



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**POLIMORFISMO DO ÉXON 1 DO GENE DA
LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS
EXPOSTOS À MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

KAROLINA FONSECA KALIL

Belém - Pará
2006

KAROLINA FONSECA KALIL

**POLIMORFISMO DO ÉXON 1 DO GENE DA
LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS
EXPOSTOS À MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maristela Gomes da Cunha

**Belém - Pará
2006**

KAROLINA FONSECA KALIL

**POLIMORFISMO DO ÉXON 1 DO GENE DA
LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS
EXPOSTOS À MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

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

Orientadora	Prof ^a . Dr ^a . Maristela Gomes da Cunha Departamento de Patologia - UFPA
Co - orientador	Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto Departamento de Patologia - UFPA
Banca Examinadora	Prof ^a . Dr ^a . Edilene Oliveira da Silva Departamento de Patologia - UFPA
	Prof ^a . Dr ^a . Marinete Marins Póvoa Seção de Parasitologia - IEC
	Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos Departamento de Fisiologia - UFPA
Suplente	Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves Departamento de Genética - UFPA

Belém, 14 de dezembro de 2006.

“Os desafios são vencidos com incentivos oriundos de críticas feitas por aqueles que almejam a mesma vitória.”

Karolina Fonseca Kalil

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, em especial, a minha avó, Maria de Nazareth, que foi a única pessoa que me incentivou desde o início, no dia da inscrição para a prova de mestrado, até o final.

Ela foi a pessoa que mais ouviu meus desabafos, meus choros, meus pensamentos de desistência e que sempre me perguntava: “Nadaste tanto para morrer na beira da praia?”

Foi ela que nunca me deixou desistir por mais exausta que eu estivesse, com meus dois empregos, com os plantões do hospital, com as aulas e com a prática de laboratório do mestrado, além das outras atividades que tinha como o curso de italiano e o cursinho pré-vestibular.

Por tudo isso é que dedico todo o mérito deste trabalho à senhora, minha vizinha querida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado a graça por estar hoje aqui encerrando minhas atividades como mestranda.

Agradeço aos meus pais, a minha irmã, ao meu sobrinho, a minha avó, a minha mãe neném e a todos os meus familiares por me darem força e incentivo durante esta longa jornada.

Agradeço ao meu namorado Flávio Gomes, à Pietra Petrokovysk e as minhas amigas Sueid Abou e Kátia Balbi por sempre estarem me ajudando nos momentos difíceis que passei.

Agradeço às minhas primas, Enoy Fonseca e Amanda Fonseca, que tiveram uma participação imprescindível na entrega de minha dissertação de mestrado.

Agradeço aos meus professores, Dr^a Maristela Gomes da Cunha e Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto pela orientação oferecida e pela paciência que tiveram todo esse tempo.

Agradeço à Dr^a Izabel Barroso Augusto da Silva por ter cedido as amostras utilizadas neste trabalho.

Agradeço aos estagiários dos Laboratórios de Virologia e de Microbiologia, que sempre me socorreram nos momentos de dúvidas e de execução das técnicas laboratoriais.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de algum modo, ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1.2 BIOLOGIA DOS PARASITOS DA MALARIA.....	16
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
1.4 RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA.....	23
1.4.1 Resposta Imune Inata ou Inespecífica.....	23
1.4.2 Resposta Imune Adquirida ou Específica.....	25
1.5 LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL).....	28
1.5.1 Considerações Gerais.....	28
1.5.2 Estrutura da Lectina Ligadora de Manose (MBL).....	29
1.5.3 Funções da Lectina Ligadora de Manose (MBL).....	31
1.5.3.1 Ligação a agentes patogênicos microbianos.....	31
1.5.3.2 Ativação do Sistema Complemento.....	32
1.5.3.3 Promoção da opsonização independente de complemento.....	33
1.5.3.4 Modulação da Inflamação.....	33
1.5.3.5 Promoção da Apoptose.....	34
1.6 ASPECTOS GENÉTICOS DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL).....	35
1.6.1 Estrutura Genética da MBL.....	35

1.6.2	Polimorfismo associado à Lectina Ligadora de Manose (MBL)	36
1.7	PARTICIPAÇÃO DA MBL NA IMUNIDADE CONTRA DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS.....	39
1.7.1	Participação da MBL na Imunidade Inata.....	39
1.7.2	Polimorfismos associados às doenças.....	42
1.7.3	Polimorfismos Associados às Doenças causadas por Protozoários.....	42
1.7.4	MBL na Malária.....	43
1.8	OBJETIVOS.....	47
1.8.1	Objetivo Geral.....	47
1.8.2	Objetivos Específicos.....	47
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1	CASUÍSTICA E COLETA DE DADOS CLÍNICOS.....	48
2.1.1	Grupo de Indivíduos Primoinfectados.....	48
2.1.2	Grupo de indivíduos não-infectados	50
2.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	51
2.3	ASPECTOS ETICOS.....	52
2.4	DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA.....	52
2.5	GENOTIPAGEM PARA DETECTAR POLIMORFISMOS NO GENE DA UTILIZANDO REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	53
2.6	ANALISE ESTATISTICA.....	55
3	RESULTADOS.....	57
3.1	FREQÜÊNCIAS ALELICAS E GENOTÍPICAS DO GENE <i>MBL₂</i> NOS GRUPOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS POR	

	<i>PLASMODIUM VIVAX</i> E NÃO INFECTADOS.....	57
3.2	ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	61
3.3	ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO ÉXON 1 DO GENE <i>MBL₂</i> COM A INTENSIDADE DOS SINAIS E SINTOMAS DURANTE O PRIMEIRO EPISÓDIO DE MALÁRIA.....	63
3.4	ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO ÉXON 1 DO GENE <i>MBL₂</i> COM A DENSIDADE PARASITÁRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS POR <i>Plasmodium vivax</i>	72
3.5	FREQUÊNCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA EM INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS QUE RESIDEM EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE <i>Plasmodium vivax</i>	73
4	DISCUSSÃO	89
5	CONCLUSÕES	101
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
7	ANEXOS	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Freqüências alélicas do gene <i>MBL₂</i> em grupos de indivíduos primoinfectados por <i>Plasmodium vivax</i> e não infectados	58
Tabela 2 - Freqüências genotípicas do gene <i>MBL₂</i> em grupos de indivíduos primoinfectados por <i>Plasmodium vivax</i> e não infectados com e sem relato de episódio prévio de malária	62
Tabela 3 - Freqüências alélicas do gene <i>MBL₂</i> em grupos de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> e que apresentam diferentes graus de intensidade dos sinais e sintomas clínicos, durante o primeiro episódio de malária.....	68
Tabela 4 - Freqüências genotípicas do gene <i>MBL₂</i> em grupos de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> e que apresentam diferentes graus de intensidade dos sinais clínicos, durante o primeiro episódio de malária.....	69
Tabela 5 - Freqüências genotípicas do gene <i>MBL₂</i> em grupos de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> e que apresentam diferentes graus de intensidade dos sintomas clínicos, durante o primeiro episódio de malária.....	70
Tabela 6 - Valores de p e G obtidos na análise estatística para comparação entre os grupos que apresentaram diferentes graus de sintomas clínicos e freqüência de genótipos do éxon 2 do gene <i>MBL₂</i>	71
Tabela 7 - Genótipos do gene <i>MBL₂</i> e densidade parasitária determinada pelo exame da gota espessa (média ± dp) em indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	73

Tabela 8 - Freqüências alélicas do gene <i>MBL₂</i> em indivíduos que residem em área de transmissão de malária distribuídas de acordo com o número de episódios prévio de malária	75
Tabela 9 - valores de p e χ^2 obtidos na comparação das freqüências alélicas distribuídas de acordo com o número de episódios prévio de malária	76
Tabela 10 - Freqüências genótípicas em análise com genótipos agrupados em indivíduos que residem em área de transmissão de malária distribuídas de acordo com o número de episódios de malária	77
Tabela 11 – Freqüências dos genótipos do gene da <i>MBL₂</i> em indivíduos que residem em área de transmissão da malária distribuídas de acordo co o número de episódios de malária	79
Tabela 12 - Valores de p e χ^2 obtidos na análise estatística para comparação das freqüências de genótipos do éxon 1 do gene <i>MBL₂</i> entre os grupos que apresentaram diferentes números de episódios de Malária.....	80
Tabela 13 - Freqüências alélicas do gene <i>MBL₂</i> em indivíduos não infectados por <i>P. vivax</i> que residem em área de transmissão distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.....	82
Tabela 14 - Valores de p e G obtidos na comparação das freqüências alélicas distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.....	83

Tabela 15 - Frequências genótípicas do gene <i>MBL₂</i> (genótipos agrupados) em indivíduos não infectados por <i>P. vivax</i> que residem em área de transmissão distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.....	85
Tabela 16 - Frequência de genótipos do gene <i>MBL₂</i> em grupos indivíduos não infectados por <i>P. vivax</i> que residem em área de transmissão distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.....	87
Tabela 17. Valores de p e G obtidos na análise estatística para comparação das frequências de genótipos do éxon 2 do gene <i>MBL₂</i> entre os grupos que apresentaram diferentes tempos após o último episódio de malária.....	88

RESUMO

Neste estudo analisamos a frequência de polimorfismos no éxon 1 do gene 2 da lectina Ligadora de manose (MBL) em indivíduos expostos à malária causada por *Plasmodium vivax*. Foram analisadas amostras de 81 indivíduos primoinfectados e 250 não infectados. Os indivíduos não infectados constituíram dois grupos, um que relatou nunca ter tido malária e o outro que teve de 1 a 4 ou mais episódios da doença. No grupo infectado, foi investigada a associação entre os polimorfismos e a suscetibilidade à infecção, a intensidade dos sinais e sintomas clínicos e a parasitemia. As mutações foram identificadas por reação em cadeia da polimerase e análise de restrição. O grupo infectado apresentou distribuição de frequências alélicas e genóticas diferente do grupo não infectado. As frequências dos alelos *MBL*A*, *MBL*B*, *MBL*C* e *MBL*D* nos indivíduos infectados foram 64,20%, 19,75%, 0,00% e 15,43%, nos não infectados que nunca tiveram malária as frequências foram 72,96%, 14,80%, 3,06% e 9,18%, e nos não infectados que relataram episódio prévio de malária as frequências foram 74,67%, 14,81%, 2,30% e 8,22%, respectivamente. O alelo *MBL*B* foi associado à sintomatologia intensa e ao aumento na parasitemia, enquanto o alelo *MBL*D* foi associado às parasitemias mais baixas. No grupo não infectado, a distribuição das frequências alélicas e genóticas variou com o número de episódios e o tempo decorrido após o último episódio de malária. As variantes *MBL*B* e *MBL*D* contribuíram para essa variação. Esse foi o primeiro estudo para avaliar o impacto desses polimorfismos do gene da lectina ligadora de manose na resposta imune inata em indivíduos expostos naturalmente à malária causada por *Plasmodium vivax*.

ABSTRACT

In this study we evaluated the frequency of polymorphism in exon 1 of gene 2 of mannose-binding lectin (MBL) in individuals exposed to malaria caused by *Plasmodium vivax*. We analyzed 81 samples from primo-infected and 250 from non-infected individuals. In the non-infected group were included individuals that reported never had malaria and individuals that have had 1 to 4 or more malaria episodes. In this study we analyzed the association between polymorphisms and susceptibility to infection, intensity of signals and clinical symptoms and parasitaemia. Polymorphisms in MBL gene were detected by polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis. The infected group presented allele and genotype frequency distribution different from non-infected group. The frequencies of the alleles MBL*A, MBL*B, MBL*C and MBL*D in infected individuals were 64.20%, 19.75%, 0.00% and 15.43%, in non-infected individuals that had never had malaria the frequencies were of 72.96%, 14.80%, 3.06% and 9.18%, and in non-infected individuals that have reported previous episode of malaria the frequencies were 74.67%, 14.81%, 2.30% and 8.22%, respectively. The allele *MBL*B* was associated with intense symptomology and increase in parasitemia, whereas the allele *MBL*D* was associated with lower parasitemias. In non-infected group, allele and genotype frequency varied according to the number of episodes and the time after the last malaria episode. The alleles *MBL*B* and *MBL*D* contributed for this variation. This was the first study to evaluate the impact of these polymorphisms of MBL gene in innate immune response of individuals naturally exposed to malaria caused by *Plasmodium vivax*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é um grave problema de saúde pública, que ocorre, principalmente, nos países de clima tropical e subtropical. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 2 bilhões de pessoas estão exposta ao risco de adquirir malária, sendo que a área geográfica onde ocorre a transmissão compreende cerca de 90 países, distribuídos na África, Ásia e América do sul e central (OMS, 2002).

Os relatos sobre as febres intermitentes datam da era pré-cristã. Em material obtido de múmias egípcias de 3500 A.C, já foram identificados antígenos de *Plasmodium*. Hipócrates foi quem primeiro caracterizou as manifestações clínicas da malária, suas complicações e associação com as estações do ano. O termo que designou a doença surgiu no século XIX, quando se acreditava que a doença estava intimamente relacionada aos vapores nocivos exalados dos pântanos (*mal air= mau ar*).

Em 1880, o médico francês, Charles Alphonse Laveran, identificou o agente etiológico da malária, ao observar organismos em movimento em uma preparação de sangue de uma paciente com sinais e sintomas sugestivos de malária. Em 1899, Grassi e colaboradores descreveram o ciclo evolutivo completo do agente etiológico no homem. No ano seguinte, Ronald Ross confirmou que a malária era transmitida por mosquito do gênero *Anopheles* (Bruce-Chawatt, 1985).

A malária é uma doença infecciosa de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, causada por protozoários

intracelulares da família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*, sendo que apenas quatro espécies podem infectar o homem, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (NEVES, 2005). Destas quatro espécies de *Plasmodium* humanos, o *P. vivax* é o mais amplamente distribuído nas zonas tropicais e subtropicais do globo.

O *Plasmodium falciparum*, comparado às outras espécies, causa maior morbidade e mortalidade, e apresenta-se hoje como um grave problema terapêutico, devido a crescente resistência a cloroquina e outras drogas. Esta resistência já foi detectada na maioria das zonas endêmicas conhecidas (Sachs & Malaney, 2002). O *P. vivax* e o *P. falciparum* têm maior importância epidemiológica no Brasil. Embora raramente letal, o *P. vivax* é responsável por cerca de 70 a 80% de todos os casos de malária registrados anualmente (Ministério da Saúde/SVS, 2002).

1.2. BIOLOGIA DOS PARASITAS DA MALÁRIA

Os plasmódios são parasitas intracelulares obrigatórios e apresentam dois tipos de reprodução no seu ciclo, uma assexuada ou esquizogonia, que ocorre no hospedeiro intermediário, e outra sexuada ou esporogonia que ocorre no hospedeiro definitivo (Good *et al.*, 2004).

O ciclo de vida dos parasitas da malária humana inicia com o ciclo pré-eritrocítico, quando os esporozoítas são inoculados na corrente sangüínea pelos mosquitos. Em menos de uma hora, estes esporozoítas alcançam o fígado e

invadem os hepatócitos, formando estruturas arredondadas denominadas criptozoítas, que iniciam a reprodução assexuada (Smith *et al.*, 2002).

A invasão no hepatócito é crucial para a evolução da infecção; no período de uma semana ocorre multiplicação intracelular do parasita, originando esquizontes hepáticos, que irão gerar cerca de 30.000 merozoítas a partir de um único esporozoíta. Os merozoítas liberados invadem as hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico (Good, 2005).

Após a ruptura dos hepatócitos, inicia o ciclo eritrocítico com a migração dos merozoítas que invadem as hemácias, dando início a esquizogonia sangüínea, levando ao aumento da densidade parasitária. Nesta fase, os merozoítas se transformam em trofozoítas, que se diferenciam em esquizontes e, finalmente, em novos merozoítas que continuam o ciclo com a invasão de outras hemácias (Figura 1). No entanto, após alguns ciclos, e em condições adversas no hospedeiro, alguns merozoítas evoluem para a produção dos gametócitos (macrogametócito e microgametócito). Estas formas são transmitidas para o hospedeiro invertebrado, no momento do repasto sangüíneo, mantendo desta forma o ciclo de vida do *Plasmodium* (Good *et al.*, 2004).

Após a ingestão pelo mosquito, os gametócitos iniciam a fase sexuada do ciclo de vida do parasita. No tubo digestivo dos mosquitos do gênero *Anopheles*, os gametócitos se diferenciam em uma célula ovo ou zigoto que, depois de algum tempo evolui para uma forma móvel, o oocineto e, posteriormente, o oocisto que acaba se rompendo e, conseqüentemente, liberando os elementos filhos, os esporozoítas, os quais se difundirão para a

hemolinfa do inseto e serão concentrados nas glândulas salivares, no período de 7 a 18 dias após a infecção. No momento do repasto sangüíneo, ocorrerá a inoculação de esporozoítas, iniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado suscetível (Moore *et al.*, 2002; Neves, 2005).

Após a inoculação dos esporozoítas, a densidade parasitária aumenta até atingir níveis que podem ser detectados pelo exame direto do sangue. Neste momento, atingiu-se a patência, sendo o período anterior denominado de período pré-patente (Smith *et al.*, 2002).

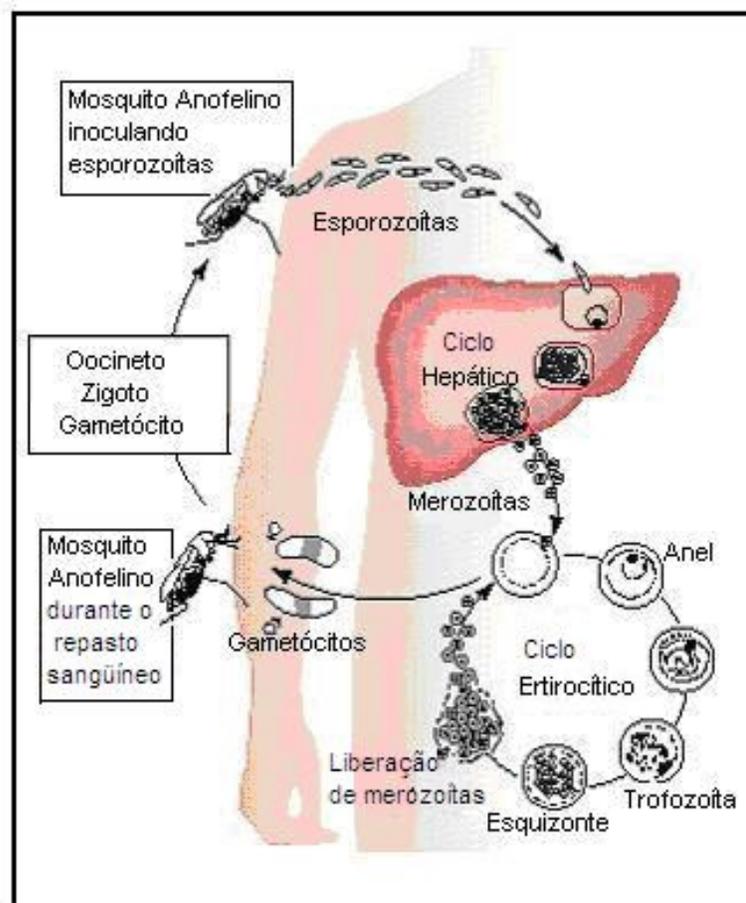


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium*

Fonte: Good *et al.*, 2005 (com adaptações)

1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA

Os sinais e sintomas clínicos na malária são manifestações decorrentes tanto da presença do parasita, como da intensidade da resposta imune do hospedeiro contra antígenos específicos do parasita. A principal característica clínica da malária em indivíduos que ainda não adquiriram algum grau de proteção é a crise malárica, constituída principalmente por febre, calafrios e cefaléia (Karunaweera *et al.*, 2003).

A febre está diretamente relacionada com a liberação dos merozoítas sangüíneos, que ocorre ao final da esquizogonia, quando há o rompimento dos eritrócitos parasitados. Após a sincronia, desta fase do ciclo da população dos parasitas, a febre será intermitente. A resposta imune contra antígenos desta fase, e a conseqüente produção de citocinas, como a Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) estão envolvidas nos mecanismos de manifestação da febre. Estas citocinas atuam diretamente no centro termorregulador do hospedeiro (Clark & Cowden, 2003). A febre que ocorre em períodos regulares de tempo, é precedida de calafrios. Estes calafrios são devido à capacidade da IL-1 também atuar sobre neurônios presentes no hipotálamo anterior, impedindo que estes exerçam seu papel inibitório sobre o hipotálamo posterior, gerando uma vasoconstrição periférica, que desencadeia a diminuição da temperatura corporal, suscitando em sensações de arrepios, denominadas de calafrios. Após o acesso de febre o paciente tem sudorese e sensação de alívio. Assim, os paroxismos febris na

malária apresentam quatro períodos sucessivos, o de frio, o de calor, o de suor e apirexia. Na maioria dos doentes, os sintomas relacionam-se com o aumento brusco da temperatura do corpo, e caracterizam-se pela sensação de frio intenso, calafrio com marcante tremor generalizado e bater de dentes (LEÃO *et al.*, 1997).

Os episódios febris na malária são intermitentes, com intervalos de 48 a 72 horas. Esta crise se repete de forma intermitente e têm as mesmas características na malária causada pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Entretanto, com a evolução da infecção é possível observar diferenciação clínica entre as crises causadas pelas diferentes espécies de plasmódios. Na malária causada por *P. vivax* a febre se repete quase que sincronicamente a cada 48 horas e a infecção não costuma evoluir com aparecimento de complicações sistêmicas; na malária causada por *P. falciparum* a febre é intermitente com periodicidade irregular e na infecção pelo *P. malariae*, a febre repete a cada 72 horas, neste caso os sintomas e sinais clínicos são muito semelhantes aos da infecção causada por *P. vivax*. Com a repetição das crises maláricas, o paciente vai ficando cada vez mais abatido, pálido, aparecem náuseas e vômitos pós-alimentares, mialgias, artralgias e astenia. A anemia é um dos sintomas mais freqüentes no paciente com malária. Esta anemia pode ser bastante acentuada, principalmente nos pacientes em estado mais graves, em crianças e gestantes (LEÃO *et al.*, 1997).

Vários outros sintomas também podem ser apresentados pelos pacientes com malária, tais como; hepatoesplenomegalia, icterícia, alterações gastrointestinais, hipoglicemia e alterações neurológicas. A hepatomegalia é

indício de comprometimento do fígado devido os parasitas se instalarem nos hepatócitos e a esplenomegalia é por causa de alterações no baço devido à lise intensa de hemácias. Isto se deve também à uma elevada concentração de imunocomplexos e a infiltração inflamatória nestes órgãos (Greenwood & Fankule, 1979).

Os sinais e sintomas correlacionam-se com o período de incubação, que é o tempo decorrido entre a inoculação dos esporozoítas e o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Este período varia dependendo da espécie e cepa do parasita, da quantidade de parasitas, da exposição anterior à malária, bem como da resposta imune do paciente. Nas infecções por *P. vivax*, em média são decorridos 14 dias desde a picada do mosquito até o aparecimento das manifestações clínicas, infecções por *P. falciparum* são 12 dias e cerca de 30 dias para *P. malariae* (LEAO *et al.*, 1997).

As formas clínicas da malária podem se dividir em leve, moderada, grave e de urgência. Esta classificação depende de vários fatores, tais como a intensidade e duração da febre e dos sintomas gerais, o nível de parasitemia e a intensidade da anemia (Karunaweera *et al.*, 2003). Assim, indivíduos que já tiveram contato prolongado com o parasita podem apresentar sintomas muito atenuados da doença ou mesmo se tornarem portadores assintomáticos.

A forma moderada relaciona-se com a evolução da malária em indivíduos que adquiriram algum grau de imunidade, devido terem tido vários episódios de malária, e apresentaram boa resposta do sistema imune. Nestes pacientes, a febre não é muito alta, os sintomas gerais, quando existentes, são

discretos, e a parasitemia baixa, em torno de 0,1%. Ainda que possa existir anemia, em geral, o hematócrito permanece normal (Karunaweera *et al.*, 2003).

Nas formas graves, os sinais e sintomas citados acima são intensos e aparecem com complicações. As manifestações mais freqüentes se relacionam com os rins, pulmões, fígado, cérebro e sangue. A febre é variável, porém com freqüência, é alta, a cefaléia e o vômito são persistentes. Outras manifestações incluem icterícia, petéquias e pequenos derrames petequiais, principalmente na conjuntiva ocular. O paciente se sente confuso e com raciocínio lento. A parasitemia é superior a 2% e pode alcançar 30% ou mais. A anemia é muito intensa e o paciente pode ter uma redução de 50% da taxa de hemoglobina, conforme a evolução da doença (Karunaweera *et al.*, 2003).

A malária por *P. vivax* se caracteriza pela evolução lenta, febre intermitente com paroxismos em dias alternados, anemia e esplenomegalia. É possível apresentar recaídas, depois de um período variável de latências. Em indivíduos infectados pela primeira vez, a febre a princípio é irregular ou remitente, com duração de 2 a 4 dias. Essa irregularidade inicial é devido à falta de sincronismo no desenvolvimento do parasita nos glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, a ocorrência simultânea de várias populações de parasitas (Rey, 2001).

1.4. RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA

1.4.1. Imunidade inata ou inespecífica

A imunidade inata ou inespecífica contra os parasitas da malária pode ser classificada em dois tipos, um devido à resistência à infecção com bases genéticas e outro devido aos mecanismos imunológicos mediados por células (Korbel *et al.*, 2004) .

A resistência natural pode estar relacionada às características genéticas do hospedeiro que podem impedir à invasão dos eritrócitos pelos merozoítas. Dessa forma, diminui o número dos parasitas dentro dos eritrócitos infectados, ou então pode causar danos na liberação destes merozoítas que compõem o esquizonte. Sendo assim, reduz também a capacidade destes merozoítas, para invadir outras hemácias após o rompimento e liberação da célula infectada, interferindo com a manutenção do ciclo de vida do parasita (McGilvray *et al.*, 2000).

A resistência baseada em mecanismos imunológicos mediados por células é desenvolvida contra todas as moléculas estranhas ao hospedeiro e contra células não-próprias (Smith *et al.*, 2002). No caso dos parasitas da malária, esta resistência pode ser realizada através da fagocitose de parasitas livre no sangue, os merozoítas, assim como a fagocitose de eritrócitos infectados. As células responsáveis por esta fagocitose são os neutrófilos, monócitos e macrófagos (Allison & Eugui, 1983; Clark, 1987; Clark *et al.*, 1989). As citocinas liberadas por vários tipos celulares também participam destes mecanismos, atuam

contra os parasitas livres e/ou eritrócitos infectados (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Bolad & Berzins, 2000).

A participação das células NK (Natural Killer) na imunidade na malária é outro mecanismo que atua na eliminação dos parasitas mediante a ativação da resposta imune inata (Figura 2). As hemácias infectadas são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas que liberam citocinas, as quais atuam na ativação das células NK. Entre as citocinas que participam desta ativação estão a Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-15 (IL-15), Interleucina-18 (IL-18) e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (Biron, *et al.*, 1999; Cooper, *et al.*, 2004). A interleucina-12, uma citocina inflamatória produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos (CAA), tais como células dendríticas e macrófagos, é a mais potente indutora da citotoxicidade das células NK e da secreção de Interferon- γ (IFN- γ). A IL-12, assim como a IL-18 desenvolvem papel crucial na ativação da resposta imune inata mediada por células NK contra eritrócitos infectados por parasitas da malária (Trinchieri, 1998; Wie *et al.*, 1999).

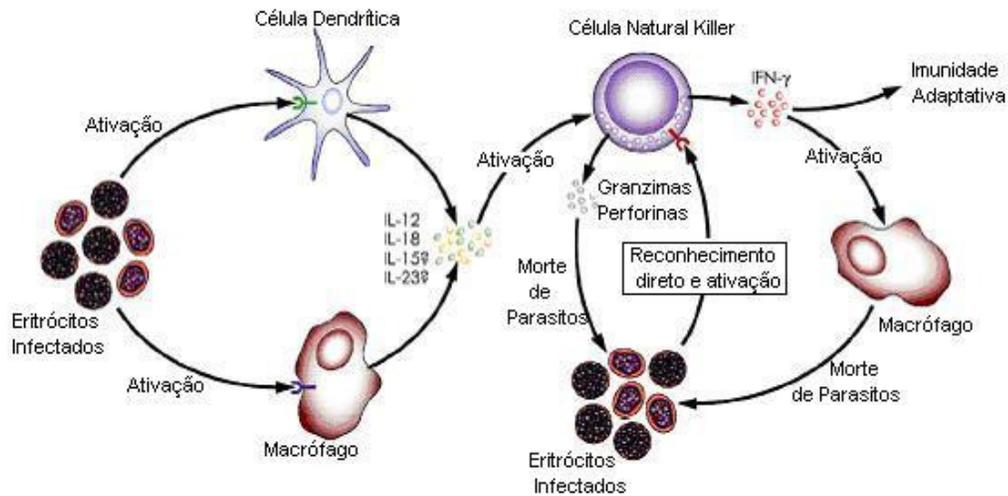


Figura 2. Esquema da resposta imune inata na malária

Fonte: Korbel *et al.*, 2004 (com adaptações)

1.4.2. Imunidade adaptativa ou específica

O ciclo de vida do plasmódio apresenta várias formas evolutivas, tornando complexa a composição antigênica visto que em cada fase do ciclo de vida destes protozoários ocorre a expressão preferencial de um conjunto de moléculas, necessárias para o estabelecimento da infecção das células hospedeiras e modulação da resposta imune (Malaguarnera & Musumeci, 2002; Moore *et al.*, 2002). Portanto, o sistema imune é estimulado a gerar uma resposta diversificada, porém específica contra diferentes formas de cada estágio, assim, contribuindo para evitar a progressão da infecção. Diante desta resposta do sistema imune, o parasita desenvolve mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro (Plebanski & Hiil, 2000; Malaguarnera & Musumeci, 2002; Becker *et al.*, 2003).

A participação da resposta imune celular é extremamente importante para a defesa do organismo humano em todas as doenças infecciosas. Este tipo de resposta pode eliminar o agente patogênico por mecanismos como a fagocitose, a produção de mediadores citotóxicos e a produção de citocinas. As citocinas são capazes de estimular a proliferação de células efetoras, como linfócitos TCD8⁺, além de linfócitos TCD4⁺ e linfócitos B. A proliferação de linfócitos T inicia com a apresentação de antígenos do parasita pelas células apresentadoras de antígeno (CAA), tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que resultará na proliferação de clones específicos de linfócitos B e T, para eliminar o patógeno do organismo (Struik & Riley, 2004).

Durante o ciclo pré-eritrocítico, antígenos das formas esporozoíta e merozoíta são processados por CAA, principalmente pela célula dendrítica, e apresentados aos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ (Plebanski & Hill, 2000). A infecção das células hepáticas resultará na apresentação de antígenos do parasita associados às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe I, reconhecimento e eliminação do hepatócito infectado por ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺ (Malaguarnera & Musumeci, 2002).

Até o presente momento os principais antígenos das formas pré-eritrocíticas, descritos como capazes de ativar células T CD4⁺ e TCD8⁺ são a proteína circunsporozoíta (CS) e a proteína de adesão relacionada à trombospondina (TRAP). Várias citocinas são produzidas nesta resposta imune

celular entre as principais estão, o Interferon- γ (IFN- γ), o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e a Interleucina 10 (IL-10) (Plebanski & Hiil, 2000).

A resposta imune celular na malária pode ser modulada pelas citocinas com ação inibitória, para que a resposta não seja exacerbada (Reth & Brummer, 2004). Entre tais citocinas inibitórias está a IL-10, que participa desta modulação inibindo a ativação do linfócito T, diminuindo a expressão das moléculas de MHC classe II, bem como reduzindo a produção de óxido nítrico (NO), mediador da inflamação (Plebanski & Hiil, 2000).

A resposta imune contra o estágio eritrocítico é de fundamental importância, pois as formas sangüíneas do parasita são responsáveis pelos sintomas clínicos da doença. Por isso, a imunidade adquirida contra essas formas pode reduzir ou eliminar os parasitas, e, conseqüentemente, as manifestações clínicas e a transmissão. Os gametócitos não provocam sintomas relacionados à doença, possivelmente, essas formas sejam pouco imunogênicas. Estudos imuno-epidemiológicos mostraram baixa prevalência de anticorpos contra antígenos dos gametócitos (Struik & Riley, 2004).

No momento da ruptura dos eritrócitos infectados contendo os merozoítas, células dos sistemas imune inato e adaptativo podem contribuir para o controle da parasitemia, essencialmente mantendo os níveis compatíveis com a sobrevivência dos parasitas. A ativação do sistema inato contra os estágios sangüíneos parece ser de baixa efetividade, mas a resposta adaptativa confere algum grau de imunidade humoral e celular (Struik & Riley, 2004).

Inicialmente, propôs-se que a participação dos anticorpos seria, principalmente, através da neutralização do parasita impedindo a penetração de merozoítas no eritrócito. Evidências obtidas na última década em estudos *in vitro* mostraram que anticorpos protetores humanos de indivíduos clinicamente imunes à malária são predominantemente imunoglobulinas citofílicas das subclasses IgG1 e IgG3. Estes anticorpos promovem a inibição da multiplicação do parasita não de forma direta, mas envolvendo os monócitos através do fenômeno denominado ADCI (Antibody-Dependent Cellular Inhibition). O modo com que estes anticorpos atuam *in vitro* ocorre pela ativação de monócitos que secretam mediadores solúveis dentre os quais o TNF α . Estes fatores atuam impedindo a multiplicação das formas trofozoítas do *P. falciparum* dentro dos eritrócitos (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990;1995).

1.5. LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

1.5.1. Considerações gerais

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína sérica que participa da imunidade inata em humanos, ligando às superfícies de microrganismos patogênicos e favorecendo a ativação de mecanismos efetores da imunidade. A MBL é uma proteína secretada pelo hepatócito e mantida em níveis estáveis. A MBL é uma proteína de fase aguda, uma vez que a sua concentração encontra-se aumentada em processos infecciosos. A lectina ligadora de manose

apresenta uma importante função na defesa imediata atuando na ativação do complemento através da terceira via ou via das lectinas (Dommett *et al.*, 2006).

A MBL participa da ativação da via das lectinas que é mediada pelas proteases serinas associadas a MBL (MASPs) e também liga aos receptores na superfície dos macrófagos, facilitando assim a fagocitose após opsonização (Garred *et al.*, 2003). Esta atividade opsônica atribuída à MBL foi descrita em relação à uma deficiência do sistema imune de uma criança do sexo feminino, que sofria de dermatite atópica e freqüentes infecções bacterianas associadas a esta deficiência da fagocitose. Também identificaram que esta deficiência era devido à ausência de um fator plasmático herdado, que foi detectado em ensaios que demonstram a opsonização de leveduras. Posteriormente, verificou-se que a atividade opsônica estava diminuída de 5 a 10% em adultos saudáveis, que durante a infância não apresentava atividade opsônica associada à infecções. Estas observações foram confirmadas em estudo retrospectivo (Richardson *et al.*, 1983).

1.5.2. Estrutura da Lectina Ligadora de Manose (MBL)

A MBL pertence família de proteínas denominadas de colectinas. Os membros dessa família possuem um domínio de colágeno e domínios de lectina (Figura 3) (Turner, 2003).

A MBL humana é uma glicoproteína de 24000 kDA expressa a partir da seqüência de 248 aminoácidos, sendo que o polipeptídeo apresenta aproximadamente 5% de carboidratos (Kilpatrick, 1998; 2002). Em humanos, existem também outras duas colectinas principais, denominadas proteína

surfactante de pulmão A (SP-A) e proteína surfactante de pulmão D (SP-D). Todas as três proteínas são macromoléculas, sendo que a MBL e a SP-A possuem um arranjo estrutural, no qual há associação de duas a seis unidades oligoméricas, formando uma estrutura quaternária que lembra um “ramo de tulipas”, semelhante ao componente C1q do complemento (Hansen & Holmosk, 1998; Gabius *et al.*, 2002; Turner, 2003).

No caso da MBL, várias estruturas oligoméricas variam de dímeros a hexâmeros, sendo que esses oligômeros são baseados em subunidades, compreendendo três cadeias peptídicas idênticas de 32kDa. Cada uma dessas cadeias é caracterizada por um domínio de lectina, também considerado domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC); por uma região hidrofóbica, o domínio de colágeno e por uma região N-terminal rica em cisteína (Figura 3) (Turner, 2003).

No domínio de colágeno, há três cadeias que se associam para formar uma tripla hélice clássica. Na região hidrofóbica, cada cadeia adota uma estrutura espiralizada, e no final da porção carboxi-terminal o domínio de lectina exibe uma característica semelhante à de proteínas globulares. Cada um desses domínios se liga a íons cálcio, onde este é capaz de orientar a ligação da MBL com os grupos 3- e 4-hidroxil de resíduos de carboidratos, como manose, N-acetil-D-glicosamina, fucose e glicose (Turner, 2003).

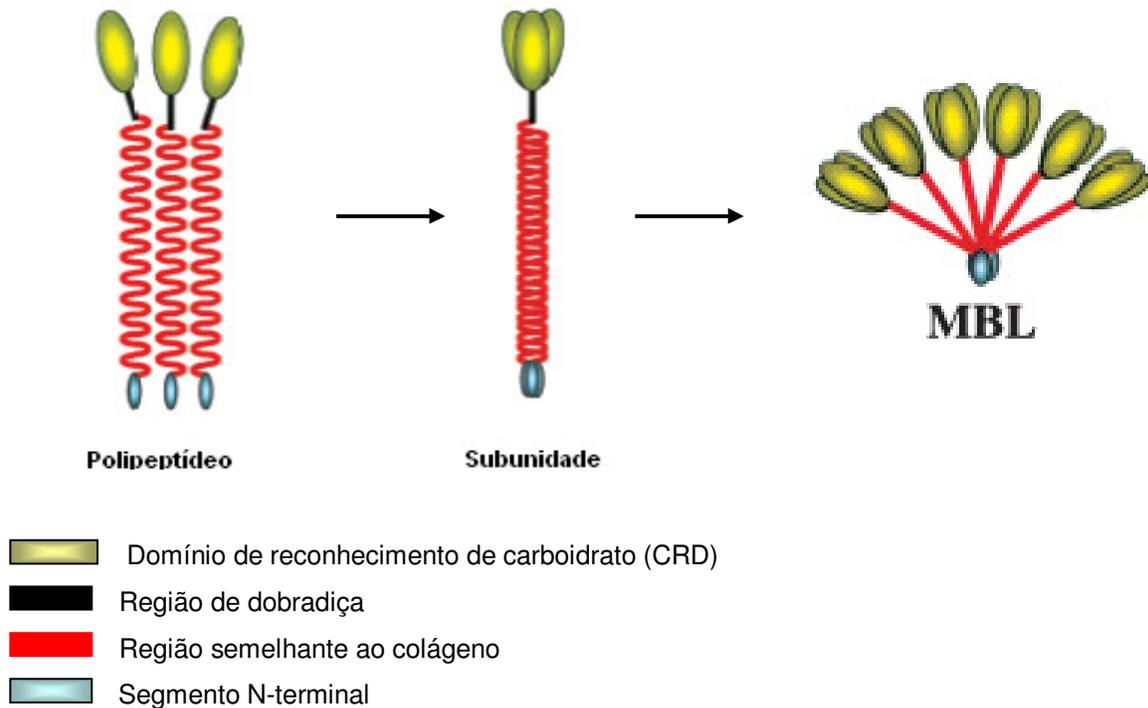


Figura 3. Estrutura esquemática da MBL (Adaptado de Fujita *et al.*, 2004).

1.5.3. Funções da Lectina Ligadora de Manose (MBL)

A MBL é o principal componente do sistema imune inato. Existem evidências de que esta proteína possui diversas funções, sendo algumas delas mencionadas a seguir.

1.5.3.1. Ligação a agentes patogênicos microbianos

A MBL é capaz de se ligar a uma grande variedade de agentes patogênicos, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários, e em alguns casos

tem sido demonstrado correlação com características estruturais dos agentes patogênicos microbianos (Turner, 2003). Entretanto, ainda não está bem esclarecido se esse mecanismo de interação entre a MBL e o microorganismo é de caráter apenas benéfico para o hospedeiro, uma vez que alguns estudos demonstraram que essa ligação MBL-agente microbiano pode favorecer a entrada do patógeno na célula hospedeira (Kahn *et al.*, 1996), ao invés de conferir proteção ao hospedeiro contra esses agentes (Swanson *et al.*, 1998).

1.5.3.2. Ativação do Sistema Complemento

A ativação do sistema complemento mediada por MBL representa a terceira via de ativação do complemento, que é distinta das outras duas vias, a clássica e a alternativa (Turner, 2003).

A família de proteases serinas associadas à MBL (MASP) é constituída pelas MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (Dahl *et al.*, 2000; Matsushita & Fujita, 1992; Thiel *et al.*, 1997), que juntamente com a forma truncada da versão da MASP-2, gera a MAp19 (Stover *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999) que pode estar associada à MBL. No entanto, várias evidências sugerem que a MASP-2 é a proteína mais importante na ativação do complemento (Thiel *et al.*, 1997).

O complexo de MBL-MASP-2 torna-se ativado quando ligado aos resíduos de carboidratos expressos na superfície dos patógenos. A MASP-2 expressa uma atividade enzimática idêntica a C1 estearase, que realiza a função de clivagem seqüencial dos componentes C4 e C2 do complemento. O fragmento gerado C4b liga-se covalentemente à superfície do patógeno e interage,

subseqüentemente, com o componente C2, que também foi clivado pela MASP-2. O complexo formado C4b2a expressa atividade enzimática da C3 convertase, a qual é diferente da C3 convertase das duas outras vias de ativação do complemento. Assim, ocorre a liberação do fragmento opsônico C3b, que leva à amplificação da cascata do sistema complemento. Essa importante função explica o motivo da deficiência de MBL ter sido primeiramente identificada em associação com a deficiência na opsonização de agentes patogênicos em crianças com repetidas infecções (Turner, 2003).

1.5.3.3. Promoção da opsonização independente de complemento

A promoção da opsonização pela MBL tem sido atribuída à ligação com vários receptores ou proteínas ligadoras de manose, incluindo a cC1qR/calcioreticulina (Malhotra *et al.*, 1990), a C1qRp (Tenner *et al.*, 1995) e a CR1 (Ghiran *et al.*, 2000; Klickstein *et al.*, 1997). Entretanto, ainda não está bem esclarecido se a MBL atua diretamente como uma opsonina ou se ela é somente um componente intensificador de outras vias do complemento e/ou da fagocitose mediada por anticorpos.

1.5.3.4. Modulação da Inflamação

Existem estudos referentes às doenças associadas à MBL, os quais indicam que esta proteína tem um papel principal na modulação da inflamação. Os mecanismos ainda não estão bem elucidados, no entanto, alguns autores sugerem que a proteína exerce um efeito complexo na liberação de citocinas pelos

monócitos (Jack *et al.*, 2001b). Por exemplo, quando a bactéria *Neisseria meningitidis* foi incubada com concentrações aumentadas de MBL e, posteriormente, adicionou-se sangue total com deficiência de MBL, houve aumento da concentração de citocinas produzidas pelos monócitos, tais como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, entretanto quando adicionado sangue total com níveis normais de MBL houve uma diminuição nos níveis destas citocinas (Turner, 2003).

1.5.3.5. Promoção da Apoptose

Estudos recentes indicam que a MBL de forma semelhante ao C1q, pode se ligar à células apoptóticas e iniciar o processo de remoção dos detritos pelos macrófagos (Ogden *et al.*, 2001). Esse processo parece requerer a presença de calciorreticulina na superfície da célula (cC1qR), que se liga ao domínio de colágeno da MBL. Embora o cC1qR não tenha nenhum domínio transmembrana, ele parece estar associado com o receptor da α 2-macroglobulina, denominado de CD19, que está presente na superfície da célula e, assim, inicia o processo de fagocitose das células apoptóticas através da macropinocitose (Turner, 2003).

Desta forma, demonstrou-se que a MBL pode se ligar em células apoptóticas autólogas, para promover, conseqüentemente, a remoção de detritos celulares (Ogden *et al.*, 2001). Sendo que o papel da MBL na fagocitose de células apoptóticas poderia ser mediado tanto pelo local de ligação a fosfolipídios, quanto pelos receptores de colectinas (Kilpatrick, 2002).

Na superfície dos monócitos humanos e em células dendríticas derivadas de monócitos, foi descrita a presença de MBL. Observou-se também que estes monócitos, que apresentam um receptor de colectinas, poderiam também ter um receptor de carboidratos. Entretanto, a significância destes achados ainda não está elucidada (Kilpatrick, 2002).

1.6. ASPECTOS GENÉTICOS DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

1.6.1. Estrutura genética da MBL

Em humanos, os genes das colectinas estão todos localizados no braço longo do cromossomo 10 (Hansen & Holmskov, 1998). Existem dois genes de MBL; o *MBL-1* que é um pseudogene e o *MBL-2*, sendo este último constituído por quatro éxons, onde o éxon 1 codifica o peptídeo sinal, a região rica em cisteína e parte da região de colágeno rica em glicina; o éxon-2 codifica a porção restante desta região de colágeno e o éxon-3 codifica a estrutura espiralizada α -hélice, que também é conhecida como região de pescoço. O quarto éxon codifica o domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), que adota uma configuração globular (Figura 4) (Turner, 2003).

A região promotora do gene *MBL-2* contém vários elementos, que iniciam a transcrição da MBL (Sastry *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989) e foi demonstrado que na fase aguda das infecções, a proteína apresenta níveis plasmáticos elevados (Thiel *et al.*, 1992).

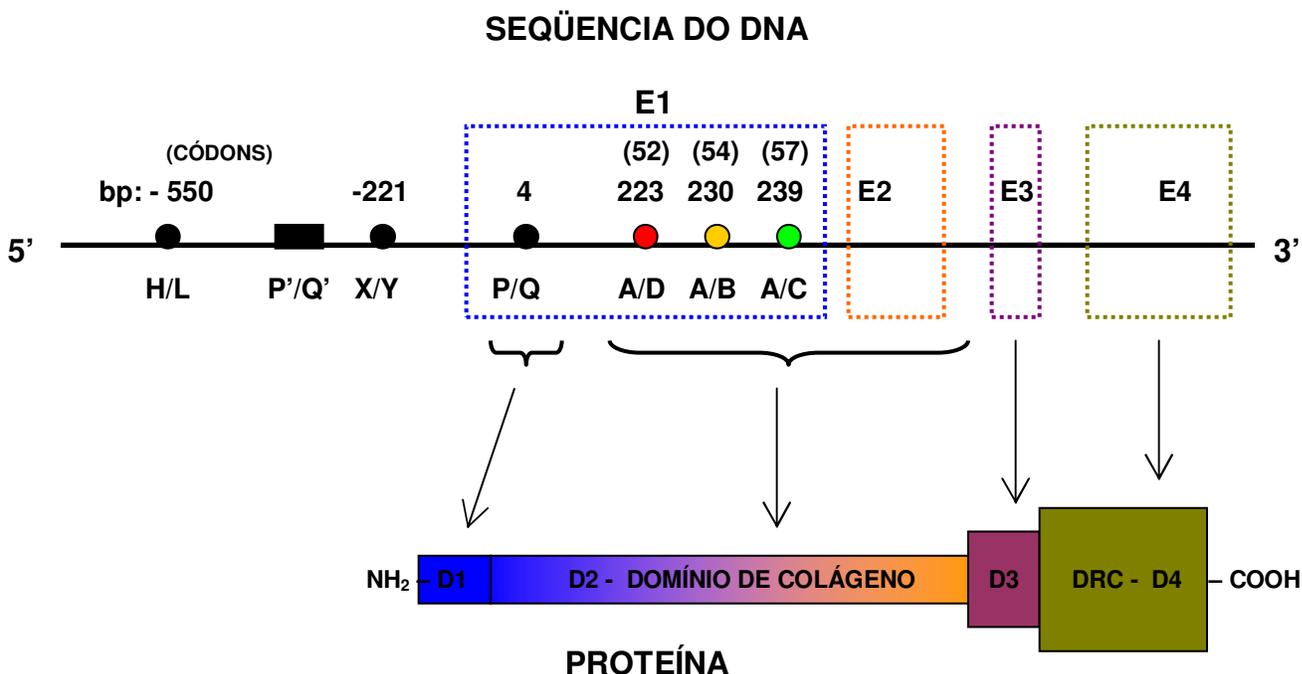


Figura 4. Esquema da estrutura genética da MBL

No esquema da figura 3, os éxons estão representados por E1, E2, E3 e E4. As variantes alélicas estão representadas pelos genótipos a seguir: • A/D → ponto de mutação códon 52, gerando variante D; • A/B → ponto de mutação códon 54, gerando variante B; • A/C → ponto de mutação códon 57, gerando variante C; X/Y representam o dimorfismo na região promotora ao nível do par de base – 221. Os quatro domínios formados estão representados por D1, D2, D3 e D4.

1.6.2. Polimorfismo associado à Lectina Ligadora de Manose (MBL)

O tipo considerado normal, sem mutações, ou seja, o tipo selvagem é designado de variante A, que apresenta dois genótipos, o homocigoto A/A e o heterocigoto A/O (Kilpatrick, 2002).

Três mutações de ponto têm sido descritas no éxon 1 do gene da MBL. A primeira mutação descoberta foi devido a uma mudança de base de uma

guanina para uma adenina no códon 54, causando a mudança de uma glicina para um ácido aspártico e, assim gerando uma queda aparente na concentração de MBL (Sumiya *et al.*, 1991). A variante que apresenta esta mutação foi denominada de variante B e está presente em indivíduos europeus com baixas concentrações de MBL, acometendo cerca de 25% da população européia.

Também foram verificados outros dois alelos similares no gene codificador da MBL, sendo um no códon 52 e outro no códon 57, os quais dão origem às variantes D e C, respectivamente. A variante C é bastante comum na África (onde a variante B é rara), mas a variante D parece estar ausente ou encontrada em baixíssimas freqüências no mundo todo.

As variantes C e D possuem alterações estruturais no domínio N-terminal da região de colágeno e no domínio rico em cisteína (Wallis, 2002). Todas as variantes (B, C e D) estão associadas a baixos níveis de concentração de MBL em relação ao tipo selvagem (variante A). Por exemplo, o tipo mais comum de heterozigose A/B geralmente tem cerca de 1/10 da concentração de MBL quando comparada àquela encontrada em indivíduos com homozigose (A/A) para variante A ou tipo selvagem. Enquanto que, homozigotos (B/B) e os heterozigotos (B/C) para a variante B apresentam somente o nível mínimo detectado pelo método imunoenzimático (ELISA). Essas alterações estruturais nas variantes também modificam as interações existentes entre as proteases serinas (MASPs) e a MBL, causando uma diminuição na capacidade de ativar o sistema complemento (Yokota *et al.*, 1995; Wallis, 2002).

Em humanos, a MBL circulante exibe uma variação de 0,01 a 5µg/mL ou mais. A concentração encontrada na circulação de adultos aumenta rapidamente após a primeira semana da infecção, sendo que na fase infantil, o nível permanece um pouco mais aumentado do que na fase adulta dos indivíduos (Thiel *et al.*, 1995; Kilpatrick *et al.*, 1997; Terai & Kobayashi, 1993; Terai *et al.*, 1993; Aittoniemi *et al.*, 1996).

A estrutura gênica tem um grande efeito sobre os níveis de MBL circulante no plasma sanguíneo. Contudo, a influência não-genética também é importante, visto que o surgimento de infecções ou trauma ocasiona um aumento três vezes maior da concentração de MBL no plasma (Thiel *et al.*, 1992). O hormônio de crescimento também tem efeito positivo nesta resposta, enquanto que os glicocorticóides parecem diminuir a síntese de MBL (Naito *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2001). Todas essas observações são consistentes com a presença de muitos elementos regulatórios na região promotora do gene MBL.

O genótipo é um bom indicador da concentração de MBL no plasma para grupos ou populações, mas não para indivíduos. Pois, existem relatos de indivíduos, que apresentam baixas concentrações de MBL e esses níveis não estão associados com o seu genótipo (Crosdale *et al.*, 2000; Kruse *et al.*, 2002). Nos últimos anos, a deficiência tem sido geneticamente definida como a existência de um haplótipo associados com níveis diminuídos de MBL; essa definição se aplica em aproximadamente 40% da população, e corresponde a uma concentração de MBL plasmática menor que 0,6µg/mL (Madsen *et al.*, 1994;1995).

A concentração da MBL no plasma de um indivíduo é geneticamente determinada pelos dois haplótipos herdados de seus pais. Com a idade os níveis podem variar em decorrência, dentre outros fatores, da interação com o meio ambiente, devido a exposição à infecções e trauma, principalmente, em resposta de fase aguda, quando os níveis de MBL na circulação sanguínea podem estar aumentados em até três vezes em comparação com valores fisiológicos normais (Hansen *et al.*, 2001).

1.7. PARTICIPAÇÃO DA MBL NA IMUNIDADE CONTRA DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

1.7.1. Participação da MBL na Imunidade Inata

Inicialmente, acreditava-se que a imunidade inata era uma resposta caracterizada por um conjunto de mecanismos de pouca importância. Por outro lado, a imunidade adquirida com seus sistemas de reconhecimento antigênicos altamente específicos e suas complexas interações entre moléculas endógenas e células, era considerada os mecanismos mais importantes para a defesa do hospedeiro. Atualmente, com base no conhecimento acerca da fase inicial da resposta imune tem sido possível compreender que o sistema imune inato é muito mais complexo e atuante, comparado a participação que fora, inicialmente, proposta para esse sistema (Kilpatrick, 2002).

A imunidade inata é distinta da adquirida e atua sinergicamente com a imunidade adquirida, interagindo de forma produtiva no sentido de promover uma imunidade efetiva contra os patógenos (Ochsenbein & Zinkernagel, 2000).

Pode-se citar como exemplo a atividade do sistema complemento, que consiste em três vias de ativação (Clássica, Alternativa e das Lectinas), sendo capaz de amplificar, não especificamente, por meio de seus componentes, os mecanismos efetores da imunidade mediada pelos anticorpos.

O sistema imune inato utiliza uma diversidade de receptores que reconhecem e induzem resposta imune contra os patógenos. Estes receptores são, geralmente, proteínas que reconhecem padrões moleculares de natureza glicolipídica presentes somente na superfície dos patógenos. Dentre alguns desses receptores é relevante citar a MBL, que estimula diretamente a fagocitose pelos macrófagos, enquanto outros receptores são produzidos como moléculas secretadas e que também promovem a fagocitose de patógenos pela opsonização ou pela ativação do complemento.

A ativação do sistema complemento é ampla e potente, caracterizada pelo envolvimento de várias enzimas e pelo efeito em cascata. As vias clássica e alternativa são ativadas de formas distintas e interagem ao nível de C3, a fim de formar uma via única que resulta em lise celular. A terceira via de ativação do complemento é denominada de via das lectinas, uma lectina é a proteína ligadora de manose (MBL) que pode iniciar o processo de ativação, independentemente da presença de anticorpos ou C1q (HOLMSKOV, 1994).

A ativação do Sistema Complemento pela MBL plasmática ocorre quando a lectina se liga a resíduos de oligossacarídeos (Manose e N-acetil glicosamina) presentes na superfície de vários microorganismos (Petersen *et al.*, 2001). Essa ligação induz a ativação das proteases serinas associadas à MBL

(MASP), que são capazes de clivar os componentes C4, C2 e C3 que leva a formação da C3 convertase C4b2a (Matsushita & Fujita, 1992; Thiel *et al.*, 1997; Matsushita *et al.*, 2000). Uma vez iniciada essa reação em cascata, em detrimento de sua ligação aos carboidratos, desencadeia a formação do complexo de ataque à membrana (CAM), que ocasiona a morte do microorganismo (Ross *et al.*, 2003).

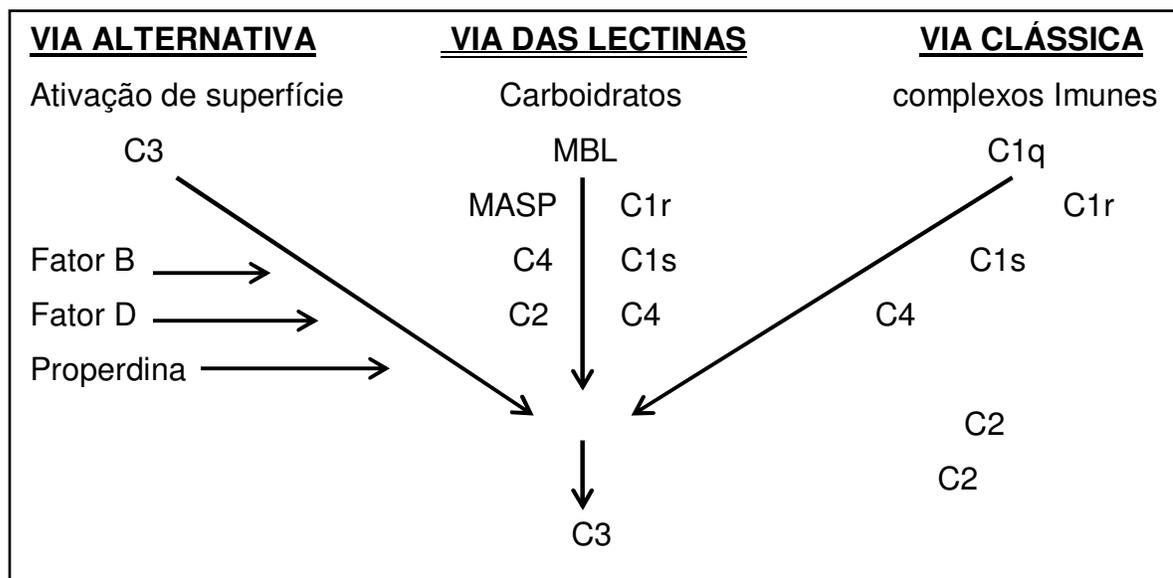


Figura 5. Vias de ativação do Sistema Complemento.

A importância da MBL na imunidade inata tem sido demonstrada por através de estudos clínicos, que associaram a sua deficiência sérica com o aumento da susceptibilidade a várias doenças infecciosas (Super *et al.*, 1989; Jack *et al.*, 2001a). Assim, os polimorfismos genéticos são responsáveis pelas baixas concentrações de MBL no soro e, conseqüentemente, por uma imunodeficiência associada à atividade opsonizante prejudicada (Kuhlman *et al.*, 1989; Sumiya *et al.*, 1991).

1.7.2. Polimorfismos associados às doenças

Um número crescente de estudos tem sido descritos na literatura, na tentativa de esclarecer a associação da proteína MBL e sua deficiência, à suscetibilidade à infecção por diversos patógenos e à severidade de doenças infecciosas ou autoimunes.

Alguns destes trabalhos descritos na literatura demonstraram que a MBL é uma molécula do sistema imune inato capaz de reconhecer superfícies microbianas, interagindo com vírus (Ezekowits *et al.*, 1989; Kase *et al.*, 1999; Saifuddin *et al.*, 2001), com bactérias (Van Emmerik *et al.*, 1994) entre elas *Staphylococcus aureus* (Neth *et al.*, 2000) e *Neisseria meningitidis* (Drogari-Apiranthitou *et al.*, 1997; Garred *et al.*, 1993 ; Jack *et al.*, 1998; 2001); com fungos, como *Aspergillus fumigatus* (Klabunde *et al.*, 2002) e com protozoários, tais como o *Trypanosoma cruzi* (Kahn *et al.*, 1996), e o *Plasmodium falciparum* (Luty *et al.*, 1998; Klabunde *et al.*, 2002; Garred *et al.*, 2003).

1.7.3. Polimorfismos Associados às Doenças causadas por Protozoários

O *Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular obrigatório capaz de invadir diferentes tipos de células de mamíferos, causando a doença de Chagas. Este parasita possui em sua superfície glicoproteínas pertencentes à família SA85-1 (Kahn *et al.*, 1990; 1993). Muitos estudos sugerem que estas proteínas de superfície contribuem para adesão e invasão da célula hospedeira (Andrews *et al.*, 1984; Boschetti *et al.*, 1987; Abui *et al.*, 1989).

Em 1996, Kahn e colaboradores observaram que a MBL e o *Trypanosoma cruzi* circulam juntos na corrente sanguínea e que o SA85-1 é um dos ligandos do parasita a MBL. Esta glicoproteína SA85-1 está presente em ambas as formas evolutivas, tripomastigota e amastigota. Entretanto, Ferreira e colaboradores (2004) demonstraram que esta ligação ocorre somente com uma das formas evolutivas do parasita, as amastigotas. Isto pode ser explicado por uma simples mudança conformacional na superfície das amastigotas, que as tornariam mais específicas a MBL humana, e conseqüentemente esta interação facilitaria a entrada da amastigota na célula hospedeira. No entanto, também foi observado que a presença de dois resíduos de manose era outro componente essencial para esta ligação com a MBL, sendo que expresso somente em amastigotas.

Portanto, conclui-se que devido as formas amastigotas apresentarem um certo diferencial nas glicoproteínas da sua superfície, isto contribuiria para uma adesão e uma interação mais específica com a MBL humana, realizando, assim, o processo invasivo, que utiliza a MBL humana como porta de entrada nas células hospedeiras (Kahn *et al.*, 1996).

1.7.4. MBL na Malária

A MBL através do domínio de reconhecimento de carboidratos e na presença do íon cálcio, é capaz de se ligar a resíduos de açúcares de manose, fucose, N-acetilglicosamina e glicose encontradas frequentemente em uma ampla variedade de agentes infecciosos (Holmskov *et al.*, 1994; Turner, 1996; Petersoen

et al., 2001). Entre os carboidratos reconhecidos pela MBL alguns não são exclusivos de patógenos, uma vez que estão presentes na superfície celular dos mamíferos, porém ou em menor quantidade ou ocultos por outros carboidratos, como a galactose e o ácido siálico. Além disso, os açúcares de mamíferos não formam arranjos repetitivos, o que faz com que não ocorra uma interação eficiente com a proteína da MBL (Parslow & Bainton, 2004).

No plasmódio, o açúcar mais freqüente é a manose, componente da âncora de GPI - glicosilfosfatilinositol, que desenvolvem papel de receptores para a ligação com a MBL (Struik & Riley, 2004).

Luty e colaboradores (1998) pesquisaram se a MBL poderia influenciar na resposta contra a infecção por *Plasmodium falciparum* em crianças, através da comparação dos níveis plasmáticos de MBL e seus polimorfismos genéticos nestas crianças apresentando desde malária media até severa. Os resultados demonstraram que na fase aguda da infecção, pacientes com malária severa apresentavam níveis baixos de MBL, enquanto que na fase de convalescência, a variação da concentração foi pequena em relação à fase aguda e ainda mais os dois grupos de pacientes com malária severa e média obtiveram valores iguais.

Neste mesmo estudo, Luty e colaboradores (1998) também detectaram duas mutações no éxon 1, nos códons 54 e 57. Observou-se que 38% das crianças apresentaram uma mutação no códon 54. A freqüência desta mutação foi mais alta em crianças com malária severa. Os resultados demonstraram que as mutações estavam associadas à malária severa e aos

baixos níveis de MBL, aumentando assim a possibilidade da MBL participar de alguma proteção contra a malária.

Em relação à concentração de MBL e o polimorfismo em paciente infectados por *Plasmodium falciparum*, Klabunde e colaboradores (2002) observaram que no tipo selvagem do gene, os níveis de MBL na fase aguda apresentaram-se mais altos na malária severa do que na média, o que sugere-se que isso possa ocorrer em elevadas parasitemias devido à intensidade da resposta imune. Entretanto, depois de seis meses, os níveis se mantiveram equivalentes tanto na severa quanto na média.

Turner (1996) verificou que baixas concentrações de MBL é resultado de mutações na região codificadora do gene *MBL₂*, o que causa alterações estruturais da molécula no domínio de colágeno, gerando uma proteína não funcional devido a incapacidade de formar oligômeros estáveis. Portanto, a maior frequência deste polimorfismo em indivíduos com malária severa determinou níveis baixos na concentração de MBL, e não conferiu assim, a proteção necessária, devido esta proteína se apresentar truncada ou não funcional. A MBL produzida em indivíduos com malária severa pode reter a atividade de ligação de resíduos de carboidratos. Desta forma, foi proposto que nos indivíduos com parasitemia alta, as baixas concentrações de MBL são mantidas, pois a proteína pode estar ligada à metabólitos do parasita, resultando em níveis baixos ou não detectáveis de MBL na circulação (Luty *et al.*, 1998).

Até o presente momento, existem evidências acerca da participação da MBL na malária causada por *P. falciparum*. Em relação à malária causada por

P. vivax, ainda não foi realizado nenhum estudo. Atualmente, esta espécie de *Plasmodium* é a mais prevalente no Brasil. Portanto, avaliar diferentes aspectos da resposta imune inata humana poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos imunológicos capazes de conferir proteção contra a malária.

Neste trabalho, analisamos os polimorfismos do éxon1 do gene da Lectina Ligadora de Manose (MBL) em indivíduos infectados e em indivíduos que residem em área de transmissão de malária causada por *Plasmodium vivax*.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi analisar o polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL₂* em indivíduos expostos naturalmente à malária causada por *Plasmodium vivax*.

1.8.2. Objetivos Específicos

- Determinar as freqüências das mutações no éxon 1 do gene *MBL₂* em indivíduos primoinfectados por *Plasmodium vivax* e comparar com indivíduos não infectados.
- Investigar possíveis associações entre a freqüência das mutações no éxon 1 do gene *MBL₂*, os sinais e sintomas em indivíduos primoinfectados por *P. vivax* e a densidade parasitária.
- Determinar a freqüência das mutações no éxon 1 do gene *MBL₂* em indivíduos não infectados e verificar possível associação com o número de episódios prévios de malária.
- Determinar a freqüência das mutações no éxon 1 do gene *MBL₂* em indivíduos não infectados e verificar possível associação com o tempo decorrido após o último episódio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CASUÍSTICA E COLETA DE DADOS CLÍNICOS

2.1.1. Grupo de Indivíduos Primoinfectados

Foram incluídos neste estudo pacientes que procuraram atendimento no Laboratório de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (LECM/IEC), no período de fevereiro de 2002 a março de 2003. Após a confirmação de diagnóstico de malária, indivíduos com idade acima de 15 anos e que informaram estar tendo o primeiro episódio de malária, foram selecionados e convidados a participar do estudo que foi realizado para verificar associação entre aspectos clínicos e polimorfismo no gene do Fator de necrose tumoral α (TNF- α) na malária por *P. vivax*. Após a conclusão desse estudo, as amostras de sangue e soro que se encontravam estocadas, foram utilizadas neste trabalho com a finalidade de analisar o polimorfismo da Lectina Ligadora de Manose (MBL).

Foram utilizadas 81 amostras de pacientes primoinfectados, com idade entre 15 a 78 anos, sendo 24 indivíduos do sexo feminino e 57 do sexo masculino. A média das idades do grupo de pacientes foi 37,1 anos. Todos os pacientes selecionados relataram que estavam apresentando o primeiro episódio de malária causada por *P. vivax*. Foram excluídos da amostra mulheres grávidas ou nutrizes, pacientes que relatavam apresentar outras doenças infecciosas, parasitárias ou doenças auto-imunes, bem como pacientes que estavam sendo tratados com drogas antiinflamatórias, antibióticos e drogas citotóxicas.

O atendimento clínico dos pacientes foi realizado por médico do programa de ensaios clínicos em malária do Instituto Evandro Chagas. Os pacientes foram acompanhados durante oito dias, conforme protocolo utilizado no (LECM/IEC). O dia do diagnóstico e início do tratamento foi denominado de D0, os outros dias foram numerados até D7, que corresponde ao oitavo dia do tratamento. Durante esse período, as manifestações clínicas foram avaliadas diariamente através do questionário de sintomas e graduadas com base na intensidade dos sinais e sintomas observados.

Os sintomas febre, calafrios, cefaléia, astenia, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarréia, anorexia, tosse, dispnéia e colúria, referidos pelo paciente, foram avaliados nos dias D0, D1, D2 e D7. Esses sintomas foram graduados de acordo com a intensidade, recebendo a seguinte pontuação: 0 = nenhum, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = intenso, 4 = muito intenso. Ao final a soma destes pontos resultou na obtenção de um valor de escore para cada paciente, nos dias pré-determinados. Os escores da amostra variaram de 0 a 56 pontos.

Com base nos escores, a sintomatologia foi classificada em 4 categorias, de acordo com a descrição estatística; zero até o primeiro quartil (indivíduos com sintomatologia leve); do primeiro quartil até a mediana (indivíduos com sintomatologia moderada); da mediana até o terceiro quartil (indivíduos com sintomatologia intensa) e acima do terceiro quartil (indivíduos com sintomatologia muito intensa). Os principais sintomas apresentados foram febre, cefaléia e calafrios.

Os sinais temperatura axilar, estado geral e coloração da pele, mucosas e escleróticas foram avaliados nos dias D0 e D7. Esses sinais foram graduados de acordo com a intensidade, recebendo valores de 0 a 3. Os escores da amostra variaram de 0 a 12 pontos. Com base na distribuição dos escores, os indivíduos foram classificados em três grupos leve (0 a 4), moderado (4,1 a 8) e intenso (8,1 a 12), sendo que somente um indivíduo foi classificado com sinais intensos.

2.1.2. Grupo de indivíduos não infectados

O outro grupo analisado foi composto por indivíduos não infectados, expostos naturalmente à malária, residentes em Cotijuba, área endêmica de malária, com transmissão exclusiva de *P. vivax*. Esse grupo foi constituído de 250 indivíduos, sendo 138 do sexo feminino e 112 do sexo masculino, com idades que variaram de 1 a 86 anos. A média das idades desse grupo foi 29,3 anos.

No momento da coleta de sangue, foram obtidas informações sobre o número de episódios prévios de malária e o tempo decorrido após o último episódio. Estas informações contribuíram para a investigação de uma possível associação com os genótipos identificados nesta amostra. Desta forma, o polimorfismo no éxon 1 do gene *MBL₂* foi investigado em grupos de indivíduos não infectados, um grupo relatou nunca ter tido malária (n = 98) e o outro grupo relatou ter tido pelo menos um episódio de malária (n = 152); tiveram 1 episódio (n= 66), 2 episódios (n= 27), 3 episódios (n= 20) e mais de 4 episódios (n= 39).

No grupo que relatou ter tido malária, também analisamos uma possível associação dos polimorfismos com o tempo decorrido após o último episódio de malária. Para tanto, 144 indivíduos desse grupo foram classificados de acordo com o tempo decorrido; menos de 1 mês (n=25); no período entre 1 a 6 meses (n=33); no período entre 7 e 12 meses (n=15); no período entre 13 e 24 meses (n=15) ou há mais de 24 meses sem diagnóstico de malária (n=56). Os indivíduos não incluídos nesta análise foram os que não souberam informar o período (n = 8).

2.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue utilizadas neste estudo foram coletadas após a confirmação do diagnóstico de malária e antes de iniciar o tratamento. No momento da coleta, os pacientes foram informados sobre a pesquisa através da leitura do termo de livre consentimento, contendo informações sobre riscos e benefícios e, se estivessem de acordo em participar do estudo, assinavam o termo de livre consentimento (Anexo I) e informavam os dados solicitados na ficha clínica e epidemiológica (Anexo II) e na ficha de prontuário médico (Anexo III).

As amostras do grupo controle, constituído por indivíduos residentes à Ilha de Cotijuba, Belém, Pará, foram obtidas por busca ativa, no período de abril de 2001 a janeiro de 2002. No momento da coleta, todos estavam negativos para a pesquisa de parasitas da malária, realizada pelo exame da gota espessa.

Foram coletados cinco mililitros de sangue de cada indivíduo primoinfectado em tubos a vácuo e sem anticoagulante, que permaneceu à temperatura ambiente até a separação do soro. Após a separação, o sangue foi centrifugado e alíquotas de soro foram mantidas a -20°C até o momento da realização dos ensaios. Para obtenção do DNA foram coletados 5mL em tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA.

2.3. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto para avaliar o polimorfismo do gene da MBL foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (protocolo n° 058/2006 CEP-CCS/UFPA), em obediência à resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa envolvendo seres humanos. Neste momento, o Comitê foi informado que as amostras estavam estocadas e as mesmas constituíam um grupo de amostras utilizadas em projetos concluídos, os quais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas.

2.4. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

A pesquisa de parasitos foi realizada por técnicos especializados do Instituto Evandro Chagas através da técnica da gota espessa. Uma amostra de sangue foi obtida diretamente pela punção da polpa digital. Após assepsia, punccionou-se o local com uma lanceta estéril. A primeira gota de sangue foi

removida com algodão seco. Comprimindo o dedo suavemente, pode-se obter outra gota de sangue com aspecto esférico sobre a pele seca. A face limpa da lâmina foi colocada, então, em contato com a gota, mas sem tocar a pele do paciente. Com o auxílio de outra lâmina, espalhou-se o sangue, formando um retângulo. A preparação foi corada pelo Método de Walker, utilizando-se o corante Giemsa. A leitura foi realizada em microscópio óptico, determinando o número de parasitas por mm^3 de sangue.

2.5. GENOTIPAGEM PARA DETECTAR POLIMORFISMOS NO GENE DA MBL UTILIZANDO REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A obtenção do DNA das amostras dos indivíduos primoinfectados e não infectados por *P. vivax* foi realizada pelo método do fenol/clorofórmio, conforme estabelecido no laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFPA, por Nina (2004).

Para a determinação da frequência dos Alelos *MBL**A, *MBL**B e *MBL**C foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação de 349 pb do éxon 1 do gene MBL, a partir do DNA extraído de indivíduos primoinfectados por *P. vivax* e indivíduos do grupo controle. As amplificações foram realizadas no equipamento Termo-ciclador (Mastercycler Personal, Eppendorf).

A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 50 μL contendo 500ng de DNA extraído, 225 μM de cada dNTP, 5 μM de cada iniciador,

KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. O par de iniciadores e as condições de amplificação utilizada nesta reação foram conforme descrito por Madsen e colaboradores em 1995 e, em 2006, por Vallinoto e colaboradores. 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. O par de iniciadores envolvidos nesta reação foi:

- MBL01 → 5' - AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG - 3'
- MBL02 → 5'- AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG - 3'

A identificação da presença dos alelos *MBL**A, *MBL**B e *MBL**C foi realizada pela digestão enzimática do produto amplificado (349pb), para tanto foram utilizadas endonucleases de restrição *BanI* e *MboI*. A *BanI* cliva o alelo *MBL**A em dois fragmentos (260 pb e 89 pb) e o alelo *MBL**B não é digerido. A *MboI* cliva especificamente o alelo *MBL**C em dois fragmentos (279 pb e 70 pb).

Para determinação do alelo *MBL**D foi utilizada a técnica da SSP-PCR, utilizando-se seqüências de iniciadores específicos para mutação *D. A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 25µL contendo 500ng de DNA extraído, 225µM de cada dNTP, 5µM de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,1mM, Tris – HCl pH 8,3 10 mM e 0,5U de *Taq* polimerase. Foram realizadas duas reações, sendo a primeira para identificar o alelo D e a outra para verificar se tal alelo ocorria em homozigose ou heterozigose. O par de iniciadores utilizado na primeira reação foi:

- sspMBP1a → 5' – CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG – 3' (617nt – 640nt)

➤ 52 – D → 5' – TCTCCCTTGGTGCCATCACA – 3' (887nt-868nt)

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

Para determinar a ocorrência da mutação *D em homo ou heterozigose com os alelos *MBL* *A, *MBL* *B e *MBL* *C, foi realizada uma segunda reação de amplificação, utilizando as mesmas condições descritas acima e os par de iniciadores utilizado foi:

➤ sspMBP1a → 5' – CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG – 3' (617nt – 640nt)

➤ 52-ABC → 5' – TCTCCCTTGGTGCCATCACG – 3'

A ocorrência da variante *D foi determinada pela presença ou ausência do fragmento de DNA, conforme estabelecido por (Steffenses *et al.*, 2000).

Os produtos das amplificações e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2%, em tampão TAE 1x (TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparação das freqüências obtidas na genotipagem da MBL entre os grupos de indivíduos primoinfectados e o grupo controle, constituído por

indivíduos não infectados, foram realizados pelo teste G ou teste de qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa BioEstat 3.0v (Ayres *et al.*, 2003). Este program também foi utilizado para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise para verificar a associação entre as prevalências das variantes alélicas da MBL e a densidade parasitária foi efetuada pelo teste de Mann-Whitney. Para verificar a associação entre as prevalências das variantes alélicas da MBL e os sinais e sintomas foi utilizado o teste G e para compara as freqüências com o número de episódio e tempo decorrido após o último episódio utilizou-se teste G ou teste de qui-quadrado (χ^2). Os cálculos foram realizados no programa BioEstat 3.1 (Ayres *et al.*, 2003).

3. RESULTADOS

3.1. FREQUÊNCIAS ALELICAS E GENOTÍPICAS DO GENE *MBL₂* NOS GRUPOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS POR *PLASMODIUM VIVAX* E NÃO INFECTADOS

O polimorfismo no éxon 1 do gene *MBL₂* foi investigado em dois grupos de indivíduos, sendo um grupo constituído por 81 indivíduos infectados, apresentando o primeiro episódio de malária causada por *P. vivax* e o outro constituído por indivíduos não infectados. No grupo primoinfectado a avaliação clínica foi realizada para determinar o grau de intensidade dos sinais e sintomas e analisar, bem como a quantificação da parasitemia, para avaliar uma possível associação do grau de severidade da doença e densidade parasitária com polimorfismo no éxon 1 do gene *MBL₂*.

O grupo controle foi constituído por 250 indivíduos não infectados, que residem em área endêmica de malária, com transmissão exclusiva de *P. vivax*. Foram coletadas as informações sobre o número de episódios prévios de malária e o tempo decorrido desde o último episódio.

No grupo de indivíduos que apresentavam o primeiro episódio de malária por *P. vivax*, verificamos que as frequências das formas alélicas *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*D* foram 64,20%, 19,75% e 16,05%, respectivamente (Tabela 1). O alelo *MBL*C* não ocorreu nesse grupo.

O grupo de indivíduos não infectados foi constituído por indivíduos que relataram que nunca tiveram malária ou que tiveram pelo menos um episódio

prévio de malária, mas no momento não estavam com malária. Neste grupo de indivíduos não infectados foram identificadas todas as formas alélicas *MBL**A, *MBL**B, *MBL**C e *MBL**D e a distribuição das frequências foram semelhantes. No grupo que relatou ter tido episódio prévio de malária, as frequências dos diferentes alelos foram *MBL**A (74,67%), *MBL**B (14,81%), *MBL**C (2,30%) e *MBL**D (8,22%). No grupo que nunca teve malária, as frequências observadas foram *MBL**A (72,96%), *MBL**B (14,80%), *MBL**C (3,06%) e *MBL**D (9,18%).

Tabela 1 - Frequências alélicas do gene *MBL*₂ em grupos de indivíduos primoinfectados por *Plasmodium vivax* e não infectados.

Alelos	Grupos de indivíduos n (%)		
	Primoinfectado	Teve episódio prévio de malária	Nunca teve episódio de malária
<i>MBL</i> *A	105 (64,82)	227 (74,67)	143 (72,96)
<i>MBL</i> *B	32 (19,75)	45 (14,81)	29 (14,80)
<i>MBL</i> *C	00 (0,00)	07 (2,30)	06 (3,06)
<i>MBL</i> *D	25 (15,43)	25 (8,22)	18 (9,18)
Total	162 (100)	304 (100)	196 (100)

n = número de cromossomos analisados

Primoinfectado x Teve episódio prévio de malária ($p = 0,0031$; Teste G = 13,8423)

Primoinfectado x Nunca teve episódio de malária ($p = 0,0081$; Teste G = 12,2216)

Teve episódio prévio de malária x Nunca teve malária ($p = 0,9333$; Teste G = 0,4332)

A comparação entre os grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências alélicas observadas entre o grupo infectado e os dois grupos não infectados, o que teve episódio prévio de malária ($p = 0,0031$; Teste G = 13,8423) e o que nunca teve malária ($p = 0,0081$; Teste G = 12,2216). As diferenças observadas nas freqüências alélicas entre os dois grupos não infectados não foram estatisticamente significativas ($p = 0,9333$; Teste G = 0,4332).

Na tabela 2, observamos as freqüências genótípicas do gene *MBL₂* nos grupos de indivíduos infectados por *P. vivax* e não infectados, com e sem relato de episódio prévio de malária. No grupo de indivíduos primoinfectados, observamos que o genótipo mutante heterozigoto *A/O* foi o mais prevalente, ocorrendo na freqüência de 58,03%, enquanto as freqüências dos genótipos homozigotos selvagem (*A/A*) e mutante (*O/O*), foram 35,80% e 6,17%, respectivamente. O genótipo mutante heterozigoto *A/O* representa os genótipos *A/B*, *A/C* e *A/D*. Entre os indivíduos primoinfectados identificamos somente dois desses genótipos, *A/B* e *A/D*, e as freqüências encontradas foram semelhantes 28,4% e 29,63%, respectivamente. O genótipo mutante *O/O* representa os genótipos *B/B*, *B/D* e *D/D*. No grupo infectado, identificamos os genótipos *B/B* e *B/D*, e as freqüências encontradas foram 4,94% e 1,23%, respectivamente.

No grupo de indivíduos não infectados, mas com histórico anterior de malária observamos que o genótipo selvagem *A/A* foi o mais prevalente, ocorrendo na freqüência de 54,61%, enquanto as freqüências dos genótipos mutantes (*A/O*) e (*O/O*), foram 40,13% e 5,26%, respectivamente. Neste grupo

identificamos os três possíveis genótipos mutantes representados pelo *A/O* (*A/B*, *A/C* e *A/D*), o genótipo *A/B* foi o mais prevalente (25,66%). As freqüências dos genótipos *A/C* e *A/D* foram 4,60% e 9,87%, respectivamente. O genótipo mutante *O/O* (*B/B*, *B/D* e *D/D*) ocorreu em homozigose e heterozigose. Neste grupo, as freqüências dos genótipos *B/B* e *B/D* foram 1,97% e 3,29% respectivamente.

No grupo de indivíduos não infectados e sem relato de episódio prévio de malária, observamos que o genótipo selvagem *A/A* foi o mais prevalente, ocorrendo na freqüência de 56,12%, enquanto as freqüências dos genótipos mutantes (*A/O*) e (*O/O*), foram 33,67% e 10,21%, respectivamente. Neste grupo também identificamos os três possíveis genótipos mutantes representados pelo *A/O* (*A/B*, *A/C* e *A/D*), o genótipo *A/B* foi o mais prevalente (21,43%). Os genótipos *A/C* e *A/D* ocorreram com a mesma freqüência (6,12%). Neste grupo, identificamos os genótipos *B/B* e *B/D*, e as freqüências encontradas foram 4,09% e 6,12% respectivamente.

No grupo infectado o genótipo *A/O* foi o mais freqüente, enquanto que no grupo não infectado foi o genótipo *A/A*, nos dois grupos as formas em heterozigose foram mais prevalentes entre as variantes alélicas *MBL*B* e *MBL*D*. A comparação do grupo infectado com os grupos não infectados revelou que houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genóticas, agrupadas ou não agrupadas. A comparação entre o grupo primoinfectado e os dois grupos não infectados mostrou que as diferenças observadas nas freqüências de genótipos agrupados foram estatisticamente significativa, quando comparamos o grupo primoinfectado com o grupo que teve

episódio prévio de malária ($p = 0,0214$; Teste G = 7,6873) e quando comparamos com o grupo que nunca teve malária ($p = 0,0047$; Teste G = 10,7260). As diferenças observadas nos grupos não infectados não foram estatisticamente significativas ($p = 0,2651$; Teste G = 2,6554).

A análise mais detalhada dos resultados obtidos (genótipos não agrupados), confirmou a diferença estatisticamente significativa observada entre o grupo primoinfectado e o grupo não infectado com relato de episódio prévio de malária ($p = <0,0001$; Teste G = 29,6059) e o grupo que nunca teve malária ($p = <0,0001$; Teste G = 36,2418). As diferenças nos grupos não infectados não foram estatisticamente significativas ($p = 0,7112$; Teste G = 3,7447).

3.2. ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

A estimativa do equilíbrio Hardy-Weinberg a partir dos desvios entre as proporções genotípicas observadas e esperadas, não foi estatisticamente significativa no grupo que relatou episódio prévio de malária ($p = 0,4525$) e no grupo que nunca teve malária ($p = 0,1467$). Contudo, verificou-se que o grupo constituído por indivíduos primoinfectados não estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, visto que as frequências genotípicas esperadas diferiram significativamente das frequências observadas ($p = 0,0143$), caracterizada por um aumento de indivíduos heterozigotos A/D em detrimento de uma diminuição na frequência de indivíduos homozigotos A/A .

Tabela 2 - Freqüências genotípicas do gene *MBL₂* em grupos de indivíduos primoinfectados por *Plasmodium vivax* e não infectados com e sem relato de episódio prévio de malária.

Freqüências dos genótipos n (%)							
Genótipos	Grupos de indivíduos			Genótipos	Grupos de indivíduos		
	Primoinfectado	Teve malária	Nunca teve malária		Primoinfectado	Teve malária	Nunca teve malária
A/A	29 (35,80)	83 (54,61)	55 (56,12)	A/A	29 (35,80)	83 (54,61)	55 (56,12)
				A/B	23 (28,40)	39 (25,66)	21 (21,43)
A/O	47 (58,03)	61(40,13)	33 (33,67)	A/C	00 (0,00)	07 (4,60)	06 (6,12)
				A/D	24 (29,63)	15 (9,87)	06 (6,12)
				B/B	04 (4,94)	03 (1,97)	04 (4,09)
O/O	05 (6,17)	08 (5,26)	10 (10,21)	B/D	01(1,23)	00(0,00)	00 (0,00)
				D/D	00 (0,00)	05 (3,29)	06 (6,12)
Total	81 (100)	152 (100)	98 (100)	Total	81 (100)	152 (100)	98 (100)

n = número de indivíduos analisados

3.3. ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO ÉXON 1 DO GENE *MBL*₂ COM A INTENSIDADE DOS SINAIS E SINTOMAS DURANTE O PRIMEIRO EPISÓDIO DE MALÁRIA

A avaliação clínica dos indivíduos primoinfectados por *P. vivax* foi realizada no momento da confirmação do diagnóstico para malária. Esta avaliação foi realizada por um médico da equipe que atende no laboratório de ensaios clínicos em malária do Instituto Evandro Chagas, sendo que os sinais foram observados durante o exame físico e os sintomas foram relatados pelos pacientes. Todas essas manifestações clínicas foram classificadas e divididas em escores, possibilitando identificar grupos com diferente intensidade dos sinais ou sintomas.

Os sinais verificados foram a temperatura axilar, o estado geral do paciente, a coloração da pele e das mucosas quanto à presença de palidez e, das escleróticas quanto à presença de icterícia.

De acordo com os escores determinados em relação ao grau de intensidade dos sinais, os grupos foram classificados em leve, moderado e intenso. Na tabela 3, podemos observar que os dois grupos apresentaram freqüências alélicas para o homozigoto selvagem maior que as freqüências alélicas das variantes em relação à intensidade dos sinais. As freqüências do alelo *MBL**A nos grupos leve e moderado foram 68,48% e 57,35%, respectivamente. As freqüências do alelo *MBL**D nos grupos leve e moderado foram 16,30% e 16,18%, respectivamente. Nos dois grupos, a distribuição das freqüências alélicas foram semelhantes ($p = 0,3804$; Teste G= 3,0739).

A análise das freqüências genótípicas nesses grupos mostrou que o genótipo heterozigoto *A/O* foi o mais freqüente, observou-se freqüência de 58,70% e 70,59% em indivíduos que apresentaram sinais leve e moderado, respectivamente. Foram comparados somente os níveis leve e moderado de classificação, uma vez que somente um paciente teve seus sinais classificados como intenso. Este paciente apresentou o genótipo selvagem *A/A* (Tabela 4). Em relação aos demais genótipos, o grupo leve apresentou maior freqüência do genótipo *A/A* (39,13%) que o grupo moderado (26,47%), os grupos leve e moderado apresentaram somente um indivíduo com o genótipo *O/O*, as freqüências foram 2,17% e 2,94%, respectivamente. As diferenças entre esses dois grupos não foram estatisticamente significativas ($p = 0,1751$; Teste G = 3,4857).

Em uma análise mais detalhada (Tabela 4), podemos observar que no grupo leve o genótipo heterozigoto *A/D* ocorreu com freqüência semelhante a do genótipo *A/A*, cujas freqüências foram 32,61% e 39,13%, respectivamente. A freqüência do genótipo *A/B* foi 26,09% e do *B/B* foi 2,17%. No grupo moderado, também observamos que o genótipo heterozigoto *A/D* ocorreu com freqüência semelhante a do genótipo *A/A*, as freqüências encontradas foram 29,41% e 26,47%, respectivamente. O genótipo *A/B* foi mais freqüente (32,36%) e o genótipo *B/B* foi observado em 8,82%. Neste grupo, somente um indivíduo apresentou o genótipo homozigoto *B/D* (2,94%).

A comparação das freqüências genótípicas, nos grupos leve e moderado, considerando na análise as freqüências para cada genótipo (não

agrupados), confirmou que as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p = 0,6089$; Teste G = 4,5034).

Considerando a intensidade dos sintomas, analisamos as freqüências alélicas e genóticas com o intuito de verificar a associação dos genótipos do éxon 1 do gene *MBL₂* com a intensidade dos sintomas como febre, calafrios, astenia, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, anorexia, tosse, dispnéia e colúria referidos pelos pacientes primoinfectados. De acordo com os escores determinados em relação ao grau de intensidade, os grupos foram classificados em leve, moderado, intenso e muito intenso.

Na tabela 3, podemos observar que os alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*D* foram identificados nos quatro grupos, e o alelo *MBL*A* foi o mais freqüente em todos os grupos. As freqüências deste alelo nos grupos leve, moderado, intenso e muito intenso foram 70,0%, 65,22%, 54,55% e 65,62%, respectivamente. O alelo *MBL*B* ocorreu com freqüência semelhante nos grupos moderado (21,74%), intenso (27,27%) e muito intenso (25,0%). No grupo leve, este alelo foi observado em 5,0%, portanto cerca de quatro vezes menor que as freqüências observadas nos demais grupos. As freqüência do alelo *MBL*D* nos grupo leve (20,0%) e intenso (18,8%) foram semelhantes. No grupo moderado foi 13,04% e no grupo muito intenso foi observada a menor freqüência (9,38%).

A comparação das freqüências alélicas nos diferentes grupos mostrou que as diferenças observadas entre os grupos leve e intenso foram estatisticamente significativa ($p = 0,0384$ e Teste G = 8,4024). As diferenças entre o grupo leve e os demais grupos não foram estatisticamente significativas; grupo

leve e grupo moderado ($p = 0,1277$ e Teste G = 5,6898); grupo leve e grupo muito intenso ($p = 0,0745$ e Teste G = 6,9190). As comparações das freqüências entre o grupo moderado e os outros não foram estatisticamente significativas; grupo moderado e intenso ($p = 0,7789$ e Teste G = 1,0924), grupo moderado e muito intenso ($p = 0,9577$ e Teste G = 0,3122). As diferenças observadas nas freqüências alélicas nos grupos intenso e muito intenso também não foram estatisticamente significativas ($p = 0,6913$ e Teste G = 1,4612).

Em relação à freqüência dos genótipos, observamos na tabela 5 que o genótipo *A/O* foi o mais freqüente nos grupos moderado e intenso, 60,87% e 72,72%, respectivamente. Nos grupos leve e muito intenso a freqüência desse genótipo foi 50,0% e 43,75%, respectivamente. O genótipo *A/A* foi mais freqüente no grupo leve (50,0%) e menos freqüente no grupo intenso (18,18%). Nos grupos moderado e muito intenso a freqüência deste genótipo foi 34,78% e 43,75%, respectivamente. O genótipo variante homozigoto *O/O* foi observado nos grupos moderado (4,35%), intenso (9,10%) e muito intenso (12,50%). No grupo com sintomatologia leve nenhum indivíduo apresentou esse genótipo.

A comparação das freqüências de genótipos agrupados nos diferentes grupos mostrou que as diferenças observadas entre os grupos leve e intenso foram estatisticamente significativa ($p = 0,0345$ e Teste G = 6,7311). Na tabela 6, observamos o resultado da análise estatística. As diferenças entre o grupo leve e os demais grupos não foram estatisticamente significativas. As diferenças entre os outros grupos (moderado e intenso) também não foram estatisticamente significativas.

Em uma análise mais detalhada, podemos observar que a frequência do genótipo heterozigoto *A/B* nos grupos moderado e intenso foi 34,78% e 36,36%, respectivamente, semelhante a frequência observada no grupo muito intenso (31,25%). Este fenótipo foi menos freqüente no grupo leve (10,0%) (Tabela 5).

Nos grupos leve e intenso a frequência do genótipo *A/D* foi 40,0% e 36,36%, respectivamente. Nos grupos moderado e muito intenso foi 26,09% e 12,05%, respectivamente. Portanto, foi mais freqüente nos grupos leve e intenso e menos freqüente no grupo muito intenso. O genótipo *B/B* ocorreu nos grupos moderado, intenso e muito intenso na frequência de 4,35%, 9,10% e 6,25%, respectivamente. O genótipo variante *B/D* foi observado apenas no grupo muito intenso, e ocorreu com frequência de 6,25%.

A comparação das frequências genóticas mostrou que as diferenças observadas entre os grupos não foram estatisticamente significativas. O resultado da análise estatística para comparar as frequências genóticas nos grupos que apresentaram sintomas classificados em leve, moderado, intenso e muito intenso está apresentado na tabela 6.

Tabela 3 - Frequências alélicas do gene *MBL₂* em grupos de indivíduos infectados por *P. vivax* e que apresentam diferentes graus de intensidade dos sinais e sintomas clínicos, durante o primeiro episódio de malária.

Frequências dos alelos n (%)								
Alelos	Intensidade dos sinais			Alelos	Intensidade dos sintomas			
	Leve	Moderado	Intenso		Leve	Moderado	Intenso	Muito Intenso
<i>MBL*A</i>	63 (68,48)	39 (57,35)	02 (100)	<i>MBL*A</i>	30 (75,00)	30 (65,22)	24 (54,55)	21 (65,62)
<i>MBL*B</i>	14 (15,22)	18 (26,47)	00 (0,00)	<i>MBL*B</i>	02 (05,00)	10 (21,74)	12 (27,27)	08 (25,00)
<i>MBL*C</i>	00 (0,00)	00 (0,00)	00 (0,00)	<i>MBL*C</i>	00 (0,00)	00 (0,00)	00 (0,00)	00 (0,00)
<i>MBL*D</i>	15 (16,30)	11 (16,18)	00 (0,00)	<i>MBL*D</i>	08 (20,00)	06 (13,04)	08 (18,18)	03 (9,38)
Total	92 (100)	68 (100)	02 (100)		40 (100)	46 (100)	44 (100)	32 (100)

n = número de cromossomos analisados

Tabela 4 - Freqüências genóticas do gene *MBL₂* em grupos de indivíduos infectados por *P. vivax* e que apresentam diferentes graus de intensidade dos sinais clínicos, durante o primeiro episódio de malária.

Freqüências dos genótipos n (%)							
Genótipos	Intensidade dos sinais			Genótipos	Intensidade dos sinais		
	Leve	Moderado	Intenso		Leve	Moderado	Intenso
A/A	18 (39,13)	09 (26,47)	01(100)	A/A	18 (39,13)	09 (26,47)	01(100,0)
				A/B	12 (26,09)	11 (32,36)	0 (0,00)
A/O	27 (58,70)	24 (70,59)	0 (0,00)	A/C	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
				A/D	15 (32,61)	10 (29,41)	0 (0,00)
O/O	01(2,17)	01(2,94)	0 (0,00)	B/B	01 (2,17)	03 (8,82)	0 (0,00)
				B/D	0 (0,00)	01(2,94)	0 (0,00)
				D/D	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Total	46 (100)	34 (100)	01 (100)	Total	46 (100)	34 (100)	01 (100)

n = número de indivíduos analisados

Tabela 5 - Freqüências genóticas do gene *MBL₂* em grupos de indivíduos infectados por *P. vivax* e que apresentam diferentes graus de intensidade dos sintomas clínicos, durante o primeiro episódio de malária.

Freqüências dos genótipos n (%)									
Genótipos	Intensidade dos sintomas				Genótipos	Intensidade dos sintomas			
	Leve	Moderado	Intenso	Muito Intenso		Leve	Moderado	Intenso	Muito Intenso
A/A	10 (50,0)	08 (34,78)	04 (18,18)	07 (43,75)	A/A	10 (50,00)	08 (34,78)	04 (18,18)	07 (43,75)
					A/B	02 (10,00)	08 (34,78)	08 (36,36)	05 (31,25)
A/O	10 (50,0)	14 (60,87)	16 (72,72)	07 (43,75)	A/C	0 (00,0)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
					A/D	08 (40,00)	06 (26,09)	08 (36,36)	02 (12,50)
O/O	0 (0,0)	01(4,35)	02 (9,10)	02 (12,50)	B/B	0 (0,00)	01(4,35)	02 (9,10)	01(6,25)
					B/D	0 (00,0)	0 (0,00)	0 (0,00)	01(6,25)
					D/D	0 (00,0)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Total	20 (100)	23 (100)	22 (100)	16 (100)	Total	20 (100)	23 (100)	22 (100)	16 (100)

n = número de indivíduos analisados.

Tabela 6 - Valores de p e G obtidos na análise estatística para comparação entre os grupos que apresentaram diferentes graus de sintomas clínicos e frequência de genótipos do éxon 2 do gene *MBL2*.

Análise estatística para comparação entre os grupos (valores de p e G)							
Grupos	Análise com os genótipos agrupados			Grupos	Análise com os genótipos não agrupados		
	Moderado	Intenso	Muito Intenso		Moderado	Intenso	Muito Intenso
Leve	$p = 0,3554$	$p = 0,0345$	$p = 0,4283$	Leve	$p = 0,4765$	$p = 0,1632$	$p = 0,2350$
	$G = 2,0693$	$G = 6,7311$	$G = 1,6958$		$G = 5,5411$	$G = 9,1888$	$G = 8,0426$
Moderado		$p = 0,4045$	$p = 0,7942$	Moderado		$p = 0,9230$	$p = 0,8112$
		$G = 1,8102$	$G = 0,4607$			$G = 1,9635$	$G = 2,9813$
Intenso			$p = 0,2304$	Intenso			$p = 0,4058$
			$G = 2,9355$				$G = 6,1569$

3.4. ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO ÉXON 1 DO GENE *MBL2* COM A DENSIDADE PARASITÁRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS POR *P. Vivax*

A comparação da densidade parasitária, determinada pelo número de parasitos por mm^3 de sangue, nos grupos de indivíduos que apresentaram genótipos selvagem ou variante foi realizada com o a finalidade de verificar se determinado genótipo poderia estar associado ao controle da parasitemia, durante o primeiro episódio de malária por *P. vivax*. Na tabela 6, podemos observar que não houve diferença estatística significativa na comparação das médias da parasitemia entre os indivíduos do genótipo *A/A* e os demais genótipos. A média da parasitemia nos indivíduos que apresentaram a variante *A/D* foi menor que a média dos indivíduos que apresentaram genótipo *A/B*, sendo esta diferença estatisticamente significativa. As diferenças observadas entre os grupos com genótipos *A/B* e *B/B*, assim como *B/B* e *A/D* não foram estatisticamente significativas. As comparações das médias da parasitemia apresentaram os seguintes resultados; genótipos *A/A* e *A/B* ($p=0,2852$); *A/A* e *A/D* ($p=0,1802$); *A/A* e *B/B* ($p=0,6791$); ***A/B* e *A/D* ($p=0,0182$)**; *A/B* e *B/B* ($p=0,8645$); *A/D* e *B/B* ($p=0,2644$).

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 5 e 7, podemos observar que o genótipo *A/D* ocorreu com maior freqüência no grupo de indivíduos que apresentou densidade parasitária baixa e sintomatologia leve, moderada ou intensa, enquanto que o genótipo *A/B* ocorreu no grupo com densidade parasitária mais elevada e sintomatologia moderada, intensa e muito intensa.

Tabela 7 - Genótipos do gene *MBL₂* e densidade parasitária determinada pelo exame da gota espessa (média \pm dp) em indivíduos infectados por *P. vivax*.

Genótipos Agrupados	*Parasitemia	Genótipos	Parasitemia
A/A	9.100 \pm 8.555	A/A	9.100 \pm 8.555 (n=29)
		A/B	11.782 \pm 9.541 (n=23)
A/O	9.196 \pm 9.508	A/C	-----
		A/D	6.718 \pm 8.979 (n=24)
		B/B	9.875 \pm 8.066 (n=4)
O/O	8.800 \pm 7.387	B/D	4.500 (n=1)
		D/D	-----
Parasitemia			9.137 \pm 8.963 (n=81)

n= número de indivíduos analisados. *Número de parasitos por mm³ de sangue.

3.5. FREQUENCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA EM INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS QUE RESIDEM EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE *Plasmodium vivax*.

Foram analisados indivíduos não infectados, que relataram se tiveram ou não episódio prévio de malária. Portanto, foram analisados dois grupos, um que nunca teve malária e outro que relatou ter tido pelo menos um episódio de malária. Nos dois grupos foram identificadas as quatro formas alélicas descritas para o éxon 1 do gene *MBL₂*, *MBL *A*, *MBL *B*, *MBL *C* e *MBL *D*. Na tabela 8, podemos observar

que o alelo selvagem (*MBL*A*) foi mais freqüente que os alelos mutantes, em todos os grupos. As freqüências alélicas observadas entre o grupo que nunca teve e os grupos que tiveram 1, 2, 3, 4 ou mais episódios variaram de 67,5% a 81,48%, sendo que o grupo que relatou ter tido três episódios apresentou a menor freqüência alélica e o grupo que relatou ter tido dois episódios apresentou a maior freqüência.

Em relação ao alelo selvagem *MBL*B*, a distribuição das freqüências variaram de 10,25% a 18,94%, sendo que o grupo que relatou ter tido um episódio apresentou a maior freqüência e o grupo que teve 4 ou mais episódios apresentou a menor freqüência. Para o alelo *MBL*C* as freqüências variaram de 2,5% a 3,85%, a menor freqüência foi observada no grupo que relatou ter tido três episódios de malária e a maior freqüência foi observada no grupo que teve 4 ou mais episódios. No grupo que relatou dois episódios não observamos ocorrência deste alelo. As freqüências do alelo *MBL*D* nos diferentes grupos variaram de 3,79% a 12,82%, a menor freqüência foi observada no grupo que relatou ter tido um episódio de malária e a maior freqüência também foi observada no grupo que teve 4 ou mais episódios.

A comparação das freqüências alélicas mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que teve um episódio e o grupo que teve 4 ou mais episódios ($p= 0,0384$; $\chi^2 = 8,402$). Esta diferença se deve a maior freqüência da variante *MBL*D* no grupo que teve mais episódios de malária. As diferenças observadas nos demais grupos não foram estatisticamente significativas (Tabela 9).

Tabela 8 - Frequências alélicas do gene *MBL₂* em indivíduos que residem em área de transmissão de malária distribuídas de acordo com o número de episódios prévio de malária.

Alelos	Frequência dos alelos n (%)				
	Número de episódios prévios de malária/				
	Nunca teve	1	2	3	≥4
<i>MBL*A</i>	143 (72,96)	99 (75,00)	44 (81,48)	27 (67,50)	57 (73,08)
<i>MBL*B</i>	29 (14,80)	25 (18,94)	05 (9,26)	07 (17,50)	08 (10,25)
<i>MBL*C</i>	06 (3,06)	03 (2,27)	0 (0,00)	01 (2,50)	03 (3,85)
<i>MBL*D</i>	18 (9,18)	05 (3,79)	05 (9,26)	05 (12,5)	10 (12,82)
Total	196 (100)	132 (100)	54 (100)	40 (100)	78 (100)

n = número de cromossomos

Com a finalidade de identificar uma possível associação dos polimorfismos descritos para o éxon 1 do gene *MBL₂*, analisamos as frequências genóticas nos grupos descritos acima. Na tabela 10, podemos observar a distribuição dos genótipos agrupados. O genótipo *A/A* foi o mais freqüente em todos os grupos, quando comparado com os genótipos *A/O* e *O/O*. O grupo que nunca teve malária e os grupos que tiveram 1 ou 4 ou mais episódios as frequências do genótipo *A/A* foram semelhantes. Nesses três grupos as frequências desse genótipo variaram de 51,28% a 56,12%. O grupo que relatou 2 episódios de malária apresentou a maior frequência (74,08%) e a menor frequência ocorreu no grupo que relatou 3 episódios de malária (45,0%).

Tabela 9 - valores de p e χ^2 obtidos na comparação das freqüências alélicas distribuídas de acordo com o número de episódios prévio de malária.

Número de episódios	Valores de p e χ^2			
	1	2	3	≥ 4
Nunca teve	$p = 0,2288$	$p = 0,3888$	$p = 0,8716$	$p = 0,6417$
	$\chi^2 = 4,321$	$\chi^2 = 3,019$	$\chi^2 = 0,707$	$\chi^2 = 1,678$
1		$p = 0,1219$	$p = 0,2324$	$p = 0,0384$
		$\chi^2 = 5,797$	$\chi^2 = 4,284$	$\chi^2 = 8,402$
2			$p = 0,3348$	$p = 0,4302$
			$\chi^2 = 3,394$	$\chi^2 = 2,760$
3				$p = 0,7172$
				$\chi^2 = 1,350$

As freqüências do genótipo *A/O* foram semelhantes nos grupos de indivíduos que relataram 1, 3 ou 4 ou mais episódios, variaram de 45,0% a 46,96%. No grupo que nunca teve malária a freqüência desse genótipo foi 33,67%. A maior freqüência foi observada no grupo que relatou 1 episódio de malária (46,96%) e a menor freqüência ocorreu no grupo que relatou 2 episódios de malária (14,81%). Para o genótipo *O/O*, as freqüências variaram de 1,52% a 11,11%, a menor freqüência foi observada no grupo que relatou ter tido 1 episódio de malária e a maior freqüência foi observada no grupo que teve 2 episódios de malária.

A comparação das freqüências genótípicas mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que nunca teve malária e o grupo que teve 1 episódio ($p = 0,041$; $\chi^2 = 6,38$), esta diferença se deve a freqüência do genótipo mutante heterozigoto *O/O*. As diferenças observadas nas freqüências genótípicas entre o grupo que teve 2 episódios foram estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo que teve 1 episódio ($p = 0,040$; $\chi^2 = 11,04$) e com o grupo que teve 4 ou mais episódios ($p = 0,043$; $\chi^2 = 6,27$) (Tabela 12).

Tabela 10 - Freqüências genótípicas em análise com genótipos agrupados em indivíduos que residem em área de transmissão de malária distribuídas de acordo com o número de episódios de malária.

Freqüência dos genótipos n (%)					
Genótipos	Número de episódios prévios de malária				
	Nunca teve	1	2	3	≥ 4
A/A	55 (56,12)	34 (51,52)	20 (74,08)	09 (45,00)	20 (51,28)
A/O	33 (33,67)	31 (46,96)	04 (14,81)	09 (45,00)	17 (43,59)
O/O	10 (10,21)	01 (1,52)	03 (11,11)	02 (10,00)	02 (5,13)
Total	98 (100)	66 (100)	27 (100)	20 (100)	39 (100)

n = número de indivíduos

Em uma análise mais detalhada, considerando os genótipos relacionados ao polimorfismo em estudo, podemos observar na tabela 11 que, em todos os grupos analisados, o genótipo selvagem em homozigose foi mais prevalente que em heterozigose, como mostrado anteriormente na análise com genótipos agrupados. O genótipo *A/B* apresentou freqüência semelhante no grupo que nunca teve malária e nos grupos que tiveram 3 ou 4 ou mais episódios. O grupo que teve 2 episódios apresentou a menor freqüência (11,11%) e o que teve 1 episódio apresentou a maior freqüência (34,85%).

Nos grupos analisados, as freqüências dos genótipos selvagens heterozigotos, *A/C* e *A/D*, variaram de 3,7% a 15,39%. O genótipo *A/C* não foi observado no grupo que apresentou 2 episódios de malária. O genótipo *B/B* foi observado em todos os grupos, exceto no que teve 4 ou mais episódios, as freqüências variaram de 1,52% a 5,00%. O genótipo *D/D* ocorreu em todos os grupos, exceto no que teve 1 episódio, as freqüências variaram de 5,00% a 7,41%.

A comparação entre os grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que teve 1 episódio e o grupo que teve 2 episódios ($p = 0,028$; $\chi^2 = 12,52$). Esta diferença também foi observada na análise com genótipos agrupados (Tabela 12).

Tabela 11 - Frequências dos genótipos do gene *MBL₂* em indivíduos que residem em área de transmissão de malária distribuídas de acordo com o número de episódios de malária.

Genótipos	Frequência de genótipos n (%)				
	Número de episódios prévios de malária				
	Nunca teve	1	2	3	≥4
A/A	55 (56,12)	34 (51,52)	20 (74,08)	09 (45,00)	20 (51,28)
A/B	21 (21,43)	23 (34,85)	03 (11,11)	05 (25,00)	08 (20,51)
A/C	06 (6,12)	03 (4,54)	0 (0,00)	01 (5,00)	03 (7,69)
A/D	06 (6,12)	05 (7,57)	01 (3,70)	03 (15,0)	06 (15,39)
B/B	04 (4,09)	01 (1,52)	01(3,70)	01 (5,00)	0 (0,00)
D/D	06 (6,12)	0 (0,00)	02 (7,41)	01 (5,00)	02 (5,13)
Total	98 (100)	66 (100)	27 (100)	20 (100)	39 (100)

n = número de indivíduos

No grupo de indivíduos não infectados e que residem em área de transmissão de malária exclusiva por *P. vivax*, analisamos as frequências alélicas e genotípicas em relação ao tempo decorrido do último episódio de malária. Esta análise foi realizada com as informações fornecidas pelos participantes do estudo. Os grupos foram separados de acordo com a distribuição temporal do último episódio, compondo, assim, cinco grupos; conforme tiveram o último episódio há menos de 1 mês, e nos período de 1 e 6 meses, 7 e 12 meses, 13 e 24 meses ou há mais de 24 meses.

Tabela 12 - Valores de p e χ^2 obtidos na análise estatística para comparação das freqüências de genótipos do éxon 1 do gene *MBL2* entre os grupos que apresentaram diferentes número de episódios de malária.

Comparação entre os grupos (valores de p e χ^2)									
*Grupos	Análise com os genótipos agrupados				Grupos	Análise com os genótipos não agrupados			
	1	2	3	>4		1	2	3	>4
Nunca	$p = 0,041$	$p = 0,157$	$p = 0,613$	$p = 0,429$	Nunca	$p = 0,156$	$p = 0,514$	$p = 0,807$	$p = 0,465$
teve	$\chi^2 = 6,38$	$\chi^2 = 3,69$	$\chi^2 = 0,97$	$\chi^2 = 1,69$	teve	$\chi^2 = 7,99$	$\chi^2 = 4,24$	$\chi^2 = 2,29$	$\chi^2 = 4,60$
		$p = 0,040$	$p = 0,191$	$p = 0,553$			$p = 0,028$	$p = 0,346$	$p = 0,183$
1		$\chi^2 = 11,04$	$\chi^2 = 3,31$	$\chi^2 = 1,18$	1		$\chi^2 = 12,52$	$\chi^2 = 5,60$	$\chi^2 = 7,53$
			$p = 0,068$	$p = 0,043$				$p = 0,296$	$p = 0,160$
2			$\chi^2 = 5,37$	$\chi^2 = 6,27$	2			$\chi^2 = 6,09$	$\chi^2 = 7,92$
				$p = 0,750$					$p = 0,803$
3				$\chi^2 = 0,57$	3				$\chi^2 = 2,32$

* divididos conforme o número de episódios

Na tabela 13, podemos observar que todos os grupos analisados apresentaram as formas alélicas *MBL*A* e *MBL*B*. O alelo *MBL*C* não foi identificado em dois grupos, o que teve o último episódio no período entre 7 e 12 meses e o que teve malária no período entre 13 e 24 meses. O alelo *MBL*D* também não foi identificado em dois grupos, o que teve o último episódio a menos de um mês e o grupo que teve malária no período entre 13 e 24 meses. O alelo selvagem (*MBL*A*) foi o mais freqüente em todos os grupos comparados com os alelos mutantes, as freqüências alélicas observadas foram semelhantes entre os grupos que tiveram o último episódio há menos de 1 mês, e entre 13 e 24 ou mais de 24 meses. As freqüências nesses grupos variaram de 76,0% a 93,75%. O grupo que relatou ter tido malária entre 13 e 24 meses apresentou a maior freqüência (93,75%) e o grupo que teve malária entre 7 e 12 meses apresentou a menor freqüência deste alelo (53,33%). No grupo que teve malária no período entre 6 e 12 meses a freqüência foi 68,18%.

Nos diferentes grupos a distribuição das freqüências do alelo mutante *MBL*B*, variou de 6,25% (período entre 13 e 24 meses) a 20,0% (menos de 1 mês e entre 7 e 12 meses). Nos grupos que tiveram malária no período entre 1 e 6 meses e mais de 24 meses, as freqüências do alelo *MBL*B* foram semelhantes (13,64% e 13,39%, respectivamente). Para o alelo *MBL*C* as freqüências encontradas foram 2,68%, 3,03% e 4,0%, nos grupos que tiveram episódio a mais de 24 meses, no período entre 1 e 6 meses e há menos de 1 mês, respectivamente. O alelo *MBL*D* foi detectado em três grupos e com ampla variação. A maior freqüência ocorreu no grupo que teve malária no período entre 7 e 12 meses (26,67%) e a menor

freqüência ocorreu no grupo que teve malária há mais de 24 meses (3,57%). A freqüência deste alelo no grupo que teve malária no período entre 1 e 6 meses foi 15,15%.

Tabela 13 - Freqüências alélicas do gene *MBL₂* em indivíduos não infectados por *P. vivax* que residem em área de transmissão distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.

Alelos/ Tempo	Freqüência de alelos n (%)				
	<1 mês	1 - 6 m	7 – 12m	13 – 24m	>24m
<i>MBL</i>*A	38 (76,00)	45 (68,18)	16 (53,33)	15 (93,75)	90 (80,36)
<i>MBL</i>*B	10 (20,00)	09 (13,64)	06 (20,00)	01 (6,25)	15 (13,39)
<i>MBL</i>*C	02 (4,00)	02 (3,03)	0 (0,00)	0 (0,00)	03 (2,68)
<i>MBL</i>*D	0 (0,00)	10 (15,15)	08 (26,67)	0 (0,00)	04 (3,57)
Total	50 (100)	66 (100)	30 (100)	16 (100)	112 (100)

m= meses, n = número de indivíduos.

A comparação das freqüências alélicas mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que teve malária há menos de um mês e os grupos que tiveram malária no período entre 1 e 6 meses ($p= 0,0064$; $G = 12,2927$) ou entre 7 e 12 meses ($p= 0,0003$; $G = 19,0492$). Também foram significativas as diferenças observadas entre o grupo que teve malária no período entre 7 e 12 meses e o grupo que teve no período entre 13 e 24 meses ($p= 0,0131$;

G = 10,7558) ou há mais de 24 meses ($p= 0,0011$; G = 16,0751). As demais diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de p e G obtidos na comparação das freqüências alélicas distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.

Tempo (meses)	Valores de p e G			
	1-6	7-12	13-24	>24
<1	$p = 0,0064$	$p = 0,0003$	$p = 0,3540$	$p = 0,2450$
	G = 12,2927	G = 19,0492	G = 3,2544	G = 4,1570
1-6		$p = 0,2484$	$p = 0,0731$	$p = 0,0540$
		G = 4,1235	G = 6,9628	G = 7,6412
7-12			$p = 0,0131$	$p = 0,0011$
			G = 10,7558	G = 16,0751
13-24				$p = 0,4158$
				G = 2,8474

Com a finalidade de identificar uma possível associação dos polimorfismos descritos para o éxon 1 do gene *MBL2* e o tempo decorrido após o último episódio de malária, analisamos as freqüências genóticas nos grupos descritos acima. Na tabela 15, apresentamos a distribuição dos genótipos agrupados. Os genótipos *A/A* e *A/O* foram detectados em todos os grupos. As freqüências do genótipo homocigoto *A/A* variaram de 33,33% (grupo que teve malária no período entre 7 e 12 meses) a 87,50% (grupo que teve malária no período entre 13 e 24 meses). Os grupos que relataram terem tido malária há

menos de um mês, entre 1 e 6 meses ou há mais de 24 meses as freqüências desse alelo foram 52,0%, 42,43% e 62,5%, respectivamente.

As freqüências do genótipo heterozigoto *O/O* variaram de 12,50% (grupo que teve malária no período entre 13 e 24 meses) a 51,51% (grupo que teve malária no período entre 1 e 6 meses). Os grupos que relataram terem tido malária há menos de um mês, entre 7 e 12 meses ou há mais de 24 meses as freqüências desse alelo foram 48,0%, 40,0% e 35,71%, respectivamente.

A comparação das freqüências dos genótipos agrupados mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que teve malária há menos de 1 mês e o grupo que teve malária no período entre 7 e 12 meses ($p = 0,012$ $G = 8,740$). Também houve diferença significativa entre o grupo que teve malária no período entre 1 e 6 meses e o grupo que teve malária no período entre 13 e 24 meses ($p = 0,0049$; $G = 6,014$). Este último grupo também foi diferente do grupo que teve malária há mais de 24 meses ($p = 0,006$; $G = 2,338$) (Tabela 17).

Em uma análise mais detalhada, considerando os genótipos relacionados ao polimorfismo em estudo, podemos observar na tabela 16, que o genótipo selvagem em homozigose foi o genótipo mais prevalente em todos os grupos analisados, conforme apresentado anteriormente na análise com genótipos agrupados. As freqüências do genótipo *A/B* variaram de 12,50% (grupo que teve malária no período entre 13 e 24 meses) a 40,0% (grupo que teve malária há menos de 1 mês). Nos demais grupos as freqüências foram semelhantes, sendo que os grupos que relataram terem tido malária no período entre 1 e 6 meses, 7 e

12 meses ou há mais de 24 meses apresentaram as freqüências 21,21%, 26,67% e 23,211%, respectivamente.

Tabela 15 - Freqüências genótípicas do gene *MBL₂* (genótipos agrupados) em indivíduos não infectados por *P. vivax* que residem em área de transmissão distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.

Genótipos	Freqüência dos genótipos				
	Tempo decorrido após o último episódio (meses)				
	<1	1 - 6	7 - 12	13 - 24	>24
A/A	13 (52,00)	14 (42,43)	05 (33,33)	07 (87,50)	35 (62,50)
A/O	12 (48,00)	17 (51,51)	06 (40,00)	01 (12,50)	20 (35,71)
O/O	0 (0,00)	02 (6,06)	04 (26,67)	0 (0,00)	01 (1,79)
Total	25 (100)	33 (100)	15 (100)	08 (100)	56 (100)

n = número de indivíduos analisados

O genótipo *A/C* ocorreu em três grupos e as freqüências foram semelhantes. As freqüências observadas nos grupos que relataram terem tido malária a menos de 1 mês, no período entre 1 e 6 meses ou há mais de 24 meses foram 8,0%, 6,06% e 5,36%, respectivamente. O genótipo mutante *A/D* também ocorreu em três grupos. As freqüências observadas nos grupos que relataram terem tido malária no período entre 1 e 6 meses, entre 7 e 12 ou há mais de 24 meses foram 24,24%, 13,33% e 7,14%, respectivamente.

O genótipo mutante *B/B* também foi observado nesses mesmos grupos. As freqüências observadas nos grupos que relataram terem tido malária no período entre 1 e 6 meses, entre 7 e 12 ou há mais de 24 meses foram 3,03%, 6,67% e 1,79%, respectivamente. O genótipo *D/D* ocorreu em apenas dois grupos, porém as freqüências foram muito diferentes. No grupo que teve malária no período entre 1 e 6 meses a freqüência encontrada foi 3,03%, enquanto que no grupo que teve malária no período entre 7 e 12 meses a freqüência deste genótipo foi 20,0%.

Na tabela 17, podemos observar o resultado da análise realizada para comparar as freqüências genotípicas nos diferentes grupos. Esta comparação mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que teve malária há menos de um mês e os grupos que tiveram malária no período entre 1 e 6 meses ($p= 0,010$; $G = 13,325$) ou entre 7 e 12 meses ($p= 0,010$; $G = 14,903$). Também foram significativas as diferenças observadas entre este último grupo e o grupo que teve malária há mais de 24 meses ($p= 0,014$; $G = 14,117$). As demais diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

As diferenças observadas entre o grupo que teve malária no período entre 7 e 12 meses e os grupos que tiveram malária há menos de um mês ou há mais de 24 meses também foram observadas na análise com genótipos agrupados.

Tabela 16 - Frequência de genótipos do gene *MBL₂* em grupos indivíduos não infectados por *P. vivax* que residem em área de transmissão distribuídas de acordo com o tempo decorrido após o último episódio de malária.

Genótipos	Frequência dos genótipos				
	Tempo decorrido após o último episódio (meses)				
	<1	1 - 6	7 - 12	13 - 24	>24
A/A	13 (52,00)	14 (42,43)	05 (33,33)	07 (87,5)	35 (62,50)
A/B	10 (40,00)	07 (21,21)	04 (26,67)	01 (12,50)	13 (23,21)
A/C	02 (8,00)	02 (6,06)	0 (0,00)	0 (0,00)	03 (5,36)
A/D	0 (0,00)	08 (24,24)	02 (13,33)	0 (0,00)	04 (7,14)
B/B	0 (0,00)	01 (3,03)	01 (6,67)	0 (0,00)	01 (1,79)
D/D	0 (0,00)	01(3,03)	03 (20,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Total	25 (100)	33 (100)	15 (100)	08 (100)	56 (100)

Tabela 17 - Valores de p e G obtidos na análise estatística para comparação das freqüências de genótipos do éxon 2 do gene MBL_2 entre os grupos que apresentaram diferentes tempos após o último episódio de malária.

Comparação entre os grupos (valores de p e G)									
Tempo (meses)	Análise com os genótipos agrupados				Tempo (meses)	Análise com os genótipos não agrupados			
	1-6	7-12	13-24	> 24		1-6	7-12	13-24	> 24
<1	$p = 0,276$	$p = 0,012$	$p = 0,164$	$p = 0,426$	<1	$p = 0,020$	$p = 0,010$	$p = 0,555$	$p = 0,3238$
	$G = 2,569$	$G = 8,740$	$G = 3,605$	$G = 1,705$		$G = 13,325$	$G = 14,903$	$G = 3,954$	$G = 5,822$
1-6		$p = 0,158$	$p = 0,049$	$p = 0,144$	1-6		$p = 0,303$	$p = 0,172$	$p = 0,152$
		$G = 3,683$	$G = 6,014$	$G = 3,869$			$G = 6,023$	$G = 7,710$	$G = 8,061$
7-12			$p = 0,021$	$p = 0,006$	7-12			$p = 0,134$	$p = 0,014$
			$G = 7,677$	$G = 9,983$				$G = 8,415$	$G = 14,117$
13-24				$p = 0,310$	13-24				$p = 0,673$
				$G = 2,338$					$G = 3,174$

4. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos a freqüência de polimorfismos no éxon 1 do gene 2 da Lectina Ligadora de Manose (MBL) em indivíduos expostos à malária causada por *Plasmodium vivax*. A MBL é uma proteína da família das colectinas, que possui um papel fundamental na imunidade inata, atuando na fagocitose direta ou indireta, através da ativação do complemento pela via das lectinas (Matsushita & Fujita, 1992; Thiel *et al.*, 1997; Matsushita *et al.*, 2000).

Estudos realizados em diversas populações têm mostrado que o polimorfismo no éxon 1 do gene *MBL₂* influencia nos níveis séricos da proteína (Lipscombe *et al.*, 1992; Madsen *et al.*, 1994; Steffenssen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004). Os alelos variantes *MBL*B*, *MBL*C* e *MBL*D* têm sido associados à maior susceptibilidade às diversas infecções, causadas por bactérias, vírus e protozoários. Por outro lado, em algumas populações, esses mesmos alelos podem ter um efeito protetor contra determinados agentes infecciosos, uma vez que os baixos níveis de MBL diminuem a capacidade de opsonização, e assim, a entrada desses agentes nas células hospedeira não seria favorecida (revisto por Dommett *et al.*, 2006).

Em 1992, Garred e colaboradores demonstraram que o nível de MBL determinado no soro de indivíduos dinamarqueses homocigotos para o alelo *MBL*A* foi 1,2µg/mL, enquanto que em indivíduos heterocigotos que apresentavam a mutação no códon 54 (alelo *MBL*B*), a concentração da proteína foi de 0,2µg/mL. Desta forma, o genótipo pode ser um dos indicadores da

concentração da MBL na circulação. Em relação a esses níveis séricos de MBL, Madsen e colaboradores (1994) relataram que 90% dos indivíduos que são homozigotos para o tipo selvagem do gene estrutural (*A) apresentam concentrações variáveis de MBL superiores a 0,6µg/mL, enquanto que 85% dos heterozigotos para esse gene apresentam variações nos níveis de MBL circulantes menor que 0,6µg/mL.

A ligação da MBL às hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* foi comprovada, utilizando ensaios com marcação de glicoproteínas do parasito. O principal carboidrato neste protozoário é a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sintetizada nos estágios de trofozoíta, merozoíta e esquizonte, durante a maturação (Gerold *et al.*, 1994). Entretanto, ainda não está bem estabelecido se essa ligação é capaz de inibir o crescimento do parasito. Assim, foi proposto que a MBL pode cooperar com o macrófago, favorecendo a fagocitose e atuando na detoxificação de componente glicosilados, como as toxinas produzidas na malária (Klabunde *et al.*, 1998). Devido às restrições para estabelecer cultivo de *P. vivax* ainda não há na literatura relatos sobre a participação da MBL na malária causada por *P. vivax*.

Inicialmente analisamos o polimorfismo em indivíduos infectados e não infectados. No grupo de indivíduos que apresentavam o primeiro episódio de malária por *P. vivax* verificamos que a freqüência das formas alélicas *MBL**A, *MBL**B e *MBL**D foram 64,20%, 19,75% e 16,05%, respectivamente. Entre esses indivíduos observamos que o alelo *MBL**C não ocorreu. Em outros dois estudos

que analisaram tais polimorfismos em indivíduos infectados por *P. falciparum* o alelo *MBL*C* foi encontrado, mas o alelo *MBL*D* estava ausente (Bellamy *et al.*, 1998; Luty *et al.*, 1998).

A distribuição das freqüências alélicas no grupo de indivíduos infectados foi diferente da distribuição observada no grupo de indivíduos não infectados. As comparações foram realizadas entre o grupo infectado e um grupo não infectado que relatou nunca ter sido exposto à malária e entre outro grupo não infectado, mas que relatou ter tido um ou mais episódios da doença. Estas diferenças ocorreram devido a maior freqüência do alelo *MBL*D* no grupo infectado.

Nas populações em geral, o alelo *MBL*D* tem ocorrido com freqüências baixas (5%) (Garred *et al.*, 1996). No presente estudo, este alelo foi detectado em heterozigose na freqüência de 15,43% no grupo de primoinfectados. Esse aumento comparado com a literatura pode ser explicado devido os pacientes primoinfectados serem indivíduos provenientes de diversas localidades, os quais procuravam atendimento no Instituto Evandro Chagas e relatavam que esse era o primeiro episódio da doença. O grupo controle foi constituído por indivíduos residentes em uma mesma área endêmica para malária causada por *P. vivax* (Ilha do Cotijuba, Belém, Pará). Essa diferença de origem e seleção dos indivíduos participantes do estudo pode ter contribuído para a maior a freqüência do alelo *MBL*D* no grupo infectado, visto que não são procedentes da mesma região e podem apresentar diferenças genéticas.

O alelo *MBL* C* mostrou-se ausente somente no grupo de infectados. A ausência deste alelo também foi verificada em outro estudo realizado com indivíduos da população de Belém, Pará (Vallinoto *et al.*, 2006).

Os indivíduos infectados apresentaram maior frequência do genótipo heterozigoto *A/O* (58,03%), enquanto as frequências dos genótipos homozigotos selvagem (*A/A*) e mutante (*O/O*), foram 35,80% e 6,17%, respectivamente. No grupo de indivíduos não infectados o alelo selvagem em homozigose (*A/A*) ocorreu em maior frequência. Entre os indivíduos não infectados com ou sem relato de episódio prévio de malária, a frequência desse genótipo foi 54,61% e 56,12%, respectivamente. Bellamy e colaboradores (1998) analisaram a frequência dos genótipos da MBL em indivíduos de Gambia infectados por *P. falciparum* e não observaram diferença entre indivíduos infectados e não infectados. Em estudo realizado também na África, mas em Gabão, Luty e colaboradores (1998) analisaram o polimorfismo e o nível plasmático da MBL em indivíduos com malária causada por *P. falciparum* e observaram que 38,0% apresentavam pelo menos uma mutação. Entretanto, nesse estudo não foi realizada a comparação com indivíduos não infectados.

No grupo infectado, observamos que 64,2% dos indivíduos apresentaram pelo menos uma mutação. Portanto, a frequência das formas variantes foi maior que a observada entre indivíduos africanos infectados por *P. falciparum*. Deve ser ressaltado que a frequência de variantes alélicas encontrada no grupo infectado por *P. vivax* também foi maior que a descrita por Vallinoto e colaboradores (2006), que analisaram amostras de indivíduos de

Belém, Pará, infectados e não infectados pelo HIV-1, e observaram que as freqüências de indivíduos que apresentaram pelo menos uma mutação variaram de 48,3% a 50,5%.

Em 2003, outro estudo também investigou a freqüência das variantes alélicas em 551 crianças africanas de Gana, e não encontrou diferenças entre infectados e não infectados por *P. falciparum*. Nesse estudo a freqüência de mutação encontrada no grupo infectado foi 53,6%, sendo o alelo *MBL*C* o mais freqüente. Os nossos resultados mostraram maior freqüência das variantes alélicas e houve diferença entre infectado e não infectado, devido a ocorrência do genótipo *A/D* entre os infectados. Para analisar essas diferenças devemos considerar que os indivíduos incluídos no nosso estudo são primoinfectados por *P. vivax* e com diferenças quanto a miscigenação da população. Além disso, os primoinfectados foram selecionados dentre os infectados por *P. vivax* que relatavam terem tido episódio prévio de malária. Esta seleção pode ter contribuído para essa diferença. Ainda não foi avaliado se indivíduos infectados por *P. vivax*, seja a primeira infecção ou não, apresentam freqüências alélicas e genotípicas diferentes dos não infectados.

Após observarmos esta diferença entre os grupos primoinfectado e não infectado, analisamos se as variantes alélicas encontradas no grupo de indivíduos infectados estariam associadas com a maior intensidade dos sinais e sintomas. Em relação aos sinais não foi possível correlacionar a intensidade com os alelos e genótipos, visto que somente um paciente apresentou sinais classificados, de acordo com os escores, como intenso, e a comparação entre

sinais leve e moderado não apresentou diferença. Em relação aos sintomas, observamos que houve diferença entre os indivíduos que apresentaram sintomatologia leve e intensa, sendo que o grupo leve apresentou maior frequência do alelo *MBL*^A* e o grupo intenso maior frequência do alelo *MBL*^B* (mutação no códon 54). Este polimorfismo pode reduzir os níveis séricos de MBL e favorecer a manifestação de sintomas mais graves, visto que na malária a sintomatologia está relacionada tanto a densidade parasitária, quanto a resposta imune decorrente da imunidade específica, portanto, a maior exposição favorece a fisiopatologia da malária. Este é o primeiro relato da associação de polimorfismos no gene MBL com sintomas da malária causada por *P. vivax*.

Luty e colaboradores (1998) compararam indivíduos com malária severa e moderada causada por *P. falciparum* e observaram que cerca de 35% dos indivíduos com malária severa apresentavam níveis de MBL menor que 200µg/mL, enquanto no grupo com malária moderada apenas 19% apresentavam a concentração de MBL nesta faixa, na fase aguda da doença. Entre os indivíduos com MBL abaixo dessa concentração 85% apresentavam pelo menos uma mutação no gene que codifica esta proteína. Os indivíduos com malária severa apresentaram maior frequência dos polimorfismos nos códon 54 (*MBL*^B*) e 57 (*MBL*^C*), quando comparados com os indivíduos com malária moderada (Luty *et al.*, 1998). Portanto, os nossos resultados estão de acordo com Luty e colaboradores (1998) que mostraram associação dos alelos variantes com a malária grave e baixos níveis séricos de MBL, considerando a análise relacionada

à genotipagem, visto que os níveis séricos de MBL não foram analisados. Na literatura, ainda não há relatos acerca dos níveis de MBL em indivíduos infectados por *P. vivax*.

Em 2003, Garred e colaboradores analisaram o polimorfismo do gene MBL em indivíduos infectados por *P. falciparum* com diferentes manifestações clínicas. Foram comparados três grupos, um grupo com malária cerebral, um com anemia severa e outro com malária não complicada. A distribuição dos genótipos foi semelhante nos três grupos, indicando que não houve associação de um determinado genótipo com a maior susceptibilidade ao *P. falciparum*. Os grupos apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, os nossos resultados não estão de acordo com Garred e colaboradores (2003). Esta diferença pode ser atribuída às diferenças na fisiopatologia da malária causada por espécies diferentes de *Plasmodium*.

A mutação no códon 54 (alelo *MBL*B*) altera os níveis séricos de MBL, pois esses estariam mais baixos e causariam um defeito na opsonização e na fagocitose do sistema imune do hospedeiro (Lee *et al.*, 2004). Luty e colaboradores (1998) ao pesquisarem os níveis de MBL e o polimorfismo do gene em indivíduos com malária causada por *P. falciparum*, verificaram que os pacientes que apresentavam esta mesma mutação apresentavam malária severa. Os nossos resultados também mostraram claramente que o genótipo em heterozigose (*A/B*) foi mais freqüente entre os indivíduos que apresentaram sintomatologia intensa. Esse genótipo também foi associado a maior densidade parasitária entre os indivíduos infectados.

Analisamos se os polimorfismos encontrados estavam relacionados com o aumento da densidade parasitária e observamos que os indivíduos portadores do alelo selvagem e os portadores de alelos com mutações apresentaram níveis de parasitemia semelhante. Porém, os indivíduos com mutação no códon 54 (genótipo *A/B*) apresentaram parasitemias mais altas que os indivíduos com mutação no códon 52 (genótipo *A/D*). Com base nesse resultado, podemos inferir que as variantes podem alterar os níveis de MBL com diferente intensidade, dependendo da mutação, e, conseqüentemente, a sua participação no controle da parasitemia.

Em relação à mutação no códon 52, os nossos resultados devem ser analisados com base nas observações que a concentração da proteína MBL em indivíduos portadores desta mutação (*MBL**D**) é semelhante à concentração observada na ausência de qualquer mutação (genótipo selvagem), e que mesmo com esta mutação a proteína é produzida mantendo os arranjos dos oligômeros estáveis, semelhantes aos arranjos da proteína normal, conferindo uma ligação eficaz e capaz de ativar o sistema complemento (Garred *et al.*, 2003). Assim, devemos considerar que a maior freqüência de genótipos *A/D* encontrada no grupo infectado, pode representar um aspecto favorável para os mecanismos da imunidade inata do hospedeiro. Os nossos resultados relacionados à densidade parasitária confirmam esta proposição, visto que o genótipo *A/D* foi relacionado a menor parasitemia e o genótipo *A/B* a parasitemias mais altas.

Garred e colaboradores (2003) mostraram que a MBL se liga ao *P. falciparum* e observaram que as variantes em homozigose estavam associadas

ao aumento na densidade parasitária. No nosso estudo foi possível verificar diferenças entre variantes em heterozigose. Em relação ao *P. vivax*, até o momento não existe nenhum relato na literatura.

A consequência biológica da presença dos heterozigotos *A/B* e *A/D* ainda não está muito clara, todavia, já foi demonstrado que indivíduos portadores desses genótipos são capazes de produzir níveis normais da MBL, devido a expressão do alelo *MBL *A*, associado a presença de haplótipos normais da região promotora do gene (Jülicher *et al.*, 2000). Porém, um estudo recente demonstrou que a concentração sérica de MBL foi maior em pacientes portadores de mutação *A/D*, sugerindo que o efeito deste alelo possa ser diferente, comparado com os genótipos heterozigotos para as variantes *MBL *B* e *MBL *C*. Portanto, observou-se que esses genótipos estavam associados ao maior risco de susceptibilidade à infecção, devido os baixos níveis de MBL circulante no sangue, enquanto o *A/D* estava associado ao menor risco (Garred *et al.*, 1997a; 2003; Wallis, 2002). Os resultados obtidos no nosso estudo estão de acordo com a análise que propõe que a variante alélica *MBL *B* altera o nível sérico da MBL, podendo contribuir para maior susceptibilidade à malária, visto que o genótipo *A/B* ocorreu em associação com a sintomatologia intensa e maior densidade parasitária. Também está de acordo com a análise que propõe que a variante alélica *MBL *D* pouco altera os níveis de MBL, visto que o genótipo *A/D* ocorreu em associação com menor densidade parasitária. Porém, não verificamos associação com sintomatologia leve.

No grupo de indivíduos não infectados, analisamos se os genótipos estavam associados com o número de episódios e observamos que o grupo que teve um episódio apresentou freqüências alélicas diferentes do grupo que teve 4 ou mais episódios. A diferença mais evidente foi observada na freqüência do alelo *MBL*D*, no grupo que relatou ter tido mais episódio de malária. Deve ser destacado que esses indivíduos não estavam infectados, portanto não foi possível verificar se nesse grupo esta mutação pode estar associada ao fato de ter mais episódios, mas com a parasitemia mantida em níveis mais baixos.

Na análise com genótipos agrupados observamos que a distribuição do grupo que nunca teve malária foi diferente da distribuição do grupo que teve um episódio. As mutações em homozigose e heterozigose ocorrem com maior freqüência no grupo que nunca teve malária. Nesse caso, as mutações não estão associadas à maior suscetibilidade. O grupo que teve um episódio também foi diferente do grupo que teve dois episódios, sendo que o grupo que teve um episódio apresentou maior freqüência das mutações em heterozigose e no grupo mais exposto às mutações em homozigose foram mais freqüentes. O grupo que teve dois episódios também foi diferente do grupo que teve 4 ou mais episódios. Na análise com genótipos não agrupados apenas a diferença entre o grupo que teve um episódio e o que teve dois episódios foi confirmada, sendo que o grupo que teve dois episódios apresentou mais mutações em homozigose que o grupo que teve um episódio. Se estas mutações interferem nos níveis séricos de MBL na malária causada por *P. vivax* ainda é uma questão para ser esclarecida.

O tempo decorrido após o último episódio foi outro parâmetro analisado para verificar se as mutações poderiam favorecer exposições mais freqüentes à malária. Nesta análise, observamos que os indivíduos que tiveram malária a menos de um mês apresentaram diferenças alélicas, quando comparado com os que tiveram no período entre 1 e 6 meses e 7 e 12 meses. Entretanto, esta associação não foi verificada a medida que aumentava o tempo decorrido após o último episódio. Também observamos que os indivíduos que tiveram malária no período entre 7 e 12 meses apresentaram distribuição de alelos diferentes, quando comparado com os que tiveram no período entre 13 e 24 e há mais de 24 meses. Neste caso, os indivíduos que tiveram malária mais recentemente apresentaram o alelo *MBL*D*.

Esta observação deve ser melhor analisada, visto que ainda não foi possível esclarecer se a presença desse alelo pode apenas controlar a parasitemia, mas não prevenir a infecção. Assim, outras análises serão necessárias para esclarecer se a presença do alelo *MBL*D* pouco altera os níveis séricos, mantendo o papel protetor da MBL ou se tem participação na opsonização que poderia favorecer, tanto à infecção como a manutenção de baixas parasitemias, estabelecendo, assim, uma relação parasito/hospedeiro mais estável.

Na análise com genótipos agrupados, os resultados mostraram que os grupos foram muito diversos em relação as freqüência genóticas e o tempo decorrido após o episódio de malária. Na análise com genótipos não agrupados esta observação foi confirmada.

Este estudo é a primeira análise das freqüências dos polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2* em indivíduos infectados por *P. vivax*, bem como avaliação do impacto desses polimorfismos na intensidade dos sintomas, na densidade parasitária e na cooperação para prevenir e/ou controlar a infecção em indivíduos expostos naturalmente à malária.

5. CONCLUSÕES

1. No grupo de indivíduos que apresentaram o primeiro episódio de malária por *P. vivax* as freqüências das formas alélicas *MBL**A, *MBL**B, *MBL**C e *MBL**D foram 64,20%, 19,75%, 0,0% e 16,05%, respectivamente.
2. As formas alélicas *MBL**B e *MBL**D ocorreram com freqüência semelhante no grupo primoinfectado.
3. A comparação dos grupos infectado e controle, com exposição prévia à malária ou não, revelou que houve diferença na distribuição das freqüências alélicas. Esta diferença foi devido a maior freqüência do alelo *MBL**B e *MBL**D no grupo infectado.
4. A comparação dos grupos infectado e controle revelou que houve diferença na distribuição das freqüências genótípicas, agrupadas ou não agrupadas. No grupo infectado o genótipo A/O foi o mais freqüente e no grupo não infectado foi o genótipo A/A. No grupo infectado o genótipo A/D foi mais freqüente que no grupo controle.
5. A presença de variantes alélicas não interferiu com a intensidade dos sinais clínicos observados durante o primeiro episódio de malária.
6. No grupo infectado, a forma alélica *MBL**A ocorreu em associação com a sintomatologia leve e a *MBL**B com a sintomatologia intensa.
7. O genótipo A/B foi cerca de três vezes mais freqüente no grupo com sintomatologia intensa que no grupo com sintomatologia leve. A densidade parasitária em indivíduos portadores desse genótipo foi maior que nos indivíduos que apresentaram o genótipo A/D.

8. A comparação das freqüências alélicas no grupo de indivíduos não infectados mostrou que houve diferença entre os indivíduos que tiveram um e os que tiveram 4 ou mais episódios. Esta diferença foi devido à maior freqüência da variante *MBL* D* no grupo mais exposto à malária.
9. O perfil de distribuição das freqüências genóticas variou entre indivíduos não infectados, distribuídos nos grupos que nunca teve malária, teve um, dois ou 4 ou mais episódios de malária, sendo que a freqüência do genótipo *A/B* contribuiu para esta variação.
10. O perfil de distribuição das freqüências alélicas variou com o tempo decorrido após o último episódio e as freqüências das formas alélicas *MBL* B* e *MBL* D* contribuíram para esta variação.
11. O perfil de distribuição das freqüências genóticas variou com o tempo decorrido após o último episódio e as freqüências dos genótipos *A/A* e *D/D* contribuíram para esta variação.
12. O genótipo selvagem em homozigose (*A/A*) foi mais freqüente em indivíduos que estavam há mais tempo sem adquirir malária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. 5^a Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.
- ABUIN, G., W. COLLI, W. DE SOUZA, AND M. J. M. ALVES. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. **Molecular Biochemistry Parasitology** **35**: 229-237, 1989.
- ADACHI, K. *et al.* Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. **Journal of Immunology**, **167**: 5928-34, 2001.
- AITTONIEMI, J., MIETTINEM, A., LAIPPAL, P., ISOLAURI, E., VIKARI, J., RUUSKA, T. & SOPPI, E. Age-dependent variation in the serum concentration of manna-binding protein. **Acta Paediatrica**, **85**: 906 - 909, 1996.
- ALLISON, A.C., EUGUI, E.M. The role of cell-mediated immune responses in resistance to malária, with special reference to oxidant stress. **Annual Review of Immunology**, **1**: 361 - 392, 1983.
- AMOROSO, A., BERINO, M., BONIOTTO, M., CROVELL, S., PALOMBA, E., SCARLATTI, G., SERRA, C., TOVO, P.-A., VATTA, S. Polymorphism at códon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. **AIDS**, **13**: 863 - 864, 1999.
- ANDERS, E.EM, HARTLEY, C.A., READING, P.C., EZEKOWITZ, R.A.B. Complement-dependent neutralization of influenza virus by a serum mannose-binding lectin. **Journal of Genetic and Virology**, **75**: 615 - 622, 1994.

- ANDREWS, N. W., K.-S. HONG, E. S. ROBBINS, AND V. NUSSENZWEIG. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, **64**: 474-484, 1987.
- AYRES, M., AYRES, M. Jr., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BIOESTAT: Aplicação estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Pará, Brasil, **Sociedade Civil Mamirauá MCT-CNPq**, 193p, 2003.
- BAX, W.A., CLUYSENAER, O.J.J., BARTELINK, A.K.M., AERTS, P.C., EZEKOWITZ, R.A.B., VAN DIJK, H. Association of familial deficiency of mannose-binding lectin and meningococcal disease. **Lancet**, **354**: 1094-1095, 1999.
- BECKER, K., TILLEY, L., VENNERSTROM, J.L., ROBERTS, D., ROGERSON, S., GINSBURG, H. Oxidative stress in malária parasite-infected erythrocytes: host-parasite interaction. **International Journal of Parasitology**, **34**: 163-189, 2004.
- BIRON, C.A., NGUYEN, K.B., PIEN, G.C., COUSENS, L.P., SALAZAR-MATHER, T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annual Review of Immunology**, **17**: 18-220, 1999.
- BOLAD, A., BERZINS, K. Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization. **Scandinavian Journal of Immunology**, **52**: 233-239, 2000.

- BOSCHETTI, M. A., M. W. PIRAS, D. HENRIQUEZ, AND R. PIRAS. The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. **Molecular Biochemical Parasitology**, **24**:175-184, 1987.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., ATTANATH, P., SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; DRUILHE, P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, **172**: 1633-1641, 1990.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Journal of Experimental Medicine**, **182**: 409-418, 1995.
- BRUCE-CHWATT, L.J. Historical outline. In: **Essential Malariology**. London: William Heinemann, 1980. p.1-9.
- BRUNA-ROMERO, O., SCHMIEG, J., DEL VAL, M., BUSCHLE, M., TSUJI, M. The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malária. **Journal of Immunology**, **170**: 3195-3203, 2001.
- CLARK, I.A. Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. **Parasitology Today**, **3**: 300-305, 1987.
- CLARK, I.A. & COWDEN, W.B. The pathophysiology of falciparum malaria. **Pharmacological Therapy**, **99**: 221-260, 2003.

- CLARK, I.A., CAHUDHRI, G., COWDEN, W.B. Some roles of free radicals in malaria. **Free Radical Biology & Medicine**, **6**: 315-321, 1989.
- COHEN, S., MCGREGOR, I.A., CARRINGTON, S. Gama globulin and acquired immunity to human malária. **Nature**, **192**: 733-737, 1961.
- COLUCCHI, F., CALIGIURI, M., DI, S.J. What does it take to make a natural killer? **Nature Reviews Immunology**, **3**: 413- 425, 2003.
- COOPER, M.A., FEHNIGER, T.A., FUCHS, A., COLONNA, M., CALIGIURI, M.A. NK cell and DC interactions. **Trends in Immunology**, **25**: 47-52, 2004.
- CROSDALE, D.J., OLLIER, W.E.R., THOMSON, W., DYER, P.A., JENSENIUS, J., JOHNSON, R.W.G. & POULTON, K.V. Mannose-binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. **European Journal of Immunogenetics**, **27**: 111-117, 2000.
- CUNHA, M.G., RODRIGUES, M.M., SOARES, I.S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, **20**: 385-396, 2001.
- DAHL, M.R., THIEL, S. WILLIS, A.C., VORUP-JENSEN, T., CHRISTENSEN, T., PETERSEN, S.V., JENSENIUS, J.C. Mannan-binding lectin associated serine protease 3 (MASP-3) - a new component of the lectin pathway. Of complement activation. **Immunopharmacology**, **49**: 79, 2000.

- DALY, T.M. & LONG, C.A. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelli yoelli* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. **Infection and Immunity**, **61**: 2462-2467, 1993.
- DOMMET, R.M., KLEIN, N., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, **68**: 193-209, 2006.
- DROGARI-APIRANTHITOU, M., FIJEN, C.A.P., THIEL, S., PLATONOV, A., JENSEN, L., DANKERT, J., KUIJPER, E.J. The effect of mannan-binding lectin on opsonophagocytosis of *Neisseria meningitidis*. **Immunopharmacology**, **38**: 93-99, 1997.
- EDOZIEN, J.C., GILLES, H.M., UDEOZO, I.O.K. Adult and cord-blood gamma-globulin and immunity to malária in Nigerians. **Lancet**, **2**: 951-955, 1962.
- ENDO, M., OHSAWA, J., OHI, H., FUJITA, T., MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Mannose-binding lectin contributes to glomerulonephritis induced by hepatitis C virus infection. **Nephron**, **87**: 347-375, 2001.
- ESPINOSA, A.M., SIERRA, A. Y., BARRERO, C.A., CEPEDA, L.A. CANTOR, E.N., LOMBO, T.B., GUZMÁN, F., AVILA, S.J., PATARROYO, M.A. Expression, Polymorphism analysis, Reticulocyte binding and Serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP1 protein recombinant fragments. **Vaccine**, **21**: 1033-1043, 2003.

- EZEKOWITZ, R.A.B., KUHLMAN, M., GROOPMAN, J.E., BYRN, R.A. A human serum mannose-binding proteins inhibits *in vitro* infection by the human immunodeficiency virus. **Journal of Experimental Medicine**, **169**: 185-196, 1989.
- FUJITA, T., MATSUSHITA, M., ENDO, Y. The lectin complement pathway – its role in innate immunity and evolution. **Immunological Reviews**, **198**: 185-202, 2004.
- FUNASA - Fundação Nacional da Saúde/Ministério da Saúde. Gerência Técnica de Malária. Avaliação epidemiológica da malária no Brasil, 2002-2003.
- GABIUS, H.J., ANDRE, S., KALTNER, H., SIEBERT, H.C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1572**: 165-177, 2002.
- GARRAUD, O., MAHANTY, S., PERRAUT, R. Malária-specific antibody subclass in immune individuals: a key source of information for vaccine design. **Trends in Immunology**, **24**: 30-35, 2003.
- GARRED, P., MADSEN, H.O., KURTZHALS, J.A.L., *et al.* Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of manna-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. **European Journal of Immunogenetic**, **19** : 401-412, 1992
- GARRED, P., BRYGGE, K., SORENSE, C.H., MADSEN, H.O., THIEL, S., SVEJGAARD, A. Mannan-binding protein - levels in plasma and upper-air-ways

secretions and frequency of genotypes in children with recurrence of otitis media. **Clinical and Experimental Immunology**, **94**: 99-104, 1993.

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(a).

GARRED, P., RICHTER, C., ANDERSON, 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, 1997 (b).

GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN, H.O., KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency - revisited. **Molecular Immunology**, **40** : 73-84, 2003.

GHIRAN, I., BARBASHOV, S.F., KLICKSTEIN, L.B., TAS, S.W., JENSENIUS, J.C., NICHOLSON-WELLER, A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **Journal of Experimental Medicine**, **192**: 1797-1807, 2000.

GRENNWOOD, M.B. & FANKULE, Y.M. The tropical splenomegaly syndrome: a review of its pathogenesis. In: **The role of spleen in the immunology of parasitic diseases**. Tropical Diseases Research Series 1, Schwabe, Basel, 229-244, 1979.

- GOOD, M.F., XU, H., WYKES, M., ENGWERDA, C.R. Development and regulation of cell-mediated immune response to the blood stage of malaria: implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology, 23:** 69-99, 2004.
- GOOD, M.F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. **Trends in Parasitology, 21:** 29-34, 2005.
- GUPTA, S., SNOW, R.W., DONNELLY, C.A., MARSH, K., NEWBOLD, C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. **Nature Medicine, 5:** 340-343, 1999.
- HANSEN, S. & HOLMSKOV, U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. **Immunobiology, 199:** 165-189, 1998.
- HANSEN, T.K., THIEL, S., DALL, R., ROSENFALCK, A.M., TRAINER, P., FLYVBJERG, A., JORGENSEN, J.O.L. & CHRISTIANSEN, J.S. GH strongly affects serum concentrations of mannan-binding lectin: evidence for a new IGF-independent immunomodulatory effect of GH. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86:** 5383-5388, 2001.
- HARTSHORN, K.L., SASTRY, K., WHITE, M.R., ANDERS, E.M., SUPER, M., EZEKOWITZ, R.A. & TAUBER, A.I. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. **The Journal of Clinical Investigations, 91:** 1414-1420, 1993.

- HIBBERD, M.L., SUMIYA, M., SUMMERFIELD, J.A., BOOY, R., LEVIN, M. The Meningococcal Research Group, Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. **Lancet**, **353**: 1049-1053, 1999.
- HUNDT, M., HEIKEN, D. & SCHMIDT, R.E. Association of low mannose-binding lectin serum concentrations and bacterial pneumonia in HIV infections. **AIDS**, **14**: 1853-1854, 2000.
- JACK, D.L., DODDS, A.W., ANWAR, N., ISON, C.A., LAW, A., FROSCH, M., TURNER, M.W., KLEIN, N.J. Activation of complement by mannose-binding lectin on isogenic mutants of *Neisseria meningitidis* serogroup B **Journal of Immunology**, **160**: 1346- 1353, 1998.
- JACK, D.L., JARVIS, G.A., BOOTH, C.L., TURNER, M.W., KLEIN, N.J. Mannose-binding lectin accelerates complement activation and increases serum killing of *Neisseria meningitidis* serogroup C. **The Journal of Infectious Diseases**, **184**: 836-845, 2001 (a).
- 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 Infection Diseases**, **184**:1152-1162, 2001 (b).
- JACK, D.L., KLEIN, N.J., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunology Reviews**, **180**: 86-99, 2001 (c).

KAHN, S., T. G. COLBERT, J. C. WALLACE, N. A. HOAGLAND, AND H. EISEN.

The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**, **88**:4481-4485, 1991.

KANH, J.S., WLEKLINSKI, M., EZEKOWITZ, A.B., CODER, D., ARUFO, A. The major surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* amastigotas are ligands of human serum mannose-binding protein. **Infection and Immunity**, **64**: 2649 - 2656, 1996.

KARUNAWEERA, N.D; WIJESEKERA, S.K; WANASEKERA, D.; MENDIS, K.N; CARTER, R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends in Parasitology**, **19**: 188-193, 2003.

KASE, T., SUZUKI, Y., KAWAI, T., SAKAMOTO, T., OHTANI, K., EDA, S., MAEDA, A., OKUNO, Y., KURIMURA, T. & WAKAMIYA, N. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. **Immunology**, **97**: 385-392, 1999.

KAWASAKI, T. Structure and biology of mannan-binding protein, MBP, na important component of innate immunity, **Biochimica et Biophysica Acta**, **1473**: 186 - 195, 1999.

KILPATRICK, D.C. Mannan-binding protein in sera positive for rheumatoid factor. **British Journal of Rheumatology**, **36**: 207 - 209, 1997.

KILPATRICK, D.C. Mystery plasma lectin was a contaminant. **Transfusion Medicine**, **8**: 239, 1998.

KILPATRICK, D.C..Mannan-binding lectin: clinical significance and applications.

Biochimica et Biophysica Acta, 1572: 401-413, 2002.

KLABUNDE, J., UHLEMANN, A.C., TEBO, A.E., KIMMEL, J.,SCHWARZ, P.G.,

KREMNSNER, P.G. & KUN, J.F.J. Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. **Parasitology Research, 88:** 113-117, 2002.

KLICKSTEIN, L.B., BARBASHOV, S.F., LIU, T., JACK, R.M., NICHOLSON-

WELLER, A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. **Immunity, 7:** 345-355, 1997.

KORBEL, S.D., FINNEY, O.C., RILEY, E.M. Natural killer cells and innate immunity

to protozoan pathogens. **International Journal for Parasitology, 34:** 1517 - 1528, 2004.

KOOPEL, R. & SOLOMON, B. IgM detection via selective recognition by mannose-

binding protein. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 49:** 641 - 647, 2001.

KRUSE, C., ROSGAARD, A., STTEFENSEN, R., VARMING, K., JENSENIUS, J.C.

& CHRISTIANSEN, O.B. Low serum level of mannan-binding lectin is a determinant fo pregnancy outcome in women with recurrent spontaneous abortion. **American Journal of Obstetrics and Ginecology, 187:** 1313-1320, 2002.

- KUMAR, S., COLLINS, W., EGAN, A., YADAVA, A., GARRAD, O., BACKMAN, M.J., PATINO, J.A.G., DIGGIS, C., KASLOW, D.C. Immunogeneticity and efficacy in aotus monkey of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on 19-kilodanton C terminus of merozoite surface protein 1. **Infection and Immunity**, **68**: 2215-2223, 2000.
- KUMARATILAKE, L.M., FERRANTE, A., JAEGER, T., MORRIS-JONES, S.D. The role of complement, antibody, and tumor necrosis factor alpha in the killing of *Plasmodium falciparum* by the monocytic cell line THP-1. **Infection and Immunity**, **65**: 5342-5345, 1997.
- LANGHORNE, J. *et al.* Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. **Immunology Reviews**, **201**: 35-47, 2004.
- LEÃO, N.Q. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. In: Malária, 1997. p. 645-669.
- LUTY, A.J.F. & KREMSNER, P.G. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, **178**: 1221-1224, 1998.
- MAAS, J., DE RODA HUSMAN, A.-M., BROUWER, M., KROL, A., COUTINHO, R., KEET, I., VAN LEEUWEN, R., SCHUITEMAKER, H. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. **AIDS**, **12**: 2275-2280, 1998.

- MADSEN, H.O., GARRED, P., JOERGEN, A.L., KURTZHALS, J.A., LAMM, L.U., RYDER, L.P., THIEL, S., SVEJGAARD, A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, **40**: 37-44, 1994.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J.A.L., LAMM, L.U., RYDER, L.P., SVEJGAARD, A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **Journal of Immunology**, **155**: 3013-3020, 1995.
- MALAGUARNERA, L. & MUSUMECI, S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malária. The Lancet. **Infectious Diseases**, **2**: 472-478, 2002.
- MALHOTRA, R., THIEL, S., REID, K.B.M., SIM, R.B. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. **Journal of Experimental Medicine**, **172**: 955-959, 1990.
- MALHOTA, R., HAURUN, J.S., THIEL, S., SIM, R.B. Binding of human collectins (SP-A and MBP) to influenza virus. **Biochemistry Journal**, **304**: 455-461, 1994.
- MATSUSHITA, M. & FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C2s-like protease. **Journal of Experimental Medicine**, **176**: 1497-1502, 1992.
- MATSUSHITA, M., HIJIKATA, M., OHTA, Y., IWATA, K., MATSUMOTO, M., NAKAO, K., KANAI, K., YOSHIDA, N., BABA, K., MISHIRO, S. Hepatitis C virus

- infection and mutations of mannose-binding lectin gene *MBL*. **Archives of Virology**, **143**: 645-65, 1998.
- McGILVRAY, I.D., SERGHIDES, L., KAPUS, A., ROTSTEIN, O.D., KAIN, K.C. Non-opsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasited erythrocytes : a role for CD36 in malarial clearance. **Blood**, **96**: 3231-3240, 2000.
- McGREGOR, I. A. CARRINGTON, S.; COHEN, S. Treatment of east African *P. falciparum* malaria with west African human gamma-globulin. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, **50**: 170-175, 1963.
- MOORE, S;A., SURGEY, E.G.E., CADWGAN, A.M. Malaria vaccines: where are we and where are we going? **Lancet Infectious Diseases**, **2**: 737-743, 2002.
- MOORTHY, V.S., GOOD, M.F. HILL, A.V.S. Malaria vaccine developments. **The Lancet**, **363**: 150-156, 2004.
- NAITO, H., IKEDA, A., HASEGAWA, K., OKA, S., UEMURA, K., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. Characterization of human serum mannan-binding protein promoter. **Journal of Biochemistry**, **126**: 1004-1012, 1999.
- NETH, O., JACK, D.L., DODDS, A.W. , HOLZEL, H. , KLEIN, N.J. , TURNER, M.W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infection and Immunity**, **68**: 688-693, 2000.
- NEVENS, J.R., MALLIA, A.K., WENDT, M.W. & SMITH, P.K. Affinity chromatographic purifications of immunoglobulin M antibodies utilizing

immobilized mannan-binding protein. **Journal of Chromatography**, **597**: 247-256, 1992.

NEVES, D.V. **Parasitologia Humana**. 10^a ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.428.

NIELSEN, S.L., ANDERSEN, P.L., KOCH, C., JENSENIUS, J.C. & THIEL, S. The level of serum opsonina, mannan-binding protein HIV-1 antibody-positive patients. **Clinical and Experimental Immunology**, **100**: 219 - 222, 1995.

NINA, J.C. **Prevalência de portadores assintomáticos de *Plasmodium vivax* e avaliação da resposta imune humoral em indivíduos que residem em área de transmissão estável de malária**. Dissertação de Mestrado. Belém, UFPA, 2004.108p.

OCANA-MORGNER, C., MOTA, M.M., RODRIGUEZ, A. Malária blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, **197(2)**: 143-151, 2003.

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**: 781-795, 2001.

PASTINI, T., LIITSOLA, K., NIINI, P., SALMINEN, M., SYVÄNEN, A.-C. Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type-1 infection in the Finnish population. **AIDS Research Human Retroviruses**, **14**: 695-698, 1998.

- PERRY, J.A., RUSH, A., WILSON, R.J., OLVER, C.S., AVERY, A.C. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. **Journal of Immunology**, **172**: 475-482, 2004.
- PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSENIUS. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, **38**: 133-149, 2001.
- PHILIPS, R.S. Current status of malaria and potential for control. **Clinical Microbiology Review**, **14**: 208-226, 2001.
- PICHYANGKUL, S. *et al.* Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **Journal of Immunology**, **172**: 4926-4933, 2004.
- PLEBANSKI, M., HILL, A.S.A. The immunology of malaria infection. **Current Opinion in Immunology**, **12**: 437-441, 2000.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.
- RICHARDSON, V.F., LARCHER, V.F., PRICE, J.F. A common congenital immunodeficiency predisposing to infection and atopy in infancy. **Archives of Diseases in Children**, **58**: 799-802, 1983.
- ROBINSON, N.C., PHILLIPS, B., WINCHESTER. Affinity chromatography of human liver α -D-mannosidase, **FEBS Letters**, **53**: 110-112, 1975

- RODRIGUES, M.M., BOSCARDIN, S.B., VASCONCELOS, J.R., HIYANE, M.I., SALAY, G., SOARES, I.S. Importance of CD8 T cell mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for development of effective vaccines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências, 75:** 443-468, 2003.
- SABCHAREON, A., BURNOUF, T., OUTTARA, D., ATTANATH, P., BOUROUTAYOUN, H., CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHONGSUPHJASIDDHI, T., DRUILLE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *Falciparum* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 45:** 297-308, 1991.
- SACHS, J., MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature, 415:** 680-685, 2002.
- SASAKI, K., TSUTSUMI, A., WAKAMUYA, N., OHTANI, K., SUZUKI, Y., WATANABE, Y., NAKAYAMA, N., KOIKE, T. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology, 35:** 960-965, 2000.
- SASTRY, K., HERMAN, G.A., DAY, L., DEUGNAN, E., BRUNS, G., MORTON, C.C., EZEKOWITZ, R.A. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to human pulmonary surfactante gene and localization to chromosome 10. **Journal of Experimental Medicine, 170:** 1175-1198, 1989.

- SENALDI, G., DAVIES, E.T., PEAKMAN, M., VERGANI, D., LU, J. & REID, K.B.M. Frequency of mannose-binding protein deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, **38**: 1713-1714, 1995.
- SMITH, G.T., AVY, K., SERGHIDES, L., MCALLISTER, C.D., KAIN, K.C. Innate immunity to malaria caused by *Plasmodium*. **Medical and Clinical Experiments**, **25**: 262-272, 2002.
- SOUZA, J.M., D'ALMEIDA COUTO, A.A.R., SILVA, E.B., ABDON, N.P., SILVA, R.S.U. Malaria. In: **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. LEÃO, R.N.Q. (Coord.).Belém: CEJUP, 1997. p. 645-669.
- STEFFENSEN, R. THIEL, S., VARMING, K., JERSILD, C. & JENSENIUS, J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Journal of Immunological Methods**, **241**: 33-42, 2000.
- STEVENSON, M.M. & RILEY, E.M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews of Immunology**, **4**: 169-80, 2004.
- STOVER, C.M., THIEL, S., THELEN, M., LYNCH, N.J., VORUP-JENSEN, T., JENSENIUS, J.C., SCHWAEBLE, W. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **Journal of Immunology**, **162**: 3481-3490, 1999.

- STRUICK, S.S. & RILEY, E.M. Does malaria suffer from lack of memory?
Immunology Reviews, **201**: 268-290, 2004.
- 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 opsonisation. **Lancet**, **2**: 1236-1239, 1989.
- SWANSON, A., EZEKOWITZ, R.A., LEE, A., HUO, C.-C. Human mannose-binding protein inhibits infection of HeLa cells by *Chlamydia trachomatis*, **Infection and Immunity**, **66**: 1607-1612, 1998.
- TADEI, W.P., THATCHER, B.D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **42**: 87-94, 2000.
- TAKAHASHI, M., ENDO, Y., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. **Institute of Immunology**, **11**: 859-863, 1999.
- TAYLOR, M.E., BRICKELL, P.M., CRAIG, R.K., SUMMERFIELD, J.A. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **Biochemical Journal**, **262**: 763-771, 1989.

- TEBO, A.E.; KREMSNER, P.G.; LUTY, A.J.F. *Plasmodium falciparum*: A major Role for IgG3 in Antibody-Dependent Monocyte-Mediated Cellular Inhibition of Parasite Growth *in vitro*. **Experimental Parasitology, 98**: 20-28, 2001.
- TENNER, A.J., ROBINSON, S.L., EZEKOWITZ, R.A.B. Mannose-binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 m(r) component of the C1q receptor. **Immunity, 3**: 485-493, 1995.
- TERAI, I. & KOBAYASHI, K. Perinatal changes in serum mannose-binding protein (MBP) levels. **Immunology Letters, 38**: 185-187, 1993.
- TERAI, I., KOBAYASHI, K., FUJITA, T. & HAGIWARA, K. Human serum mannose-binding protein: development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and determination of levels in serum from 1085 normal Japanese and in some body fluids. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology, 50**: 111-119, 1993.
- THIEL, S., HOLMSKOV, U., HVIID, L., LAURSEN, S.B., JENSENIUS, J.C. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. **Clinical and Experimental of Immunology, 90**: 31-35, 1992.
- 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.M., JENSENIUS, J.C. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature, 386**: 506-510, 1997.

- THOMAS, H.C., FOSTER, G.R., SUMYIA, M., McLNTOSH, D., JACK, D.L., TURNER, M.W., SUMMERFIELD, J.A. Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. **Lancet**, **348**: 1417-1419, 1996.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Advances in Immunology**, **71**: 83-243, 1998.
- TOWNSEND, R. , READ, R.C., TURNER, M.W., KLEIN, N.J., JACK, D.L. Differential recognition of obligate anaerobic bacteria by human mannose-binding lectin, **Clinical and Experimental of Immunology**, **124**: 222-228, 2001.
- TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, **40**: 423-429, 2003.
- URBAN, B.C. *et al.* Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, **400**: 73-77, 1999.
- URBAN, B.C., WILLCOX, N., ROBERTS, D.J. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**, **98**: 8750-8755, 2001.
- UEMURA, K., YOKOTA, Y., KOZUTSUMI, T. & KAWASAKI, T. A unique CD45 glycoform recognized by the serum mannan-binding protein in immature thymocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, **271**: 4581-4584, 1996.

- VALLINOTO, A.C.R., MENEZES-COSTA, M.R., ALVES, A.E.M., MACHADO, L.F.A., AZEVEDO, V.N. DE 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**, **43**: 1358-1362, 2006.
- VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J. Lectins from Monocotyledonae, in: D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche, T.-C. Bog-Hansen (Eds.), **Lectin Reviews**, vol. 1, Sigma, Saint Louis, EUA:161-170, 1991.
- VAN EMMERIK, L.C., KUJIPER, E.J., FIJEN, C.A.P., DANKER, J. & THIEL, S. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. **Clinical and Experimental Immunology**, **97**: 411-416, 1994.
- WALLIS, R. Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein. **Immunobiology**, **205**: 433-445, 2002.
- WIE, X.Q., LEUNG, B.P., NIEDBALA, W., PIEDRAFITA, D., FENG, G.J., SWEET, M., DOBBIE, L., SMITH, A.J., LIEW, F.Y. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **Journal of Immunology**, **163**: 2821-2828, 1999.
- YOKOTA, Y., ARAI, T. & KAWASAKI, T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. **Journal of Biochemistry**, **117**: 414-419, 1995.
- YUEN, M.-F., LAU, C.S., LAU, Y.-L., WONG, W.-M., CHENG, C.-C., LAI, C.-L. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. **Hepatology**, **29**: 1248-1251, 1999.

ANEXO I

*** TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa: “**Malária vivax: níveis parasitêmicos e manifestações clínico-laboratoriais relacionados ao fator de necrose tumoral-alfa**”.

Coordenação e responsabilidade dos pesquisadores Prof^a Isabel Barroso Augusto da Silva (médica) e Prof. Dr. José Maria de Souza (médico). Este estudo será conduzido no Ambulatório de Malária do Instituto Evandro Chagas (IEC) e na Unidade Básica de Saúde do Marco.

I – INTRODUÇÃO

Você está convidado a participar de um estudo clínico que irá verificar a quantidade de parasitas da malária no seu sangue, os sintomas, sinais e alterações laboratoriais causadas pela malária. Nós queremos saber como a doença se comporta em grupos de pacientes, de acordo com o nível de parasitemia.

Ao longo do tempo, observamos que algumas pessoas podem apresentar sintomatologia leve a moderada, enquanto outras têm quadros clínicos mais intensos. Por isso resolvemos fazer esse estudo.

As informações fornecidas neste documento são para esclarecer, o melhor possível, a nossa intenção. Foram baseadas nas resoluções n° 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, que definem as normas para pesquisa com seres humanos. As resoluções estão com a médica responsável pelo estudo e disponíveis para os pacientes.

II - PROCEDIMENTOS

A partir de sua aceitação você fará parte deste estudo. Independente da sua aceitação, você receberá a medicação durante 7 dias e será acompanhado por nossa equipe, diariamente, durante suas consultas.

Neste estudo não será usada nenhuma medicação nova para o tratamento da malária.

Você será submetido a exames que normalmente são utilizados em nosso serviço, mesmo que você não participe do projeto: é o **EXAME DE PESQUISA DE PLÁSMODIO (“fura-dedo”)**, que você fará todos os dias, até que o seu resultado esteja negativo em 2 (dois) dias consecutivos, e ainda no 3^o (terceiro), 7^o (sétimo), 28^o (vigésimo oitavo) dias após o início do tratamento e nos retornos mensais.

No estudo, também serão realizados exames de sangue. Para isso, serão retirados 15 ml de sangue da veia, no primeiro dia do atendimento, chamado de dia zero - D0. Esse material servirá para realização dos seguintes exames laboratoriais: Hemograma, reticulócitos, contagem de plaquetas, aminotransferases, bilirrubinas totais e frações, fosfatase alcalina, gama GT, sódio, potássio, glicemia, uréia, fator de necrose tumoral e tipagem gênica dos alelos TNF1 e TNF2.

Em todos os exames será utilizado material descartável.

CASO VOCÊ SINTA NECESSIDADE DE TOMAR ALGUM OUTRO TIPO DE MEDICAÇÃO, DURANTE O PERÍODO DO ESTUDO, FALE ANTES CONOSCO. DA

MESMA FORMA, QUALQUER SINTOMA OU SINAL QUE VOCÊ VENHA A SENTIR DURANTE O ESTUDO, COMUNIQUE AO SEU MÉDICO.

III - POSSÍVEL DESVANTAGEM: Coleta 15 mL de sangue, no primeiro dia.

IV - BENEFÍCIOS

Este estudo irá fornecer informações mais completas sobre a saúde do paciente e sobre as alterações causadas pela malária, porque faremos uma avaliação dirigida, tanto clínica como laboratorial.

No caso do paciente apresentar alguma alteração clínica ou laboratorial, além da malária, será orientado quanto ao tratamento.

Havendo algum resultado alterado, clínico ou laboratorial, o exame será repetido até que se normalize.

V- INCENTIVOS

Após serem anotados no prontuário do paciente, os resultados dos exames serão entregues aos pacientes.

VI - PARTICIPAÇÃO

Sua participação neste estudo é **VOLUNTÁRIA**. Você pode desistir a qualquer momento. Neste caso, solicitamos apenas que explique seus motivos à médica responsável.

A relação com seu médico e seu tratamento não serão, de forma alguma, afetadas se você não participar ou mesmo interromper sua participação. Antes e durante o estudo você tem o direito de esclarecer quaisquer dúvidas com a médica responsável pelo estudo ou outro membro da equipe de atendimento do Ambulatório de Malária do IEC.

CASO CONCORDE EM PARTICIPAR, VOCÊ DEVERÁ SEGUIR ESTRITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES QUE VENHAM A SER DADAS PELA EQUIPE, CASO CONTRÁRIO PODERÁ SER RETIRADO DO ESTUDO.

Tendo decidido por sua participação no estudo, pedimos assinar e datar abaixo.

Declaro ter recebido informações satisfatórias referentes a minha participação no estudo acima referido.

Estou ciente dos benefícios e possíveis desvantagens provenientes deste estudo.

Sei também que posso deixar o estudo se assim o desejar, sem que a qualidade dos cuidados médicos que me são oferecidos seja afetada.

NOME DO PACIENTE (e do responsável em caso de menor de 18 anos)

Assinatura do paciente ou responsável (para pacientes abaixo de 18 anos)

(data) ____/____/____

NOME DO MÉDICO: Isabel Barroso Augusto da Silva

ASSINATURA DO MÉDICO - CRM/PA: 6552

Endereço: Av. Almirante Barroso, n° 492 – Marco CEP 66090-000 Telefones para contato: 211-4466 211-4432

* Este termo foi aplicado no momento da coleta das amostras que permaneceram estocadas e serão utilizadas neste estudo

ANEXO II

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

MS/FUNASA/INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

VIGILÂNCIA DA RESPOSTA DOS PARASITAS DA MALÁRIA

GUARDA/PN _____ Lâmina nº _____ Data ____/____/____ Diagnóstico _____
 Paciente _____
 _____ Registro _____ Sexo ____ Idade _____ (Anos/Meses) Responsável _____
 _____ Parentesco _____ Fon _____
 e _____
 Endereço _____
 _____ Perímetro _____
 Bairro _____
 Local de Nascimento _____ Cor da Pele _____
 _____ Peso _____
 Ocupação Principal _____ Ocupação Alternativa _____
 Localidade de Infecção _____ Município _____ UF _____
 Período de Permanência na Área _____ Autoctonia? () Sim () Não
 Passado Nosológico: Vezes que teve malária: Nunca () 1x () 2x () 3x () 4x () 5x ou + ()
 Última vez _____ Medicamento(s) utilizado(s) no último tratamento _____
 _____ Por quantos dias?

Outras Doenças: (Hepatite, Leishmaniose, D. Chagas, Amebíase, Esquistossomose, doenças crônico-degenerativas, etc.) _____

Alergia? Sim () Não () A que? _____

Quando adoece, usa remédio de farmácia ou caseiro? Ou

ambos? _____

Movimentação do paciente: Nos últimos 12 meses viajou ou pernitoiu fora da localidade onde reside?

Sim () Não () Período _ _____ Localidade _____

Município _____ UF _____ Motivo da Viagem _____ Teve febre na localidade onde dormiu? Sim () Não () Quantos dias após regressar? _____

Onde pernitoiu havia alguém com febre? _____ Nome _____

Sinal ou sintoma clínico inicial _____ Data início de sintomas _____
 Droga (s) utilizada (s) no tratamento atual e
 esquema: _____
 Formulação da droga (VO/IM/EV) _____ Quantidade (Amp., Frasco, Comp.) _____

CONCLUSÃO DO CASO/ RESPOSTA AO TRATAMENTO:

CURA _____ RECRUDESCÊNCIA _____ RECAIDA _____ INDEFINIDO _____ ÓBITO _____

INTERRUPÇÃO OU TROCA DE ESQUEMA _____

SINAIS E SINTOMAS REFERENTES AO QUADRO CLÍNICO E/OU DECORRENTES DE INTOLERÂNCIA OU TOXICIDADE DEVIDAS AO MEDICAMENTO (OU ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) EM ESTUDO.

Sinal/Sintoma / DIA	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	DX	DX
Febre										
Calafrio										
Cefaléia										
Artralgia/ Lombalgia										
Astenia / Mialgias										
Tonteira										
Zumbidos/ Surdez										
Insônia										
Náuseas/ Vômitos										
Dor Abdominal										
Erução / Flatos										
Diarréia										
Colúria										
Oligúria /Anúria										
Palidez / Icterícia										
Prurido /Alergia										
Tosse / Dispneia										
Anorexia										
Esplenomegalia										
Hepatomegalia										
Pressão Arterial										
Freq. Respiratória										
Pulso										
Temperatura Axilar										

As informações deverão ser registradas segundo a convenção que se segue:

Ausente/Normal = 0 Alteração Discreta = 1 Moderada = 2 Severa = 3 Severíssima = 4
 Indefinida = IND

Visto do Médico(a), Enfermeiro(a) ou Estagiário(a)

ANEXO III

PRONTUÁRIO MÉDICO

Pesquisa: “**Malária vivax: manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas ao fator de necrose tumoral alfa**”.

Médica responsável: **Isabel Barroso Augusto da Silva**

Atendimento D0 – data:

Identificação do paciente

Nº do prontuário:

Nome:

Idade:

Sexo:

Cor:

Estado civil:

Naturalidade:

Procedência:

Profissão principal:

Secundária:

Endereço atual:

Endereço anterior:

Queixa principal, duração e história atual

.....

Interrogatório sistemático

.....

Antecedentes fisiológicos

.....

Antecedentes patológicos

Doenças da infância, adolescência, vida adulta e atuais (infecções, doenças crônicas, internamentos, medicamentos utilizados)

.....

Malária (dados epidemiológicos)

.....
.....
.....

História familiar

.....
.....
.....

História social

Condições habitacionais

.....
.....

Condições econômicas

.....
.....

Alimentação

.....
.....

Viagens

.....
.....

Lazer, tabagismo e consumo de droga (bebida alcoólica e tóxicos)

.....
.....

Origem étnica dos pais, tipos de união

.....
.....

Exame físico

Estado geral:

Fácies:

Temperatura:

Peso:

Altura:

Pele e fâneros:

Mucosas:

Estado mental:

Gânglios:

Pulsação:

Pressão arterial:

Caracteres étnicos

.....
.....

Exame do tórax (respiratório e cardiovascular)

.....
.....

ANEXO IV**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ****A: Prof^a. Dra. Maristela Gomes da Cunha**

Carta: 064/06 CEP-CCS/UFPA

Belém, 07 de julho de 2006.

Senhora Pesquisadora, temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa intitulado "Polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL₂* (Lectina Ligadora e Manose) em indivíduos expostos à Malária causada por *Plasmodium vivax* sob o protocolo nº 058/06 CEP-CCS/UFPA, foi apreciado e aprovado na reunião do dia 30 de Dezembro de 2006. Você tem como compromisso a entrega do relatório até dia 30 de Dezembro de 2006 no CEP-CCS/UFPA, situado no Campus Universitário do Guamá n complexo de sala de aula do CCS - sala 13 (altos), em frente ao estacionamento do Curso de Odontologia.

Atenciosamente,

Prof. MsC. Wallace Raimundo Araújo dos Santos

Coordenador do CEP-CCS/UFPA

Comitê de ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-CCS/UFPA) – Complexo de Sala de Aula/CCS – Sala 14 – Campus Universitário, nº 1, Guamá – CEP: 66.075-110 – Belém-Pará. Tel./Fax: 3201-8028 e-mail: cepccs@ufpa.br