



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE *MBL*
(*MANNOSE-BINDING LECTIN*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)**

FELIPE BONFIM FREITAS

Belém-Pará
2008

FELIPE BONFIM FREITAS

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE
MBL (MANNOSE-BINDING LECTIN) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto

Belém-Pará
2008

FELIPE BONFIM FREITAS

INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE
MBL (MANNOSE-BINDING LECTIN) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profª. Dra. Maristela Gomes da Cunha
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profª. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak (suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 12 de Agosto de 2008

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Freitas e Maria do Socorro Bonfim Freitas (*in memoriam*), por todas as palavras, conselhos, orientações e valores passados, além de todas as oportunidades a mim oferecidas, pois sem elas com certeza não estaria conquistando mais essa vitória em minha vida profissional e pessoal. Aceitem aqui o meu mais sincero obrigado. Serei eternamente grato por todo carinho e amor que vocês me deram.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de manifestar o meu mais sincero obrigado ao Prof. Dr. Antônio Vallinoto, pela oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Virologia, demonstrando em vários momentos muita paciência, dedicação e atenção, orientando sempre com muita objetividade, simplicidade e enorme competência. Obrigado por todos os ensinamentos acadêmicos e pessoais. Serei sempre grato por ter me ajudado tanto nesta nova etapa da minha vida.

Agradeço também ao Prof. Dr. Ricardo Ishak e a Prof^a Dra. Marluisa de Oliveira Guimarães Ishak, por sempre terem se dedicado ao máximo no crescimento e desenvolvimento do Laboratório de Virologia, tornando-se verdadeiros exemplos profissionais e pessoais.

Ao Prof. Dr Luiz Fernando Almeida Machado e a Prof^a MsC.Vânia Nakauth Azevedo que muito me ensinaram durante todos os momentos de convívio.

Aos amigos do Laboratório de Virologia: Helena, Rosimar, Di Paula, Paula, Regiane, Gisele, Sandra, Leonardo, Iran, Jamilla, Izete, Jaqueline, Carol, Simone, Rafaela, Érika, Elizabete, Tany, Ethienne e em especial as amigas Renata e Lucinda pelo enorme auxílio laboratorial no início de meu trabalho. Saibam que todos em algum momento colaboraram de alguma forma nesta conquista.

Agradeço de forma especial aos bioquímicos Mauro e Ednelza, que foram verdadeiros amigos e me ajudaram de forma grandiosa na coleta dos dados e amostras no Hospital Universitário Barros Barreto.

Sou muito grato a minha namorada Rafaela Lebrege, por sempre ter acreditado em mim e ter manifestado um apoio constante, me incentivando e criticando, sendo uma verdadeira companheira e amiga, acreditando no meu potencial nos momentos em que até eu mesmo duvidava.

À todos os amigos pessoais que sempre acreditaram no meu sucesso e em vários momentos deram forças para que eu chegasse até a conclusão deste trabalho.

À todos os indivíduos doadores de suas amostras que aqui foram testadas.

À CAPES e UNESCO por financiar parte desse projeto.

À UFPA e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes infecciosos e parasitários pelo acolhimento para o desenvolvimento desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A FAMÍLIA <i>RETROVIRIDAE</i>	15
1.1.1 O <i>Vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1)</i>	15
1.1.2 Morfologia e Organização Genômica do HIV-1	16
1.1.3 O Ciclo de Replicação do HIV-1	19
1.1.4 Patogênese da Infecção pelo HIV-1	21
1.1.5 Resposta Imune ao HIV-1	23
1.2 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE.....	26
1.2.1 Estrutura e Função da MBL	27
1.2.2 Polimorfismos no Éxon 1 do gene <i>MBL</i>	30
1.2.3 Polimorfismos na Região Promotora do gene <i>MBL</i>	33
1.2.4 Níveis Séricos da Lectina Ligadora de Manose	35
1.2.5 Proteases Serinas Associadas a MBL	37
1.3 MBL E SUA ASSOCIAÇÃO COM AS DOENÇAS.....	39
1.4 PAPEL DA MBL NA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	44
1.5 OBJETIVOS.....	49
1.5.1 Objetivo Geral	49
1.5.2 Objetivos Específicos	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DA AMOSTRA.....	50
2.1.1 Pacientes com Aids	50
2.1.2 Indivíduos Controles Soronegativos para o HIV-1	50
2.1.3 Indivíduos Soronegativos de Alto risco	51
2.1.4 Indivíduos Soropositivos Assintomáticos	51
2.1.5 Aspectos Éticos	51
2.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	52
2.2.1 Grupos de Indivíduos Soronegativos	52

2.2.2	Grupo de Indivíduos Soropositivos.....	52
2.3	QUANTIFICAÇÕES DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA E DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺	52
2.4	MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	53
2.4.1	Extração do DNA.....	53
2.4.2	Determinação dos Polimorfismos no Éxon 1.....	53
2.4.3	Eletroforese.....	54
2.5	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	56
3	RESULTADOS.....	57
3.1	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	57
3.2	POLIMORFISMOS GENÉTICOS E CO-INFECCÕES.....	64
3.3	POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÕES DE LINFÓCITOS TCD4 ⁺ E DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA.....	68
4	DISCUSSÃO.....	72
5	CONCLUSÕES.....	80
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	ANEXOS.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das freqüências alélicas do gene <i>MBL</i> na população de pacientes com Aids, nos indivíduos assintomáticos e no grupo controle.....	56
Tabela 2. Distribuição das freqüências genotípicas do gene <i>MBL</i> na população de pacientes com Aids, nos indivíduos assintomáticos e no grupo controle.....	58
Tabela 3. Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes com Aids, nos indivíduos assintomáticos e no grupo controle.....	60
Tabela 4. Distribuição das freqüências genotípicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes soropositivos, controle e controle de alto risco.....	61
Tabela 5. Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas do gene <i>MBL</i> no grupo de pacientes soropositivos, controle e controle de alto risco.....	63
Tabela 6. Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas no gene <i>MBL</i> entre os indivíduos com Aids mono e co-infectados.....	65
Tabela 7. Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas do gene <i>MBL</i> entre os indivíduos com Aids co-infectados.....	66
Tabela 8. Polimorfismos do gene <i>MBL</i> e a quantificação de células TCD4 ⁺ nos indivíduos com Aids.....	67
Tabela 9. Polimorfismos do gene <i>MBL</i> e a quantificação da carga viral nos indivíduos com Aids.....	68

Tabela 10. Polimorfismos do gene <i>MBL</i> e a quantificação de células TCD4 ⁺ nos indivíduos soropositivos assintomáticos.....	69
Tabela 11. Polimorfismos do gene <i>MBL</i> e a quantificação da carga viral nos indivíduos soropositivos assintomáticos.....	70

RESUMO

No presente estudo foram investigadas as frequências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* em um grupo de 128 pacientes com Aids, 116 portadores assintomáticos da infecção pelo HIV-1, 84 mulheres soronegativas profissionais do sexo, com comportamentos de alto risco e 99 indivíduos controles soronegativos, com o objetivo de avaliar a ocorrência de uma possível associação entre os polimorfismos neste gene e a infecção pelo HIV-1. A identificação dos alelos *MBL* *A, *B, *C e *D foi realizada por meio da reação em cadeia mediada pela polimerase, utilizando seqüências de iniciadores específicos e posterior digestão enzimática (RFLP). As análises das frequências alélicas e genotípicas do éxon 1 não mostraram qualquer diferença significativa entre pacientes soropositivos (assintomáticos e Aids) e soronegativos (controle e controle de alto risco) ($p > 0,05$). Não foram observadas associações significativas entre a presença de co-infecções e as variantes alélicas. Entretanto, tuberculose, neurotoxoplasmose, candidíase, neurocriptococose e pneumonia foram as co-infecções com maior prevalência. As associações entre o número de linfócitos TCD4⁺, a carga viral plasmática e os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* nos pacientes com Aids e portadores assintomáticos não foram estatisticamente significante. Desse modo, pode-se sugerir a ausência de associação entre estes polimorfismos e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, destacando a necessidade de estudos adicionais para determinar se estes polimorfismos apresentam qualquer impacto associado à infecção ou a progressão para a Aids.

ABSTRACT

The present study investigated the frequency of the mutations in the exon 1 of the *MBL* gene in a sample of 128 Aids patients, 116 HIV-1 infected asymptomatic individuals, 84 healthy sex worker women with high risk behavior and 99 healthy control individuals, in order to evaluate the occurrence of a possible association between the polymorphisms and HIV-1 infection. The *MBL* *A, *B, *C and *D alleles identification was performed through a polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonucleases analyses (RFLP). The analysis of allele and genotype frequencies in the exon 1 of *MBL* gene did not show any differences between seropositives patients (asymptomatic and Aids individuals) and seronegatives individuals (healthy and high risk controls) ($p>0,05$). It was not show significant associations between the presences of other related infections and the presence of the alleles variant. However, tuberculosis, toxoplasmosis of the brain, candidosis, meningitis by cryptococcus and pneumonia was the most prevalent co-infections. Associations between the *MBL* gene polymorphisms and the number of CD4⁺ T-cells and plasma viral load in the Aids and asymptomatic patients were not statistically significant. Therefore, it has been suggested the absence of association between the polymorphisms and the HIV-1 infection susceptibility, emphasizing the need for further studies to determinate if the present polymorphisms have any impact associated with infection or the progression to Aids.

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos 20 anos, a infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana-1* (HIV-1) e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) se tornou uma pandemia, ultrapassando os limites de um problema de saúde pública, com sérias implicações políticas e econômicas (Piot *et al.*, 2001).

A Aids foi primeiramente reconhecida nos Estados Unidos, no início da década de 80, em um grupo de homens homossexuais que sofriam com infecções oportunistas recorrentes, principalmente pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (Gottlieb *et al.*, 1981). Apesar dos relatos da infecção ser relativamente recentes, análises filogenéticas estimam que o HIV-1 surgiu entre os anos de 1915 e 1941, tornando-se uma ameaça pública mundial 50 anos depois (Korber *et al.*, 2000).

Desde a sua descoberta, em meados dos anos 80, a Aids continua se expandindo na taxa de 14.000 novas infecções por dia. Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas em HIV/AIDS (UNAIDS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem, em média, 33,2 milhões de pessoas no mundo que vivem com o HIV. Somente no ano de 2007, foram registradas 2,5 milhões de novas infecções incluindo adultos e crianças. Dentre todas as regiões do planeta, a África sub-sahariana é a que apresenta um maior índice com, aproximadamente, 22,5 milhões de indivíduos infectados, sendo a Aids a principal causa de mortes neste continente. A incidência da infecção também vem crescendo em taxas expressivas na Ásia meridional, onde só em 2007, foram registrados 860 mil novos casos de infecção pelo vírus. A Oceania é o continente com o menor número de registros desta infecção viral com, aproximadamente, 75 mil casos (UNAIDS/WHO, 2007).

No Brasil, apesar da epidemia ser considerada estável nos últimos anos, cerca de 620 mil pessoas estão infectadas com o HIV-1, representando, aproximadamente, um terço do total de casos encontrado na América Latina (UNAIDS/WHO, 2007). Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde de 2007, a região Sudeste possui 60,9% dos casos (289 mil infectados), seguido das regiões Sul com 18,8% (89 mil casos), Nordeste com 11,2% (53 mil casos), 5,6% na região Centro-Oeste (26 mil casos) e Norte com 3,4% (16 mil casos). O Estado do Pará notificou cerca de 4.147 casos, o que representa 25% do total de casos da região Norte (Boletim Epidemiológico AIDS e DST, 2007).

Atualmente, são conhecidas duas espécies do HIV, o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 é o tipo mais virulento e mais disseminado pelo mundo. Já o HIV-2 parece ser menos patogênico e é encontrado quase que exclusivamente no oeste da África (Hahn *et al.*, 2000). Existem múltiplos grupos e subtipos do HIV-1 com distribuições geográficas distintas de acordo com suas origens. O grupo M e seus subtipos são os mais prevalentes no mundo, porém outros dois grupos, N e O, foram descritos na África e na Europa Oriental. Cada subtipo é distinto em sua epidemiologia e antigenicidade, o que pode ter implicações na elaboração de vacinas (Essex, 1999).

A dispersão da infecção causada pelo HIV-1 é consequência das trocas de fluidos corpóreos contaminados, que podem ser feitas através: das relações sexuais, do compartilhamento de agulhas, dos acidentes com materiais perfurocortantes contaminados, transfusões sanguíneas e hemoderivados e da transmissão via transplacentária. Adicionalmente, co-fatores, tais como, doenças sexualmente transmissíveis e os polimorfismos de genes codificadores de receptores para o vírus, facilitam a infecção pelo HIV-1 e influenciam na progressão a AIDS. Contudo, o real

efeito da heterogeneidade genética do hospedeiro na susceptibilidade à infecção ainda é pouco compreendido (Garred *et al.*, 2003).

1.1 A FAMÍLIA *RETROVIRIDAE*

1.1.1 O *Vírus da imunodeficiência humana (HIV)*

A família *Retroviridae* compreende vírus que infectam primariamente vertebrados, determinando-lhes uma variedade de doenças de natureza imunossupressora e neoplásica, embora já tenham sido encontrados retrovírus infectando outros seres, tais como aves, répteis, insetos e moluscos (Gallo & Wong-Staal, 1982).

Os retrovírus apresentam cerca de 100 nm de diâmetro e são envelopados, possuindo ainda um cerne esférico ou cônico que possui algumas proteínas que desempenham função catalítica durante a replicação viral. O genoma destes vírus consiste de duas moléculas de RNA de polaridade positiva, idênticas, medindo cerca de 7 a 10 Kilobase (Kb) de comprimento. Estas servem como molde para a transcrição de uma molécula de DNA de dupla fita, pela ação de uma DNA polimerase RNA dependente (transcriptase reversa), que posteriormente será integrada ao genoma da célula hospedeira sob a forma de um provírus (Temin & Mizutani, 1970).

Os retrovírus são divididos em três sub-famílias. *Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae*, baseando-se primariamente na patogenicidade, mais do que nas relações genômicas (Weiss *et al.*, 1985; Drew, 1992). Atualmente o Comitê Internacional de Taxonomia Viral reconhece sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e

Spumavirus, e esses em subgêneros e espécies de acordo com os aspectos de seqüência nucleotídica e estrutura genômica (Coffin, 1993; Liu, 1996).

Os retrovírus patogênicos ao homem incluem os (i) Vírus linfotrópico de células T humanas 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2), relacionados a distúrbios neurológicos e hematológicos, classificados no gênero *Deltaretrovírus* e os (ii) *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV), classificados no gênero *Lentivirus* (Gallo, 1991; Coffin *et al.*, 1996; Liu, 1996).

1.1.2 Morfologia e Organização genômica do HIV-1

O HIV-1 é uma partícula esférica com, aproximadamente, 100 nm de diâmetro. Apresenta externamente um envelope composto por uma membrana lipoprotéica oriunda da célula hospedeira acrescida de glicoproteínas virais. Internamente, o vírus apresenta um nucleocapsídeo protéico em formato de cone onde se encontrarão o genoma viral, a transcriptase reversa, a protease e a integrase (Wong-Staal & Gallo, 1985; Figura 1).

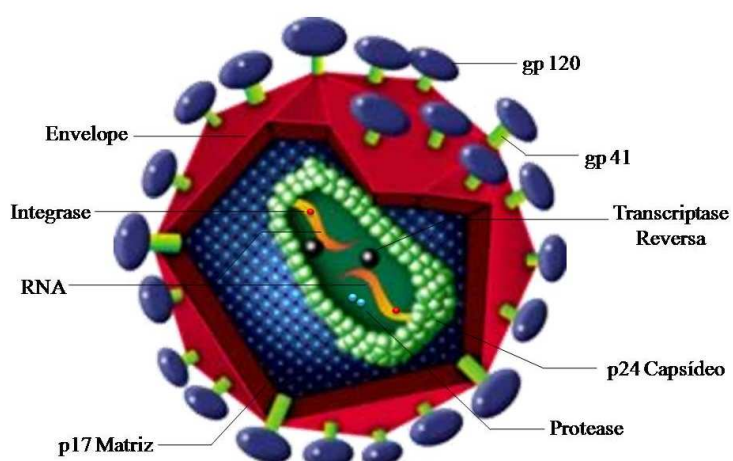


Figura 1- Estrutura Morfológica do HIV-1 (Adaptado de Chemistry at Wellesley College <<http://www.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/hiv/t-hiv.GIF>>).

O HIV-1 apresenta um genoma com 9,8 kb, sendo formado por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, com polaridade positiva, contendo nove genes delimitados por duas regiões terminais longas e repetitivas chamadas *LTR* (*Long Terminal Repeats*). Estes genes estão divididos em três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) comuns aos outros retrovírus, e seis genes regulatórios (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*) (Greene, 1991).

O gene *gag* codifica uma proteína precursora (p55), que ao ser clivada por uma protease viral durante a maturação, origina várias proteínas estruturais que compõem o cerne viral, como a matriz protéica (p17), o capsídeo viral (p24) e as proteínas mais internas do nucleocapsídeo (p7 e p9) (Ratner *et al.*, 1985). Essa protease, que também cliva polipeptídeos precursores codificados pelo gene *pol*, é codificada pelo mesmo gene responsável pela produção das seguintes enzimas: (i) a transcriptase reversa, responsável pela replicação do RNA viral, (ii) a Rnase que degrada a fita após a síntese da primeira fita de DNA e (iii) a integrase, que faz a interação do ácido nucléico viral ao genoma celular (Varmus & Swanstrom, 1985; Levy, 1994).

A glicoproteína de superfície (gp120 ou SU) e a glicoproteína transmembrana (gp41 ou TM) são produzidas a partir da clivagem por proteases de um precursor (gp160) codificado pelo gene *env*. Estas duas proteínas de superfície irão interagir entre si através de forças não-covalentes (Robey *et al.*, 1985).

Estas glicoproteínas superficiais são importantes no momento do contato entre a partícula viral e a célula hospedeira, pois estas se ligam aos receptores CD4 e aos co-receptores localizados na membrana plasmática de linfócitos T auxiliares, de monócitos, de macrófagos e de células dendríticas foliculares (Weiss *et al.*, 1992a).

O gene *env* apresenta uma grande diversidade na sequência 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) (Alizon *et al.*, 1986; Myers *et al.*, 1993). Variações na sequência 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* demonstram que um número limitado de aminoácidos conservados em diferentes regiões da gp120, são requeridos para uma eficiente ligação ao CD4 (Kwalski *et al.*, 1987). O estudo molecular da região C2V3 permitiu estabelecer uma classificação genotípica para as diversas cepas de HIV-1 (WHO, 1994; Kostrikis *et al.*, 1995).

Os genes não estruturais compreendem os genes reguladores ou acessórios (*tat* e *rev*) que são essenciais para a replicação viral. O gene *tat* codifica uma proteína regulatória transativadora que, juntamente com certas proteínas celulares, interagem com a região TAR (*Tat responsive element*) do RNA mensageiro viral. Tat é a principal proteína envolvida na ativação do HIV (Kameoka *et al.*, 2001). O gene *rev*, por sua vez, codifica uma proteína regulatória, Rev, que interage com 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 vá para o citoplasma a fim de ser traduzido (Gergerfelt *et al.*, 2002).

Além dos genes reguladores *tat* e *rev*, outros genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) são importantes na replicação e infectividade viral. O gene *nef* codifica uma proteína com basicamente duas funções distintas: aumentar a replicação viral e reduzir o

número de receptores CD4 na superfície de células infectadas (Zhou & Aiken, 2001). O gene *vif* promove a infecção de células sem vírus e a produção de novas partículas virais (Khan *et al.*, 2001). O gene *vpu*, presente somente no HIV-1, possui a função de degradação de CD4 e auxilia em um brotamento eficiente do vírus (Deora & Ratner, 2001). O gene *vpr*, por sua vez, é um fraco fator de transcrição, mas modula a transcrição da LTR do HIV-1 e a montagem do vírus (Sawaya *et al.*, 2000).

1.1.3 O ciclo de Replicação do HIV-1

A fase inicial da replicação do HIV-1 inicia-se com a ligação da proteína do envelope viral (gp120) a molécula CD4, predominantemente na superfície de linfócitos T auxiliares ou macrófagos (Klatzmann *et al.*, 1984). A ligação viral ao receptor CD4 é necessária, porém insuficiente para mediar a entrada viral. A interação entre CD4 e gp120 aumenta a afinidade do vírus para moléculas co-receptores, como os receptores de quimiocinas (CXCR4 e CCR5), 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).

Após a ligação à célula-alvo, ocorre a penetração do vírus por endocitose mediada por receptores ou pela fusão do envelope viral com a membrana celular, sendo o nucleocapsídeo liberado no citoplasma (Lifson *et al.*, 1986; Bauer *et al.*, 1987). Ainda no citoplasma, através da enzima transcriptase reversa, que utiliza um RNA transportador (tRNA) presente no vírus, como indicador, ocorre a transcrição das fitas de RNA em um filamento híbrido RNA-DNA. Posteriormente, a transcriptase reversa atua como ribonuclease H degradando a fita de RNA e, a seguir, sintetiza a fita positiva de DNA que é mantida como um complexo de nucleoproteína a qual é

transportada para o núcleo, onde pode haver integração (provírus) no genoma da célula, através da enzima integrase, ou a permanência na forma circular não integrada (Panganiban & Fiore, 1988; Figura 2).

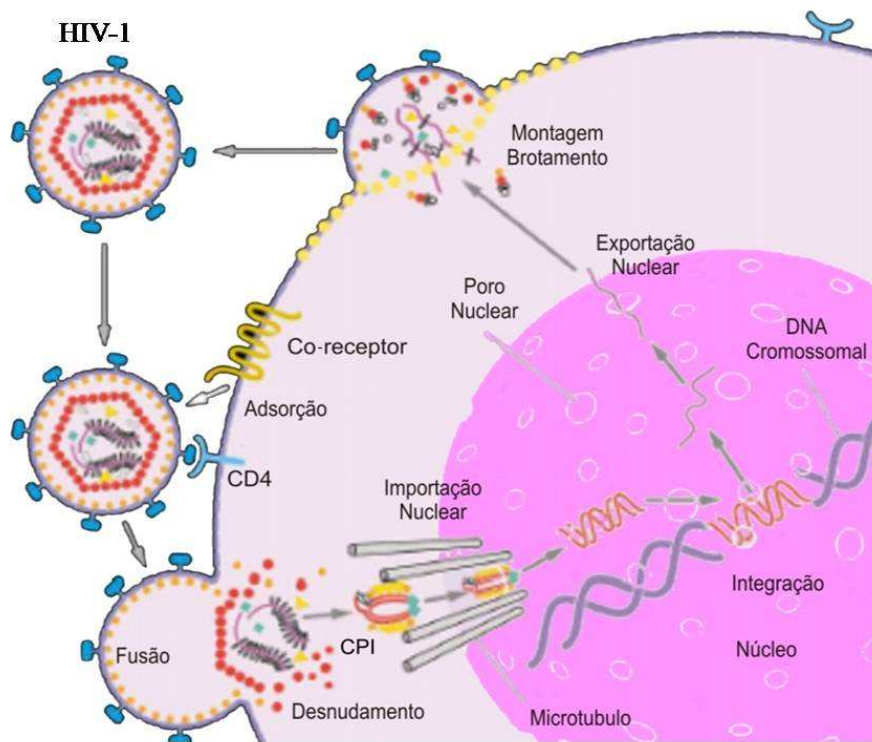


Figura 2 – Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV-1 (Adaptado de Sherman & Greene, 2002).

A fase tardia de replicação inicia-se com a ação da enzima RNA polimerase II celular, que transcreve o provírus em RNA mensageiro viral, que vai para o citoplasma. Os transcritos irão originar o RNA genômico e a síntese de proteínas da estrutura viral. As proteínas do envelope são transportadas para a membrana celular. As proteínas estruturais se reúnem no citoplasma com os RNA virais e migram para a membrana, em regiões onde há acúmulo de glicoproteínas virais, saindo da célula por brotamento. Após a liberação, a protease sofre uma autoativação, clivando as

poliproteínas, de modo que a partícula viral toma a forma característica tornando-se infecciosa (Greene, 1991).

A associação do HIV-1 a um tipo específico de receptores indica não apenas o tropismo para um determinado tipo celular, mas também tem servido como um indicador confiável de maior ou menor susceptibilidade genética do hospedeiro ao HIV-1 (Winkler *et al.*, 1998). A presença de determinadas mutações nos genes dos receptores de α e β -quimiocinas são fatores que determinam a transmissão do vírus e a progressão para o quadro de 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 Aids.

1.1.4 Patogênese da Infecção pelo HIV-1

Apesar do curso da infecção pelo HIV-1 poder variar de indivíduo para indivíduo, há um modelo comum a todos. O HIV subverte o sistema imune através da destruição de linfócitos T auxiliares, que possuem o receptor CD4 em sua membrana e que, normalmente, coordenam a resposta imune (Baggiolini & Moser, 1997).

Cerca de 50-70% dos pacientes desenvolvem uma síndrome aguda três a seis semanas após a infecção primária, caracterizada por uma alta viremia e uma diminuição no número de células CD4⁺ no sangue periférico. Durante este estágio, o HIV dissemina-se e replica-se principalmente no tecido linfóide. A viremia aguda é seguida pela resposta citotóxica que é responsável pelo controle da replicação viral. Entretanto esta resposta é inadequada para suprimir a replicação completamente, e a expressão do HIV persiste em reservatórios como linfonodo, baço, timo, medula óssea,

cérebro e trato gastro-intestinal (Pantaleo *et al.*, 1993). Os sintomas mais frequentes da fase aguda são febre, sudorese, mal estar, mialgias, anorexia, náuseas, diarreia e faringite não exsudativa, além de cefaléia, fotofobia, meningismo e exantema maculopapular (Ho *et al.*, 1985; Niu *et al.*, 1993).

Após a soroconversão, o vírus permanece no organismo, de forma ainda não totalmente conhecida, durante um período latente longo e variável, podendo permanecer assintomático por vários anos ou então manifestar sintomas pouco específicos como linfadenopatia generalizada persistente, fadiga, febre baixa, sudorese noturna, diarreia intermitente e perda de peso (Chaisson *et al.*, 2000). Outras formas de apresentação se devem a processos imunologicamente mediados, resultantes da resposta do hospedeiro à infecção viral crônica, como linfadenopatia, trombocitopenia, polineuropatias, miopatias e complexo Aids-demência (Navia *et al.*, 1986a; 1986b; Kurtzberg *et al.*, 1987; Fuller *et al.*, 1993).

O tempo de progressão da doença pode apresentar variações consideráveis. Alguns indivíduos progridem mais rapidamente que outros, e a razão da progressão depende de características do vírus como o tipo e os subtipos, e do hospedeiro como a idade e fatores genéticos. Com o avanço da infecção pelo HIV-1 e declínio da imunidade, a maior parte dos pacientes começa a apresentar sinais e sintomas clínicos de imunodeficiência (Chaisson *et al.*, 2000).

A Aids é o estágio mais avançado da doença no qual o sistema imunológico do hospedeiro infectado já não pode mais controlar a ocorrência de infecções oportunistas ou de neoplasias, que raramente acometem indivíduos imunocompetentes. As infecções oportunistas podem ocorrer em qualquer estágio da progressão da infecção pelo HIV, porém seus aspectos clínicos podem variar de acordo

com a idade, sexo, raça, localização geográfica, histórico de tratamento e comportamental (Chaisson *et al.*, 2000). A Aids de uma maneira geral, manifesta-se clinicamente como um quadro sindrômico de emagrecimento, febre, diarreia persistente, queda do estado geral associado às infecções oportunistas.

A progressão à Aids em pacientes infectados pelo HIV-1 parece estar diretamente relacionada à diminuição na contagem de linfócitos T CD4⁺ e à carga viral no plasma e nos tecidos linfóides (Graziosi *et al.*, 1998). Embora diversos fatores estejam relacionados à variabilidade na taxa de progressão da doença, a ativação do sistema imunológico é provavelmente o fator determinante mais importante (Bentwich *et al.*, 2000).

1.1.5 Resposta Imune ao HIV-1

A primeira linha de defesa que se verifica contra a infecção pelo HIV-1 é a resposta imune inata, porém o controle da infecção que inclui diminuições da carga viral e dos sintomas clínicos é alcançado com maior eficácia com a instalação de uma resposta imune específica celular e humoral, mediada principalmente por linfócitos T CD8⁺ e pela produção de anticorpos anti-HIV (Vergis & Mellors, 2000).

A infecção pelo HIV-1 induz uma intensa resposta por anticorpos a praticamente todas as proteínas reguladoras e, principalmente, estruturais do HIV-1. Alguns destes anticorpos, especialmente aqueles dirigidos frente a gp41 e ao domínio variável 3 (V3) possuem atividade de neutralização (Wyatt & Sodroski, 1998; Parren *et al.*, 1999), porém tem se observado que esta capacidade de neutralização é escassa e rapidamente o vírus desenvolve um mecanismo de escape contra estes anticorpos. Isto se deve, provavelmente, a grande variabilidade das regiões imunógenas nas

glicoproteínas virais, induzindo a produção de anticorpos sensíveis ao escape viral mediante a ocorrência de mutações nos epítomos reconhecidos. Por outro lado, os epítomos de interação com o receptor CD4 que estão muito mais conservados e seriam capazes de induzir anticorpos neutralizantes em amplo espectro só se expõe quando a proteína muda sua conformação ao se ligar a molécula CD4 (Kwong *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003).

Além da ação neutralizante direta dos anticorpos, outros mecanismos têm sido associados com a resposta humoral ao HIV-1. Anticorpos não neutralizantes podem ter um importante papel na eliminação de vírus e células infectadas mediando a ativação do sistema complemento, opsonização e fagocitose de partículas virais e Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) contra células infectadas (Huber & Trkola, 2007). Sendo assim, o papel dos anticorpos na proteção do hospedeiro é controverso. Embora uma parte destes anticorpos tenha ação neutralizante, existem anticorpos opsonizantes, que poderiam facilitar a entrada do HIV em células fagocitárias. Devido a persistência do agente infeccioso e sua variabilidade genética, o estímulo para a ativação das células B é mantida durante a evolução da infecção (Silva *et al.*, 2001).

A resposta imune celular contra o HIV-1 se fundamenta, basicamente, em 3 tipos celulares: linfócitos T auxiliares CD4⁺, linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) e células *natural killer* (NK). Entretanto, os trabalhos apontam para a predominância de uma resposta mediada principalmente pelos linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ (McMichael & Rowland-Jones, 2001).

Estudos demonstram que existe uma expansão clonal de linfócitos T CD8⁺ em pacientes soropositivos, com uma intensa atividade citotóxica tendo um

importante papel no controle da viremia e eliminação de células infectadas. A atividade destes linfócitos é direcionada contra proteínas estruturais do vírus, como proteínas do *core* viral e epítomos do envoltório, porém, esta resposta citotóxica também pode ser dirigida a partir da transcriptase reversa e de proteínas reguladoras (Starr, 2003).

Estudos apontam que do ponto de vista qualitativo, esta resposta pode reconhecer múltiplos epítomos de diferentes proteínas e, a análise do repertório dos receptores antigênicos dos linfócitos T revela um amplo espectro de reordenamentos. Entretanto, em pacientes infectados crônicos com evolução rápida da doença, verificou-se um escape viral com a geração de variantes virais incapazes de serem reconhecidas pelos linfócitos T previamente estabelecidos (Borrow *et al.*, 1997).

As células T CD8⁺ também apresentam outras funções importantes, além da atividade citotóxica. Elas podem suprimir a replicação do HIV-1 mediante a produção de quimiocinas e outros fatores (Adkinson *et al.*, 2003).

Em relação aos linfócitos T CD4⁺, estes, possuem um importante papel na resposta imune específica contra o HIV, pois são responsáveis por desencadear uma resposta imunológica mediada por linfócitos B e CTL, além de uma resposta antiviral peculiar, porém seu papel na defesa do hospedeiro ainda não está completamente esclarecido. Devido ao fato de essas células serem alvos de infecção e destruição pelo HIV, tem sido sugerido que elas são eliminadas em estágios iniciais da infecção em muitos pacientes e, assim, não poderiam contribuir substancialmente para as defesas do hospedeiro (Rosenberg *et al.*, 1997).

Existem numerosos fatores solúveis que são ativos frente a infecção pelo HIV-1 como proteínas do complemento e diversas citocinas. Entre estas estão citocinas do tipo 1 como a interleucina 2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-

β (TNF- β) que ativam macrófagos e são responsáveis pela imunidade mediada dependente de fagócitos e do tipo 2 como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), que são responsáveis por efetiva indução da produção de anticorpos e uma resposta protetora independente de fagócitos (Borkow & Bentwich, 2004).

1.2 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro contra os agentes infecciosos (Fearon & Lockley, 1996). Há 550 milhões de anos atrás, elementos chaves do sistema imune inato, estavam se desenvolvendo em invertebrados primários como tunicados, esponjas e ouriços do mar (Flajnick, 1998). O reconhecimento pelo sistema imune inato depende da detecção de padrões repetidos de moléculas, como o lipopolissacarídeo, os glicanos e em muitos casos o reconhecimento de moléculas de carboidratos presentes em diversos microrganismos. As células e as proteínas do sistema imune inato devem então demonstrar uma cinética de resposta rápida para efetuar a eliminação do patógeno (Janeway, 1992). O sistema imune adaptativo, por sua vez, possui sistemas de alta especificidade no reconhecimento de antígenos que atuam na geração de respostas específicas contra os agentes infecciosos, porém, sempre que a resposta imune adaptativa é imatura ou comprometida, os elementos do sistema inato emergem como a principal defesa contra a infecção (Borregard *et al.*, 2000).

A MBL tem um papel central na resposta imune inata, pois se liga a estruturas de diversos carboidratos presentes em vários agentes infecciosos levando a opsonofagocitose direta ou ativa a via do complemento da lectina culminando com a

formação do complexo de ataque a membrana levando a lise do patógeno (Dumestre-Perard *et al.*, 2002). O envolvimento da MBL como primeira linha de defesa do hospedeiro foi indicado por Miller *et al.* (1968), através de achados em crianças que sofriam com infecções recorrentes do trato respiratório superior e diarreia. Posteriormente, um estudo *in vitro* usando *Saccharomyces cerevisiae* revelou um defeito de opsonização no soro destes indivíduos indicando, assim, uma deficiência de algum fator plasmático.

A MBL é sintetizada principalmente pelos hepatócitos no fígado, porém estudos em camundongos demonstraram que esta proteína também pode ser sintetizada em outros órgãos como: cérebro, baço, rins e coração (Dumestre-Perard *et al.*, 2002).

Existem dois genes *MBL* humanos, o *MBL-1* é um pseudogene e somente o *MBL-2* codifica a proteína final. O gene codificador da MBL se localiza no cromossomo 10 humano na posição q11.2-q21 (Sastry *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989) e a presença de polimorfismos na região promotora e no éxon 1 do gene resulta em variações consideráveis dos níveis plasmáticos da proteína (Garred *et al.*, 1999a).

1.2.1 Estrutura e Função da MBL

A MBL é uma proteína de fase aguda que pertence à família das Colectinas. Esta família é caracterizada por proteínas que contém uma região colagenosa e um domínio de lectina ligante de carboidrato (Holmskov *et al.*, 2003). Em humanos, além da MBL, são conhecidos também outros membros deste grupo como as proteínas sulfatantes do pulmão (SP-A e SP-D) e a CL-L1 que se localiza no citosol de hepatócitos (Hakansson & Reid, 2000) e duas colectinas do plasma bovino, a congulinina e a CL-43 (Loveless *et al.*, 1995).

Proteínas da família das colectinas são compostas por subunidades de 96 KDa formadas a partir de três cadeias polipeptídicas de 32 KDa. Estas subunidades, por sua vez, irão se agrupar em oligômeros (tetrâmeros, pentâmeros ou hexâmeros) que quando visualizados ao microscópio eletrônico aparentam as formas de “bouquet” ou de flecha. Cada cadeia polipeptídica possui 248 aminoácidos e é composta de quatro regiões: uma região N-terminal com ligações cruzadas (*cross-linking*) contendo dois ou três resíduos de cisteínas, seguidas por uma região variável similar ao colágeno que contém 19 repetições Gly-Xaa-Yaa (*collagen-Like*), uma região de flexão (*neck-region*) e uma região de lectina C-terminal dependente de cálcio, também denominado de domínio de reconhecimento de carboidrato-CRD (Taylor *et al.*, 1989; Petersen *et al.*, 2001; Figura 3).

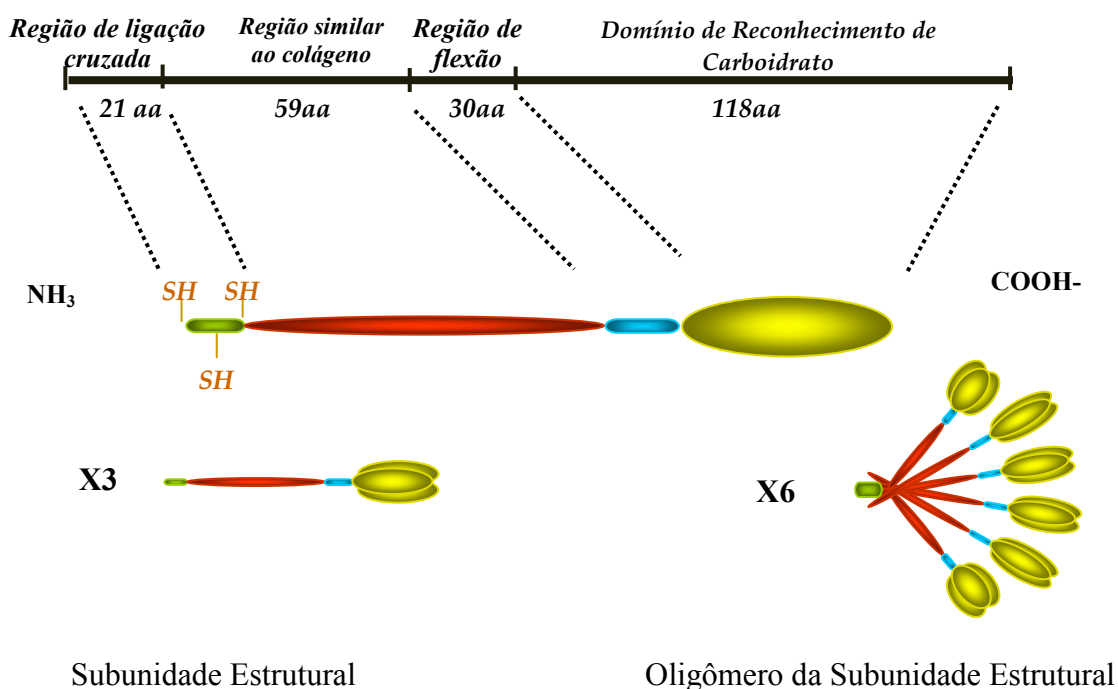


Figura 3- Estrutura da cadeia polipeptídica da MBL madura (adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

A região similar 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 pescoço 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 interações hidrofóbicas e ligações dissulfídicas entre as cadeias na região de ligação cruzada N-terminal (Wallis & Drickamer, 1999; Petersen *et al.*, 2001).

A MBL tem a capacidade de se ligar a diversos resíduos de monossacarídeos, como: *N*-acetilglucosamina, manose, *N*-acetilmanoseamina, L-fucose, e glucose, não se ligando a galactose. A constante de dissociação da interação entre um CRD e um carboidrato é muito fraca (10^{-3} M) (Lobst *et al.*, 1994). Entretanto, múltiplos CRD estão presentes na estrutura quaternária da molécula MBL, permitindo uma elevada concentração de carboidratos (Sheriff *et al.*, 1994).

A MBL possui a capacidade de se ligar a diversos patógenos que exibem nas suas membranas moléculas repetidas de carboidratos (Holmskov *et al.*, 1994; Neth *et al.*, 2000), entretanto, em condições fisiológicas normais, a MBL não se liga a superfície das células do hospedeiro (Lee *et al.*, 1992). Isso se deve em razão: (i) da presença de ácido siálico na terminação dos resíduos de glicanos da superfície celular ou (ii) da falta de estruturas repetitivas de carboidratos na superfície de células animais, porém, transformações malignas e algumas infecções virais modificam a estrutura de oligossacarídeos da superfície celular, assim algumas células tumorais e glicoproteínas virais expressas na membrana da célula têm demonstrado se fixarem à MBL (Fujita *et al.*, 1995; Yong *et al.*, 1999).

Um trabalho realizado por Falzacappa *et al.* (2004) analisou a evolução do gene *MBL* através do seu seqüenciamento em 12 primatas não humanos, comparando-as com a seqüência humana. A região similar ao colágeno apresentou-se altamente conservada entre as espécies não humanas com níveis de similaridade de 95-100% com a seqüência humana. Esta conservação pode ser atribuída ao fato desta região da molécula contribuir diretamente para a oligomerização e interação com as proteases serinas associadas a MBL (MASP). Entretanto, a análise da seqüência nucleotídica do domínio C-terminal evidenciou mutações grupo-específicas, com níveis de similaridade de 79,7% em algumas espécies, levando à substituições de aminoácidos. Estas substituições podem ser explicadas pela adaptação na exposição a diferentes patógenos para diferentes primatas.

Sendo assim, a partir das análises nucleotídicas, os autores do trabalho chegaram à conclusão de que existe uma alta conservação da molécula em concordância com o seu importante papel no sistema imune.

1.2.2 Polimorfismos no Éxon 1 do Gene *MBL*

Os níveis da MBL na circulação sangüínea são bastante estáveis (Nielsen *et al.*, 1995), apesar de se observar que estes níveis podem variar muito individualmente ou entre indivíduos de diferentes etnias, podendo obter valores de 50 ng/mL até acima de 3 µg/mL. Esta ampla variação é decorrente da existência de vários polimorfismos no éxon 1 e na região promotora. Esses polimorfismos resultam em um número diferente de genótipos, alguns dos quais estão associados com o decréscimo do nível de MBL (Steffensen *et al.*, 2000).

O éxon 1 do gene *MBL* contém três polimorfismos pontuais de nucleotídeos (SNP) nos códons 52, 54 e 57. No códon 52 ocorre a troca de uma citosina por uma timina (CGT para TGT) conferindo a mudança de uma arginina por uma cisteína na posição 32 da proteína madura. A presença deste resíduo adicional de cisteína rompe a formação do oligômero pela geração de pontes dissulfídricas aberrantes envolvendo o resíduo de cisteína introduzido (Wallis & Cheng, 1999).

Nos códons 54 e 57 ocorre a troca de uma guanina por uma adenina (GGC para GAC) e (GGA para GAA), respectivamente. Estas mudanças levam a troca de uma glicina por ácido aspártico e de uma 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, causando uma incorreta associação das subunidades, levando a baixos níveis circulantes da proteína, além disso, estas modificações na região de colágeno ocasionam em interações defeituosas com as MASP, que são importantes na clivagem dos componentes do complemento, levando assim a uma falha na sua ativação (Turner & Hamvas, 2000; Figura 4).

As baixas quantidades de MBL encontrado na circulação de indivíduos homozigotos para qualquer uma destas três mutações, ou pela combinação entre elas, são predominantemente compostas por moléculas de baixo peso molecular. Heterozigotos produzem primariamente a 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 alélica destes polimorfismos apresenta grandes variações entre os grupos étnicos. O alelo *B* é comum em populações europeias e asiáticas, enquanto que o alelo *C* é mais freqüente em populações sub-saharianas. O alelo *D* está presente em todas estas populações (Garcia-Laorden *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001).

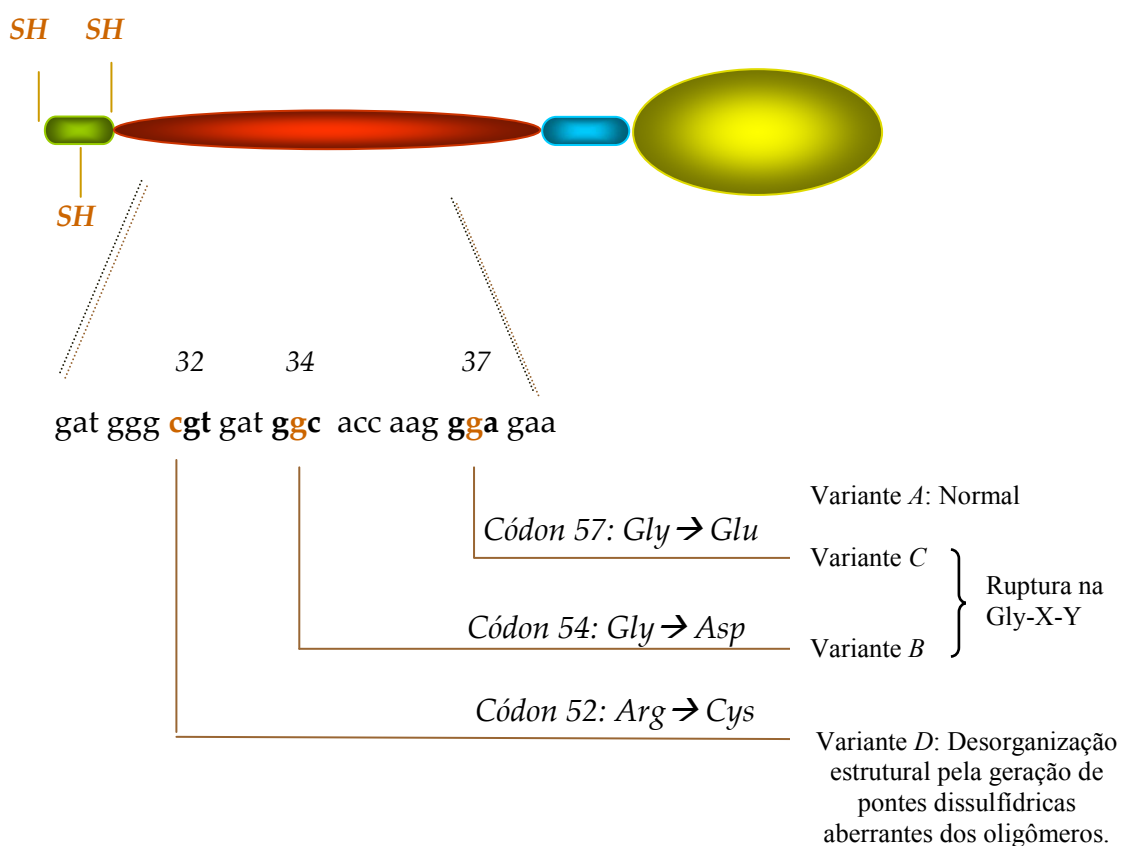


Figura 4 - Esquema demonstrando três mutações no éxon 1 do gene da MBL que geram três substituições de aminoácidos na região colagenosa (Adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

1.2.3 Polimorfismos na região promotora do gene *MBL*

Diversos estudos investigam a grande variação interindividual nos níveis sorológicos da MBL, sendo sugerido que estes níveis também são modulados em nível de transcrição (Madsen *et al.*, 1995). Em adição aos três SNP no éxon 1, existem outros polimorfismos localizados na região promotora do gene. Substituições nucleotídicas localizadas nas posições -550 (G para C) e -221 (G para C) originam as variantes H(G)/L(C) e Y(G)/X(C), respectivamente. Outra substituição (C para T) na região 5' não traduzida do éxon 1 (posição +4) origina a variante P(C)/Q(T). Devido o desequilíbrio de ligação entre algumas das variantes, apenas sete haplótipos de MBL (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC E LYPD) foram identificados (Madsen *et al.*, 1998; Figura 5). Em adição, o haplótipo HXPA foi relatado como ocorrido em três pacientes com Lupus Eritematoso sistêmico (LES) (Sullivan *et al.*, 1996). Os haplótipos HYA, LYA e LXA estão associados com altos, médios e baixos níveis sorológicos da MBL, respectivamente (Garred *et al.*, 2003). Particularmente, a presença do alelo *X* em combinação com o alelo estrutural do tipo selvagem (alelo *A*) tem um importante efeito inibitório nos níveis sorológicos da MBL (*down-regulation*) (Petersen *et al.*, 2001; Garred *et al.*, 2003).

As frequências dos sete haplótipos variam consideravelmente entre as populações, refletindo as épocas em que as mutações surgiram, a história das migrações humanas e as pressões seletivas do meio ambiente que estariam agindo no genoma humano (Madsen *et al.*, 1995; Figura 6).

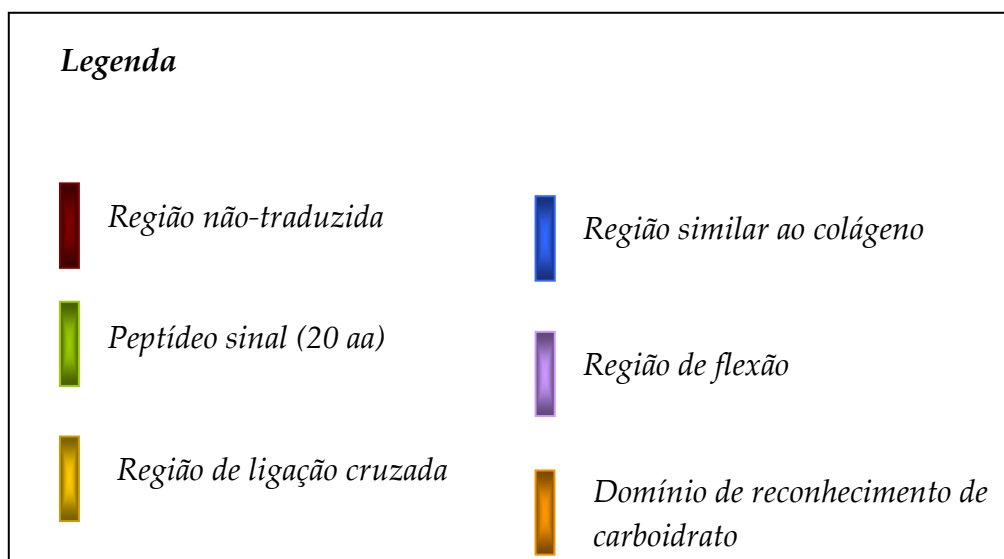
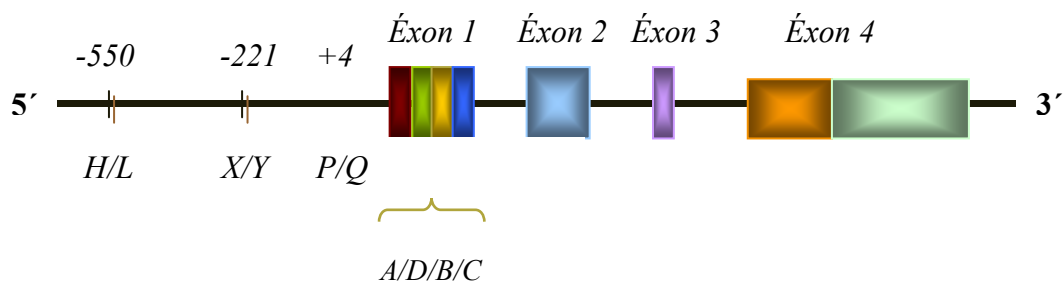


Figura 5 – Representação esquemática do gene *MBL* demonstrando a ocorrência das mutações estruturais no éxon 1 e funcionais na região promotora do gene (Adaptado de Kilpatrick *et al.*, 2002).

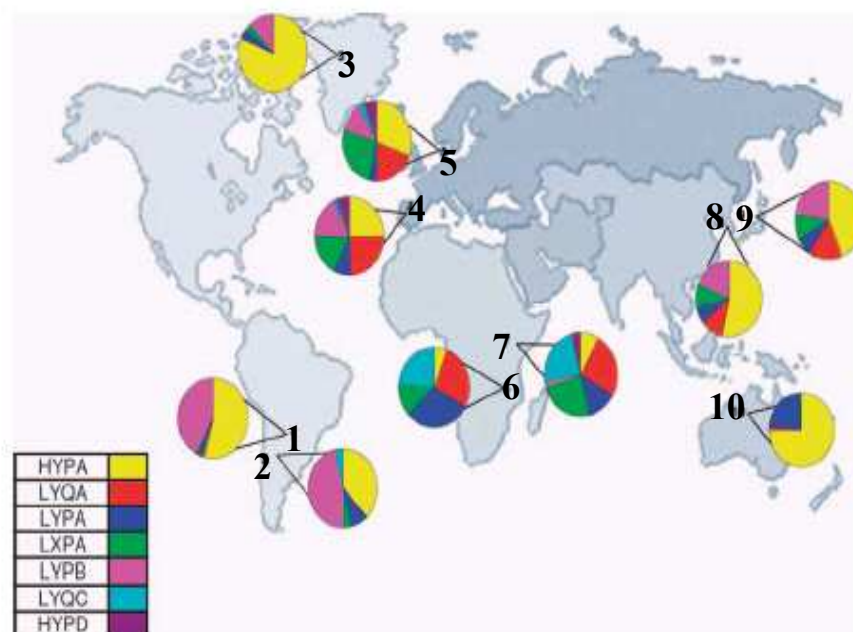


Figura 6 – Distribuição geográfica dos Haplótipos do gene *MBL* (Adaptado de Dommet *et al.*, 2006). Legenda: 1-Chiriguanos, Argentina; 2-Mapuche, Argentina; 3-Esquimós, Groelândia; 4- caucasianos, Espanha; 5-caucasianos, Dinamarca; 6-Moçambique; 7- Quênia; 8-Korea; 9-Japão; 10-Austrália.

1.2.4 Níveis Séricos da Lectina Ligadora de Manose

Os níveis plasmáticos médios de MBL em caucasóides britânicos foram relatados ser de 1.630 ng/mL em homozigotos para o alelo normal, 358 ng/mL em heterozigotos para a mutação no códon 54 e aproximadamente 10 ng/mL em homozigotos para a mutação neste mesmo códon (Lipscombe *et al.*, 1992). Outro estudo realizado na população caucasóide Dinamarquesa foi relatado ser de 1,2 µg/mL a média sérica de MBL em indivíduos homozigotos para o alelo normal (Garred *et al.*, 1992b); contudo, os níveis variam de 0 a 5 µg/mL, No mesmo estudo, o nível médio em indivíduos heterozigotos para a mutação no códon 54 foi de 0,2 µg/mL (0-1,2 µg/mL).

Esta grande variação entre indivíduos com estrutura haplotípica idêntica pode, em parte, ser atribuída à presença de mutações na região promotora. Interessantemente, foi demonstrado que o haplótipo LX tem um efeito dominante nos níveis de MBL e, conseqüentemente, indivíduos homocigotos com haplótipo LXA mostraram um nível médio de MBL circulante comparável aquele do genótipo com duas mutações estruturais (Madsen *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 2000).

Utiliza-se o termo “deficiência de MBL” para se referir à concentração muito baixa de MBL para opsonizar leveduras em ensaios funcionais. Este nível foi relatado em 5-10% de adultos saudáveis e corresponde aos níveis gravimétricos de <0,1 µg/mL (Madsen *et al.*, 1994). A deficiência tem sido definida como posse de alótipos associados aos baixos níveis de MBL. Esta definição aplica-se a, aproximadamente, 40% da população e corresponde a menos de 0,6 µg/mL (Kilpatrick, 2002).

A MBL, além de ser uma proteína do sistema imune inato, possui a característica de um elemento de resposta inflamatória de fase aguda, semelhante a proteína C-reativa que também é uma proteína sintetizada pelas células do fígado e que se eleva à medida que o processo inflamatório se torna mais intenso (Ezekowitz *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989).

Existem diversos estudos apontando um papel complexo da MBL na inflamação. Dados experimentais estão provando que o efeito da MBL na produção de citocinas é dependente de suas concentrações. Quando concentrações aumentadas de MBL são adicionadas ao sangue total, ocorre um aumento inicial na produção de citocinas por monócitos, principalmente de IL-1β, IL-6 e TNF-α, porém em altas concentrações de MBL (>4 µg/mL), a produção de TNF-α, IL-6 e IL-1β é suprimida (Jack *et al.*, 2001b). Existe um equilíbrio entre o padrão de produção de citocinas pró-

inflamatórias em resposta a um estímulo inicial e uma resposta compensatória anti-inflamatória com o aumento na concentração da MBL. A supressão de citocinas pró-inflamatórias provavelmente estaria ocorrendo devido a MBL estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Sprong *et al.*, 2004).

Atualmente, diversos estudos estão sendo realizados com a finalidade de implementar uma forma terapêutica de reposição dos níveis plasmáticos normais da MBL. Infusões plasmáticas da proteína recombinante foram realizadas em dois pacientes, um adulto e uma criança, com casos de infecções recorrentes. A atividade de opsonização foi recuperada e as infusões foram bem toleradas, com uma meia vida estimada de 5-7 dias e não foram formados anticorpos anti-MBL. Após 6 infusões ocorreram grandes reduções nos episódios de infecção (Valdimarsson *et al.*, 1998).

1.2.5 Proteases Serinas associadas a MBL (MASP)

Oligômeros da MBL circulam em complexos funcionais com três proteases serinas: MASP-1, MASP-2 e MASP-3 e outra proteína de menor peso molecular sem função proteolítica denominada Map19 ou peptídeo menor associado a MBL (MAP).

As proteases serinas da via MBL são proteases moduladores com uma composição do domínio catalítico idêntica ao dos elementos C1r e C1s da via clássica do complemento (Takayama *et al.*, 1994, Thiel *et al.*, 1997).

Inicialmente foi mostrado que a MBL purificada a partir de soro de camundongos, de ratos, de coelhos e de humanos 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 C1_r2C1_s2 da via clássica (Ikeda *et al.*, 1987). Usando diferentes sistemas *in vitro*, foi mostrado que a MBL humana purificada poderia ligar-se e facilitar a ativação de C1_r2C1_s2 (Lu *et al.*, 1990; Ohta *et al.*, 1990). Entretanto, análises posteriores de preparações de MBL de humanos e camundongos revelaram a presença de uma protease serina específica, que necessita de um substrato específico, tal como a 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 a MBL. Com a identificação da MASP-2, foi revelado que o C4 é clivado por ação da MASP-2 e não da MASP-1. Estudos posteriores mostraram claramente que MASP-2 cliva C4 e C2, desse modo gerando C3 convertase-C4b2a (Vorup-Jensen *et al.*, 2000).

A MASP-2 e a Map19 são produtos do mesmo gene, localizado no cromossomo 1, porém ainda não se conhece uma função fisiológica da Map19 (Takahashi *et al.*, 1999).

Stengaard-Pedersen *et al.* (2003) reportaram o primeiro caso identificado de deficiência na MASP-2. Análises funcionais na habilidade da MBL em ativar o complemento foram realizadas em pacientes suspeitos de imunodeficiência. Em um deles, foram verificadas as ausências de MASP-2 e Map19 no plasma e análises genéticas indicaram que o paciente era homozigoto para uma mutação pontual no éxon 3 do respectivo gene (D105G). Clinicamente, o paciente sofria com infecções

recorrentes e sintomas de auto-imunidade. Posteriormente, a frequência desta mutação foi estimada em um número pequeno de populações com valores de 1,3% a 6,3%.

Além da Protease serina 2, existem as MASP-1 e MASP-3, ambas codificadas pelo mesmo gene localizado no cromossomo 3. A MASP-1 tem a capacidade de clivar tanto C3 quanto C2 da cascata do complemento (Matsushita *et al.*, 2000). A MASP-3 ainda não possui papel fisiológico determinado.

1.3 MBL E SUA ASSOCIAÇÃO COM AS DOENÇAS

A significância imunológica na deficiência da MBL foi inicialmente estabelecida em crianças (Super *et al.*, 1989), porém existem atualmente numerosos estudos indicando um papel desta lectina em adultos, corroborando a noção de que esta proteína pode ser considerada um fator humoral com papel crítico na defesa imune do hospedeiro. Vários estudos têm explorado este papel da MBL em relação à aquisição de organismos infecciosos (susceptibilidade) e ao curso clínico de diversas doenças (severidade).

Foi mostrado que 90% dos indivíduos com deficiência de MBL não adquirem infecções repetidas. Isto é, provavelmente, devido à redundância 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) encontraram que a deficiência de MBL em crianças com infecções periódicas têm coincidido com deficiência de subclasses de IgG.

Até agora a correlação entre deficiência da MBL e a suscetibilidade para a infecção foi avaliada a partir de um valor arbitrário para deficiência (normalmente

pelo baixo nível de detecção nos testes usados). Não há nenhum dado clínico que apóie esta definição de deficiências de MBL associada a um aumento de suscetibilidade para diferentes doenças. Outros trabalhos avaliam a frequência dos alelos variantes da MBL em estudos de caso controle (Garred *et al.*, 1997). 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).

Diversos estudos têm analisado a relação da MBL com indivíduos que possuem imunodeficiências adquiridas. Peterslund *et al* (2001), analisaram quadros de ocorrência de infecções severas em pacientes que realizaram quimioterapia. Em contraste, alguns estudos têm demonstrado uma relação inversa da MBL com casos de transplantes de órgãos. Foi demonstrado que a ativação e a deposição do sistema complemento no endotélio vascular de órgãos transplantados ocasionam em processos isquêmicos que levam a danos teciduais e a ativação do complemento, via Lectina, tem sido demonstrada, indicando que a inibição da mesma poderia ser um novo caminho para a redução destas injúrias no órgão (Collard *et al.*, 2000, 2001).

Atualmente, diversos estudos também vêm pesquisando uma possível relação do sistema imune inato com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Tem sido demonstrado um papel da MBL em facilitar a eliminação de células apoptóticas *in vitro* (Ogden *et al.*, 2001; Nauta *et al.*, 2004). Estudos relatam que células em estado de apoptose aumentam a expressão de fucose e *N*-acetilglucosamina em suas membranas possibilitando que a Lectina ligue-se a estes carboidratos facilitando a eliminação destas células (Ogden *et al.*, 2001). As variantes alélicas da MBL têm sido fortemente relacionadas como fatores de risco para o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (Lee *et al.*, 2005) e artrite reumatóide (Sato *et al.*, 1997).

Diversos estudos têm mostrado que a MBL se liga a uma ampla variedade de microorganismos (Neth *et al.*, 2000; Bathum *et al.*, 2005), tais como: *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vírus da hepatite C* (HCV), *Candida albicans* e outros.

Alguns microorganismos apresentam substratos ideais para a ligação da MBL, conseqüentemente, um maior poder de afinidade e ativação do complemento. Kuipers *et al.* (2003), identificaram que os níveis de fixação da MBL com diferentes microorganismos podem variar desde níveis fortes de avidéz, como no caso de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, passando por níveis de baixa avidéz como *Saccharomyces cerevisiae*, que necessita de uma grande concentração para ativação, até *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pneumoniae* que não possui qualquer poder de avidéz ou ativação.

Este espectro de opsonização mediada pela MBL pode ser mediado pela presença de componentes da superfície microbiana como, por exemplo, em bactérias que podem apresentar lipopolissacarídeos (LPS), ácidos lipoteicóicos e outros. Cepas de *N. meningitidis* que apresentam LPS com resíduos de ácido siálico apresentam ligações fracas com a MBL ou até mesmo ausentes. Enquanto que cepas com LPS não sializados apresentam alta avidéz com a Lectina Ligadora de Manose (Jack *et al.*, 2001).

Devido à preservação global de haplótipos polimórficos em diferentes populações, especula-se que níveis sorológicos baixos da MBL podem conferir alguma vantagem biológica. Uma hipótese sugere que baixos níveis podem conferir vantagem seletiva contra infecção por patógenos intracelulares, como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, que pode usar a opsonização mediada pelo complemento

para infectar células do hospedeiro (Garred *et al.*, 1994; Ezekowitz, 2003; Casanova & Abel, 2004). Em um estudo envolvendo uma população negra sul-africana, o alelo *B* foi associado com a proteção contra tuberculose pulmonar e meningite tuberculosa (Hoan-Van Helden *et al.*, 1999). Similarmente, em Gâmbia, onde o alelo *D* é um dos mais prevalentes, verificou-se que pacientes com tuberculose apresentavam uma menor frequência deste gene mutante (Bellamy *et al.*, 1998).

Um outro estudo realizado por Santos *et al.* (2007), verificou que níveis séricos elevados estavam mais relacionados com pacientes que tinham leishmaniose visceral do que os controles sadios.

Os protozoários também estão incluídos na ampla diversidade de microrganismos que se ligam a MBL, dentre os muitos, estão: a *Leishmania major*, a *Leishmania mexicana*, *Cryptosporidium parvum* e *Plasmodium falciparum* (Garred *et al.*, 1994). Um estudo realizado por Kelly *et al.* (2000) evidenciou que os indivíduos homocigotos para o alelo *B* apresentavam um risco elevado de desenvolver criptosporidiose, tendo sido encontrada uma associação dependente da concentração da MBL com a presença de esporozoítas. Em pacientes HIV infectados, aqueles que eram homocigotos para este alelo tinham maior probabilidade de desenvolver criptosporidiose.

Foi verificada uma frequência maior de mutações estruturais no gene *MBL* em crianças hospitalizadas no Gabão, África, que apresentavam quadros de malária severa por *Plasmodium falciparum* do que aquelas que manifestaram a forma branda da doença (Luty *et al.*, 1998). Em outro estudo conduzido por Klabunde *et al.* (2002), foi evidenciado que apesar de existir uma interação entre a MBL e as proteínas

de eritrócitos infectados com o *P. falciparum*, esta não era capaz de inibir o desenvolvimento do agente infeccioso.

A manose é um dos principais constituintes da parede das células fúngicas, promovendo uma alta avidéz da MBL a diversas espécies, como por exemplo: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (Neth *et al.*, 2000; Cross *et al.*, 1995; Jack *et al.*, 2001). Aspergilose pulmonar necrótica crônica, que é uma rara infecção progressiva em indivíduos sem imunodeficiência perceptível, foi associada com os polimorfismos do gene *MBL*. Verificou-se um aumento significativo da presença do alelo *D* quando comparado com os controles saudáveis, conseqüentemente, embora o alelo *D* possa estar diretamente associado com a aspergilose pulmonar, pode também ser um marcador de fatores associados à susceptibilidade à doença, tais como mutações nos genes próximos às outras colectinas, como as proteínas A e D surfactantes do pulmão (Crosdale *et al.*, 2001). A fagocitose de *C. albicans* é aumentada pela presença de TNF. Foi verificado que a secreção desta citocina por monócitos humanos estimulados por *C. albicans* é aumentada por MBL de uma maneira dose dependente (Ghezzi *et al.*, 1998).

Em relação às infecções virais, diversos estudos têm relatado uma progressão da hepatite B e C associada à insuficiência da MBL, e um aumento na taxa de sobrevivência quando relacionada à pacientes com o haplótipo HH da região promotora, em estudos envolvendo pacientes asiáticos (Sasaki *et al.*, 2000; Hakoziaki *et al.*, 2002). Em 2005, Thio *et al.* publicaram resultados de um estudo com 527 pacientes que obtiveram recuperação natural da hepatite B ou então que persistiram com a infecção. Os indivíduos com genótipos relacionados com altos níveis de MBL estavam

associados com a cura natural da infecção, enquanto que aqueles correlacionados com baixos níveis da proteína estavam associados com a persistência do vírus.

1.4 PAPEL DA MBL NA INFECÇÃO PELO HIV-1

O papel da MBL na infecção pelo HIV-1 tem sido bastante estudado nos últimos anos, e diversos estudos clínicos, importantes, têm mostrado que os níveis de MBL podem influenciar na suscetibilidade e severidade à doença (Kilpatrick, 2002).

A primeira descrição da interação entre a MBL e o HIV foi realizada em um estudo *in vitro*. Este modelo mostrou que a infecção de linfócitos T CD4⁺ pelo HIV-1 poderia ser inibida parcialmente (25%) por concentração fisiológica da MBL (1 µg/mL), enquanto que 100% de inibição foi vista em concentrações de 50 µg/mL (Ezekowitz *et al.*, 1989). Além disso, os autores confirmaram, através de ensaios enzimáticos, que a glicoproteína de superfície (gp120) era rica em oligossacarídeos, entre eles, a manose, que interagia com a MBL. Esta interação foi confirmada por Haurum *et al.* (1993) que também mostraram que o sistema complemento podia ser ativado pela 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 poderia promover a eliminação do vírus, mas, por outro lado, poderia mediar (ii) uma adsorção do vírus independentemente de CD4, em células que expressam receptores do complemento.

Quando as partículas do HIV-1 atravessam a membrana celular durante o brotamento, elas levam consigo não somente as glicoproteínas de superfície (gp120 e gp41), mas também moléculas próprias da célula hospedeira como o Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I (MHC-I) e Classe II (MHC-II) e

moléculas de adesão (Fortin *et al.*, 1998). Algumas dessas moléculas são glicosiladas contendo grandes quantidades de glicanos de manose o que pode dificultar no reconhecimento e na resposta por anticorpos, por outro lado, fornecem potentes sítios de ataque através do sistema imune inato (Hart *et al.*, 2002).

Saifuddin *et al.* (2000), produziram partículas que não continham em sua superfície as glicoproteínas (gp120 e gp41) e comparou com aquelas que possuíam ambas as proteínas. Aproximadamente 5 vezes mais partículas virais se ligaram a MBL quando as glicoproteínas estavam presentes, sugerindo que os carboidratos importantes para a ligação com a MBL eram expressos em gp120 e gp41.

A gp120 é altamente glicosilada com metade de seu peso molecular de 120 kDa consistindo de glicanos. Em contraste, há apenas quatro ou cinco potenciais sítios de carboidratos na gp41, nos quais são preservados os sítios de glicosilação em diferentes cepas de HIV-1 isoladas, mesmo sendo uma região hipervariável como certas regiões da gp120 (Ji *et al.*, 2005).

Uma lectina do tipo C presente em células dendríticas, chamada de molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica (DC-SIGN) tem sido associada com um tipo de infecção chamada “trans” infecção, onde o vírus se liga a esta molécula e após sua entrada pode ser transferido a células T que interagem com células dendríticas. Estudos recentes *in vitro* têm demonstrado que a MBL tem a capacidade de se ligar a DC-SIGN e quando em níveis normais acaba bloqueando a infecção de células T mediada por células dendríticas (Spear *et al.*, 2003; Ying *et al.*, 2004).

Existem várias evidências da inibição dos glicanos ligados a gp120 na resposta imune adaptativa ao HIV-1. Recentemente, um estudo por Wei *et al.* (2003) mostrou que em pacientes infectados com o HIV-1, os anticorpos capazes de neutralizar

o vírus surgem, mas o HIV-1 rapidamente evolui para escapar da neutralização, primariamente pela mutação dos sítios ligados a glicosilação. Estudos com modelos de macacos infectados com o HIV-1 apóiam a idéia de que glicanos são importantes no escape do vírus à neutralização por anticorpos (Reitter *et al.*, 1998).

Dados recentes indicam que MBL opsoniza o HIV-1, porém não possui um efeito de neutralização. A possível explicação para a ligação da MBL ao HIV-1, mas sem neutralização, é que a MBL, se liga a múltiplos sítios em múltiplas moléculas de gp120 ou mesmo em vários trimeros de gp120 com avidéz suficiente para permanecer associado ao vírus durante a opsonização ou captura do vírus. Entretanto, quando o vírus entra em contato com a célula alvo, a ligação da MBL, por ser de baixa afinidade é incapaz de bloquear, efetivamente, a interação da gp120 com a molécula CD4. Isso significa que a MBL pode ligar-se ao sítio de ligação da gp120 sem obscurecer o sítio de ligação de CD4 ou interferir com as mudanças conformáticas que ocorrem na interação da gp120 com os receptores de quimiocina (Ji *et al.*, 2005).

Um estudo conduzido por Poignard *et al.* (2003) sugeriu uma outra possível explicação para a ligação e opsonização, mas ineficiente neutralização da MBL. Este estudo indicou que na superfície do HIV-1 existem duas formas da gp120. Uma forma é relativamente acessível a anticorpos, mas não é funcional, enquanto a outra forma é menos acessível e funcional durante a infecção. Portanto, é possível que a MBL se ligue à forma não funcional da gp120 do vírus.

Garred *et al.* (1997) determinaram os genótipos para MBL em 96 homens homossexuais infectados pelo HIV-1, sendo encontrado uma porcentagem de 8% (8/96) homozigotos para alelos mutantes comparados com apenas 0.8% (1/123) no grupo controle. Além disso, entre os indivíduos que manifestaram a Aids, aqueles que

portavam os alelos variantes apresentaram um tempo de sobrevivência relativamente menor. Nenhuma associação significativa foi observada entre os genótipos da MBL e a detecção de anticorpos anti-HIV e a progressão para a Aids. Estes resultados foram concordantes com um estudo anterior. Nielsen *et al.* (1995) determinaram o nível de MBL circulante em 80 indivíduos infectados pelo HIV-1, em 10% dos pacientes (8/80) foram detectados baixos níveis da MBL – abaixo do limite de detecção do teste - com uma frequência significativamente maior que no grupo controle (3/123; 2,4%). Um aumento na frequência da deficiência dos níveis de MBL em pacientes HIV-1 soropositivos, também foi encontrado em africanos sub-Saharianos (Garred *et al.*, 1997b) e em húngaros (Prohaszka *et al.*, 1997). Outros estudos não detectaram qualquer aumento significativo da deficiência por MBL em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Senaldi *et al.*, 1999).

Outro estudo mais recente realizado por Vallinoto *et al.* (2006) verificou que a prevalência do genótipo *BB* foi seis vezes maior no grupo de indivíduos HIV infectados do que no de soronegativos, e que este genótipo estava associado, também, com um aumento significativo da carga viral e uma menor contagem de linfócitos T CD4⁺, evidenciando assim uma relação entre a presença de alelos mutantes e a progressão da doença.

Porém, outro estudo, realizado na Espanha, verificou que a frequência de genótipos que possuíam alelos mutantes era maior nos indivíduos saudáveis quando comparado ao grupo de pacientes portadores do HIV, sugerindo que estes genótipos não seriam um fator de risco para a infecção pelo HIV na sua população e sim um fator de proteção contra esta infecção (Garcia-Laorden *et al.*, 2006).

Devido a aparente reatividade universal com as cepas do HIV, a MBL representa claramente um importante mecanismo para o reconhecimento do HIV pelo sistema imune. Entretanto, a influência da MBL na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, na progressão da infecção e no desenvolvimento da síndrome, permanece controversa. As razões para estas controvérsias poderiam ser as diferenças nas populações estudadas e nos métodos utilizados, incluindo, por exemplo, as definições de progressão clínica da doença, métodos de quantificação da MBL e entre outros. Além disso, sabe-se que outros polimorfismos podem influenciar diretamente na susceptibilidade e progressão da doença, como os haplótipos de HLA e mutações nos genes codificadores de citocinas.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Investigar possíveis associações entre os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* e a infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana 1* (HIV-1) e destes com a Aids.

1.5.2 Objetivos Específicos

i) Descrever as freqüências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* na população de pacientes com Aids e em indivíduos portadores assintomáticos da infecção pelo HIV-1;

ii) Descrever as freqüências das mutações no éxon 1 do gene *MBL* em uma população controle de indivíduos não portadores da infecção pelo HIV-1 e em uma população controle de alto risco também composta de indivíduos soronegativos para a infecção;

iii) Avaliar a ocorrência de associação entre os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* e a presença de co-infecções virais e bacterianas nos pacientes com Aids;

iv) Investigar possíveis associações entre a freqüência dos polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL* com informações clínicas obtidas nos prontuários dos pacientes com Aids;

v) Investigar possíveis associações entre a freqüência dos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* com a contagem de linfócitos TCD4⁺ e carga viral plasmática em indivíduos portadores assintomáticos da infecção pelo HIV-1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO E COLETA DA AMOSTRA

2.1.1 Pacientes com Aids

O presente trabalho constitui-se em um estudo transversal onde foi avaliado o perfil genético de 128 pacientes com quadro de Aids, maiores de 18 anos, diagnosticados de acordo com a classificação do CDC (*Centers for Disease Control and Prevetion*), de ambos os sexos, residentes no Estado do Pará, atendidos e internados no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB), localizado na região metropolitana de Belém. As amostras de sangue (5 ml) foram coletadas durante o ano de 2006, por meio de um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante e em seguida encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. As amostras de plasma e porção celular foram separadas e congeladas a -20°C até o momento do uso. Todos os pacientes foram informados sobre o projeto e aqueles que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1).

2.1.2. Indivíduos Controles Soronegativos para HIV-1

No presente estudo, amostras de sangue (5ml) de 99 indivíduos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), soronegativos para HIV-1, coletadas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante foram utilizadas como grupo controle. As amostras de plasma e porção celular foram separadas, congeladas a -20°C e armazenadas no Laboratório de Virologia da UFPA até o momento do uso. Todos os

pacientes foram informados sobre o projeto e aqueles que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

2.1.3. Indivíduos Soronegativos de alto risco para HIV-1

Foram coletadas 84 amostras de sangue (5 ml) de mulheres profissionais do sexo, maiores de 18 anos, que residiam e desenvolviam suas atividades na região metropolitana de Belém. No momento da coleta de sangue foram obtidas informações epidemiológicas de um questionário (anexo 2) respondido por todas as selecionadas, comprovando a característica de um grupo de alto risco. As amostras de plasma e porção celular foram separadas e congeladas a -20°C no Laboratório de Virologia da UFPA até o momento do uso.

2.1.4. Indivíduos Soropositivos Assintomáticos para HIV-1

Foram selecionadas 116 amostras de sangue (5ml) de pacientes provenientes da Unidade de Referência Especializada em Doenças Infecciosas e Parasitárias especiais (URE-DIPE), de ambos os sexos, maiores de 18 anos e que não apresentavam sintomas da Aids e que tiveram uma contagem de linfócitos T CD4^+ maior ou igual a 500 células por mm^3 de sangue. Todos os indivíduos selecionados assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

2.1.5. Aspectos Éticos

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto (processo nº 2027/2005,

anexo 3), em obediência à resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

2.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS

2.2.1 Grupos de indivíduos Soronegativos

Os plasmas dos indivíduos componentes destes grupos (Controle e controle de alto risco) foram testados para a presença de anticorpos anti-HIV I/II, anti-HTLV I/II, anti-HCV (*Ortho Diagnóstico System Inc, USA*), anti-*T. pallidum* e marcadores para o HBV (HBsAg, Anti-HBs e Anti-HBc total) (*DiaSorin spA, Italy*), usando ensaios imunoenzimáticos, sendo excluídos destes grupos os indivíduos que apresentaram positividade para qualquer um dos testes.

2.2.2 Grupo de indivíduos soropositivos

Os plasmas dos pacientes com Aids foram testados para a presença de anticorpos anti-HTLV I/II, anti-HCV (*Ortho Clinical Diagnostics, USA*), anti-*T.pallidum* e marcadores para o HBV (HBsAg, Anti-HBs e Anti-HBc total), usando ensaios imunoenzimáticos (*DiaSorin spA, Italy*). Além destas co-infecções mencionadas, informações a respeito de outras doenças foram coletadas nos prontuários destes mesmos pacientes.

2.3 QUANTIFICAÇÕES DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA E DE LINFÓCITOS T CD4⁺

Os valores da carga viral plasmática e o número de linfócitos T CD4⁺ dos pacientes com Aids foram obtidos por meio de seus próprios prontuários obtidos no

registro do Departamento de Arquivo Médico (DEMA) no Hospital Universitário João de Barros Barreto, sendo que nos indivíduos soropositivos assintomáticos, estes dados foram obtidos a partir das contagens realizadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

2.4 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.4.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído de células mononucleares do sangue periférico a partir do método Fenol-Clorofórmio. O procedimento ocorreu de acordo com as seguintes etapas: Lise de hemácias (**Solução A:** Cloreto de Amônio [1.0M], EDTA [0.1M], H₂O destilada; **Solução B:** Bicarbonato de Amônio [1.0M], H₂O destilada), lise de leucócitos (Tris-HCl [100mM], EDTA [20mM], NaCl [200mM], SDS 0,5 %, H₂O destilada), precipitação de proteínas (Acetato de Amônio [7,5M], H₂O destilada) e hidratação do DNA (H₂O destilada livre de DNase e RNase).

2.4.2 Determinação dos Polimorfismos no Éxon 1

No presente trabalho foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação de 120 pares de bases (pb) do éxon 1 do gene *MBL*, a partir do DNA de indivíduos com Aids, de indivíduos controles soronegativos, indivíduos soronegativos de alto risco e soropositivos assintomáticos. As amplificações foram realizadas no equipamento termo-ciclador *Peltier Thermal Cycler Biocycler*.

A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 50 µL contendo 500 ng de DNA extraído, 235 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* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvido nesta reação foi (mblE01For) 5'-

CATCAACGGCTTCCCAGGGCAAGATGGG-3' e (mblE02) 5'-
AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3' (Madsen *et al.*, 1995; Tin *et al.*, 2005).

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 e uma última fase de extensão a 72°C por 10 minutos.

As identificações dos alelos *MBL*A*, *MBL*B*, *MBL*C* e *MBL*D* foram realizadas pela digestão enzimática do produto amplificado (120pb) usando-se as endonucleases de restrição *BanI*, *MboII* e *MwoI*. A *BanI* atua no códon 54 clivando o alelo *MBL*A* em dois fragmentos (86 pb e 34 pb). A *MboII* cliva especificamente o alelo *MBL*C* no códon 57 em dois fragmentos (77 pb e 43 pb) e a enzima *MwoI* atua no códon 52 clivando o alelo *MBL*A* em dois fragmentos (92 pb e 28 pb) (Tin *et al.*, 2005). Quanto as condições das digestões enzimáticas, as enzimas *BanI* e *MboII* atuam na temperatura de 37°C por um período de 3 horas e 30 minutos e 4 horas e 30 minutos, respectivamente. Com relação à *MwoI*, sua temperatura de ação é 60°C, atuando durante um período de 3 horas (Tin *et al.*, 2005).

2.4.3 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100V/50 minutos) em gel de agarose a 4%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque-Tris-Base 1,6 M, Acetato de Sódio 0,8 M e EDTA-Na₂ 40mM/1000mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta (Figuras 7, 8 e 9).

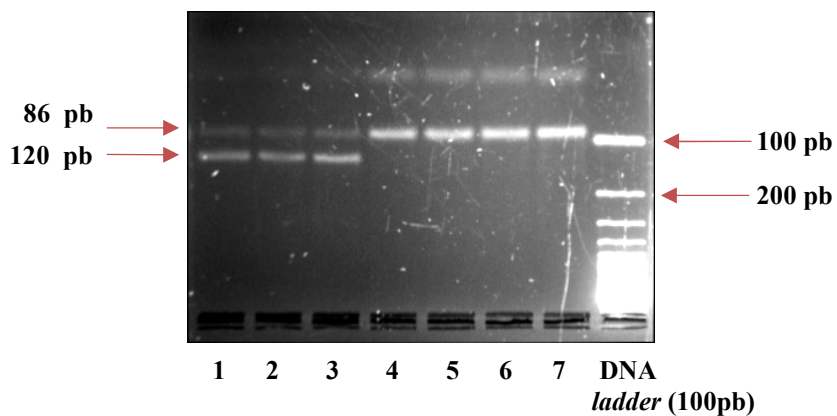


Figura 7 – Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima *BanI*, a partir do fragmento de 120 pb do éxon 1. (*AB*: 1,2 e 3; *AA*: 4,5,6 e 7).

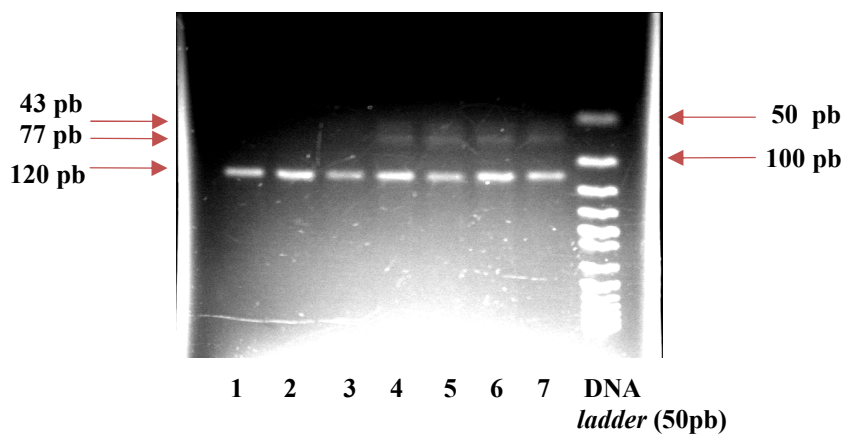


Figura 8 – Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima *MboII*, a partir do fragmento de 120 pb do éxon 1. (*AA*: 1,2 e 3 ; *AC*: 4,5,6 e 7).

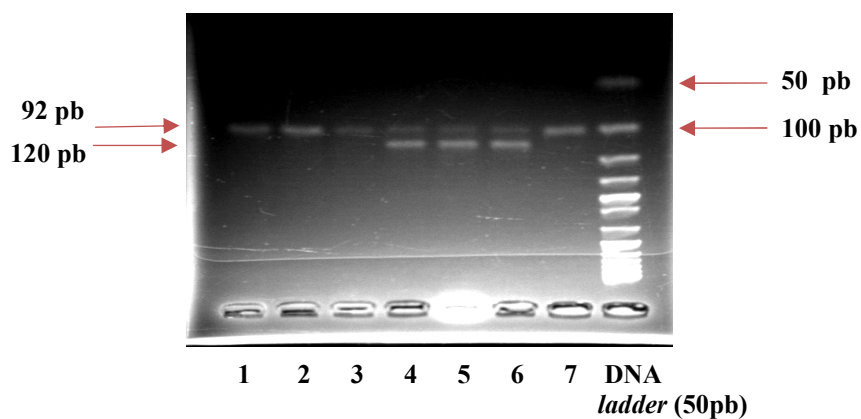


Figura 9 – Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima *MwoI*, a partir do fragmento de 120 pb do éxon 1. (*AA*: 1,2,3 e 7; *AD*: 4,5 e 6).

2.5 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O cálculo das frequências alélicas e genóticas do éxon 1 do gene *MBL* observados nos grupos controle e de pacientes com Aids foi efetuado por meio de contagem direta.

A comparação das frequências alélicas e genóticas entre os grupos de pacientes e de controle foi efetuada por meio do teste de qui-quadrado (χ^2) utilizando o programa BioEstat 5.0 v (Ayres *et al.*, 2008) e o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo programa *Tools for Population Genetic Analyses* (TFPGA) 1.3 v (Miller, 1999).

A associação entre a frequência dos polimorfismos e a presença de co-infecções nos pacientes com Aids foi efetuada por meio do programa BioEstat 5.0 v, assim como a avaliação da associação entre a frequência dos alelos e genótipos do éxon 1 com os parâmetros laboratoriais (contagem de células T CD4⁺ e a contagem de carga viral plasmática) (Ayres *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS

3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

A análise das frequências alélicas no éxon 1 do gene *MBL* indicou uma maior prevalência do alelo *A* nos três grupos analisados com frequências de 0,75 nos indivíduos com Aids, de 0,78 nos assintomáticos e de 0,80 no grupo controle. O alelo *B* apresentou uma maior frequência nos indivíduos com Aids (0,19) do que no grupo dos indivíduos soronegativos (0,14) e nos assintomáticos (0,15). Com relação aos alelos *C* e *D*, ambos tiveram distribuições muito parecidas nos grupos analisados, apresentando frequências muito próximas. As diferenças nas frequências alélicas não mostraram ser estaticamente significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das frequências alélicas do gene *MBL* na população de pacientes com Aids, nos indivíduos assintomáticos e no grupo controle.

Alelos	Pacientes Aids n (%)	HIV-1 assintomáticos n (%)	Controle n (%)	χ^2	<i>p</i>
<i>MBL *A</i>	194 (75,78)	183 (78,88)	159 (80,30)	1,438 ^a	0,6966 ^a
<i>MBL *B</i>	51 (19,92)	37 (15,95)	28 (14,14)	2,803 ^b	0,4231 ^b
<i>MBL *C</i>	4 (1,56)	4 (1,72)	4 (2,02)	0,311 ^c	0,9580 ^c
<i>MBL *D</i>	7 (2,73)	8 (3,45)	7 (3,53)	3,137 ^d	0,7915 ^d
Total	256 (100)	232 (100)	198 (100)		

a: pacientes Aids vs HIV-1 assintomáticos

b: pacientes Aids vs controle

c: HIV-1 assintomáticos vs controle

d: Todos os Grupos

A distribuição das frequências genóticas evidenciou 7 genótipos diferentes. Com relação ao genótipo *AA*, sua maior prevalência foi no grupo controle quando comparado com os pacientes portadores assintomáticos e com os indivíduos com Aids, apresentando frequências de 0,65, 0,59 e 0,54, respectivamente. O genótipo *AB* prevaleceu no grupo dos pacientes com Aids, apresentando frequência de 0,35, enquanto que no grupo controle esta foi de 0,22 e nos portadores HIV-1 assintomáticos de 0,30.

No presente estudo foram encontrados também, os genótipos *AC* e *AD*, com frequências que variaram de 0,02 a 0,05 nos três grupos, e bem como os genótipos em homozigose para as variantes alélicas, *BB*, *BC* e *BD*, sendo que, dentre estes os que apresentaram menor frequência (0,78%) foram o *BB* e o *BC*. As diferenças nas distribuições genóticas observadas nos grupos não foram estatisticamente significantes (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das frequências genótípicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Aids, nos indivíduos HIV-1 Assintomáticos e no grupo controle.

Genótipos	Pacientes Aids <i>n</i> (%)	HIV-1 assintomáticos <i>n</i> (%)	Controle <i>n</i> (%)	χ^2	<i>p</i>
<i>AA</i>	70 (54,69)	69 (59,48)	65 (65,65)	3,152 ^a	0,7895 ^a
<i>AB</i>	46 (35,94)	35 (30,17)	22 (22,22)		
<i>AC</i>	3 (2,34)	4 (3,45)	3 (3,03)	5,349 ^b	0,4998 ^b
<i>AD</i>	5 (3,90)	6 (5,17)	4 (4,04)		
<i>BB</i>	1 (0,78)	-	1 (1,01)	4,511 ^c	0,6078 ^c
<i>BC</i>	1 (0,78)	-	1 (1,01)		
<i>BD</i>	2 (1,56)	2 (1,72)	3 (3,03)	12,888 ^d	0,7982 ^d
<i>CC</i>	-	-	-		
<i>CD</i>	-	-	-		
<i>DD</i>	-	-	-		
Total	128 (100)	116 (100)	99 (100)		

a: pacientes Aids vs HIV-1 assintomáticos

b: pacientes Aids vs controle

c: HIV-1 assintomáticos vs controle

d: Todos os Grupos

Além da distribuição genotípica mostrada anteriormente, foi realizada uma outra análise onde foram definidos três genótipos: *AA*, *AO* e *OO*. Onde *A* é o alelo normal e *O* representa qualquer uma das três variantes alélicas (*B*, *C* e *D*). Nesta análise o genótipo *AO* foi o mais freqüente no grupo com Aids em comparação ao grupo de portadores HIV-1 assintomáticos e ao grupo controle, apresentando frequências de 0,42, de 0,38 e 0,29 respectivamente.

O genótipo homozigoto normal (*AA*) apresentou frequência de 0,65 no grupo soronegativo enquanto que os indivíduos com Aids apresentaram frequência de 0,54 e os portadores assintomáticos apresentaram frequência de 0,59. A análise das duas

formas alélicas variantes (*OO*) evidenciou uma ligeira maior frequência deste genótipo no grupo controle com percentuais de 5,0%. Já nos soropositivos, esta foi de 3,0% nos pacientes com Aids e de 1,7% nos assintomáticos. Apesar da maior prevalência do genótipo *AO* nos grupos de soropositivos e do genótipo *AA* no grupo controle, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes (Tabela 3).

Além dos genótipos, a distribuição alélica também foi analisada mostrando que a frequência do alelo *A* prevaleceu no grupo controle com valor de 0,80 e o alelo *O* foi mais frequente entre os indivíduos com Aids, mostrando uma frequência de 0,24. Estas diferenças também não foram significantes (Tabela 3).

A estimativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir dos desvios entre as proporções genotípicas observadas e as esperadas, não foram estatisticamente significativas nos grupos de pacientes com Aids, Assintomáticos e Controle, com valores de p igual a 0,0912, 0,0769 e 0,4614, respectivamente.

Tabela 3. Distribuição das frequências genóticas e alélicas do gene *MBL* no grupo de pacientes com Aids, nos indivíduos assintomáticos e no grupo controle.

Perfil	Pacientes Aids n (%)	HIV-1 assintomáticos n (%)	Controle n (%)	χ^2	<i>p</i>
Genótipos					
<i>AA</i>	70 (54,69)	69 (59,48)	65 (65,65)	0,904 ^a	0,6363 ^a
<i>AO</i>	54 (42,18)	45 (38,79)	29 (29,29)	4,190 ^b	0,1231 ^b
<i>OO</i>	4 (3,12)	2 (1,72)	5 (5,05)	3,543 ^c	0,1701 ^c
Total	128 (100)	116 (100)	99 (100)	5,566 ^d	0,2340 ^d
Alelos					
<i>A</i>	194 (75,78)	183 (78,88)	159 (80,30)	0,665 ^a	0,4149 ^a
<i>O</i>	62 (24,22)	49 (21,12)	39 (19,70)	1,320 ^b	0,3007 ^b
				0,133 ^c	0,8066 ^c
				1,450 ^d	0,4843 ^d
Total	256 (100)	232 (100)	198 (100)		

a: pacientes Aids vs HIV-1 assintomáticos

b: pacientes Aids vs controle

c: HIV-1 assintomáticos vs controle

d: Todos os Grupos

A pesquisa das frequências genóticas, também, foi realizada em um grupo controle soronegativo de alto risco, sendo os valores comparados com aqueles observados no grupo de soropositivos, composto de indivíduos assintomáticos e daqueles com Aids. Em relação aos genótipos encontrados, o genótipo *AA* prevaleceu nos três grupos, tendo frequências de 65,65% no grupo controle, 61,90% no grupo de alto risco e 59,97% nos indivíduos infectados. O contrário foi observado em relação ao genótipo *AB*, onde este com frequência de 33,20% foi maior no grupo de soropositivos

quando comparado com as frequências de 22,22% e 27,38% nos grupos controle e alto risco, respectivamente.

Dentre os outros genótipos, o *AD*, foi o terceiro mais frequente apresentando frequências semelhantes entre os grupos, variando de 4,04 a 4,76% e os genótipos *BB* e *BC* apresentaram as menores prevalências no grupo dos soropositivos e no controle, sendo que no grupo controle de alto risco não foi encontrado o genótipo *AC*. Apesar das diferentes prevalências dos genótipos entre os grupos, estas não se mostraram significativas quando realizadas as análises estatísticas (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das frequências genóticas do gene *MBL* no grupo de pacientes soropositivos, controle e controle de alto risco.

Genótipos	Soropositivos	Controle	Controle alto risco	χ^2	<i>p</i>
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
<i>AA</i>	139 (56,97)	65 (65,65)	52 (61,90)	5,298 ^a	0,5062 ^a
<i>AB</i>	81 (33,20)	22 (22,22)	23 (27,38)		
<i>AC</i>	7 (2,87)	3 (3,03)	-	6,814 ^b	0,3384 ^b
<i>AD</i>	11 (4,49)	4 (4,04)	4 (4,76)		
<i>BB</i>	1 (0,41)	1 (1,01)	1 (1,19)	3,796 ^c	0,7043 ^c
<i>BC</i>	1 (0,41)	1 (1,01)	2 (2,38)		
<i>BD</i>	4 (1,64)	3 (3,03)	2 (2,38)	10,501 ^d	0,5721 ^d
<i>CC</i>	-	-	-		
<i>CD</i>	-	-	-		
<i>DD</i>	-	-	-		
Total	244 (100)	99 (100)	84 (100)		

a: soropositivos vs controle

b: soropositivos vs controle alto risco

c: controle vs controle alto risco

d: Todos os Grupos

Quanto a análise dos genótipos agrupados, o observado foi uma prevalência maior do genótipo *AA* no grupo controle, com frequência de 0,65, sendo que nos soropositivos esta foi de 0,56. Por outro lado, o genótipo heterozigoto apresentou maior frequência nos soropositivos do que no grupo controle e controle de alto risco, sendo os valores de 0,40; 0,29 e 0,32 respectivamente. As diferenças entre estas frequências nestes grupos não se mostraram estatisticamente significativas. Com relação as variantes alélicas, foi observado uma frequência maior do alelo *A* no grupo controle (0,80), enquanto que nos outros dois grupos esta variou de 0,77 a 0,79. Já a forma variante *O* apresentou uma ligeira maior prevalência no grupo de soropositivos (0,22) em relação aos grupos controle (0,19) e controle de alto risco (0,22), entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada (Tabela 5).

Com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, não houve diferenças estatisticamente significativas no grupo controle de alto risco ($p=0,5565$).

Tabela 5. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene *MBL* no grupo de pacientes soropositivos, controle e controle de alto risco.

Perfil	Soropositivos	Controle	Controle alto risco	χ^2	<i>p</i>
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
Genótipos					
<i>AA</i>	139 (56,97)	65 (65,65)	52 (61,90)	4,770 ^a	0,0921 ^a
<i>AO</i>	99 (40,57)	29 (29,29)	27 (32,14)	3,692 ^b	0,1579 ^b
<i>OO</i>	6 (2,45)	5 (5,05)	5 (5,95)	0,288 ^c	0,8658 ^c
Total	244 (100)	99 (100)	84 (100)	6,540 ^d	0,1623 ^d
Alelos					
<i>A</i>	377 (77,25)	159 (80,30)	131 (77,98)	0,598 ^a	0,4392 ^a
<i>O</i>	111 (22,75)	39 (19,70)	37 (22,02)	0,037 ^b	0,9314 ^b
				0,299 ^c	0,5845 ^c
				0,768 ^d	0,6813 ^d
Total	488 (100)	198 (100)	168 (100)		

a: soropositivos vs controle

b: soropositivos vs controle alto risco

c: controle vs controle alto risco

d: Todos os Grupos

3.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E CO-INFECÇÕES

A presença das co-infecções nos indivíduos com Aids também foi relacionada com os polimorfismos do gene *MBL*, sendo estabelecidos dois grupos: mono-infectados, que foram negativos para todos os marcadores sorológicos analisados e os co-infectados, que apresentaram sorologia positiva para pelo menos um dos

marcadores analisados, sendo estes, sorologia para HTLV, HCV, *T.pallidum* e marcadores para HBV (HBsAg, Anti-HBs e Anti-HBc total).

A frequência de indivíduos co-infectados foi de 39% contra 61% de mono-infectados. Houve uma discreta prevalência do genótipo *AA* nos indivíduos mono-infectados, da ordem de 53,8% comparada com os 52% no grupo de co-infectados. Já o genótipo *AO*, apresentou uma frequência de 43,6% nos indivíduos mono-infectados e de 44% nos indivíduos que apresentaram alguma co-infecção. O número de genótipos *OO* foi exatamente igual nos dois grupos, com frequências de 2,5% nos mono e de 4,0% nos co-infectados. O resultado dos testes estatísticos mostrou que não houve significância nas diferenças observadas (Tabela 6).

A análise das frequências alélicas mostrou que o alelo *A* foi mais frequente nos mono-infectados (75,64%) do que nos co-infectados (74%), ao passo que a variante *O* teve maior frequência nos indivíduos que apresentaram alguma co-infecção (29%) em relação aos mono-infectados, porém nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das frequências genóticas e alélicas do gene *MBL* entre os indivíduos com Aids mono e co-infectados.

	Mono-infectados	Co-infectados	χ^2	<i>p</i>
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>		
Genótipo				
<i>AA</i>	42 (53,85)	26 (52,00)		
<i>AO</i>	34 (43,59)	22 (44,00)		
<i>OO</i>	02 (2,56)	02 (4,00)		
Total	78 (100)	50 (100)	0,222	0,8951
Alelos				
<i>A</i>	118 (75,64)	74 (74,00)		
<i>O</i>	38 (24,36)	26 (29,00)		
Total	156 (100)	100 (100)	0,088	0,7674

Além das co-infecções analisadas através dos testes sorológicos, foram coletadas outras informações diretamente dos prontuários dos pacientes com Aids, como o diagnóstico de outras doenças. Do total de 128 pacientes, foi possível o acesso aos prontuários de 100. As doenças mais prevalentes foram: Tuberculose pulmonar ou extra pulmonar (45,0%), neurotoxoplasmose (24,0%), candidíase oral ou esofágica (44,0%), neurocriptococose (12,0%) e pneumonia causada por bactérias ou fungos (23,3%).

As análises das frequências genóticas e alélicas dos indivíduos que apresentaram estas co-infecções demonstraram que o genótipo *AO* foi mais frequente em relação ao genótipo *AA* nos indivíduos com diagnóstico de neurotoxoplasmose e de neurocriptococose, em ambos o genótipo heterozigoto apresentou frequência de

58,33%. O genótipo *AA* variou de 41,66% nos casos de neurotoxoplasmose até 66,67% nos indivíduos que apresentaram pneumonia. O genótipo homozigoto para o alelo *O* só foi encontrado nos pacientes com tuberculose, com frequência de 4,4% e nos indivíduos com candidíase, com frequência de 4,5% (Tabela 7).

Com relação às frequências alélicas, o alelo *A* foi o mais frequente, variando de 70,8% (candidíase) até 83,3% (pneumonia). Já o alelo *O* apresentou uma variação de 16,6% (pneumonia) até 29,1% (neurotoxoplasmose) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene *MBL* entre os indivíduos com Aids co-infectados.

Genótipo	TB	Neuro	Candidíase	Neuro	Pneumonia
	<i>n</i> (%)	toxoplasmose <i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	criptococose <i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
<i>AA</i>	24 (53,33)	10 (41,67)	24 (54,54)	5 (41,67)	16 (66,67)
<i>AO</i>	19 (42,22)	14 (58,33)	18 (40,91)	7 (58,33)	8 (33,33)
<i>OO</i>	2 (4,44)	-	2 (4,54)	-	-
Total	45 (100)	24 (100)	44 (100)	12 (100)	24 (100)
Alelos					
<i>A</i>	67 (74,44)	34 (70,83)	66 (75,00)	17 (70,83)	40 (83,33)
<i>O</i>	23 (25,26)	14 (29,17)	22 (25,00)	7 (29,17)	8 (16,67)
Total	90 (100)	48 (100)	88 (100)	24 (100)	48 (100)

3.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA

A relação entre o número médio de linfócitos TCD4⁺ e os genótipos do éxon 1 do gene *MBL* encontrados na população dos pacientes com Aids, está descrita na Tabela 8. Do total de 100 prontuários cujo acesso foi possível, apenas 59 tinham a informação do número de LTCD4⁺. Sendo assim foram calculadas as médias aritméticas de acordo com os genótipos encontrados. Observou-se uma média de 105,65 células TCD4⁺/mL de sangue nos 30 indivíduos que apresentaram o genótipo *AA* (Grupo A), enquanto que a média naqueles 28 pacientes que tinham os genótipos *AB*, *AC* e *AD* (Grupo B) foi de 158,43 células TCD4⁺/mL. Além destes genótipos já citados, um único indivíduo que apresentou o genótipo *BD* teve valor de 1,00 células/mL. A análise estatística entre os Grupos A e B mostrou que não houve diferenças significantes entre as quantificações e os genótipos (Tabela 8).

Tabela 8. Polimorfismos do gene *MBL* e a quantificação de células TCD4⁺ nos indivíduos com Aids.

Grupos	<i>n</i>	Média (LTCD4 ⁺ /mL)	Comparação	ANOVA	
				F	<i>p</i>
A	30	105,65			
B	28	158,43	Grupo A vs grupo B	2,5669	0,1109

Grupo A (*AA*) e Grupo B (*AB*, *AC* e *AD*)

Além da relação entre os genótipos encontrados e a contagem de linfócitos TCD4+, a associação entre os valores da carga viral e os polimorfismos também foi analisada. Ao total, 49 prontuários obtinham a informação de carga viral, sendo assim, dois grupos foram criados: Grupo A constituído de 24 indivíduos com genótipo *AA* e que tiveram uma média aritmética de 138.141 cópias/mm³ (log=5,14) e grupo B constituído de 24 indivíduos com genótipos *AB* e *AD* que apresentaram uma média menor, de 103.102 cópias/mm³ (log=5,01) e um único indivíduo com genótipo *BD* que apresentou uma carga viral de 270.000 cópias/mm³ (log=5,43). Esta diferença entre os grupos A e B não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 9).

Tabela 9. Polimorfismos do gene *MBL* e a quantificação da carga viral nos indivíduos com Aids.

Grupos	<i>n</i>	Média (cópias RNA/mm ³)	Log ₁₀	Comparação	ANOVA	
					F	<i>p</i>
A	24	138.141	5,14			
B	24	103.102	5,01	Grupo A vs grupo B	0,2838	0,6033

Grupo A (*AA*) e Grupo B (*AB* e *AD*)

Estes dois parâmetros laboratoriais também foram avaliados no grupo de pacientes soropositivos assintomáticos. Dos 116 indivíduos, 69 apresentaram o genótipo *AA* (Grupo A), com uma média aritmética de 724,08 células TCD4⁺/mL. O grupo B (*AB*, *AC* e *AD*), constituído de 45, apresentou média de 727,66 células/mL e outros dois indivíduos com genótipo *BD* apresentaram uma média de 1.023 células/mL. A análise

estatística entre os grupos A e B não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 10).

Tabela 10. Polimorfismos do gene *MBL* e a quantificação de células TCD4⁺ nos indivíduos soropositivos assintomáticos.

Grupos	<i>n</i>	Média (LTCD4 ⁺ /mL)	Comparação	ANOVA	
				F	<i>p</i>
A	69	724,08			
B	45	727,66	Grupo A vs grupo B	0,0065	0,9337

Grupo A (*AA*) e Grupo B (*AB*, *AC* e *AD*)

A carga viral plasmática também foi analisada neste grupo, porém dos 116 indivíduos, foram coletadas informações de apenas 107. O grupo A formado por 66 indivíduos com genótipo *AA* apresentou média de 7.859 cópias RNA/mm³ (Log=3,89), enquanto que os 39 indivíduos com os genótipos heterozigotos (*AB*, *AC* e *AD*) apresentaram média de 3.187 cópias RNA/mm³ (Log=3,50). Os dois indivíduos que apresentaram o genótipo *BD* tiveram uma média de 50 cópias RNA/mm³ (Log=1,70). A análise estatística entre esses dois grupos (A e B) não evidenciou nenhuma diferença significativa (Tabela 11).

Tabela 11. Polimorfismos do gene *MBL* e a quantificação da carga viral nos indivíduos soropositivos assintomáticos.

Grupos	<i>n</i>	Média (cópias RNA/mm ³)	Log ₁₀	Comparação	ANOVA	
					F	<i>p</i>
A	66	7.859	3,89			
B	39	3.187	3,50	Grupo A vs grupo B	0,1101	2,5409

Grupo A (*AA*) e Grupo B (*AB*, *AC* e *AD*)

4. DISCUSSÃO

A distribuição das formas alélicas do éxon 1 do gene *MBL* observadas no presente estudo nos pacientes portadores da infecção pelo HIV-1 e no grupo controle, apresentaram-se de maneira semelhante com as frequências relatadas em outros estudos. Um estudo de Garcia-Laorden *et al.* (2006), realizado com espanhóis, encontrou frequências de 76% do alelo *A* entre os pacientes soropositivos comparado com 72% encontrado no grupo controle. O mesmo observou frequências de 17% e 15% do alelo *B* nos grupos controle e de infectados, respectivamente, e os alelos *C* e *D* também mostraram distribuições semelhantes variando de 3% a 7%. Da mesma forma, frequências aproximadas foram observadas em outro estudo onde o alelo *A* teve percentuais de 64% e 62% e a variante *B* de 22% e 23%, nos grupos de infectados e controle, respectivamente (Garred *et al.*, 1997).

Outros estudos, além destes já citados, avaliaram a distribuição das três mutações descritas em várias populações da Europa, da África, da Ásia e da Melanésia (Madsen *et al.*, 1995; Garred *et al.*, 1997; Jülicher *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2003). A variante *B* ocorre com prevalências de 22% e 28% em europeus, chineses e esquimós. Por outro lado, a mutação *C*, em populações Sub-Saarianas, alcança frequências de 50% a 60%. A variante *D* é encontrada entre europeus e africanos, com frequências de até 14% podendo ser menor em outras populações (Turner, 2003). Segundo Kilpatrick (2002), a ocorrência de alelos mutantes do gene *MBL* é comum em várias populações, e de forma diferenciada, pode ser considerada uma evidência de uma espécie de vantagem seletiva para o estado heterozigoto de acordo com a população investigada. Uma possibilidade para a ocorrência de variantes alélicas em elevada frequência poderia ser

relacionada ao benefício da presença destas mutações contra parasitas endêmicos que se utilizariam da via da lectina para infectar as células do hospedeiro.

A MBL é importante como primeira linha de defesa do sistema imunológico devido sua habilidade de agir como proteína de fase aguda e de ativar o sistema complemento. Alguns estudos mostraram, claramente, uma associação entre a presença de variantes alélicas do gene *MBL* e a ocorrência de imunodeficiência associada às infecções crônicas (Garred *et al.*, 1997; Turner., 1998; Turner & Hamvas., 2000). Garred *et al.* (1997), estudando uma população caucasóide, observaram uma maior prevalência de homozigotos para os alelos variantes (8%) nos indivíduos infectados pelo HIV-1 comparados com 0,8% no grupo controle. Vallinoto *et al.* (2005), estudando uma amostra populacional de Belém, encontraram uma alta prevalência da variante *B* entre os soropositivos quando comparado com os sujeitos do grupo controle, todavia estas diferenças não foram estatisticamente significantes. No presente estudo, também não foram verificadas tais diferenças nas prevalências do alelo *A* e das formas variantes *O* comparando-se os grupos estudados. Assim como, outros estudos também não verificaram diferenças significativas entre estes dois grupos (Garcia-Laorden *et al.*, 2006; Kalichamy *et al.*, 2007).

Embora os resultados de Garred *et al.* (1997) não tenham revelado qualquer associação entre os alelos variantes e o tempo compreendido entre a detecção da infecção e o surgimento da Aids, a avaliação dos pacientes infectados, que desenvolveram Aids, mostrou que o tempo médio de sobrevida foi significativamente menor, após o diagnóstico da Aids, para pacientes que expressavam as variantes alélicas em homozigose e em heterozigose. Neste mesmo estudo, a frequência do genótipo *OO* no grupo de indivíduos infectados foi de 8%, enquanto que em um grupo controle de

alto risco, constituído de homens homossexuais, esta foi de 0%. A distribuição genotípica observada nos dois grupos investigados no presente estudo não corrobora esses achados. Possivelmente, essa diferença seja reflexo das diferenças populacionais entre os dois estudos, diferenças entre critérios e metodologias aplicadas ou então devido ao baixo número amostral utilizado. A contribuição genética da população amazônica analisada neste estudo é caracterizada por um modelo tri-híbrido, com 47% caucasóide, 41% indígena e 12% afrodescendente (Santos & Guerreiro., 1995), diferente do perfil exclusivamente caucasóide da população estudada por Garred *et al.* (1997).

Além da análise genotípica, diversos estudos têm investigado uma possível relação entre os níveis séricos da MBL e a infecção pelo HIV-1. Prohaszka *et al.* (1997) encontraram níveis baixos em indivíduos portadores assintomáticos quando comparados com controles não infectados. Em concordância a estes resultados, Garred *et al.* (1997) também encontraram níveis baixos da MBL nos indivíduos infectados pelo HIV-1 e que estes indivíduos teriam uma sobrevida reduzida após desenvolverem a Aids. Em contraste Senaldi *et al.* (1995) mostraram altos níveis de MBL em pessoas infectadas do que nos controles normais, porém não verificaram diferenças nesses níveis quanto aos estágios da doença, diferente de um outro estudo que verificou níveis aumentados da proteína em estágios avançados da doença, sugerindo que a terapia anti-retroviral poderia resultar em um aumento dos níveis de MBL (Heggelund *et al.*, 2003).

De acordo com o estudo feito por Stefensen *et al.* (2000), os polimorfismos da região do éxon 1 do gene *MBL*, têm influência direta nos níveis séricos da proteína. No presente estudo, as populações investigadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas e genotípicas.

Estes achados sugerem que as mutações na região de éxon 1 (relacionadas a médios e baixos níveis séricos da proteína) não estejam associadas à susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. Para se chegar a resultados mais precisos quanto ao aumento do risco à infecção e a progressão da doença conferida pela deficiência sérica da MBL, faz-se necessário um estudo longitudinal com uma casuística mais expressiva aliada a quantificação sorológica da MBL nos indivíduos envolvidos.

As diferenças nos níveis séricos da MBL relacionadas as frequências alélicas e genóticas têm sido estudadas também em outras doenças infecciosas e parasitárias. Diversos estudos envolvendo fungos, bactérias, protozoários e outros agentes virais têm observado relações diversas. Em caucasianos, estudos têm sugerido que indivíduos homocigotos para as variantes alélicas do gene *MBL* têm um risco aumentado de desenvolver doenças invasivas causadas por pneumococos, 12% de 229 pacientes eram homocigotos para as formas variantes contra 5% de 353 do grupo controle (Roy *et al.*, 2002; Eisen & Minchinton., 2003). Outro estudo desenvolvido em um hospital pediátrico em Londres verificou uma frequência de 7,7% do genótipo *OO* entre os pacientes com infecção por *N. meningitidis* comparado com 1,5% entre o grupo controle não infectado (Hibberd *et al.*, 1999).

Em contraste ao efeito protetor dos níveis normais de MBL contra bactérias extracelulares, existem observações de que as infecções causadas pelo gênero *Mycobacterium* ocorrem mais frequentemente em pacientes com níveis altos de MBL. Foi observado que etíopes infectados com *Mycobacterium leprae* tinham um nível significativamente mais elevado de MBL do que os controles não infectados (Garred *et al.*, 1994). Subseqüentemente, outro estudo demonstrou que indivíduos infectados com

Mycobacterium tuberculosis tinham um nível de MBL mais elevado do que os controles saudáveis (Garred *et al.*, 1997b).

Outros dois estudos relataram a associação dos genótipos do gene *MBL* em pacientes soropositivos para o HIV-1 e co-infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Na Espanha, foram analisados 106 pacientes caucasóides que apresentavam a co-infecção HIV-TB sendo verificada uma frequência de 81,6% do alelo *A* e de 18,4% do alelo *O* (Garcia-Laorden *et al.*, 2006). No presente estudo, frequências semelhantes foram observadas, onde o alelo *A* apresentou frequência de 74,44% e o alelo variante *O* de 25,26%. Kalichamy *et al.* (2007) pesquisando em indivíduos indianos, encontraram níveis séricos significativamente maiores nos indivíduos co-infectados do que no grupo de indivíduos somente infectados pelo HIV, sugerindo que o genótipo relacionado com altos níveis séricos (*AA*) levariam a uma predisposição para a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nos indivíduos infectados pelo HIV enquanto que o genótipo associado a baixos níveis (*OO*) estaria associado com a susceptibilidade à tuberculose em indivíduos não infectados pelo HIV.

Outros agentes causadores de co-infecções comuns em indivíduos com Aids também tem sido relacionados, como por exemplo, *Candida albicans*. Em um estudo realizado por Garred *et al.* (1997), verificou-se uma frequência de 58% do genótipo *AA* entre os indivíduos que apresentaram candidíase oral em comparação a 42% do genótipo *OO*. O presente estudo encontrou frequências semelhantes de 54,54% do genótipo considerado normal e de 40,91% do genótipo heterozigoto. Outros estudos sugerem que a fagocitose de células de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* é aumentada na presença de TNF e que a produção desta citocina é regulada de uma maneira dependente de MBL (Ghezzi *et al.*, 1998; Chaka *et al.*, 1997).

Os protozoários também estão incluídos na ampla diversidade de microrganismos que se ligam a MBL, dentre os muitos estão: a *Leishmania major*, a *Leishmania mexicana* e *Plasmodium falciparum* (Garred *et al.*, 1994), porém ainda não existem estudos que fazem a correlação de co-infecções causadas por protozoários em indivíduos soropositivos para o HIV e os genótipos do gene *MBL*.

Vários estudos também tem realizado associações de outros agentes virais com as mutações no éxon 1 do gene *MBL*. Pontes *et al.* (2005) analisaram estes polimorfismos e puderam estabelecer uma associação significativa entre a presença da variante alélica *MBL*B* e a infecção pelo HTLV. Outros trabalhos também verificaram associações significativas com o *Vírus da hepatite B* (Thomas *et al.*, 1996) e com hepatite crônica causada pelo HCV (Matsushita *et al.*, 1998).

Apenas um estudo não encontrou nenhuma associação entre outros vírus co-infectando indivíduos com Aids. Entre os que estavam co-infectados com o *Vírus herpes zoster* (HZV) foi verificado um número maior de indivíduos com o genótipo *AA* (14/21) em relação aos genótipos *OO* ou *AO* (7/21), o mesmo ocorreu com os indivíduos co-infectados com *Vírus herpes simples* (HSV). O inverso ocorreu na análise dos co-infectados pelo *Citomegalovírus* (CMV), onde o número de indivíduos com o genótipo *AO* ou *OO* foi ligeiramente maior do que os que tinham o genótipo *AA* (Garred *et al.*, 1997). No presente estudo também não foram encontradas associações significativas entre os indivíduos com Aids que apresentaram co-infecções e os polimorfismos no gene *MBL*.

As variantes alélicas do gene *MBL* podem ter um papel direto na infecção pelo HIV-1. A ligação da lectina as glicoproteínas de superfície ativa a ação do sistema complemento, o que leva à inibição da infecção em células TCD4⁺. Dessa maneira as

baixas concentrações séricas da MBL e, subseqüentemente, redução da ativação do sistema complemento podem contribuir para o aumento da carga viral plasmática (Garred *et al.*, 1997). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo foram controversos a esta hipótese, uma vez que não mostraram diferenças estatísticas entre a contagem do número de linfócitos TCD4⁺ e a carga viral com as formas alélicas nos indivíduos com Aids e assintomáticos. Em concordância com estes achados, Nielsen *et al.* (1995), Garred *et al.* (1997) e Pastini *et al.* (1998) também não encontraram correlações entre as variantes alélicas da MBL e o declínio de LTCD4⁺. Outros estudos, todavia, verificaram fortes associações entre estes parâmetros laboratoriais. Vallinoto *et al.* (2005) mostraram que os pacientes que tinham o alelo *MBL* A* apresentaram um aumento no número de células TCD4⁺ entre a primeira e segunda quantificações, característica esta, que não foi evidente entre os indivíduos infectados que tinham o alelo *MBL* B*. Na avaliação da carga viral plasmática, a primeira quantificação mostrou que os pacientes com genótipo *AA* apresentaram valores menores do que os pacientes que possuíam a variante *B*. Na segunda quantificação, este valor foi 9.8 vezes maior entre aqueles que tinham o alelo *B* e adicionalmente, uma redução significativa na carga viral foi observada nos indivíduos com o alelo *A*.

Muto (2005), estudando os polimorfismos na região promotora, também acompanhou a evolução da média de linfócitos TCD4⁺, encontrando um aumento significativo dessas células entre os portadores da haplótipo promotor HY, em homo ou heterozigose. Da mesma forma, a evolução da carga viral plasmática, mostrou-se fortemente associada aos polimorfismos na região promotora. Pacientes homo ou heterozigotos para o haplótipo HY reduziram significativamente os índices de viremia plasmática, entre a primeira e segunda contagem, diferindo do grupo de pacientes

portadores do haplótipo LY, LX e HX. Resultados semelhantes a estes dois já citados, também têm sido descritos para a infecção pelos HCV e HTLV (Song *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003).

Uma possível explicação para as diferenças encontradas nos resultados poderia ser a natureza das amostras analisadas nos estudos, pois Vallinoto *et al.* (2005) e Muto *et al.* (2005) avaliaram os polimorfismos, exclusivamente, em indivíduos portadores assintomáticos da infecção pelo HIV-1, sendo que o presente estudo além de analisar indivíduos portadores assintomáticos, analisou também pacientes com quadro de Aids, além disso, outros motivos para esta ausência de associação entre os valores de carga viral, linfócitos TCD4⁺ e os genótipos poderiam ser o pequeno tamanho amostral, fruto de um acaso ou ainda pelo fato de que o grupo B foi composto por heterozigotos e a presença do alelo *A* pode ter influenciado nos resultados, uma vez que sua presença ainda que em heterozigose, pode contribuir para uma produção de oligômeros de MBL em níveis de 50% daqueles portadores do genótipo *AA*.

Poucos estudos ainda têm sido executados no sentido da investigação do papel da MBL na susceptibilidade e progressão da infecção pelo HIV-1, além do que, os achados até então obtidos são controversos. As diferenças entre os resultados podem ser devido aos diferentes modelos experimentais utilizados (longitudinal vs. transversal).

Baseado nos resultados obtidos, pode-se sugerir que as diferentes formas alélicas não estariam relacionadas com a susceptibilidade a infecção pelo HIV e co-infecções, porém, ainda é prematuro afirmar, concluindo-se que um número maior de estudos utilizando modelos prospectivos, envolvendo um grande número de pacientes, são necessários para elucidar o papel imunogenético da MBL na infecção pelo HIV e progressão da doença.

5. CONCLUSÕES

(i) As análises das distribuições das frequências alélicas e genóticas do éxon 1 do gene *MBL* nas populações estudadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas, o que sugere a ausência de associação entre os polimorfismos do éxon 1 e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1.

(ii) As distribuições alélicas e genóticas não foram associadas à presença de co-infecções no grupo de indivíduos com Aids, sugerindo que as variantes alélicas poderiam não influenciar na susceptibilidade a estas outras doenças.

(iii) Os resultados das análises dos prontuários mostraram que as co-infecções mais prevalentes nos indivíduos com Aids, foram: tuberculose, candidíase, neurotoxoplasmose, pneumonia e neurocriptococose.

(iv) O genótipo *AO* apresentou maior frequência nos indivíduos que tiveram diagnóstico de neurotoxoplasmose e neurocriptococose, enquanto que o genótipo *AA* apresentou frequência mais elevada nos indivíduos com tuberculose e pneumonia.

(v) A análise das médias no número de linfócitos TCD4⁺ não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, sugerindo que as variantes alélicas não estariam influenciando no número destas células.

(vi) A análise das médias na quantificação da carga viral nos grupos estudados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação as variantes alélicas, sugerindo que estes polimorfismos não estariam influenciando na viremia destes indivíduos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINSON, N.F., YUNGINGER, J.W., BUSSE, W.W., BOCHNER, B.S., HOLGATE, S.H., SIMONS, F.E.R. **Middleton's Allergy: Principles and Practice**, 6.ed, 2003.
- AITTONIEMI, J., BAER, M., SOPPI, E., VESIKARI, T., MIETTINEN, A. Mannan binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. **Archive Diseases Children**, **78**: 245-248, 1998.
- ALIZON, M., WAIN-HOBSON, S., MONTAGNIER, L., SONIGO, I.P. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. **Cell**, **46**: 63-74, 1986.
- AYRES, M., AYRES, JR., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BIOESTAT: Aplicação estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus, **Sociedade Civil Mamirauá**, 173p, 2008.
- BATHUM, L., HANSEN, H., TEISNER, B., KOCH, C., GARRED, P., RASMUSSEN, K., WANG, P. Association between combined properdin and mannose-binding lectin deficiency and infection with *Neisseria meningitidis*. **Molecular Immunology**: IN PRESS.
- BAGGIOLINI, M., MOSER, B. Blocking Chemokine receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, **186**: 1189-91, 1997.
- BAUER, P.G., BARTH, O.M., PEREIRA, M.S. Endocytosis of the human immunodeficiency virus *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **82**: 449-450, 1987.

- 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. **QJM: monthly Journal of the Association of Physicians**, **91**: 13-18, 1998.
- BENTWICH, Z., MAARTENS, G., TORTEN, D., LAL, A.A., LAL, R.B. Concurrent infections and HIV pathogenesis. **AIDS**, **14**: 2071-2081, 2000.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - AIDS E DST**. Ministério da Saúde. Ano IV, nº 1 - 27ª à 52ª semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2006; 01ª à 26ª semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2007, dezembro 2007.
- BORREGARD, N., ELBACH, P., GANZ, T., GARRED, P., SVEJGAARD, A. Innate immunity: from plants to humans. **Immunology Today**, **21**: 68-70, 2000.
- BORKOW, G.; BENTWICH, Z. Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. **Clinical Microbiology Review**, **17**: 1012-1030, 2004.
- BORROW, P., LEWICKI, H., WEI, X., HORWITZ, M.S., PEFFER, N., MEYERS, H., NELSON, J.A., GAIRIN, J.E., HAHN, B.H., OLDSTONE, M.B., SHAW, G.M. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. **Nature Medicine**, **3**: 205-211, 1997.
- CASANOVA, J.L., ABEL, L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe or both? **The Journal of Experimental Medicine**, **199**: 1295-1299, 2004.

Chemistry at Wellesley College. Disponível em <<http://www.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/hiv/t-hiv.GIF>> Acesso em: 19/01/2008.

CHAISSON, R.E., STERLING, T.R., GALLANT, J.E. General clinical manifestations of Human immunodeficiency virus infection (Including oral, cutaneous, renal, ocular and cardiac diseases). In: **Principles and Practice of infectious diseases.** Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Douglas, R.G. (eds) Florida, USA: Churchill Livingstone, Inc, 2000. p. 1398-1415.

CHAKA, W., VERHEUL, A.F., VAISHNAV, V.V. Induction of TNF- α in human peripheral blood mononuclear cells by the mannoprotein of *Cryptococcus neoformans* involves human mannose binding protein. **Journal of Immunology**, **159**: 2979-2985, 1997.

COFFIN, J.M. Genetic diversity and evolution of retrovirus. In: **Levy, J.A. The Retroviridae.** New York , Plenum Press, p. 19-45, 1993.

COFFIN, J.M., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (Eds). **The general retroviral lifecycle.** VIROLOGY, FIELDS. Disponível em: <http://www.micro.msb.te.ac.uk/335/retroviruses.html>, Lippincott Raven, Philadelphia pp. 1768-1848 ed. 3, 1996.

COLLARD, C.D., MONTALTO, M.C., REENSTRA, W.R., BURAS, J.A., MERI, S., STHAL, G.L. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. **American Journal of Pathology**, **159**: 1045, 2001.

COLLARD, C.D., VAKEVA, A., MORRISEY, M.A., AGAH, A., ROLLINS, S.A., REENSTRA, W.R., BURAS, J.A., MERI, S., STHAL, G.L. Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway. **American Journal of Pathology**, **156**: 1549, 2000.

- CROSDALE, D.J., POULTON, K.V., OLLIVER, W.E., THOMSON, W., DENNING, D.W. Mannose-binding lectin gene polymorphism as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergilosis. **Journal of Infectious Diseases**, **184**: 653-656, 2001.
- CROSS, C.E., BANCROFT, G.J. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and β -glucan receptors, resulting in cytokine production and increase phagocytosis of the encapsulated form. **Infection and Immunity**, **63**: 2604-2611, 1995.
- DEORA, A., RATNER, L. Viral Protein U (Vpu) – mediated enhancement of human Immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of Cellular proliferation. **Journal of Virology**, **75**: 6714-6718, 2001.
- DIAZ, R.S. Genetic diversity of HIV. **Revista de Microbiologia**, **28**: 69-75, 1997.
- DOMMETT, R.M., KLEIN, N., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Journal Compilation**, **86**: 193-209, 2006.
- DUMESTRE-PERARD, C., PONARD, D., ARLAUD, G.J., MONNIER, N., SIM, R.B., COLOMB, M.G. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. **Molecular Immunology**, **39**: 465-473, 2002.
- EISEN, D.P., MINCHITON, R.M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**: **37**: 1496-1505, 2003.
- ESSEX, M. Human immunodeficiency viruses in the developing world. **Advanced of Viruses Research**, **53**: 71-88, 1999.
- EZEKOWITZ, R.A. Role of the mannose-binding lectin in innate immunity. **Journal of Infectious Diseases**, **187**: S335-S339, 2003.

- 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.
- FLAJNICK, M.F. Churchill and the immune system of ectothermic vertebrates. **Immunology Review**, **166**: 5-14, 1998.
- FORTIN, J.F., CANTIN, R., TREMBLAY, M.J. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. **Journal of Virology**, **72**: 2105-2112, 1998.
- FUJITA, T., MATSUSHITA, M. Ficolins, a group of complement activating plasma lectins. **The Twentieth International Lectin Meeting (Interlec 2002) 2002. Fukushima Medical University**: 960-1295, 2002.
- 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.
- FULLER, G.N., JACOBS, J.M., GUILOFF, R.J. Nature and incidence of peripheral nerve syndromes in HIV infection. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, **56**: 372-381, 1993.
- GALLO, R.C. Human retroviruses: a decade of discovery and link with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, **164**: 235-243, 1991.

- GALLO, R.C., WONG-STAAAL, F. Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemia and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. **Blood**, **60**: 545-557, 1982.
- GARCIA-LAORDEN, M.I., MANZANEDO, A., FIGUEROLA, A., SANCHEZ-GARCIA, F., RODRÍGUEZ-GALLEGO, C. Mannose-binding lectin polymorphisms in a Canary Islands (Spain) population. **Genes and Immunity**, **2**: 292-294, 2001.
- GARCIA-LAORDEN, M.I., PENA, M.J., CAMINERO, J.A., GARCIA-SAAVEDRA, A., CAMPOS-HERRERO, M.I., CABALLERO, A., RODRÍGUEZ-GALLEGO, C. Influence of mannose-binding lectin on HIV infection and tuberculosis in a Western-European population. **Molecular Immunology**, **43**: 2143-2150, 2006.
- GARRED, P., HARBOE, M., OETTINGER, T., KOCH, C., SVEJGAARD, A. Dual role of mannose-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-revisited. **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, 1997.
- 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., RITCHER, 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, 1992b.
- GERGERFELT, A.S.V., LISKA, V., LI, P.L., MCCLURE, H.M., HORIE, K., NAPPI, F., MONTEFIORI, D.C., PAVLAKIS, G.N., MARTHAS, M.L., RUPRECHT, R.M., FELBER, B.K. Rev-Independent Simian immunodeficiency virus strain are nonpathogenic in neonatal macaques. **Journal of Virology**, **76**: 96-104, 2002.
- GHEZZI, M.C., RAPONI, G., ANGELETTI, S., MANCINI, C. Serum-mediated enhancement of TNF- α release by human monocytes stimulated with the yeast form of *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, **178**: 1743-1749, 1998.
- GOTTLIEB, M.S., SCHROFF, R., SCHANKER, H.M., WEISMAN, J.D., FAN, P.T., WOLF, R.A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, **305**: 1425-1431, 1985.
- GRAZIOSI, C., SOUDEYNS, H., RIZZARDI, G.P., BART, P.A., CHAPUIS, A., PANTALEO, G. Immunopathogenesis of HIV infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **14**: 135-142, 1998.
- GREENE, W.C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, **324**: 308-317, 1991.

- GREENE, W.C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, **324**: 308-317, 1991.
- HAHN, B.H., SHAW G.M., DE COCK, K.M., SHARP, P.M. AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, **287**: 607-614, 2000.
- HAKANSSON, Y., REID, K.B. Collectin structure: a review. **Protein Science**, **9**: 1607-1617, 2000.
- HAKOSAKI, Y., YOSHIBA, M., SEKIYAMA, K. Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. **Liver**, **35**: 29-34, 2002.
- HART, M.L., SAIFUDDIN, M., UEMURA, K., BREMER, E.G., HOOKER, B., KAWASAKI, T., SPEAR, G.T. High mannose Glycans and Sialic acid on gp120 Regulate Binding of Mannose-Binding Lectin (MBL) to HIV Type I. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **17**: 1311-1317, 2002.
- 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.
- HEGGELUND, L., MOLLNES, T.E., UELAND, T., CHRISTOPHERSEN, B., AUKRUST, P., FROLAND, S.S. Mannose-binding lectin in HIV infection: relation to disease progression and highly active antiretroviral therapy. **Journal of Acquired Immune deficiency Syndrome**, **32**: 354-361, 2003.
- HIBBERD, M.L., SUMIYA, M., SUMMERFIELD, J.A., BOOY, R., LEVIN, M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. **Lancet**, **353**: 1049-1053, 1999.

- HO, D.D., SARNGADHARAN, M.G., RESNICK, L., DIMARZOVERONESE, F., ROTA, T.R., HIRSCH, M.S. Primary human T-lymphotropic virus type III infection. **Annals of Internal Medicine**, **103**: 880-883, 1985
- HOAN-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.
- 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.
- HOLMSKOV, U., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annual Review Immunology**, **12**: 547-578, 2003.
- HUBER, M. & TRKOLA, A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. **Journal of Internal Medicine**, **262**: 5-25, 2007.
- 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.
- JACK, D.L., KLEIN, N.J., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunology Review**, **180**: 86-99, 2001.
- JACK, D.L., READ, R.C., TENNER, A.J., FROSCH, M., TURNER, M.W., KLEIN, N.J., Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human

- professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. **Journal of Infectious Diseases**, **184**: 1152-1162, 2001b.
- JANEWAY, C.A. JR. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunology today**, **13**: 6-11, 1992.
- JI, X., GEWURS, H., SPEAR, G.T. Mannose-binding lectin (MBL) and HIV. **Molecular Immunology**, **42**: 145-152, 2005.
- 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 Immunological**, **150**: 571-578, 1993.
- JI, Y.M., MATSUSHITA, M., OKADA, H., FUJITA, T., KAWAKAMI, M. The C4 and C2 but not C1 components of complement are responsible for complement activation triggered by the Ra-reactive factor. **Journal of Immunological**, **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 Guine. **Mutat. Res**, **505**: 87-91, 2002.
- KALICHAMY, A., SELVARAJ, P., SWAMINATHAN, S., RAGHAVAN, S., NAREDAN, G., NARAYANAM, P.R. Mannose-binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India. **Tuberculosis**, **87**: 535-543, 2007.
- KELLY, P., JACK, D.L., NAEEM, B., POLLOCK, R.C., KLEIN, N.J., TURNER, M.J., FARTHING, M.J. Mannose-binding lectin is a complement of innate

- mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. **Gastroenterology**, **119**: 1236-1242, 2000.
- KHAN, M.A., ABERHAM, C., KAO, S., AKARI, H., GORELICK, R., BOUR, S., STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. **Journal of Virology**, **75**: 7252-7265, 2001.
- KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**, **12**: 335-351, 2002.
- KLABUNDE, J., UHLMAN, A.C., TEBO, A.E., KIMMEL, J., SCHWARZ, P.G., KREMNSNER, P.G. & KUM, J.F. Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. **Parasitology Research**, **88**: 113-117, 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.
- KORBER, B., MULDOON, M., THEILER, J., GAO, F., GUPTA, R., LAPEDES, A., HAHN, B.H., WOLINSKY, S., BHATTACHARYA, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain. **Science**, **288**: 1789-1796, 2000.
- 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.

- KOWALSKI, M., POTZ, J., BASIRIPOUR, L., DORFMAN, T., GOH, W.C., TERMILLIGER, 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.
- KUIPERS, S., AERTS, P.C., DIJK, H.V. Differential microorganisms-induced mannose-binding lectin activation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **36**: 33-39, 2003.
- KURITZKES, D.R. HIV pathogenesis and viral markers. **HIV/AIDS Clinical Management**, **2**: 1-27, 2000.
- KURTZBERG J, FRIEDMAN HS, KINNEY TR, CHAFFEE S, STINE K, FALLETTA JM, WEINHOLD KJ. Management of human immunodeficiency virus-associated thrombocytopenia with intravenous gamma globulin. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, **9**: 299-301, 1987.
- KWONG, P.D., DOYLE, M.L., CASPER, D.J., CICALA, C., LEAVITT, S.A., MAJEED, S., STEENBEKE, T.D., VENTURI, M., CHAIKEN, I., FUNG, M., KATINGER, H., PARREN, P.W., ROBINSON, J., VAN RYK, D., WANG, L., BURTON, D.R., FREIRE, E., WYATT, R., SODROSKI, J., HENDRICKSON, W.A., ARTHOS, J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. **Nature**, **420**: 678-682, 2002.
- LEE, R.T., ICHIKAWA, Y., KAWASAKI, T., DRICKAMER, K., LEE, Y.C. Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, **299**: 129-136, 1992.
- LEVY, J.A. HIV and pathogenesis of AIDS. **American Society for Microbiology**, Washington, DC, p. 9, 1994.

- LIFSON, J.D., FEINBERG, M.R., REYES, G.R., RABIN, L., BASIRIPOUR, B., CHAKBARTI, S., MOSS, B., WONG-STAAAL, F., STEIMER, K.S., ENGLEMAN, E.G. Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-II/LAV envelope glycoprotein, **Nature**, **323**: 725-728, 1986.
- LIPSCOMBE, R.J., SUMIYA, M., HILL, A.V., LAU, Y.L., LEVINSKY, R.J., SUMMERFIELD, J.A, TURNER, M.W. 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.F. Genomic diversity and molecular phylogeny of human and simian T-cell lymphotropic viruses. **Katholieke University Leuven**, 105p, 1996.
- LOBST, 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.
- LOVELESS, R.W., HOLMSKOV, U., FEIZI, T. Collectin-43 is a serum lectin with a distinct pattern of carbohydrate recognition. **Immunology**, **4**: 651-659, 1995.
- 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.

- LUTY, A.J., KUN, J.F., KREMSNER, P.G. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Infectious Diseases**, **178**: 1221-1224, 1998.
- MCMICHAEL, A.J., ROWLAND-JONES, S.L. Cellular immune responses to HIV. **Nature**, **410**: 980-987, 2001.
- 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(6)**: 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.
- 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., 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.
- MILLER, M.E., SEALS, J., KAYE, R., LEVITSKY, L.C. A familial, plasma associated defect of phagocytosis. **Lancet**, **II**: 60-63, 1968.
- MILLER, M.P. Tools for population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3v. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. **Department of Biological Sciences Northern Arizona University**. 1999.
- MUTO, N.A. **Polimorfismo da região promotora do Gene *MBL* (Mannose-binding lectin) e o seu impacto na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência humana 1 (HIV-1) e na progressão da SIDA/AIDS**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2005.
- MYERS, G., BERZOFKY, 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.

- NAUTA, A.J., CASTELANO, G., XU, W., WOLTMAN, A.M., BORRIAS, M.C., DAHA, M.R., VAN KOOTEN, C., ROSS, A. Opsonization of C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. **Journal of Immunology**, **173**: 3044, 2004.
- NAVIA, B.A., CHO, E.S., PETITO, C.K., PRICE, R.W. The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. **Annals of Neurology**, **19**: 525-535, 1986.
- NAVIA, B.A., JORDAN, B.D., PRICE, R.W. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. **Annals of Neurology**, **19**: 517-524, 1986.
- NETH, O., JACK, D.L., DODDS, A.W., HOLZEL, H., KLEIN, N.J., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinical 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.
- NIU, M.T., STEIN, D.S., SCHNITTMAN, S.M. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. **The Journal of Infectious Diseases**, **168**: 1490-1501, 1993.

- OGDEN, C.A., DECATHELINEAU, A., HOFFMANN, P.R., BRATTON, D., GHEBREHIWET, B., FADOK, V.A., HENSON, P.M. C1q and mannose-binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **Journal of Experimental Medicine**, **194**: 781, 2001.
- OHTA, M., OKADA, M., YAMASHINA, I., KAWASAKI, T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. **Journal Biological Chemical**, **265**: 1980-1984, 1990.
- PANGANIBAN, A., FIORE, D. Ordered interstrand and intrastand DNA transfer during reverse transcription. **Science**, **241**: 1064-1069, 1988.
- PANTALEO, G; GRAZIOSI, C; FAUCI, S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **New England Journal Medical**, **328**: 1-18, 1993.
- PARREN, P.W., MOORE, J.P., BURTON, D.R., SATTENTAU, Q.J. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. **AIDS**, **13**: 137–162, 1999.
- PASTINI, T., LIITSOLA, K., NIINI, P., ALMINEN, M., SYVÄNEN, A.C. Contribution of the CCR5 and MBL genes susceptibility to HIV type I infection in the Finnish population. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **14**: 171-175, 1998.
- PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, **38**: 133-149, 2001.

- PETERSLUND, N.A., KOCH, C., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. **Lancet**, **358**: 637-638, 2001.
- PIOT, P., BARTOS, M., GHYS, P.D., WALKER, N., SCHARTLANDER, B. The Global impact of HIV/AIDS. **Nature**, **410**: 968-973, 2001.
- POIGNARD, P., MOULARD, M., GOLEZ, E., VIVONA, V., FRANTI, M., VENTURINI, S., WANG, M., PARREN, P.W., BURTON, D.R. Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies. **Journal of Virology**, **77**: 353-365, 2003.
- PONTES, G.S., TAMEGÃO-LOPES, B., MACHADO, L.F.A., AZEVEDO, V.N., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R., LEMOS, J.A.R., VALLINOTO, A.C.R. Characterization of Mannose-binding lectin gene polymorphism among human T-cell lymphotropic virus 1 and 2 infected asymptomatic subjects. **Human Immunology**, **66**: 892-896, 2005.
- 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 Letters**, **58**: 171-175, 1997.
- RATNER, L., GALLO, R.C., WONG-STAAAL, F. HTLV-II, LAV, ARV are variants of the same AIDS virus. **Nature**, **313**: 636-637, 1985.
- REITTER, J.N., MEANS, R.E., DESOISERS, R.C. A role for carbohydrate in immune evasion in AIDS. **Nature Medicine**, **4**: 679-684.

- 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-II with sera from AIDS patients. **Science**, **228**: 593-595, 1985.
- ROSENBERG, E.S., BILLINGSLEY, J.M., CALIENDO, A.M., BOSWELL, S.L., SAX, P.E., KALAMS, S.A., WALKER, B.D. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, **278**: 1447-1450, 1997.
- ROY, S., KNOX, K., SEGAL, S., GRIFFITHS, D., MOORE, C.E., WELSH, K.I., SMARASON, A., DAY, N.P., MCPHEAT W.L., CROOK, D.W., HILL, A.V. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case control study. **Lancet**, **359**: 1569-1573, 2002.
- SAIFUDDIN, M., HART, M.L., GEWURZ, H., ZHANG, Y., SPEAR, G.T. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type I. **Journal of Virology**, **81(4)**: 949-955, 2000.
- SANTOS, I.K., COSTA, C.H., KRIEGER, H., FEITOSA, M.F., ZURAKOWSKI, D., FARDIN, B., GOMES, R.B., WEINER, D.L., HARN, D.A., EZEKOWITZ, R.A., EPSTEIN, J.E. Genotypes of the Mannan-Binding Lectin Gene and Susceptibility to Visceral Leishmaniasis and Clinical Complications. **Journal of Infection Diseases**, **195**: 2007.
- SANTOS, S.E.B., GUERREIRO, J.F. The indigenous contribution to the formation of the population of Brazilian Amazon Region. **Revista Brasileira de Genética**, **18**: 311-315, 1995.
- SASAKI, K., TSUTSUMI, A., WAKAMIYA, N. Mannose-binding lectin polymorphism in patients with hepatitis C virus infection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, **35**: 960-965, 2000.

- 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.
- SATO, R., MATSUSHITA, M., MIYATA, M., SATO, Y., KASUKAWA, R., FUJITA, T. Substances reactive with mannose-binding protein (MBP) in sera of patients with rheumatoid arthritis. **Fukushima Journal of Medical Science**, **43**: 99, 1997.
- SAWAYA, B.E., KHALILI, K., GORDON, J., TAUBES, R., AMINI, S. Cooperative interaction between HIV-1 regulatory protein Tat and Vpr modulates transcription for the viral genome. **The Journal of Biological Chemistry**, **275**: 35209-35214, 2000.
- 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 mannose binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. **Nature Structural Biology**, **1**: 789-794, 1994.
- SHERMAN, M. & GREENE, W.C. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. **Microbes and Infection**, **4**: 67-73, 2002.
- SILVA, M.T., CENTEVILLE, M., TANI, S.M., TORO, A.A., ROSSI, C., VILELA, M.M. Imunoglobulinas séricas em crianças com exposição perinatal ao vírus da imunodeficiência humana. **Jornal de Pediatria**, **167**: 209-218, 2001.

- SMITH, M.W., CARRINGTON, M., WINKLER, C., LOMB, D., DEAN, M., HUTTLEY, G., O' BRIEN, S.J. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. **Nature Medicine**, **3**: 1052-1053, 1997.
- SONG, L.H., BINH, V.Q., DUY, D.N., JÜLIGER, S., BOCK, T.C., LUTY, A.J.F., KREMSNER, P.G., KUN, J.F.J. Mannose-binding lectin gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. **Mutation Research**, **522**: 119-125, 2003.
- SPEAR, G.T., ZARIFARD, M.R., XIN, J., SAIFUDDIN, M. Inhibition of DC-SIGN-mediated trans infection of T cells by mannose-binding lectin. **Immunology**, **110**: 80-85, 2003.
- SPRONG, T., JACK, D.L., KLEIN, N.J., TURNER, M.W., VAN DER LEY, P., STEEGHS, L., JACOBS, L., VAN DER MEER, J.W.M., VAN DEUREN, M., 2004. Mannose-binding lectin enhances IL-1 and IL-10 induction by nonlipopolisaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. **Cytokine**, **28**: 59-66, 2004.
- STARR, S.E. Immunopathogenesis of Pediatric HIV Infection. In: SHEARER, W.T., HANSON, I.C., **Medical Management of AIDS in children**, 53-68, 2003.
- STEFFENSEN, R., THIEL, S., VARMINING, 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 Immunology Methods**, **241**: 33-42, 2000.
- STENGAARD-PEDERSEN, K.S., THIEL, M., GADJEVA, M., MOLLER-KRISTENSEN, R., SORENSEN, L.T., JENSEN, A.G., SJOHOLM, L., FUNGER

- and JENSENIUS, J.C. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. **New England Journal of Medicine**, **349**: 554-560, 2003.
- SULLIVAN, K.E., WOOTEN, C., GOLDMAN, D., PETRI, M. Mannose binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumathoids**, **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.
- 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 opsonization. **Lancet**, **2**: 1236-1239, 1989.
- TAKAHASHI, M., ENDO, Y., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. A truncated form of mannose binding lectin associated serine protease (MASP-2) expressed by alternative polyadenilation 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.
- TAYLOR, M.E., BRICKELL, P.M., CRAIG, R.K, SUMMERFIELD, J.A. Structure and evolutionary origin of de gene encoding a human serum mannose-binding protein. **The Biochemical Journal**, **262**: 763-771, 1989.
- TEMIN, H.M., MIZUTAMI, S. RNA-dependent DNA polimerase in virions of Rous Sarcoma Virus. **Nature**, **226**: 1211-1213, 1970.

- 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.
- THIO, C.L., MOSBRUGER, T., ASTEMBORSKI, J. Mannose-binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. **Journal of Virology**, **79**: 9192-9196, 2005.
- THOMAS, H.C., FOSTER, G.R., SUMIYA, M., MCINTOSH, D., JACK, D.L., TURNER, M.W., SUMMERFIELD, J.A. Mutation of gene of mannose-binding lectin protein associated with chronic hepatitis B infection. **Lancet**, **348**: 1417-1419, 1996.
- TIN, S.K., LEE, L.Y., THUMBOO, J., KOH, D.R., FONG, K.Y. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human Mannose Binding Lectin (MBL-2) gene. **Journal of Immunological Methods**, **303**: 148-151, 2005.
- TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Immunobiology**, **199**: 327-339, 2003.

- TURNER, M.W., HAMVAS, R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. **Reviews Immunogenetics**, **2**: 305-322, 2000.
- UNAIDS/WHO. **AIDS epidemic update**: December 2007, World Health Organization. Disponível em <http://www.unaids.org/en/HIV_data/epi2007/>. Acesso em: 18 Março 2008.
- VALDIMARSON, H., STEFANSON, M., VIKINGSDDOTTIR, T. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to deficient humans. **Scandinavian Journal of Immunology**, **48**: 116-123, 1998.
- VALLINOTO, A.C.R., COSTA, M.R.M., ALVES, A.E.M., MACHADO, L.F.A., AZEVEDO, V.N., SOUZA, L.L.B., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. **Molecular Immunology**: IN PRESS.
- VARMUS, H.E., SWANSTROM, R. Replication of retrovirus In: **RNA Tumor Virus**. Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J. New York, Cold Spring Harbour Laboratory, p. 75-134, 1985.
- VERGA FALZACAPPA, M.V., SEGAT, L., PUPPINI, B., AMOROSO, A., CROVELLA, S. Evolution of the mannose-binding lectin. **Genes and Immunity**, **5**: 653-661, 2004.
- VERGIS, E.N. & MELLORS, J.W. Natural history of HIV-1 infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, **14**: 809-825, 2000.
- 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.
- 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.
- WEI, X., DECKER, J.M., WANG, S., HUI, H., KAPPES, J.C., WU, X., SALAZAR-GONZALES, J.F., SALAZAR, M.G., KILBY, J.M., SAAG, M.S., KOMOVA, N.L., NOWAK, M.A., HAHN, B.H., KWONG, P.D., SHAW, G.M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, **442**: 307-312, 2003.
- WEI, X., GUOSH, S.J., TAYLOR, M.E., JOHNSON, V.A., EMINI, E.A., DEUTSCH, P., LIFSON, J.D., BONHOEFFER, S., NOWAK, M.A., HAHN, B.H., SAAG, M.S., SHAW, G.M. Viral dynamics in Human Immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature**, **373**: 117-122, 1995.
- WEISS, S., KONIG, B., MÜLLER, H.J., SEIDEL, H., GOODY, R.S. Synthetic human tRNA^{Lys3} and natural bovine tRNA^{Lys3} interact with HIV-1 reverse transcriptase and serve as specific primers for retroviral cDNA synthesis. **Gene**, **111**: 183-197, 1992a.
- 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**: 389-393, 1998.
- 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.
- 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., GRUPTA, K., SAIFUDDIN, M., ZARIFFARD, M.R., SPEAR, G.T. Interaction of mannose-binding lectin with HIV-1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **20**: 327-335, 2004.
- YOKOTA , Y., ARAI, T., KAWASAKI, T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. **Journal of Biochemical**, **117**: 414-419, 1995.
- YONG, M., UEMURA, K., OKA, S., KOSUTSUMI, Y., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. Antitumor activity of mannan-binding protein *in vivo* as revealed by a virus expression system: mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**: 371-375, 1999.

ZHOU, J., AIKEN, C. Nef Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 infectivity resulting from intervirion fusion: Evidence supporting a role for Nef at the virion envelope. **Journal of Virology**, **75**: 5851-5859, 2001.

ANEXOS



Anexo 1.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre *avaliação dos polimorfismos no gene MBL e o seu impacto na infecção pelo HIV e co-infecções*, que está sendo desenvolvida no Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
2. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
3. O título do projeto é: *Estudo do perfil imunogenético dos portadores do HIV-1 e de co-infecções: avaliação do papel do polimorfismos no gene MBL (Mannose-Binding Lectin) na susceptibilidade à infecção e como fator de progressão à Aids.*
4. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, Biomédico, Professor Adjunto da Universidade Federal do Pará.
5. O objetivo da pesquisa é descrever a associação dos polimorfismos no gene MBL e o seu possível impacto na infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana 1*.
6. Essa pesquisa não oferece riscos, porque as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada para a detecção dos polimorfismos no gene *MBL* de pacientes soropositivos e posteriormente estocadas a -20°C no Laboratório de Virologia da UFPA para pesquisas futuras.
7. Toda nova pesquisa a ser feita com o material estocado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.
8. Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas e seringas, não oferecendo risco para a pessoa.
9. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
10. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
11. O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar um melhor entendimento sobre a influência dos polimorfismos no gene *MBL*, o qual está associado à resposta imune do hospedeiro, na infecção pelo HIV-1 bem como o seu impacto nas manifestações clínicas dos pacientes.
12. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Assinatura do Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido(a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____ / ____ / ____

Assinatura da participante

Prontuário: _____

Protocolo: _____

Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia, Laboratório de Virologia, Fone/fax: (91) 3201-7587; e-mail: vallinoto@ufpa.br

**Anexo 2.**

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

CENTRO DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO (CTA)

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. N° do Protocolo:
2. Data de coleta de dados:
3. Iniciais do Paciente:
4. Data de coleta das amostras:

Dados Epidemiológicos da Mulher

5. Data do Nascimento:
6. Idade:
7. Município de residência anterior (se reside a menos de 5 anos no endereço atual):
8. Onde reside atualmente:
 1. No estabelecimento 3. Casa alugada
 2. Casa própria 4. Com parentes
9. Escolaridade:
 1. Não alfabetizado 4. 1° grau completo 7. 3° grau incompleto
 2. Alfabetizado 5. 2° grau incompleto 8. 3° grau completo
 3. 1° grau imcompleto 6. 2° grau completo
10. Estado Civil:
 1. Casada 2. Solteira 3. Amigada 4. Desquitada 5. Viúva
11. Filhos: 1. Sim 2. Não Se sim, quantos: _____
12. Amamentou? 1. Sim 2. Não
13. Mora com eles? 1. Sim 2. Não
14. Já fez algum aborto? 1. Sim 2. Não
15. Quando iniciou a profissão:
 1. 1 ano 2. 2 anos 3. 3 anos 4. Mais de 3 anos 5. Outros
16. Qual o motivo?
 1. Desemprego 2. Dívida 3. Gosta 4. Outros
17. Comportamento Sexual:
 1. Com parceiro(a) heterossexual 2. Bissexual 3. Homossexual
 4. Usuário de drogas não-injetáveis 5. Usuário de drogas EV 6. Múltiplos(a) parceiros(a)
 7. Parceiro Transfudido 8. Parceiro hemofílico
 9. Com parceiro que tinha múltiplos parceiros (promíscuo) 10. Parceiro portador de HIV
 11. Portador de AIDS
18. Faz seleção de parceiros: 1. Sim 2. Não
19. Número de parceiros por semana: 1. Nenhum 2. Um parceiro 3. Parceiro único 4. Dois a 19 parceiros 5. 20 ou mais parceiros 6. Não quer comentar
20. Parceiros de (ou em) outros estados: 1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais: _____
21. Parceiros de (ou em) outros países: 1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais: _____
22. Sexo anal: 1. Sempre 2. As vezes 3. Nunca 4. Não quer comentar 5. Não se aplica
23. Usa camisinha? 1. Sim 2. Não 3. As vezes 4. Só quando o parceiro exige.

24. Sabe o que são DST's? 1. Sim 2. Não
25. Já teve alguma DST? 1. Sim 2. Não
26. Qual? 1. Sífilis 2. Gonorréia 3. Herpes 4. Hepatite 5. Candidíase 6. Tricomoníase 7. Aids
27. Procurou o médico? 1. Sim 2. Não
28. Fez exame? 1. Sim 2. Não
29. Fez tratamento? 1. Sim 2. Não
30. Durante o tratamento manteve relações sexuais? 1. Sim 2. Não
31. Sabe o que é preventivo? 1. Sim 2. Não
32. Já fez? 1. Sim 2. Não
33. Já doou sangue? 1. Sim 2. Não
34. Recebeu os exames do Hemopa? 1. Sim 2. Não
35. Já fez transfusão sanguínea? 1. Sim 2. Não
36. Tem *piercing* ou tatuagem? 1. Sim 2. Não Se sim, há quanto tempo? _____
37. Fez uso de drogas endovenosas alguma vez? 1. Sim 2. Não 3. Não quer comentar
38. Há quanto tempo faz uso de drogas endovenosas? _____
39. Parou? 1. Sim 2. Não
40. Ano do último uso: _____
41. Como você costumava fazer uso de seringa e agulha? 1. Sempre sozinha 2. Dividia com pessoa fixa 3. Dividia com mais de uma pessoa
42. Você já fez uso de drogas injetáveis com seringas ou agulhas compartilhadas com:
 - A) Pessoas que são de ou, normalmente viajam para outros estados?
 1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais estados: _____
 - B) Pessoas que são de ou, normalmente viajam para outros países?
 1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais países: _____

Anexo 3.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Estudo do perfil imunogenético dos portadores do HIV-1 e de co-infecções: avaliação do papel do Polimorfismo do gene MBL (Mannose-Binding Lectin) na susceptibilidade à infecção e como fator de progressão à Aids”**, protocolo nº 2027/05, sob a responsabilidade dos pesquisadores, *Luiz Fernando Almeida Machado, Ricardo Ishak, José Alexandre Rodrigues de Lemos, Anna Elizabeth Martins Alves, Renato Fernandes Pinheiro, Flávia Cristina Matos de Oliveira e Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak* e Coordenação do *Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 20/02/2006, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 20 de fevereiro de 2006


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFGA