SMITH, M.W., NELSON, G.W., WU, X., CARRINGTON, M., DEAN, M., HONJO, T., TASHIRO, K., YABE, D., BUCHBINDER, S., VITTINGHOFF, E., GOEDERT, J.J., O'BRIEN, T.R., JACOBSON, L.P., DETELS, R., DONFIELD, S., WILLOUGHBY, A., GOMPERTS, E., VLAHOV, D., PHEIR, J., O'BRIEN, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant: ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, **279**: 389-393, 1998.

WOLDAY, D., MAAYAN, S., MARIAM, Z.G., BRITTON, S., LANDAY, A., BENTWICH, Z. Eradication of helminthic infection decreases HIV plasma viral load in dually infected people [Abstract]. In: **7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**. San Francisco, California, 30 January–2 February 2000. Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health. Abstract no. 157, 2000.

WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C. Human T-lymphotropic retroviruses. **Nature**, **317**: 395-403, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION: HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluation sites: genetics screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of representative viral strains. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **10**: 1927-1943, 1994.

WU, L., GERARD, N.P., WYATT, R., CHOE, H., PAROLIN, C., RUFFING, N. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. **Nature**, **384**: 179-83, 1996.

WYATT, R., SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, **280**: 1884-8, 1998.

YING H., JI X., HART M.L., GUPTA K., SAIFUDDIN M., ZARIFFARD M.R., SPEAR G.T. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **20**:327-35, 2004.

YOKOTA, Y., ARAI, T., KAWASAKI, T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. **Journal of Biochemistry**, **117**: 414-419, 1995.

ZIMMERMAN, P.A., BUCKLER-WHITE, A., ALKHATIB, G., SPALDING, T., KUBOFCIK, J., COMBADIERE, C. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. **Molecular Medicine**, **3**: 23-36, 1997.