

NILTON AKIO MUTO

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL* (*MANNOSE-BINDING LECTIN*) E O SEU IMPACTO NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) E NA PROGRESSÃO DA SIDA/AIDS**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto

Belém - Pará

2005

NILTON AKIO MUTO

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL* (*MANNOSE-BINDING LECTIN*) E O SEU IMPACTO NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) E NA PROGRESSÃO DA SIDA/AIDS**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto

Belém - Pará

2005

NILTON AKIO MUTO

POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL* (*MANNOSE-BINDING LECTIN*) E O SEU IMPACTO NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) E NA PROGRESSÃO DA SIDA/AIDS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, avaliada pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Departamento de Patologia - UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado  
Departamento de Patologia - UFPA

Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado  
Departamento de Patologia - UFPA

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos  
Departamento de Fisiologia - UFPA

Prof. Dr. Ricardo Ishak (Suplente)  
Departamento de Patologia - UFPA

Belém, 27 de junho de 2005

*"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita."*

*Mahatma Gandhi*

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Nobuyoshi Muto e Reiko Muto, pelos sacrifícios e privações a que se submeteram para me proporcionar esta oportunidade. Por todo carinho e pelo amor mais verdadeiro que posso receber nessa vida. Além do meu “eterno obrigado”, aceitem também minhas desculpas pelas vezes que por algum motivo deixei de dar a atenção que vocês mereciam. Eu os amo muito e este trabalho é o início do meu retorno à vocês, por tudo o que são e fazem por mim.

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar o meu mais sincero obrigado ao Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto, um mestre que através da paciência e dedicação se tornou mais que um amigo. Um amigo que mesmo sabendo dos meus defeitos e das minhas dificuldades, nunca deixou de acreditar em mim, como um verdadeiro mestre.

Sou grato ao Prof. Dr. Ricardo Ishak, pela confiança que teve desde o início da minha a entrada do Laboratório de Virologia da UFPA, e pelo direcionamento de uma sólida formação profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak, pelo apoio expressivo durante todo o aprendizado acadêmico.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado e a Prof<sup>a</sup> MSc.Vânia Nakauth Azevedo que muito me ensinaram, tanto no lado da simplicidade profissional como no lado profundo do ser humano .

Aos amigos mestrandos Luciana Fernandes, Lauze Lee e, em especial, ao Gemilson Pontes, pela valiosa amizade e indispensável incentivo e apoio durante a superação das dificuldades e dos momentos de desânimo.

Aos estimados amigos do Laboratório de Virologia: Fernando, Ivina, Renato, Marcos, Rogério, Sandra Caniceiro, Rosimar, Izete, Di Paula, Paula, Lílian, Keila, Renata, Lucinda e Gisele. Em especial a Anna Elizabeth, cujo auxílio diário na parte laboratorial foi fundamental na elaboração deste trabalho.

Sou grato a minha namorada Samara Pantoja Corrêa, pelo apoio constante em todos os momentos, pelo companheirismo, pelas críticas e pela amizade.

Aos meus irmãos Cleyton Isamu Muto e Natália Sayuri Muto, por sempre estarem à disposição em qualquer circunstância e na difícil tarefa de torna os dias mais alegres.

Aos pacientes soropositivos e aos doadores de amostras controles que tiveram parte das suas amostras aqui testadas.

A CAPES e ao CNPq por financiar parte desse projeto.

À UFPA pelo acolhimento desde o primeiro dia que entrei nesta instituição.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	vii
<b>RESUMO</b>	viii
<b>ABSTRAT</b>	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 A FAMÍLIA <i>RETROVIRIDAE</i></b> .....	2
<b>1.1.1 O Vírus da imunodeficiência humana (HIV)</b> .....	2
<b>1.1.2 Estrutura Morfológica e Genômica do HIV-1</b> .....	3
<b>1.1.3 O Ciclo de Replicação do HIV-1</b> .....	7
<b>1.2 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)</b> .....	9
<b>1.2.1 Características Estruturais e Funcionais da MBL</b> .....	10
<b>1.2.2 Polimorfismo no Éxon 1 do Gene <i>MBL</i></b> .....	14
<b>1.2.3 Polimorfismo na Região Promotora do gene <i>MBL</i></b> .....	16
<b>1.2.4 A Concentração da MBL no Plasma</b> .....	19
<b>1.2.5 Proteínas Associadas à MBL</b> .....	20
<b>1.2.6 Ativação do Sistema Complemento Mediada pela MBL</b> .....	24
<b>1.3 A VIA DA MBL E A ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS</b> .....	28
<b>1.4 A AÇÃO DA MBL NA INFECÇÃO PELO HIV-1</b> .....	32
<b>1.5 OBJETIVOS</b> .....	38
<b>1.5.1 Objetivo Geral</b> .....	38
<b>1.5.2 Objetivos Específicos</b> .....	38
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
<b>2.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DA AMOSTRA</b> .....	39
<b>2.1.1 Pacientes HIV-1 Soropositivos</b> .....	39
<b>2.1.2 Pacientes Controles Soronegativos para o HIV-1</b> .....	40
<b>2.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS</b> .....	40
<b>2.2.1 Sorologia</b> .....	40
<b>2.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA</b> .....	40
<b>2.4 CITOMETRIA</b> .....	41
<b>2.4.1 Quantificação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> .....	41

2.5	MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	41
<b>2.5.1</b>	<b>Extração do DNA .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....</b>	<b>41</b>
2.5.2.1	Região Promotora –550 (H/L) .....	42
2.5.2.2	Região Promotora –221 (X/Y) .....	42
<b>2.5.3</b>	<b>Eletroforese.....</b>	<b>44</b>
2.6	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	44
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

		<b>página</b>
Figura 1.	Estrutura morfológica do HIV-1.....	4
Figura 2.	Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV-1.....	8
Figura 3.	Estrutura da cadeia polipeptídica da MBL madura.....	12
Figura 4.	Esquema demonstrando três mutações no éxon 1 do gene da <i>MBL</i> que geram três substituições de aminoácidos na região colagenosa.....	16
Figura 5.	Representação esquemática do gene <i>MBL</i> demonstrando a ocorrência das mutações estruturais no éxon 1 e funcionais na região promotora do gene .....	18
Figura 6.	Vias de ativação do complemento: (a) via clássica, (b) via MBL e (c) via alternativa.....	25
Figura 7.	Análise das médias de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY.....	53
Figura 8.	Análise das médias da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY .....	57

## LISTA DE TABELAS

	<b>página</b>
Tabela 1. Par de iniciadores alelo-específico utilizado para amplificação do alelo H (-550) e do alelo L (-550).....	42
Tabela 2. Par de iniciadores alelo-específico utilizado para amplificação do alelo X (-221) e do alelo Y (-221).....	43
Tabela 3. Par de iniciadores alelo-específico para deteminação do haplótipo em <i>cis/trans</i> .....	44
Tabela 4. Freqüência alélica nos grupos controle e de pacientes infectados pelo HIV-1.....	47
Tabela 5. Freqüência haplotípica nos grupos controle e de pacientes infectados pelo HIV-1.....	48
Tabela 6. Freqüência genotípica nos grupos controle e de pacientes infectados pelo HIV-1.....	49
Tabela 7. Média de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY .....	50
Tabela 8. Média de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY.....	52
Tabela 9. Evolução da média de linfócito T CD4 <sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY .....	54
Tabela 10 Média da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY. ....	55
Tabela 11 Média da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY.....	56
Tabela 12 Evolução da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY.....	58

## RESUMO

Um emergente interesse à MBL tem surgido, devido a sua importância no sistema imune inato. Recentes estudos relatam uma influência do polimorfismo na região promotora nas regiões -550 (H/L) e -221 (X/Y) do gene *MBL*, com a deficiência do sistema imune à determinados patógenos. O objetivo do presente estudo é investigar a associação entre o polimorfismo na região promotora do gene *MBL* e a infecção pelo HIV-1 e a progressão à SIDA/AIDS. No estudo foi feita identificação destes alelos em uma população de 127 pacientes soropositivos para HIV-1 e em 97 indivíduos soronegativos, a partir da técnica de SSP-PCR, utilizando-se seqüências de iniciadores específicos para cada variante. A evolução da infecção nos pacientes soropositivos foi avaliada por meio da contagem de linfócito T CD4<sup>+</sup> e da carga viral plasmática. As distribuições nas freqüências alélicas e haplotípicas entre os grupos de portadores do HIV-1 e nos controles soronegativos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ). Entretanto, pacientes soropositivos portadores do haplótipo HY apresentaram uma maior contagem e uma evolução significativa no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>; e uma menor contagem e maior redução da carga viral plasmática, em relação aos pacientes portadores dos haplótipos LY, LX e HX. Os resultados do presente estudo mostram que a presença de haplótipos relacionados a médios e baixos níveis séricos de MBL podem ter um papel direto na forma como o paciente soropositivo evolui laboratorialmente. Desse modo, conclui-se que a caracterização dos haplótipos da região promotora do gene *MBL* em portadores da infecção pelo HIV-1 pode ser importante na avaliação do prognóstico de evolução da SIDA/AIDS.

## ABSTRACT

An emergent interest in MBL was appeared in consequence the great importance for the immune system. At the current study, the prevalence of mutations in -550 (H/L) and -221 (X/Y) MBL gene regions and its impact on the infection by HIV-1 in a population of 128 HIV-1 seropositive and in 97 seronegative patients was evaluated. The alleles identification was performed through SSP-PCR method, using specific primers sequence to each variant. The infection evolution in seropositive patients was evaluated throughout CD4<sup>+</sup> T-cell counting and plasma viral load. The relation of allele and haplotype frequencies between HIV-1 carriers and seronegative control patients did not show statistically significant differences ( $p > 0.05$ ). The evaluation of CD4<sup>+</sup> T-cell mean showed lower levels between seropositive patients who showed LY, LX and HX haplotypes, when compared to seropositive patients showing HY haplotype. These low levels were noticed both at the first (300.8 cells/mL x 405.0 cells/mL) and the second laboratorial evaluation (316.9 cells/mL x 449.9 cells/mL). The plasma viral load mean was higher between seropositive patients who carried LY, LX and HX haplotypes than seropositive patients showing HY haplotype (34,516 copies/mL x 27,482.7 copies/mL). The current study outcomes show that presence of haplotypes related to medium and low MBL serum levels might have a direct role on the way seropositive patient's laboratorial evolution occurs. Therefore, it was concluded that haplotypes identification in the promoter region of MBL gene in the HIV-1 infection carriers might be relevant in the prognosis evaluation of AIDS progression.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) é um dos mais importantes patógenos emergentes do século. Análises filogenéticas estimam que o HIV surgiu em entre os anos de 1915 e 1941, tornando-se uma ameaça pública mundial 50 anos depois (Korber *et al.*, 2000).

Desde a descoberta da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em meados da década de 80, em países desenvolvidos, a pandemia da AIDS continua se expandindo na taxa de 14.000 novas infecções por dia. O Programa Conjunto das Nações Unidas em HIV/AIDS (UNAIDS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimaram que até ao final de 2002, mais 67 milhões de indivíduos foram infectados pelo HIV-1. Destes, aproximadamente 25 milhões de pacientes já morreram e os outros 42 milhões vivem com o HIV/AIDS (UNAIDS/WHO, 2002).

A dispersão da infecção causada pelo HIV-1 é consequência das trocas de fluidos corpóreos contaminados, que podem ser feitas através: das relações sexuais, do compartilhamento de agulhas, dos acidentes com materiais perfurocortantes contaminados e da transmissão via transplacentária. Adicionalmente, co-fatores, tais como, doenças sexualmente transmissíveis e o polimorfismo de genes codificadores de receptores para o vírus, facilitam a infecção pelo HIV e influenciam a progressão a AIDS. Contudo, o real efeito da heterogeneidade genética do hospedeiro na susceptibilidade à infecção ainda é pouco compreendido (Garred *et al.*, 2003).

## 1.1 A FAMÍLIA *RETROVIRIDAE*

### 1.1.1 O *Vírus da imunodeficiência humana (HIV)*

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

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

Atualmente o Comitê Internacional de Taxonomia Viral reconhece sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*, e esses em subgêneros e espécies de acordo com as propriedades físico-químicas, biológicas e os aspectos de seqüência nucleotídica e estrutura genômica (Coffin, 1993; Liu, 1996).

Os retrovírus patogênicos ao homem incluem os (i) *Vírus linfotrópicos de células T humanas 1 e 2* (HTLV-1 e HTLV-2), relacionados à distúrbios neurológicos e hematológicos, classificados no gênero *Deltaretrovirus* e

os (ii) *Vírus da imunodeficiência humana 1 e 2* (HIV-1 e HIV-2), classificados no gênero *Lentivirus* (Gallo, 1991; Coffin *et al.*, 1996; Liu, 1996).

### **1.1.2 Estrutura Morfológica e Genômica do HIV-1**

Os modelos de estrutura do HIV-1 são baseados na combinação de resultados das análises de microscopia eletrônica de alta resolução de partículas virais e de imunohistoquímica e bioquímica dos componentes virais (Gelderblom, 1991).

O HIV-1 é uma partícula esférica, com aproximadamente 100 nm de diâmetro, apresentando no seu interior o genoma, a transcriptase reversa, a protease e a integrase protegidos por um capsídeo protéico, circundado por um envelope externo composto por uma membrana lipoprotéica oriunda da célula hospedeira acrescida de glicoproteínas virais (Wong-Staal & Gallo, 1985; Figura 1).

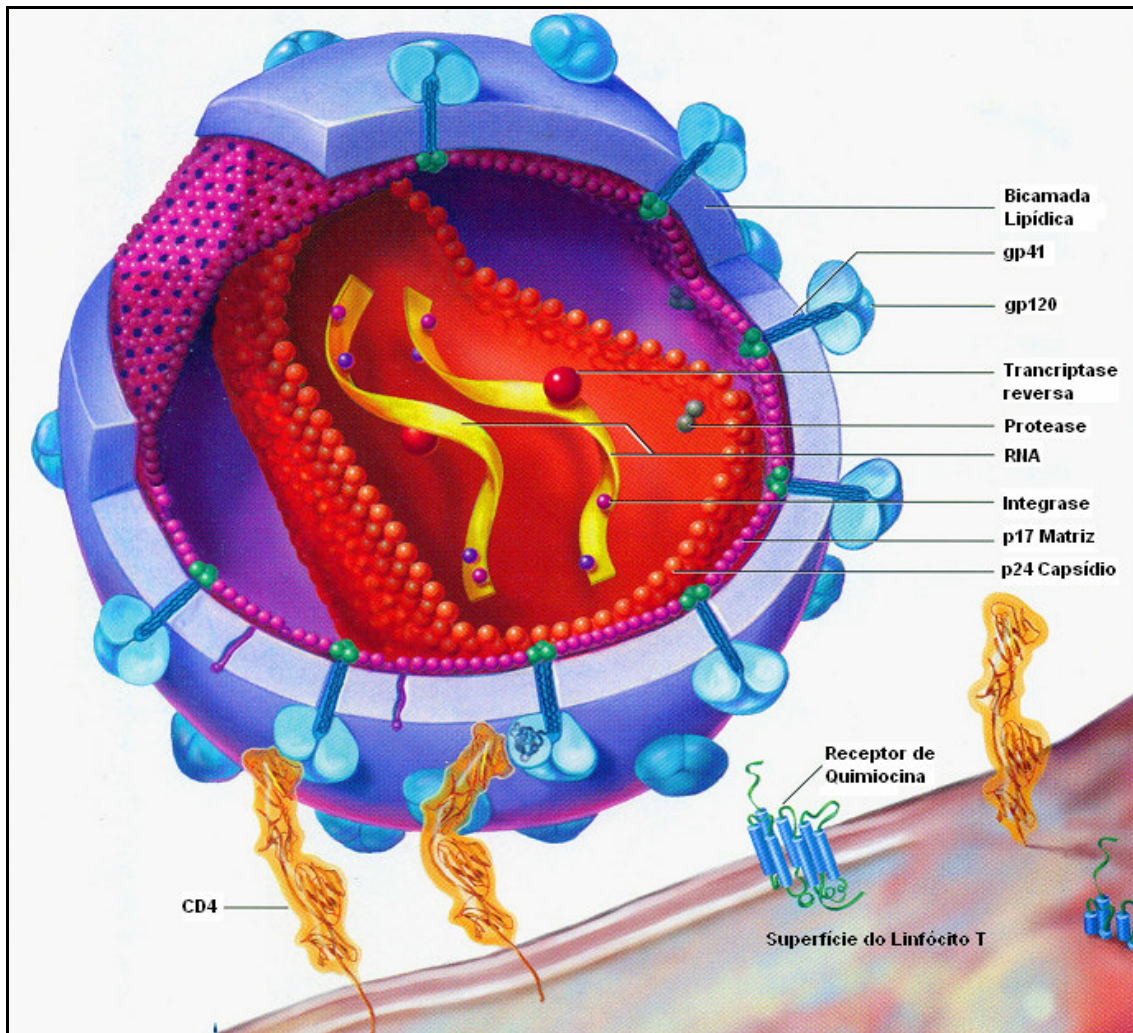


Figura 1 - Estrutura morfológica do HIV-1 (Adaptado de Abbas *et al.*, 2005).

O genoma do HIV-1 contém dois filamentos idênticos de RNA de fita simples e de polaridade positiva, contendo nove genes delimitados por duas regiões terminais longas e repetitivas chamadas *LTR* (*Long Terminal Repeats*). Estes genes estão divididos em três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), típico dos retrovírus, e seis genes regulatórios (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*) (Greene, 1991).

O gene *gag* codifica um precursor que, ao ser clivado por uma protease viral durante a maturação, origina várias proteínas estruturais que

compõem o cerne viral, como a matriz protéica (p17), o capsídio viral (p24) e as proteínas mais internas do nucleocapsídio (p7 e p9) (Ratner *et al.*, 1985). Esta protease, que também cliva polipeptídios precursores codificados pelo gene *pol*, é codificada pelo mesmo gene que também é responsável pela produção das seguintes enzimas: (i) a transcriptase reversa, responsável pela replicação do RNA viral e degradação da fita de RNA após a síntese da primeira fita de DNA e (ii) a integrase, que faz a integração do ácido nucléico viral ao genoma celular (Varmus & Swanstrom, 1985; Levy, 1994).

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

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

O gene *env* apresenta uma grande diversidade na seqüência de nucleotídeos observada em diferentes cepas. A análise molecular deste gene revelou a presença de cinco domínios variáveis (V1-V5) intercalados por quatro regiões conservadas (C1-C4) (Alizon *et al.*, 1986; Myers *et al.*, 1993). Variações na seqüência do gene *env* têm grande implicação não somente para a resposta imune antiviral, mas também para funções adicionais mediadas pela glicoproteína do envelope, tais como ligação ao CD4, tropismo celular e citopatogenicidade (Diaz, 1997).

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

Os genes não-estruturais compreendem os genes reguladores ou acessórios (*tat* e *rev*) que são essenciais para a replicação viral. O gene *tat* funciona como um potente ativador transcricional, atuante tanto na iniciação transcricional como no alongamento da cadeia, além de manter também a infectividade viral (Kameoka *et al.*, 2001). O gene *rev*, por sua vez funciona como um regulador do processamento do RNA viral e um transportador do RNAm viral do núcleo para o citoplasma (Gergerfelt *et al.*, 2002).

Além dos genes reguladores *tat* e *rev*, outros genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu*, e *nef*) são importantes na replicação e infectividade viral. O gene *nef* é um regulador transcricional envolvido no aumento da replicação viral e na redução no número de receptores CD4 na superfície de células infectadas (Zhou & Aiken, 2001). O gene *vif*, participa na regulação da infectividade viral, promovendo a infecção de células sem vírus e a produção de partículas virais (Khan *et al.*, 2001). O gene *vpu*, presente somente no HIV-1, possui a função de degradação do CD4 e é necessário para um brotamento eficiente do vírion (Deora & Ratner, 2001). O gene *vpr*, por sua vez, é um fraco ativador transcricional, mas que tem por função modular a transcrição da LTR do HIV-1 e montagem do vírus (Sawaya *et al.*, 2000).

### 1.1.3 O Ciclo de Replicação do HIV-1

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

Após a ligação à célula-alvo, ocorre a penetração do vírus por endocitose mediada por receptores ou pela fusão do envelope viral com a membrana celular, sendo o nucleocapsídeo liberado no citoplasma (Lifson *et al.*, 1986; Bauer *et al.*, 1987). O RNA viral, liberado no citoplasma celular, serve como molde para a síntese de uma molécula de DNA por ação da enzima transcriptase reversa, o que resulta em um filamento híbrido RNA-DNA. Posteriormente, ocorre a degradação da fita simples de RNA com a subsequente duplicação do DNA, que é mantida como um complexo de nucleoproteína a qual é transportada para o núcleo. Na reação mediada pela integrase, as extremidades do DNA dupla fita são covalentemente integradas ao DNA da célula hospedeira sob a forma de um provírus (Panganiban & Fiore, 1988; Figura 2).

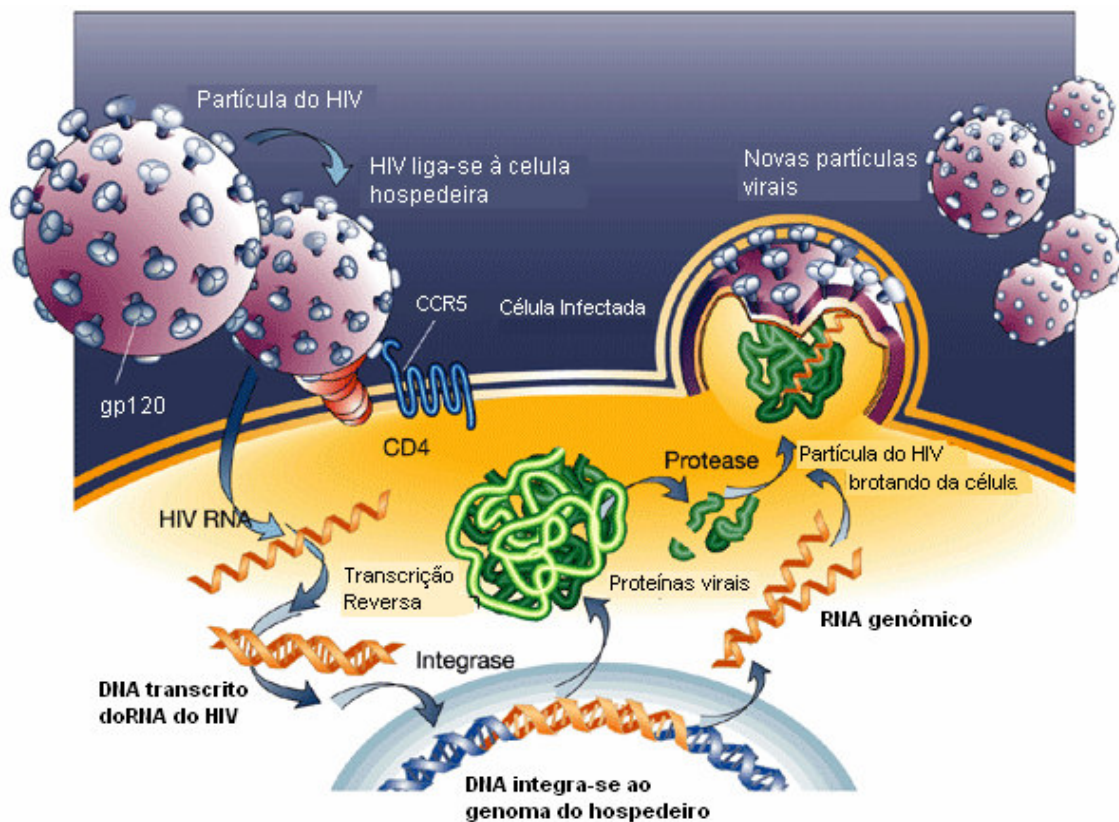


Figura 2 - Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV-1 (Adaptado de [www.flstdHivptc.com/html/Hiv\\_aids.html](http://www.flstdHivptc.com/html/Hiv_aids.html)).

**A fase tardia de replicação inicia-se com a transcrição e o processamento do RNA viral a partir do genoma proviral integrado. Os transcritos irão dar origem ao RNA genômico e a síntese de proteínas estruturais (Greene, 1991).**

**A associação do HIV-1 a um tipo específico de receptores indica não apenas o tropismo para um determinado tipo celular, mas também tem servido como um indicador confiável de maior ou menor susceptibilidade genética do hospedeiro ao HIV-1 (Winkler *et al.*, 1998). A presença de determinadas mutações nos genes dos receptores de  $\alpha$  e  $\beta$ -quimiocinas são fatores que determinam a transmissão do vírus e a progressão para o quadro de SIDA/AIDS (Smith *et al.*, 1997; Kuritzkes, 2000). Por outro lado, as co-infecções com agentes bacterianos e virais têm servido também como fator adicional e complicador do quadro clínico do paciente portador do HIV-1 e, conseqüentemente, podem interferir na progressão para SIDA/AIDS.**

## 1.2 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

O sistema imune inato era amplamente conhecido como uma coleção de mecanismos vestigiais de pequena importância e de menor interesse aos imunologistas. Em contraste, a imunidade adaptativa, com seus sistemas de alta especificidade de reconhecimento de antígenos e de interações entre moléculas endógenas e células, era tudo o que realmente importava na defesa do hospedeiro. Com uma mudança nos interesses acadêmicos frente aos mecanismos de defesa primária, ocorrido nos últimos anos, passou-se a perceber que o sistema imune inato é mais crucial, complexo e específico do que o suposto anteriormente (Borregard *et al.*, 2000). Isto pode ser compreendido pela presença de proteínas solúveis e ligadas à membrana com uma especificidade pré-definida, em muitos casos, envolvendo o reconhecimento de moléculas de carboidratos presentes em diversos microrganismos (Fearon & Lockley, 1996).

O sistema imune adaptativo, subseqüentemente, possui um papel importante na geração da resposta específica contra agentes infecciosos. Embora considerados sistemas separados, os componentes do sistema imune inato interagem com o sistema adaptativo conferindo um papel instrutivo para a imunidade inata na defesa imune adaptativa (Fearon & Lockley, 1996).

O envolvimento da MBL como primeira linha de defesa do hospedeiro é indicado pela descoberta da ocorrência de deficiência de MBL em indivíduos com infecções severas e repetidas (Sastry *et al.*, 1991).

A MBL é sintetizada, principalmente, no fígado por hepatócitos. Entretanto, em estudos com camundongos, foi demonstrado que a MBL pode ser sintetizada em outros órgãos, tais como: cérebro, baço, rins e coração (Dumestre-Perard *et al.*, 2002). Embora extensivos estudos tenham produzido informações detalhadas da estrutura da MBL, a compreensão da estrutura e da função do complexo MBL ainda é incompleta.

O gene codificador da MBL está localizado no cromossomo 10 humano na posição q11.2-q21 (Sastry *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989). A presença de polimorfismos e mutações na região promotora e no éxon 1 do gene *MBL* resulta em uma pronunciada variação interindividual dos níveis plasmáticos da MBL, tendo sido demonstrado em estudos que os baixos níveis de MBL são mais freqüentes em casos de imunodeficiência (Garred *et al.*, 1999a).

### 1.2.1 Características Estruturais e Funcionais da MBL

As colectinas constituem uma família de proteínas contendo uma região colagenosa e um domínio de lectina ligante de carboidrato (Holmskov *et*

*al.*, 1994). Em seres humanos, são conhecidos quatro membros deste grupo de proteínas: a proteína plasmática MBL, as proteínas sulfatantes do pulmão (SP-A e SP-D), a CL-L1, localizada no citosol dos hepatócitos (Hakansson & Reid , 2000) e duas colectinas do plasma bovino - a congulinina e a CL-43 (Loveless *et al.*, 1995).

As proteínas da família das colectinas são compostas de seis subunidades de 96 KDa formadas pelo agrupamento de três cadeias polipeptídicas idênticas de 32 KDa, cada uma contendo um a curta região N-terminal com ligações cruzadas (*cross-linking*) contendo duas ou três cisteínas, seguidas por uma região de comprimento variável semelhante ao colágeno (*collagen-Like*), uma região de flexão (*neck region*) e uma região de lectina C-terminal ou domínio de reconhecimento de carboidrato - CRD (Taylor *et al.*, 1989; Petersen *et al.*, 2001; Figura 3).

A região semelhante ao colágeno contém oito sítios de hidroxilação e quatro sítios de O-glicosilação em potencial. Para a formação de uma estrutura helicoidal em  $\alpha$ -hélice, a região de pescoço inicia a trimerização de um polipeptídeo para formar uma subunidade estrutural contendo uma região colagenosa e três domínios de lectina C-terminal. A subunidade é estabilizada por interação hidrofóbica e ligações dissulfídricas entre as cadeias na região de ligação cruzada N-terminal (Wallis & Drickamer, 1999; Petersen *et al.*, 2001).

Na circulação, a subunidade estrutural da MBL humana é encontrada variando na forma de dímeros a hexâmeros, conferindo uma aparência de flecha quando visualizada em microscopia eletrônica de transmissão (Lu *et al.*, 1990).

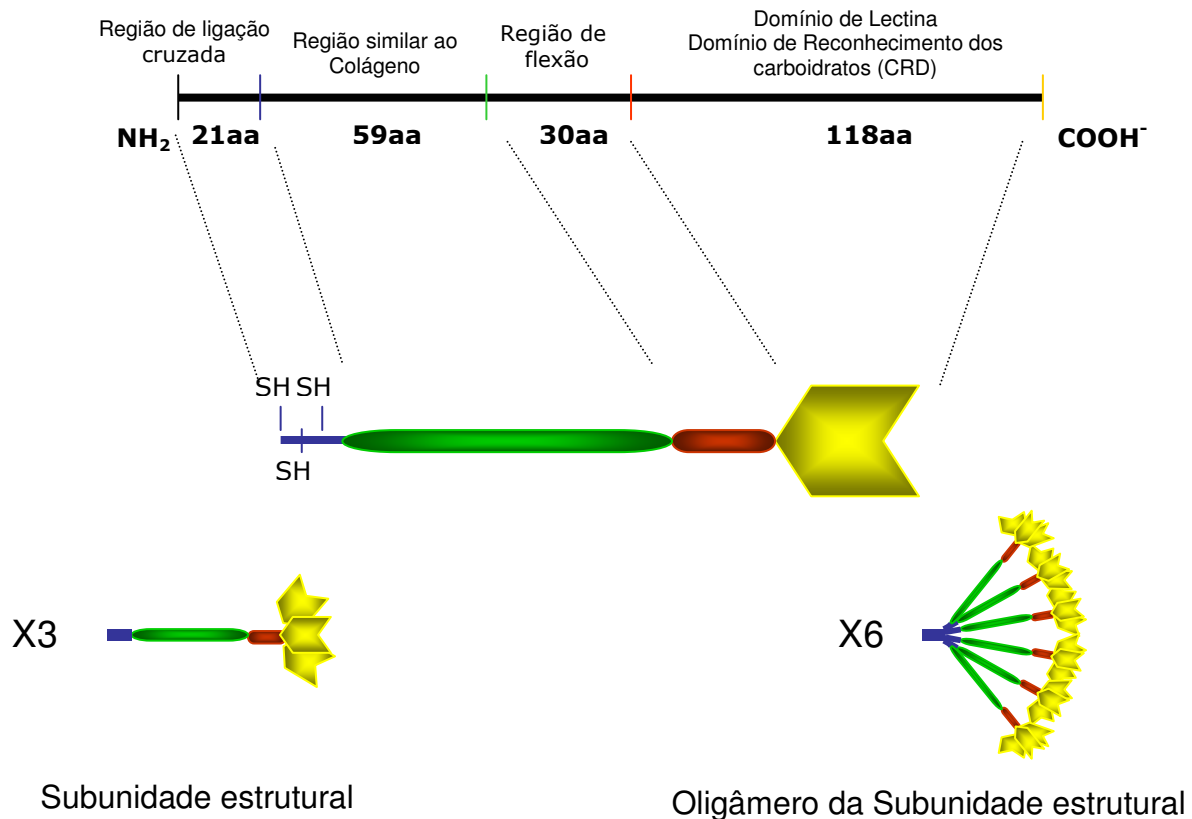


Figura 3 - Estrutura da cadeia polipeptídica da MBL madura (Adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

A MBL é uma lectina tipo-C e necessita de cálcio para ligar-se a uma molécula de carboidrato. A estrutura cristalizada dos domínios de lectina recombinantes de MBL-A de rato, complexado com um oligossacarídeo, mostra claramente a participação direta do cálcio na ligação dos grupos 3- e 4-OH dos açúcares (Weiss *et al.*, 1992b). Adicionalmente, a estrutura também revelou a necessidade dos grupos 3- e 4-OH das moléculas de açúcares estarem complexadas no plano equatorial da estrutura em anel da hexose, de maneira a

permitir ao hidrogênio se ligar as cadeias laterais de aminoácidos. Conseqüentemente, a MBL se liga a diversos monossacarídeos, como N-acetilglicosamina, manose, N-acetilmanoseamina, L-fucose e glicose, mas não galactose (Holmshov *et al.*, 1994).

Uma comparação de ligação da MBL a monossacarídeos, em comparação aos polissacarídeos mostra que a constante de dissociação da interação entre um CRD e um carboidrato é muito fraca ( $10^{-3}$  M) (Lobst *et al.*, 1994). Entretanto, múltiplos CRD estão presentes na estrutura quaternária da molécula de MBL, permitindo uma elevada avidéz por ligações de carboidratos repetitivos ou para regiões com elevada concentração de carboidratos relevantes (Sheriff *et al.*, 1994).

Tem sido mostrado que a MBL liga-se a um largo espectro de microrganismos de importância clínica - incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, que exibem em sua superfície moléculas repetidas de carboidratos (Holmskov *et al.*, 1994; Neth *et al.*, 2000). A MBL não se liga, em condições fisiológicas normais, à superfície das células do hospedeiro (Lee *et al.*, 1992). Isso deve ser em razão: (i) da presença de ácido siálico na terminação dos resíduos de glicanos da superfície celular ou (ii) da falta de estruturas repetitivas de carboidratos na superfície de células animais.

**Por outro lado, transformações malignas e infecções virais modificam a estrutura de oligossacarídeos da superfície celular, assim algumas células tumorais e glicoproteínas virais expressas na membrana da célula têm mostrado se fixarem à MBL (Fujita *et al.*, 1995; Yong *et al.*, 1999).**

### **1.2.2 Polimorfismo no Exon 1 do Gene *MBL***

O nível da MBL na circulação sangüínea é bastante estável (Nielsen *et al.*, 1995), apesar dos níveis em diferentes indivíduos, variar desde abaixo de 50 ng/mL até acima de 3µg/mL. Mutações no gene *MBL* afetam a concentração sérica da MBL (Sastry *et al.*, 1989). Estas mutações são oriundas especificamente de quatro alótipos existentes no éxon 1 do gene, assim como de vários polimorfismos na região promotora (Steffensen *et al.*, 2000). Esse polimorfismo resulta em um número diferente de genótipos, alguns dos quais são associados ao decréscimo dos níveis da MBL. Mutações pontuais nos códons 54 e 57 do éxon 1 conferem uma substituição de glicina por ácido aspártico e de glicina por ácido glutâmico nas posições residuais 34 e 37 da proteína madura, respectivamente (Sumiya *et al.*, 1991; Lipscombe *et al.*, 1992; Figura 4). Estas mutações rompem as repetições Gly-X-Y na região de colágeno. Estudos conduzidos em MBL-A de ratos recombinantes com mutações homólogas indicam que essas mudanças alteram as ligações dissulfídricas entre cadeias dentro da região de ligações cruzadas N-terminal (Wallis & Cheng, 1999;Figura 4).

Experimentos de eletroforese a partir da formas mutantes de MBL sugeriram que os baixos níveis séricos de MBL estão associados a esses dois alelos em humanos, devido à diminuição da secreção da MBL circulante (Heise *et al.*, 2000). Usando sistemas de expressões diferentes, outros estudos demonstraram que a MBL humana recombinante, carreando a mutação no codón 54 e na MBL selvagem são secretadas em taxas similares (Super *et al.*, 1992, Kurata *et al.* 1993, Ma *et al.*, 1997, Naito *et al.*, 1999), sugerindo que os baixos níveis de MBL circulante, em indivíduos que possuem a mutação no códon 54,

seja devido a uma maior taxa de rotatividade no soro da forma mutante quando comparado à MBL tipo selvagem.

Uma terceira mutação no éxon 1 resulta na substituição da cisteína por uma arginina na posição 32 da proteína madura (é referida como mutação no códon 52) (Figura 4). Enquanto esta substituição não interrompe a seqüência Gly-X-Y, a presença desse resíduo adicional de cisteína tem sido sugerida romper a formação do oligômero pela geração de pontes dissulfídicas adicionais envolvendo o resíduo de cisteína introduzido (Wallis e Cheng, 1999). O padrão de pontes dissulfídicas na região N-terminal não é afetado por esta substituição.

Os baixos níveis séricos de MBL encontrados na circulação de indivíduos homozigotos, nas três mutações, mostraram uma estrutura da MBL com um peso molecular abaixo da MBL tipo selvagem. Heterozigotos produzem primariamente o MBL tipo normal, de alto peso molecular, mas também pequenas quantidades da forma de baixo peso molecular (Lipscombe *et al.*, 1995).

Os alelos contendo as mutações dos códons 52, 54 ou 57 são designados *MBL\*D*, *MBL\*B* e *MBL\*C*, respectivamente, enquanto que o alelo normal é designado *MBL\*A* (Madsen *et al.*, 1994). As freqüências dessas mutações nas populações variam entre grupos étnicos (revisado por Turner & Hamvas, 2000). Por exemplo, em caucasóides dinamarqueses, os alelos *MBL\*B* e *MBL\*C* são encontrados com freqüências de 13% e de 12% respectivamente, enquanto que as freqüências em africanos da região do Sub-Saara (Quênia) são encontrados com freqüências de 3% e de 23%. A freqüência do alelo *MBL\*D* é de 5% em ambas as populações.

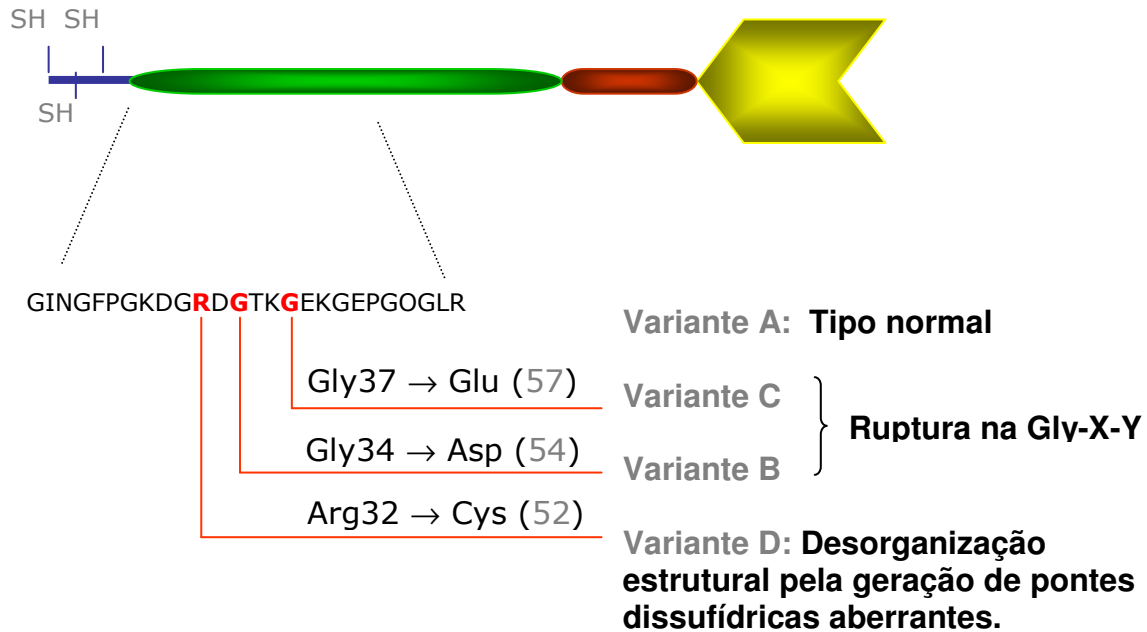


Figura 4 - Esquema demonstrando três mutações no éxon 1 do gene da *MBL* que geram três substituições de aminoácidos na região colagenosa. (Adaptado de Petersen *et al.*, 2001).

### 1.2.3 Polimorfismo na Região Promotora do Gene *MBL*

A identificação de mutações na região promotora mostrou que os níveis de MBL no plasma são também modulados em nível de transcrição (Madsen *et al.*, 1995). Substituições nucleotídicas nas posições -550 (G para C) e -221 (G para C) dão origem as variantes H(G)/L(C) e Y(G)/X(C), respectivamente. Outra substituição na região 5' não traduzida do éxon 1 (posição +4) dá origem à variante P(C)/Q(T). Diversas outras variantes do promotor foram descritas, mas, aparentemente não influenciam nos níveis de MBL (Madsen *et al.*, 1998). Os haplótipos HY, LY e LX estão associados a níveis altos, médios e baixos de MBL no plasma, respectivamente (Madsen *et al.*, 1995). Por causa do desequilíbrio de

ligação entre algumas das variantes, apenas sete haplótipos de MBL (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD) foram identificados (Madsen *et al.*, 1998). Em adição, o haplótipo HXPA foi relatado como ocorrido em três pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) (Sullivan *et al.*, 1996). Existe também um forte desequilíbrio de ligação entre o alelo Q e cinco outras substituições/deleções na região promotora, presentes somente nos haplótipos LYQA e LYQC (Madsen *et al.*, 1995; 1998). O polimorfismo da região promotora e regiões do éxon 1 do gene MBL humano estão ilustrados esquematicamente na Figura 5.

Existe ainda, o dimorfismo alélico na região promotora que é conhecido influenciar na concentração de MBL, entretanto de forma menos acentuada. O mais importante é o dimorfismo X/Y na posição -221, onde o efeito do alelo X, é quantitativamente, comparável a uma mutação estrutural gênica. O dimorfismo de L(baixo) / H(alto) é associado a uma alteração mais modesta, ambos oriundos do polimorfismo gênico estrutural. Um grupo de dimorfismo da região promotora ocorre em associação com a substituição na região 5' não-traduzida do gene estrutural, designado P ou Q. A presença de haplótipos com substituição de Q parece conferir altas concentrações comparado a haplótipos com a presença de P (Madsen *et al.*, 1998; Kilpatrick, 2002).



#### 1.2.4 A Concentração da MBL no Plasma

O nível plasmático médio de MBL na população caucasóide dinamarquesa foi relatado ser de 1,2  $\mu\text{g/mL}$ , em indivíduos homocigotos para o alelo tipo selvagem. Entretanto, os níveis plasmáticos têm sido observados variar de 0 a 5  $\mu\text{g/mL}$ . No mesmo estudo, o nível sérico médio de MBL, em indivíduos heterocigotos para a mutação do códon 54 foi de 0,2  $\mu\text{g MBL/mL}$  (variando de 0 a 1,2  $\mu\text{g/mL}$ ) (Garred *et al.*, 1992b). Níveis similares foram também obtidos em outro estudo (Lipscombe *et al.*, 1992).

Esta acentuada variação entre indivíduos com estrutura haplotípica idêntica pode ser, em parte, atribuída à presença de mutações na região promotora (Madsen *et al.*, 1995). Curiosamente, foi demonstrado que o haplótipo LX tem um efeito dominante nos níveis de MBL e, conseqüentemente, indivíduos homocigotos com haplótipo LXA mostraram um nível médio de MBL circulante comparável àquele do genótipo com duas mutações estruturais (Steffensen *et al.*, 2000), embora Garred *et al.* (1999b) não tenham encontrado isso em estudos anteriores. Devemos notar que, levando-se em conta todos os alótipos, há ainda uma variação considerável (mais de seis vezes) entre indivíduos com genótipos idênticos (Steffensen *et al.*, 2000). Isto corrobora a diferença interindividual de 2,5 vezes observada em camundongos de mesma linhagem (Liu *et al.*, 2001).

O termo utilizado, como “deficiência de MBL”, originalmente se refere à concentração muito baixa de MBL para opsonizar leveduras num ensaio funcional. Este nível foi relatado em 5-10% de adultos saudáveis e corresponde aos níveis gravimétricos de  $<0.1\mu\text{g/mL}$  (Madsen *et al.*, 1994). A deficiência tem

sido definida geneticamente como posse de alótipos associados aos baixos níveis de MBL. Esta definição aplica-se a aproximadamente, 40% da população e corresponde a menos de 0.6 µg/mL (Kilpatrick, 2002).

A MBL, além de ser uma proteína do sistema imune inato, possui a característica de um elemento de resposta inflamatória de fase aguda, semelhante a proteína C-reativa que também é uma proteína sintetizada pelas células do fígado e que se eleva à medida que o processo inflamatório se torna mais intenso (Ezekowitz *et al.*, 1989, Taylor *et al.*, 1989). Em concordância, o nível de MBL circulante foi descoberto aumentar de 1,5 a 3 vezes em pacientes que passaram por uma cirurgia e em pacientes que sofriam de malária (Thiel *et al.*, 1992). Da mesma forma, os níveis de MBL em camundongos, que receberam injeção intraperitoneal de Lipopolissacarídeo ou de caseína, mostraram um aumento plasmático de mais de 2 vezes (Lui *et al.*, 2001). Em comparação com a resposta de fase aguda da proteína C-reativa, o aumento dos níveis de MBL detectados em ambos os estudos designa a MBL como reagente fraco de fase aguda. Deve ser notado que o aumento da MBL detectada é pequeno, quando comparado com a variação de 1000 vezes encontrada entre indivíduos.

#### **1.2.5. Proteínas Associadas à MBL**

A análise inicial da afinidade da MBL purificada, a partir de soro de humanos, revelou a presença de uma proteína associada à MBL (referida como P100 em camundongos) (Matsushita e Fujita, 1992, Takada *et al.*, 1993). Posteriormente, uma outra protease serina associada à MBL, chamada de MASP-

2, foi isolada (Thiel *et al.*, 1997), assim como uma proteína de menor peso molecular (19 kDa) denominada de proteína 19 kDa associada à MBL (Map19) (Stover *et al.*, 1999) ou peptídeo menor associado à MBL (sMAP) (Takahashi *et al.*, 1999). A complexidade do primeiro componente da via MBL, na ativação do complemento, foi salientada posteriormente quando uma terceira protease serina (MASP-3) foi caracterizada (Dahl *et al.*, 2001).

A estrutura geral das MASP se assemelha a composição do domínio catalítico de dois elementos da via clássica do sistema complemento, C1r e C1s (Thiel *et al.*, 1997). Os membros da família das MASPs consistem em seis domínios: um domínio semelhante aos subcomponentes C1r/C1s do complemento, denominado domínio CUB N-terminal (CUB-I), um domínio tipo fator de crescimento epidermal (EGF), seguido de um segundo domínio CUB (CUB-II), dois domínios de proteína de controle de complemento (CCP) também conhecidos como repetições consenso curtas (SCRs) e um domínio de protease de serina C-terminal (Takayama *et al.*, 1994).

Embora semelhantes na arquitetura do domínio, Endo *et al.* (1996) sugeriram a presença de duas linhagens diferentes de MASP em vertebrados, o tipo TCN e o tipo AGY. O primeiro grupo contém aquelas MASP, que possuem o sítio de serina ativo codificado por um códon, o TCN (onde N pode ser qualquer base nitrogenada), em um domínio de protease de serina codificado por uma divisão de éxon e uma alça de histidina (uma característica estrutural de proteases de serina primitivas denotando uma ligação dissulfídrica intra-molecular entre os resíduos de cisteína em cada lado do sítio ativo do resíduo de histidina). A MASP-1 humana pertence ao tipo TCN. O outro grupo tem um sítio ativo de serina

codificado por um códon AGY (Y denota os nucleotídeos T ou C), em único éxon codificando o domínio de protease de serina e a carência de cisteína envolvida na formação da alça de histidina. Este grupo circunda as MASP-2 e -3 humana e também a C1r e C1s da via clássica do sistema complemento.

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

Baseado na similaridade estrutural entre o componente C1q do complemento e a MBL, foi sugerido que a MBL poderia ligar-se e ativar C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> da via clássica (Ikeda *et al.*, 1987). Usando diferentes sistemas *in vitro*, foi mostrado que a MBL humana purificada poderia ligar e facilitar a ativação de C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> (Lu *et al.*, 1990; Ohta *et al.*, 1990). Entretanto, análises posteriores de preparações de MBL de humanos e de camundongos revelaram a presença de uma protease serina específica, que necessita de um substrato específico, tal como a C1s (Matsushita & Fujita, 1992; Ji *et al.*, 1993). Thiel *et al.* (2000) ao analisarem soro total, estabeleceram que a MBL circulava complexada com suas proteases específicas (MASP), enquanto que C1r e C1s encontravam-se associados somente à C1q.

Matsushita & Fujita (1995) mostraram que a MASP humana também poderia clivar C3, quando associada à MBL. Com a identificação da MASP-2, foi revelado que o C4 é clivado por ação da MASP-2 e não da MASP-1 (prévia MASP) (Thiel *et al.*, 1997). Estudos posteriores realizados com MASP-2 humana recombinante, expressa em células mamárias, mostraram claramente que MASP-

2 cliva C4 e C2, deste modo gerando a C3-convertase da via clássica, C4b2a (Vorup-Jensen *et al.*, 2000).

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

Posteriormente, uma terceira protease de serina associada à MBL (MASP-3) foi caracterizada (Dahl *et al.*, 2001). A MASP-3 compartilha o domínio de organização com outros membros da família tipo MASP de proteases de serina. A atividade fisiológica da MASP-3 permanece não determinada.

Quando a MBL foi analisada por *Western blot* utilizando um anticorpo contra um peptídeo representando os aminoácidos 19 N-terminal da MASP, uma banda de 20 kDa foi detectada (Thiel *et al.*, 1997). Isto foi inicialmente interpretado como uma forma truncada da MASP-2. Com a análise do gene codificador da MASP-2, tornou-se claro que a banda de 20 kDa, observada por Thiel *et al.* (1997) era uma proteína traduzida a partir de mRNA específico. Esta proteína é agora conhecida como Map19 (Stover *et al.*, 1999) ou sMAP (Takahashi *et al.*, 1999).

A MASP-2 e a Map19 são produtos do mesmo gene. Por causa do *splicing* alternativo, os primeiros aminoácidos da MASP-2 e Map19 (compreendendo o domínio CUB-1 e o domínio tipo-EGF) são idênticos. Um éxon separado codifica quatro aminoácidos C-terminal ímpares (EQSL) da Map19. Até o presente momento, nenhum papel fisiológico da Map19 foi relatado. De acordo com resultados, Takahashi *et al.* (1999) relataram que a Map19/ sMAP é co-

purificada com a MASP-1 na ausência de cálcio. Em analogia com C1r e C1s, onde os domínios CUB-I/EGF N-terminal estão envolvidos na formação cálcio dependente do tetrâmero C1r<sub>2</sub> e C1s<sub>2</sub> e também na interação com C1q, foi sugerido que o domínio CUB-I/ EGF do sMAP/Map19 pode mediar uma possível interação cálcio dependente entre MASP-1 e MBL (Takahashi *et al.*, 1999). É também sugerido que a Map19 pode ter a função regulatória na via do MBL.

### **1.2.6 Ativação do Sistema Complemento Mediada pela MBL**

O sistema complemento compreende um grupo de enzimas e de proteínas não enzimáticas que são essenciais para a operação da resposta imune inata e adaptativa.

Existem três diferentes vias de ativação do complemento: (i) via clássica, iniciada pelo complexo antígeno-anticorpo; (ii) a via alternativa, iniciada pela interferência de componentes regulatórios do complemento na estrutura da superfície microbiana e (iii) a via da lectina que é mediada pelo ligamento da MBL a carboidratos (Gadjeva *et al.*, 2001; Figura 6).

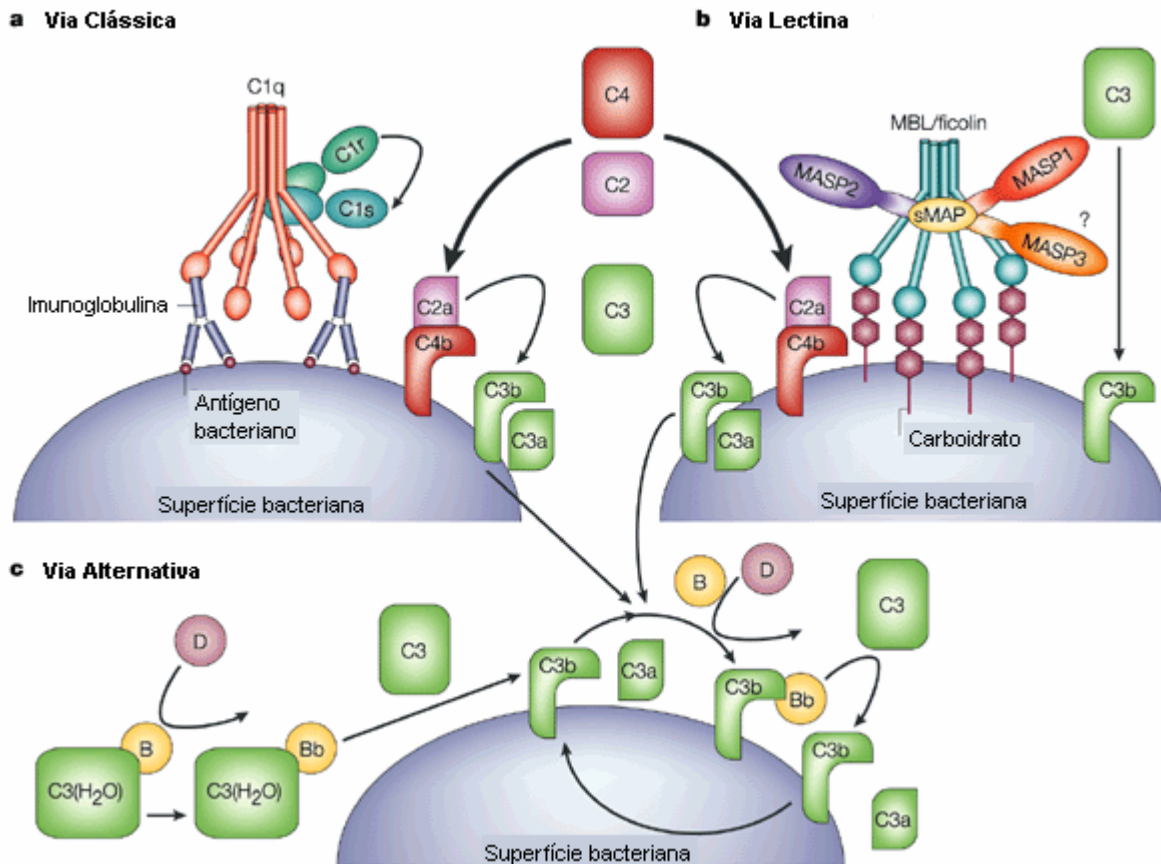


Figura 6. Vias de ativação do complemento: (a) via clássica, (b) via MBL e (c) via alternativa (Adaptado de Fujita & Matsushita, 2002)

Super *et al.* (1989) mostraram que a capacidade do soro para depósito de componentes C3b e C4b sobre uma superfície coberta de manose estava correlacionada com os níveis de MBL na circulação. O defeito de opsonização em soro deficiente de MBL foi, subseqüentemente, associado à mutação no códon 54 (Sumiya *et al.*, 1991). Lipscombe *et al.* (1995) mostraram que indivíduos homocigotos para as mutações estruturais produziram pequenas quantidades de MBL com um peso molecular abaixo da MBL do tipo selvagem. Indivíduos heterocigotos produziram primariamente MBL de alto peso molecular

mas, também, algumas moléculas de baixo peso molecular. Diversos estudos têm indicado que a capacidade da MBL em ativar o sistema complemento é altamente dependente da forma oligomérica (Ikeda *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1990; Yokota *et al.*, 1995). Portanto, a MBL de alto peso molecular com as subunidades formando estruturas na forma tetramérica e hexamérica, foi notada ser capaz de ativar o complemento, enquanto que a MBL de baixo peso molecular não poderia ativar.

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

Super *et al.* (1992) perceberam que a MBL humana expressando a mutação no códon 54 (alótipo B) em uma linhagem celular de hibridoma de camundongo, não poderia mediar a ativação do C4 e do C3. Uma explicação plausível para este defeito foi a de que as MASPs purificadas não podiam se associar a rMBL (recombinante) portadora da mutação no códon 54 (Matsushita *et al.*, 1995). Estas observações foram interpretadas como indicadores de que o sítio de interação da MASP à MBL pudesse ser mapeado na quinta repetição de colágeno (contendo o aminoácido 54) ou que a mutação pudesse romper um sítio de interação distal. Desta forma, isto simplesmente refletiria um fracasso na formação de oligômeros estáveis, uma vez que foi observado que a variante B

(rMBL) produzira oligômeros aos quais eram mais facilmente dissociados do que a rMBL tipo selvagem.

Wallis & Cheng (1999) introduziram as três mutações estruturais, da MBL humana em MBL-A de ratos recombinantes. A análise da mutação do códon 52 (Arg→Cys) revelou que a formação do oligômero foi rompida como resultado de pontes dissulfídricas aberrantes, geradas como consequência de uma cisteína extra. Análises indicam que essa MBL mutante, circula principalmente na forma de monômeros de unidade estrutural. Assim, a perda da capacidade de ativação do complemento deste mutante ocorre provavelmente devido à falha na formação dos oligômeros maiores.

Quando as mutações nos códons 54 e 57 foram introduzidas em MBL-A de ratos recombinantes, a análise GPC revelou apenas uma ligeira diminuição nas formas oligoméricas de maior peso molecular e um aumento do número das formas oligoméricas de baixo peso molecular. Posteriormente, a análise deste material indicou que o padrão de pontes dissulfídricas na região N-terminal havia sido alterado. Foi especulado que o padrão alterado de pontes dissulfídricas, poderia ter rompido o sítio de interação com a MASP, o qual foi sugerido estar localizado na região N-terminal rica em cisteína e na primeira metade do domínio de colágeno (Wallis & Drickamer, 1999). Estes achados corroboram a observação de que a MBL humana com a mutação no códon 54, não é capaz de se associar com MASP humana purificada (Matsushita *et al.*, 1995).

Considerando o resultado de outros estudos, as três mutações estruturais encontradas na MBL humana levam a uma ativação defeituosa do sistema complemento, como consequência tanto da distribuição alterada de oligômeros, quanto da incapacidade de se associar às proteases serinas, incluindo a unidade catalítica do complexo (Petersen *et al.*, 2001).

### 1.3 A VIA DA MBL E A ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

Desde o primeiro trabalho de Super *et al.* (1989), que mostrou a relação entre a ocorrência de infecções recorrentes e os baixos níveis de MBL, um grande número de artigos foram publicados a respeito da associação entre a deficiência de MBL e o aumento de susceptibilidade a várias infecções, assim como às doenças auto-imunes (Turner, 1998; Turner & Hamvas 2000). Foi mostrado que 90% dos indivíduos com deficiência de MBL não adquirem infecções repetidas. Isto é, provavelmente, devido à redundância do sistema complemento. Portanto, especula-se que a manifestação fenotípica da deficiência de MBL só é relevante, quando combinada com outra imunodeficiência humoral, que pode ser adquirida ou geneticamente determinada. Em defesa desta hipótese, Aittoniemi *et al.* (1998) encontraram que a deficiência de MBL em crianças com infecções recorrentes, estava associada à deficiência das subclasses de IgG.

Até o presente momento, a correlação entre a deficiência de MBL e a susceptibilidade à infecção tem sido avaliada a partir de um nível arbitrário para a deficiência, geralmente caracterizado pelos baixos níveis de MBL detectada pelos testes usados. Outros trabalhos avaliam a frequência dos alelos variante da

MBL em estudos de caso controle (Garred *et al.*, 1997c). Entretanto, esta aproximação é difícil de ser feita, devido a grande variação do nível de MBL encontrado entre indivíduos de genótipos idênticos (Steffensen *et al.*, 2000).

Em 1995, Garred *et al.* publicaram os resultados de um estudo em 228 pacientes com suspeita de imunodeficiência. Quando o perfil genotípico para MBL nestes pacientes foi analisado, encontrou-se uma freqüência aumentada de indivíduos homozigotos para as mutações estruturais (8.3% em pacientes contra 0.8% um grupo de controle), não havendo aumento na freqüência de indivíduos heterozigotos entre os pacientes quando comparado ao grupo controle.

Summerfield *et al.* (1997) compararam o perfil genético para MBL em 345 crianças com infecções hospitalares repetidas e em 272 crianças consultadas por outras razões. Os resultados demonstraram uma freqüência mais elevada de crianças heterozigotas (133/345 contra 60/272) ou homozigotas (146/345 contra 64/272) para os alelos mutantes da MBL no grupo de pacientes infectados, concluindo que há um aumento significativo na susceptibilidade a doenças infecciosas em crianças heterozigotas e homozigotas para os alelos mutantes da MBL.

A importância dos mecanismos de defesa mediados pela MBL em pacientes com imunodeficiência adquirida, foi recentemente notada, quando foi descoberto que a deficiência de MBL estava associada à ocorrência de infecções severas após quimioterapia (Peterslund *et al.*, 2001).

Diversos estudos têm mostrado que a MBL se liga a uma ampla variedade de microrganismos (Neth *et al.*, 2000; Bathum *et al.*, 2005), tais como:

*Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e entre outros.

Sendo que alguns microrganismos apresentam substratos ideais para ligação da MBL e subsequente ativação do complemento. Num estudo feito por Kuipers *et al.* 2003, foi identificado que os níveis de fixação da MBL com diferentes microrganismos, podem variar desde níveis de forte avidéz, como no caso da *N. meningitidis*, passando por níveis de baixa avidéz como no exemplo da *Saccharomyces cerevisiae*, que necessita de uma grande concentração para ativação, até *Enterococcus faecalis* que não possui qualquer poder de avidéz ou ativação.

Devido à alta frequência de alelos variantes de MBL em diferentes populações, foi especulado se a deficiência de MBL poderia conferir algum grau de proteção contra certas doenças infecciosas. Quando Garred *et al.* (1992a) analisaram o nível de MBL em 56 africanos do Quênia, descobriram que dez indivíduos tinham níveis de MBL abaixo do limite de detecção do teste. Baseado nesta elevada frequência de deficiência de MBL, os autores sugeriram que os baixos níveis circulantes de MBL poderiam proteger contra infecções por microrganismos intracelulares que exibem ligantes para MBL em sua superfície.

Em apoio ao efeito protetor de deficiência de MBL, foi observado que etíopes infectados com o *Mycobacterium leprae* tinham um nível significativamente mais elevado de MBL do que os controles não infectados (Garred *et al.*, 1994). Subseqüentemente, foi demonstrado que indivíduos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* tinham um nível de MBL mais elevado do que os controles sadios (Garred *et al.*, 1997b). Outros estudos têm apoiado a hipótese de

um possível papel protetor de alguns alelos do gene *MBL* na infecção por microrganismos intracelulares (Bellamy *et al.*, 1998; Hoal-Van Helden *et al.*, 1999).

Além da superfície de bactérias, estudos mostram que a MBL liga-se também a parasitas, tais como: *Trypanosoma cruzi* (Kahn *et al.*, 1996), *Schistosoma mansoni* (Klabunde *et al.*, 2000). A presença da MBL na superfície de um parasita pode permitir a captação celular tanto pela via direta do receptor MBL, quanto por receptores para fragmentos do complemento depositados no parasita como resultado da ativação do complemento pela via da MBL (Garred *et al.*, 1994).

Kelly *et al.* (2000) evidenciaram que indivíduos homocigotos para mutações estruturais no códon 54 do éxon 1 do gene MBL apresentavam um risco aumentado para criptosporidiose, tendo sido encontrada uma associação dependente da concentração da MBL com a presença de esporozoítas. O risco aumentado de criptosporidiose, na deficiência da MBL, parece incluir os pacientes com AIDS. O funcionamento supostamente ocorrer por ativação do complemento em esporozoítas, mediada por MBL.

Os protozários também estão incluídos na ampla diversidade de microrganismo que se ligam a MBL, dentre os muitos, estão: a *Leishmania major*, a *Leishmania mexicana* e *Plasmodium falciparum* (Garred *et al.*, 1994). Num estudo feito por Klabunde *et al.*, 2002, investigou-se que a interação entre a MBL e as proteínas de eritrócitos infectados com o *P. falciparum*, mostrou que apesar da MBL se ligar a estas proteínas, não foi possível inibir o seu crescimento.

A manose como um dos principais componentes da parede celular dos fungos, promove uma alta avidéz da MBL à *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. Em indivíduos com aspergilose pulmonar necrozante crônica, que é uma rara infecção progressiva vista em indivíduos sem uma imunodeficiência reconhecida, tem se observado uma associação desta infecção com a presença do polimorfismo do gene MBL, assim como em mutações em genes relacionados a outras colectinas, como as proteínas sulfatantes A e D do pulmão (Crosdale *et al.*, 2001).

Em relação às infecções virais, diversos estudos têm relatado uma progressão da hepatite crônica B e C associada à insuficiência da MBL, e um aumento na taxa de sobrevivência quando relacionados à pacientes com o haplótipo HH da região promotora, particularmente, em estudos envolvendo pacientes asiáticos (Sasaki *et al.*, 2000; Hakozaki *et al.*, 2002).

#### 1.4 A AÇÃO DA MBL NA INFECÇÃO PELO HIV-1

Uma possível correlação entre a infecção pelo HIV-1 e a MBL foi objeto de vários estudos. Foi descoberto inicialmente, dentro de um modelo *in vitro*, que a infecção de linfócitos TCD4<sup>+</sup> pelo HIV-1 poderia ser inibida parcialmente (25%) por concentração fisiológica da MBL (1µg/mL), enquanto que 100% de inibição foi vista em concentrações de 50 µg/mL (Ezekowitz *et al.*, 1989). Utilizando um ensaio em placa, estes autores mostraram que a glicoproteína do envelope do HIV-1, a gp120, contém em sua estrutura oligossacarídeos com elevada concentração de manose, que interagem com a MBL. Esta interação foi confirmada por Haurum *et al.* (1993) que também

mostraram que o sistema complemento podia ser ativado pela ligação da gp110 (HIV-2) e da gp120 (HIV-1) à MBL. As implicações deste achado são duas: (i) a deposição do complemento na superfície do HIV poderia promover a eliminação do vírus, mas por outro lado, poderia mediar também, (ii) uma adsorção do vírus, independente de CD4, em células que expressam receptores de complemento.

Durante brotamento, partículas do HIV-1 atravessam a membrana da célula e recebem em sua superfície não somente as gp120 e gp41, mas também, inúmeras proteínas da célula hospedeira como o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I e o MHC de classe II e moléculas de adesão (Fortir *et al.*, 1998). Muitas dessas proteínas derivadas da célula hospedeira são glicosiladas contendo elevada concentração de glicanos de manose que promovem uma dificuldade a mais no reconhecimento e na resposta de anticorpos, por outro lado fornecem potentes sítios de ataque através do sistema imune inato com a lectina do tipo C (MBL) (Hart *et al.*, 2002). A gp120 por ser altamente glicosilada, com aproximadamente 50% da massa molecular composta de carboidratos, possui inúmeros terminais de ligação de manose, nos quais são preservados os sítios de glicosilação em diferentes cepas de HIV-1 isoladas, mesmo sendo uma região hipervariável como certas regiões da gp120 (Ji *et al.*, 2005).

Existem várias evidências da inibição dos glicanos ligados a gp120 na resposta imune adaptativa ao HIV-1. Recentemente, um estudo por Wei *et al.* (2003) mostrou que em pacientes infectados com o HIV-1, os anticorpos capazes de neutralizar o vírus surgem, mas o HIV-1 rapidamente evolui para escapar da neutralização, primariamente pela mutação dos sítios ligados à glicosilação.

Estudos com modelos de macacos infectados com o HIV-1 apóiam a idéia de que glicanos são importantes no escape do vírus à neutralização por anticorpos (Reitter *et al.*, 1998).

Num estudo feito por Hart *et al.* (2002), a remoção da alta concentração de manose da gp120 recombinante (rgp120) através da endoglicosidase H (eH) ou endoglicosidase F (eF1) aboliu completamente a ligação da MBL, enquanto que houve um aumento desta ligação com tratamento da neuraminidase (NA), que é responsável pela remoção dos terminais de ácido siálico das cadeias de carboidrato presentes na gp120. Foi sugerido, que a presença dos resíduos terminais de ligação do  $\alpha$  2-3,6,8 do ácido siálico bloqueariam a ligação do complexo glicano ao HIV-1 e que removendo estes resíduos, novos sítios de ligação seriam reconhecidos pela MBL, permitindo uma avidéz de ligação maior por meio dos múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos.

Duas outras proteínas solúveis, a lectina derivada da *Cyanobacterium*, a *cyanovirin*, e o anticorpo monoclonal humano 2G12, têm sido descritas como ligantes aos tipos de glicanos de manose presentes na gp120 do HIV-1 (Bewley & Otero, 2001, Scalan *et al.*, 2002). Estudos de sítios de ligação na gp120 do HIV-1 com a MBL, *cyanovirin* e 2G12, apontam a uma aparente discrepância: todos os três se ligam aos glicanos de manoses da gp120, mas somente a MBL não consegue neutralizar o HIV-1. Isto pode ser explicado pela diferença entre a *cyanovirin* e a MBL, na afinidade e avidéz de interação com os sítios de ligação do HIV-1. Ao contrário da MBL, ambos, 2G12 e *cyanovirin*

contêm apenas dois sítios de ligação que se conectam à gp120 com uma alta afinidade, diferente da molécula de MBL que apresenta vários sítios de ligação com baixa afinidade (Chang & Bewley, 2002, Ying *et al.* 2004).

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

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

Quando Nielsen *et al.* (1995) determinaram o nível de MBL circulante em 80 indivíduos infectados pelo HIV, em 10% dos pacientes (8/80) foi detectado baixos níveis de MBL - abaixo do limite de detecção do teste - com uma freqüência significativamente maior que no grupo controle (3/123; 2,4%). Nenhuma correlação foi vista entre o nível de MBL e o tempo de detecção de

anticorpos anti-HIV e o desenvolvimento da AIDS ou o diagnóstico da AIDS por ocorrência de morte. Esta conclusão foi reforçada em um estudo posterior tanto na avaliação do perfil genotípico quanto nos níveis de MBL em pacientes HIV-1 soropositivos (McBride *et al.*, 1998). Um aumento na frequência da deficiência dos níveis de MBL em pacientes HIV-1 soropositivos, também foi encontrado em africanos sub-Saarianos (Garred *et al.*, 1997b) e em húngaros (Prohaszka *et al.*, 1997). Outros estudos não detectaram qualquer aumento significativo da deficiência por MBL em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Senaldi *et al.*, 1999).

Em contraste aos resultados de Nielsen *et al.* (1995), outras publicações concluíram que os indivíduos infectados pelo HIV-1, com baixos níveis de MBL, têm um tempo de sobrevivência significativamente reduzido após do diagnóstico de AIDS (Garred *et al.*, 1997a) ou que o tempo compreendido entre a soroconversão e o desenvolvimento da AIDS e a morte era ligeiramente aumentada (Maas *et al.*, 1998; Amoroso *et al.*, 1999).

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

Por causa da aparente reatividade universal com as cepas do HIV, a MBL representa claramente um importante mecanismo para o reconhecimento

do HIV pelo sistema imune. Entretanto, a influência da MBL na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, na progressão da infecção e no desenvolvimento da síndrome ainda permanece controverso, havendo a necessidade de novos estudos envolvendo o controle de variáveis laboratoriais de indicação do estágio de progressão clínica dos pacientes soropositivos.

## 1.5. OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

**Investigar a associação entre os polimorfismos na região promotora do gene *MBL* e a infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana 1* (HIV-1) e a progressão à SIDA/AIDS.**

### 1.5.2 Objetivos Específicos

**i) Descrever a frequência dos haplótipos na região promotora (-550 e -221) do gene *MBL* na população de pacientes infectados pelo HIV-1;**

ii) Descrever a frequência dos haplótipos na região promotora (-550 e -221) do gene *MBL* em uma população controle de indivíduos não portadores da infecção pelo HIV-1;

iii) Investigar possíveis associações entre a frequência dos haplótipos da região promotora do gene *MBL* e os valores de contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e os valores de carga viral plasmática em pacientes portadores do HIV-1.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. CARACTERIZAÇÃO E COLETA DA AMOSTRA

#### 2.1.1 Pacientes HIV-1 Soropositivos

No presente trabalho foi avaliado o perfil genético de 127 pacientes (88 homens, 39 mulheres) soropositivos para o HIV-1 da população metropolitana da cidade de Belém, cujas amostras de sangue foram coletadas no ano de 2001, com um período de cinco meses, entre a primeira e a segunda coleta, por meio de um sistema de coleta a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante, na Unidade de Referência Especializada de Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais (URE-DIPE). Em seguida as amostras encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para a realização dos testes de Contagem de Células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e de Carga Viral Plasmática, como parte integrante da Rede Nacional de Contagem de Células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e da Rede Nacional de Carga Viral Plasmática, do Ministério da Saúde. As amostras de plasma e de leucócitos (PBMC) foram separadas e congeladas à -20°C até o momento do uso.

Os soros dos indivíduos componentes do grupo paciente tiveram suas amostras previamente testadas na URE-DIPE, para a presença de anticorpos anti-HIV-1, por meio de um ensaio imunoenzimático (*Ortho Diagnostic System Inc., USA*) e confirmadas pelo método de biologia molecular *Western blot*.

Todos os pacientes estavam submetidos ao tratamento anti-retroviral desde a primeira coleta, fornecido pela URE-DIPE e após serem informados sobre o projeto, assinaram um termo de consentimento (anexo).

#### 2.1.2 Pacientes Controles Soronegativos para HIV-1

No presente estudo, foi utilizado como grupo controle amostras de sangue de 97 indivíduos residentes na cidade de Belém (21 homens, 76 mulheres), soronegativos para HIV-1, procedentes do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, onde foram coletadas e posteriormente armazenadas à -20°C no Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

## 2.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS

### 2.2.1 Sorologia

Os soros dos indivíduos componentes do grupo controle foram testados para a presença de anticorpos anti-HIV-1, usando um ensaio imunoenzimático (*Ortho Dianóstico System Inc., USA*) para confirmação da soronegatividade dos pacientes controles.

## 2.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA

A carga viral plasmática nos pacientes soropositivos para o HIV-1 foi determinada pelo método *Nasba*, utilizando o equipamento de leitura *Nuclisens* e o kit de diagnóstico *Nuclisens<sup>TM</sup> Nasba* (*Organon Teknika, Boxtel, Netherland*).

## 2.4 CITOMETRIA

### 2.4.1 Quantificação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>

As amostras de sangue dos pacientes soropositivos para o HIV-1 foram processadas dentro de 4 horas após a coleta e a contagem de células T CD4<sup>+</sup> foi determinada por Citometria de Fluxo (*FacsCount, Becton & Dickinson, USA*) usando o kit de imunomonitoramento da *FacsCount<sup>TM</sup> Reagents* de acordo com o protocolo padrão recomendado pelo fabricante (*Becton Dickinson, USA*).

## 2.5 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.5.1 Extração do DNA

Foi utilizado o método de extração de DNA total a partir de sangue total, de acordo com o protocolo do kit de isolamento de ácido nucléico da *Puregene, Gentra Systems, Inc., USA*. O procedimento seguiu as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

## 2.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase utilizando iniciadores alelo-específicos (SSP-PCR) foi utilizada para a amplificação de três fragmentos da região promotora do gene codificador da MBL (316pb [H-550]/[L-550], 440pb [X-221] e 443pb [Y-221]), a partir do DNA de indivíduos soropositivos para o HIV-1 e de indivíduos controles soronegativos, seguindo protocolo estabelecido por Steffensen *et al.* (2000). As amplificações foram realizadas no equipamento termo-ciclador da *Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk CT.*

### 2.5.2.1 Região Promotora -550 (H/L)

A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 50  $\mu$ L contendo 500 ng de DNA extraído, 225  $\mu$ M de cada dNTP, 5  $\mu$ M de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. O par de iniciadores alelo-específico utilizado para amplificação do alelo H (-550) foi: (H-s) e (H/L-as), enquanto que o par de iniciadores usado na identificação do alelo L (-550) foi: (L-s) e (H/L-as) (Tabela 1).

Tabela 1 - Par de iniciadores alelo-específico utilizado para amplificação do alelo H (-550) e do alelo L (-550) (Steffensen *et al.*, 2000).

Iniciadores alelo-específico	Seqüência especifica dos iniciadores
(H/L-as)	5'-AACAAATGGGACCGTGCATTGC-3'
(H-s)	5'-GCTTACCCAGGAAGCCTGTG-3'

(L-s)

5'-GCTTACCCAGGAAGCCTGTC-3'

---

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, foram efetuados 30 ciclos de: 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 59°C e 45 segundos à 72°C.

### 2.5.2.2 Região Promotora -221 (X/Y)

A reação de amplificação foi realizada, em um volume de 50 µL contendo 500 ng de DNA extraído, 225 µM de cada dNTP, 20 µM de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. O par de iniciadores alelo-específico utilizado para amplificação do alelo X (-221) foi: (Seq-s) e (X-as), enquanto que o par de iniciadores usado na identificação do alelo Y (-221) foi: (Seq-s) e (y-as) (Tabela 2).

Tabela 2 - Par de iniciadores alelo-específico utilizado para amplificação do alelo X (-221) e do alelo Y (-221) (Steffensen *et al.*, 2000).

Iniciadores alelo-específico	Seqüência específica dos iniciadores
(Seq-s)	5'-CCTGCCAGAAAGTAGAGAGG-3'
(Y-as)	5'-CTGGAAGACTATAAACATGCTTTCC-3'
(X-as)	5'-GGAAGACTATAAACATGTTTCG-3'

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, foram efetuados 35 ciclos de: 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 59°C e 45 segundos à 72°C.

Em caso de haver a amplificação de todos os alelos (H,L,X,Y), foi efetuada a amplificação com os iniciadores Y-as (-221) e L-s (-550) ou Y-as (-221) e H-s (-550) para a determinação da configuração estrutural *cis/trans* do haplótipo pesquisado (Tabela 3).

Tabela 3 – Par de iniciadores alelo-específico para deteminação do haplótipo em *cis/trans*.

Iniciadores alelo-específico	Haplótipo
Y-as (-221) e L-s (-550)	LY e HX
Y-as (-221) e H-s (-550)	HY e LX

### 2.5.3 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque - TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na<sub>2</sub> 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 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O cálculo das frequências dos alelos, haplótipos e genótipos da região promotora do gene *MBL* entre os grupos controle e de pacientes HIV-1 soropositivos foi efetuado por meio de contagem direta.

A comparação das frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas entre os grupos de pacientes e de controle foi efetuados por meio do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) utilizando o programa BioEstat 3.0v (Ayres *et al.*, 2003) e o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo programa *Tool for Population Genetic Analyses* (TFPGA) 1.3v (Miller, 1999).

A avaliação da possível associação entre a frequência dos haplótipos e genótipos da região promotora do gene *MBL* e os parâmetros laboratoriais (contagem de células T CD4<sup>+</sup> e a contagem de carga viral plasmática), foi efetuada usando os testes *t Student* e *ANOVA*, por meio do programa BioEstat 3.0v (Ayres, *et al.*, 2003).

### 3. RESULTADOS

A análise das freqüências alélicas na posição -550 da região promotora do gene *MBL* indicou uma maior prevalência da variante alélica L, tanto em indivíduos soronegativos, quanto naqueles soropositivos para o HIV-1, com freqüência de 0,615 e de 0,634, respectivamente. A freqüência do alelo H foi de 0,385 em indivíduos soronegativos e de 0,366 em soropositivos. As diferenças nas freqüências alélicas não mostraram ser estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 1,461$ ;  $p = 0,2682$ ; Tabela 4).

Na posição -221, o alelo Y apresentou-se como o mais freqüente, em ambas as populações. Nos controles soronegativos, sua freqüência foi de 0,844 e nos soropositivos foi de 0,858. Uma baixa prevalência da mutação X foi encontrada em, tanto em pacientes sadios como em pacientes infectados, com freqüência de 0,156 e de 0,142, respectivamente. As distribuições das freqüências alélicas não mostraram diferenças estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 0,183$ ;  $p = 0,7696$ ; Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência alélica nos grupos controles e de pacientes infectados pelo HIV-1.

<b>Locus</b>	<b>Alelos</b>	<b>Controle (n = 192)</b>	<b>Frequência</b>	<b>Pacientes HIV-1 (n=254)</b>	<b>Frequência</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>
-550	H	74	0,385	93	0,366	1,161	0,268
	L	118	0,615	161	0,634		
-221	X	30	0,156	36	0,142	0,183	0,769
	Y	162	0,844	218	0,858		

n = número de cromossomos analisados

O haplótipo LY foi o mais comum, tanto entre os controles, com uma frequência de 0,484, quanto entre os pacientes, com frequência de 0,531, seguido dos haplótipos HY (0,360 nos controles e 0,327 nos pacientes) e LX (0,130 nos controles e 0,102 nos pacientes). O haplótipo HX foi o de menor frequência nas duas populações. No grupo controle, apresentou-se com uma frequência de 0,026, enquanto que no grupo paciente foi de 0,040. As diferenças nas frequências haplotípicas observadas nos grupos populacionais não foram estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 2,135$ ;  $p = 0,5449$ ; Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência haplotípica nos grupos controle e de pacientes infectados pelo HIV-1.

<b>Haplótipos</b>	<b>Controle</b>	<b>Frequência</b>	<b>Pacientes HIV-1</b>	<b>Frequência</b>
	<b>n</b>		<b>n</b>	
HY	69	0,360	83	0,327
LY	93	0,484	135	0,531
LX	25	0,130	26	0,102
HX	5	0,026	10	0,040
Total	192	1,000	254	1,000

$\chi^2 = 2,135$ ;  $p = 0,5449$ ; n = número de cromossomos analisados.

Em relação as possíveis combinações genótípicas entre os haplótipos, foi encontrado um total de nove genótipos, com frequência que variam de 0,010 (LX/HX) a 0,323 (HY/LY) no grupo controle e de 0,008 (LX/HX) a 0,307 (LY/LY) no grupo de pacientes portadores da infecção pelo HIV-1. O genótipo HY/LX foi mais freqüente entre o grupo controle (0,115) do que nos pacientes infectados pelo HIV-1 (0,031). As diferenças nas frequências genótípicas não foram estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 8,676$ ;  $p = 0,3703$ ; Tabela 6).

A estimativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir dos desvios entre as proporções genótípicas observadas e as esperadas, não foi estatisticamente significativa em ambos os loci (-550 e -221) na população

controle ( $p= 0,8336$  e  $p= 0,6943$ ). Entretanto, verificou-se que a população de infectados não se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, visto que as freqüências genóticas esperadas diferiam significativamente das observadas apenas no locus -550 ( $p= 0,0078$ ), evidenciada por um decréscimo na freqüência de indivíduos heterozigotos em detrimento de um aumento na freqüência de indivíduos homozigotos para a variante L. No locus -221 as diferenças nas freqüências genóticas não foram estatisticamente significativas ( $p= 0,7148$ ).

Tabela 6 - Freqüência genótípica nos grupos controle e de pacientes infectados pelo HIV-1.

<b>Genótipos</b>	<b>Controle</b>	<b>Freqüência</b>	<b>Pacientes HIV-1</b>	<b>Freqüência</b>
	<b>n</b>		<b>n</b>	
HY HY	13	0,136	20	0,157
HY LY	31	0,323	35	0,276
HY LX	11	0,115	4	0,031
HY HX	1	0,010	4	0,031
LY LY	25	0,260	39	0,307
LY LX	9	0,094	17	0,134
LY HX	3	0,031	5	0,040
LX LX	2	0,021	2	0,016
LX HX	1	0,010	1	0,008
Total	96	1,000	127	1,000

$\chi^2 = 8,676$ ;  $p = 0,3703$ ; n = número de indivíduos analisados.

A relação entre o número médio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e os haplótipos da região promotora do gene *MBL*, encontrados na população de pacientes infectados pelo HIV-1, está descrita na Tabela 7. Durante a primeira contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a comparação dos pacientes portadores do haplótipo HY, em homo ou em heterozigose (média de 405,0 células/mL) e dos portadores dos haplótipos LY, LX e HX (média de 289,18 células/mL) mostrou diferenças altamente significativas ( $p=0,0045$ ). Cinco meses depois, numa segunda contagem, a comparação dos resultados da contagem nos portadores do HY (média de 444,27 células/mL) e dos demais haplótipos (média de 325,45 células/mL) mostrou, também, uma diferença significativa ( $p=0,0342$ ).

Tabela 7 - Média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY.

Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	HY <sup>m</sup>	s	* <sup>m</sup>	s	Teste <i>t Student</i>	
					<i>t</i>	<i>p</i>
1 <sup>a</sup> contagem	405,0 (n=64)	218,53	289,18 (n=43)	175,66	2,9009	<b>0,0045</b>
2 <sup>a</sup> contagem	444,27 (n=37)	254,01	325,45 (n=31)	186,14	2,1620	0,0342

\* = LY, LX e HX; n = número de indivíduos analisados; m = valores em média aritmética.

A contagem do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes portadores do haplótipos HY em homozigose, em heterozigose e das demais

combinações haplotípicas, está descrita na Tabela 8 e na Figura 7. Durante a primeira contagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a comparação dos valores obtidos dos pacientes portadores do genótipo HY/HY (média de 414,0 células/mL) com aqueles apresentando os demais genótipos, sem a presença do haplótipos HY (média de 289,1 células/mL) mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a comparação entre pacientes portadores do haplótipo HY em heterozigose (média de 392,2 células/mL) com os demais genótipos sem a presença do haplótipos HY, demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na segunda contagem, continuou havendo uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores dos linfócitos nos pacientes portadores do genótipo HY/HY (média de 566,6 células/mL) quando comparado aos valores obtidos dos pacientes apresentando os demais genótipos, sem a presença do haplótipos HY (média de 325,4 células/mL). Da mesma forma, foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das médias de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os pacientes portadores do genótipo HY/HY (média de 566,6 células/mL) e aqueles apresentando o haplótipo HY em heterozigose (média de 404,9 células/mL).

Tabela 8 - Média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY.

Avaliação	HY/HY <sup>m</sup>		HY/* <sup>m</sup>		*/* <sup>m</sup>		ANOVA	
		s		s		s	F	p
1ª contagem	414,0	215,0	392,2	231,5	289,1	175,6	3,255	0,042
	(n=14)		(n=30)		(n=43)			
HY/HY vs. HY/* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05
HY/HY vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			< 0.05
HY/* <sup>m</sup> vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			< 0.05
2ª contagem	566,6	307,5	404,9	226,7	325,4	186,1	4,249	0,018
	(n=9)		(n=28)		(n=31)			
HY/HY vs. HY/* <sup>m</sup>	-		-		-			< 0.05
HY/HY vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			< 0.05
HY/* <sup>m</sup> vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05

\* = LY, LX e HX; n = número de indivíduos analisados; m = valores em média aritmética.

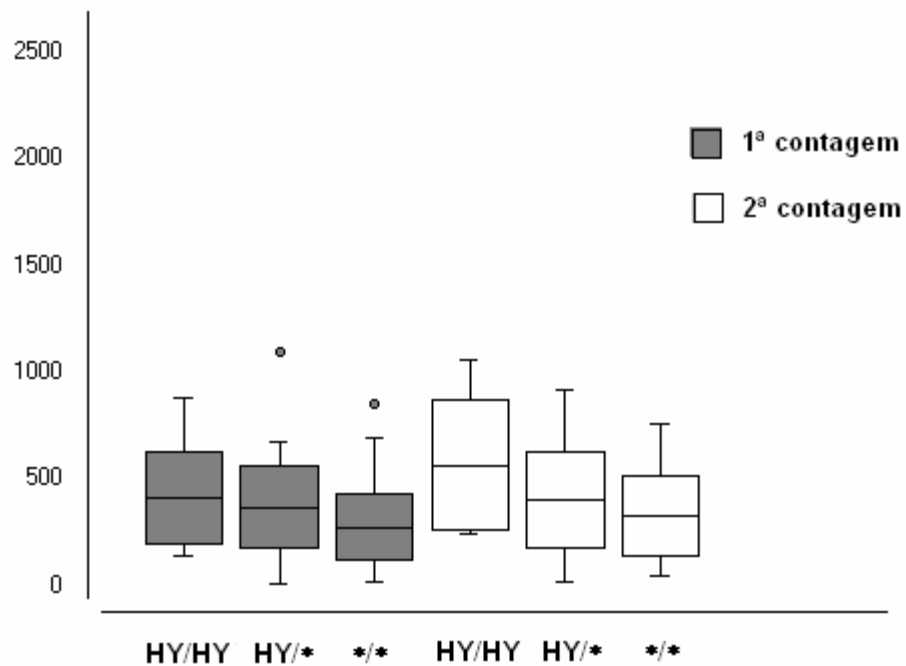


Figura 7 - Análise das médias de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY (\* = LY, LX e HX).

Pacientes portadores do haplótipo HY tiveram um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> da primeira (405,0 células/mL) para a segunda (449,9 células/mL) contagem. Por outro lado, os pacientes portadores dos haplótipos LY, LX e HX não apresentaram uma evolução significativa na média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Tabela 9).

Tabela 9 - Evolução da média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY.

Haplótipo	1 <sup>a</sup> contagem <sup>m</sup>	s	2 <sup>a</sup> contagem <sup>m</sup>	s	ANOVA	
					F	p
HY (n=36)	405,0	218,53	449,9	254,01	4,8556	<b>0,0000</b>
* (n=30)	300,8	175,66	316,9	186,14	0,2420	0,9997

\* = LY, LX e HX; n = número de indivíduos analisados; m = valores em média aritmética.

A quantificação da carga viral plasmática mostrou, em uma primeira avaliação, uma ligeira diferença entre valores obtidos de pacientes portadores do haplótipo HY (32.112,6 cópias de RNA viral/mL; log 3,15), quando comparado ao encontrado nos portadores dos haplótipos LY, LX e HX (76.962,7 cópias de RNA viral/mL; log 3,516).

Da mesma forma, as diferenças foram observadas na segunda avaliação, com médias de 11.543,4 cópias de RNA viral/mL e de 28.610,2 cópias de RNA viral/mL, respectivamente. Essas diferenças não foram estatisticamente significantes em nível de 5% (Tabela 10).

Tabela 10 - Média da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY (dados em logaritmo decimal).

Carga Viral	HY <sup>m</sup>	s	* <sup>m</sup>	s	Teste <i>t Student</i>	
					<i>t</i>	<i>p</i>
1 <sup>a</sup> Avaliação	3,150 (n=41)	1,745	3,516 (n=33)	1,533	-1,2153	0,2281
2 <sup>a</sup> Avaliação	2,852 (n=38)	1,103	3,114 (n=28)	1,126	-0,9473	0,3470

\* = LY, LX e HX; n = número de indivíduos analisados; m = valores em média aritmética.

**A relação entre a quantificação da carga viral plasmática e os haplótipos HY em homozigose, em heterozigose e as demais combinações haplotípicas, encontradas na população de pacientes infectados pelo HIV-1 investigada, está descrita na Tabela 11 e na Figura 8.**

**Na primeira contagem dos níveis virais plasmáticos, a comparação entre os genótipos dos pacientes portadores do haplótipo HY em homozigose (28.358,4 cópias de RNA viral/mL; log 3,024), em heterozigose (33.855,7 de cópias de RNA viral/mL; log 3,209) e dos demais genótipos sem a presença do haplótipos HY (76.962,7 de cópias de RNA viral/mL; log 3,516), não mostrou uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto, houve uma tendência quantitativa nos valores da carga viral plasmática, em baixos, médios e altos níveis de cópias de RNA viral/mL de acordo com a presença do haplótipo HY, como mostrado na Figura 8. Da mesma forma, na segunda avaliação, a mesma ordem dos níveis foi observada, com uma pequena diminuição nos valores das médias de cópias de RNA viral/mL em todos os genótipos.**

Tabela 11 - Média da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY (dados em logaritmo decimal).

Avaliação	HY/HY <sup>m</sup>		HY/* <sup>m</sup>		*/* <sup>m</sup>		ANOVA	
		s		s		s	F	p
1ª contagem	3,024	1,12	3,209	1,17	3,516	1,53	0,596	0,558
	(n=13)		(n=28)		(n=33)			
HY/HY vs HY/* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05
HY/HY vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05
HY/* <sup>m</sup> vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05
2ª contagem	2,493	0,91	2,980	1,52	3,114	1,12	1,160	0,320
	(n=10)		(n=28)		(n=28)			
HY/HY vs. HY/* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05
HY/HY vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05
HY/* <sup>m</sup> vs. */* <sup>m</sup>	-		-		-			> 0.05

n = número de indivíduos analisados; m = valores em média aritmética.

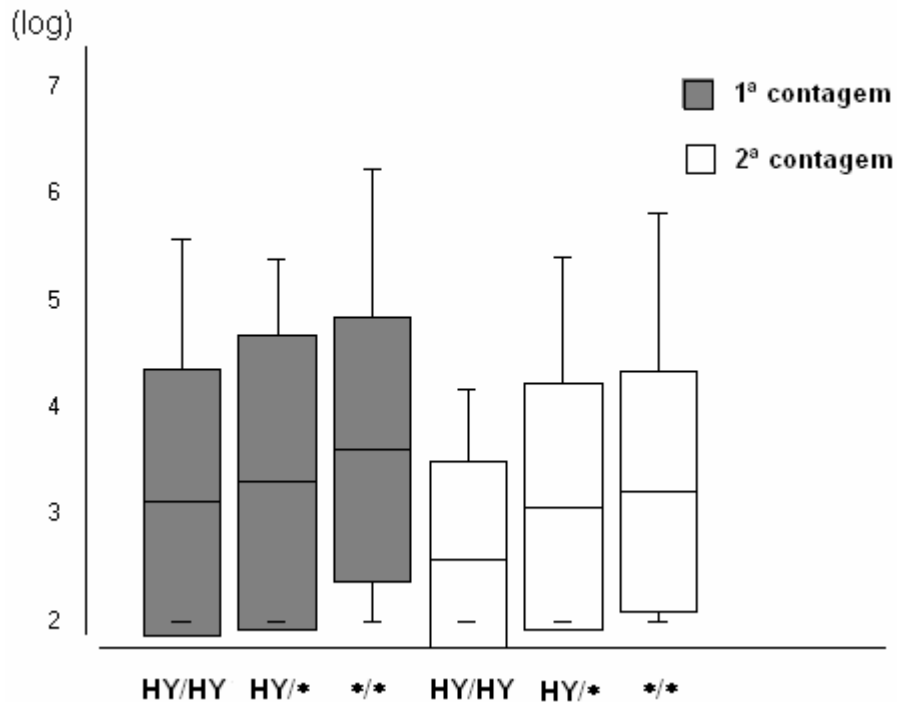


Figura 8 - Análise das médias de Carga Viral Plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores do haplótipo HY em homozigose, em heterozigose e em não portadores do haplótipo HY (\* = LY, LX e HX).

Os pacientes soropositivos para o HIV-1 que apresentaram o haplótipo promotor HY reduziram de forma altamente significativa ( $p < 0,001$ ) a média de carga viral plasmática de 27.482,7 (log 3,154) para 12.085,2 (log 2,904)

cópias de RNA viral/mL. Por sua vez, o grupo de pacientes portadores dos demais haplótipos reduziu, de forma não significativa, a média de carga viral plasmática de 34.516 (log 3,346) para 29.615,6 (log 3,108) cópias de RNA viral/mL (Tabela 12).

Tabela 12 - Evolução da média da carga viral plasmática em pacientes soropositivos (HIV-1) portadores e não portadores do haplótipo HY (dados em logaritmo decimal).

Haplótipo	1ª contagem <sup>m</sup>	s	2ª contagem <sup>m</sup>	s	ANOVA	
					F	p
HY (n=36)	3,154	1,745	2,904	1,103	2,3827	<b>0,0062</b>
* (n=26)	3,346	1,533	3,108	1,126	0,8342	0,6734

\* = LY, LX e HX; m = valores em média aritmética.

#### 4. DISCUSSÃO

A distribuição das formas alélicas da região promotora do gene *MBL* (nas posições -550 e -221) observadas no presente estudo em pacientes portadores da infecção pelo HIV-1 e no grupo controle, apresentaram-se de acordo com o padrão das frequências relatadas em outros estudos, como o de Stefensen *et al.* (2000) em uma população de doadores de sangue dinamarqueses, onde os alelos H, L, Y e X apresentaram-se com frequências de 0,370, 0,630, 0,850 e 0,195, respectivamente. Da mesma forma, frequências similares (H=0,340, L=0,660, Y=0,780 e X=0,220) foram apresentadas por Michington *et al.* (2002) em uma população de doadores de sangue australianos, e por Hakozaki *et al.* (2002) em populações controle (H=0,495, L=0,505, Y=0,851 e X=0,149) e de portadores da infecção pelo HBV, no Japão (H=0,561, L=0,439, Y=0,842 e X=0,125). Isto reflete uma convergência comum dos haplótipos de diversas populações, mesmo sendo de pontos geográficos bem distintos.

Entretanto, uma ligeira diferença foi observada na posição -550 da região promotora do gene *MBL*, o que ocasionou a uma pequena diferença no Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* entre o observado e o esperado. Isto foi evidenciado, pela alta frequência do alelo L na população paciente, o que de certa forma suscitaria a uma predisposição à infecção pelo HIV. Entretanto, segundo Kilpatrick (2002b) a ocorrência de alelos mutantes do gene *MBL* é comum em várias populações, e de forma diferenciada, podem ser considerada uma evidência de uma espécie de vantagem seletiva para o estado heterozigoto de acordo com a população investigada. Uma possibilidade para a ocorrência de variantes alélicas em elevada frequência, poderia ser relacionada ao benefício da

presença destas mutações contra parasitas endêmicos que se utilizariam da via da lectina para infectar as células dos hospedeiros.

Resultados obtidos por Nielsen *et al.* (1995) e Pastinin *et al.* (1998) indicaram que baixos níveis séricos da MBL são significativamente mais freqüentes entre pacientes soropositivos para o HIV-1, quando comparados ao grupo controle. Contudo, nenhuma correlação foi vista entre o nível de MBL e o tempo de detecção de anticorpos anti-HIV e o desenvolvimento da AIDS ou o diagnóstico da AIDS por ocorrência de morte (Nielsen *et al.*, 1995). Esta conclusão foi reforçada em um estudo posterior após a avaliação do perfil genotípico e dos níveis de MBL em pacientes portadores do HIV-1 (McBride *et al.*, 1998).

Um aumento na freqüência da deficiência dos níveis de MBL em pacientes HIV-1 soropositivos, também foi encontrado em africanos sub-Saarianos (Garred *et al.*, 1997b) e em húngaros (Prohaszka *et al.*, 1997). Outros estudos não detectaram qualquer aumento significativo da deficiência por MBL em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Senaldi *et al.*, 1999).

Em contraste aos resultados de Nielsen *et al.* (1995), outras publicações concluíram que os indivíduos infectados pelo HIV-1, com baixos níveis de MBL, têm um tempo de sobrevivência significativamente reduzido após do diagnóstico de AIDS (Garred *et al.*, 1997a) ou que o tempo compreendido entre a soroconversão e o desenvolvimento da AIDS e a morte era ligeiramente aumentada (Maas *et al.*, 1998; Amoroso *et al.*, 1999).

De acordo com o estudo feito Stefensen *et al.* (2000), o polimorfismo da região promotora, assim como as mutações no éxon 1 do gene *MBL*, têm influência direta nos níveis séricos da proteína. No presente estudo, a população

de pacientes portadores do HIV-1 e o grupo controle de indivíduos soronegativos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas. Estes achados sugerem que as mutações na região promotora do gene *MBL* (relacionadas a médios e baixos níveis séricos da proteína) não estejam associadas à susceptibilidade à infecção pelo HIV-1.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, Nielsen *et al.* (1995) e Pastini *et al.* (1998) não encontraram correlações entre as concentrações séricas de MBL e o declínio de células T CD4<sup>+</sup>, em pacientes infectados pelo HIV-1. Entretanto, em nossos resultados, acompanhando a evolução da média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos portadores da infecção, encontramos um aumento significativo dessas células entre os portadores do haplótipo promotor HY, em homo ou heterozigose. Desta forma, sugere-se que o nível normal de MBL circulante possa ser um fator favorável no combate as partículas virais circulantes e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

As altas concentrações de MBL circulante em pacientes infectados pelo HIV-1 viabilizam a ativação do sistema complemento para destruição de partículas virais e a inibição de posteriores infecções, o que pode explicar maiores contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes portadores do haplótipo HY, comparada às dos portadores dos haplótipos LY, LX e HX. Os resultados de Michington *et al.* (2002) também confirmam, que a presença dos haplótipos HY e LY está relacionada a altas concentrações de MBL, e o haplótipo LX está associado a baixas concentrações de MBL circulante. Além disso, foi observada uma tendência de maiores níveis séricos da MBL no haplótipo HY em comparação ao haplótipo LY.

Assim como as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a evolução da carga viral plasmática em pacientes infectados pelo HIV-1, mostrou-se fortemente associada aos polimorfismos na região promotora do gene *MBL*. Pacientes homo ou heterozigotos para o haplótipo HY, reduziram significativamente os índices de viremia plasmática, entre a primeira e segunda contagem, diferindo do grupo de pacientes portadores do haplótipo LY, LX e HX que não reduziram de forma significativa os níveis de carga viral plasmática. Estes resultados são similares aos já encontrados para a mutação estrutural *MBL*\*B do éxon 1 do gene *MBL*, que sugerem fortemente, uma associação desse polimorfismo com os níveis de carga viral plasmática do HIV-1 (Costa, 2004).

Poucos estudos têm sido direcionados na investigação do papel da *MBL* na infecção pelo HIV-1, além do que, os achados até então obtidos são controversos, havendo a necessidade de mais estudos para elucidar esta questão. Entretanto, os resultados aqui apresentados sugerem que o estudo e a identificação de pacientes HIV-1 soropositivos portadores dos polimorfismos LY, LX e HX na região promotora no gene *MBL* são de grande importância para a avaliação do prognóstico da evolução da SIDA/AIDS. Aliado à carga viral e contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a investigação desse polimorfismo pode funcionar como fator adicional, na determinação do início da terapia anti-retroviral, possibilitando, dessa forma, uma maior sobrevida do paciente.

## 5. CONCLUSÕES

(i) A análise da distribuição das freqüências alélicas, haplotípicas e genotípicas da região promotora do gene *MBL* nas populações de pacientes soropositivos para o HIV-1 e de controles soronegativos, não mostrou diferenças estatisticamente significativas, o que sugere a ausência de associação entre o polimorfismo do promotor e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1;

(ii) Os pacientes infectados pelo HIV-1, portadores do haplótipo HY apresentaram uma maior média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação aos pacientes portadores dos haplótipos LY, LX e HX.

(iii) Os pacientes infectados pelo HIV-1, portadores do haplótipo HY apresentaram uma evolução significativa na contagem da média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação aos pacientes portadores dos haplótipos LY, LX e HX.

(iv) Pacientes soropositivos para o HIV-1 e portadores do haplótipo HY apresentaram índices mais baixos de viremia plasmática e uma redução mais significativa da viremia em relação aos haplótipos LY, LX e HX.

(v) Os resultados aqui apresentados sugerem que a presença do haplótipo HY possa ser um fator favorável a eliminação de partículas virais da circulação e, conseqüentemente, diminuição da infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A., H. **Imunologia Celular e Molecular**. São Paulo, Elsevier. 2005. 579p.
- AITTONIEMI, J., BAER, M., SOPPI, E., VESIKARI, T., MIETTINEN, A. Mannan binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. **Archive Diseases Children, 78**: 245-248, 1998.
- ALIZON, M., WAIN-HOBSON, S., MONTAGNIER, L., SONIGO, I. P. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. **Cell, 46**: 63-74, 1986.
- AMOROSO, A., BERRINO, M., BONIOTTO, M., CROVELLA, S., PALOMBA, E., SCARLATTI, G., SERRA, C., TOVO, P.A., VATTA, S. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. **AIDS, 13**: 863-864, 1999.
- AYRES, M., AYRES, J.R., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BIOSTAT: Aplicação estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus, **Sociedade Civil Mamirauá**, 193p, 2003.
- BATHUM, L., HANSEN, H., TEISNER, B., KOCH, C., GARRED, P., RASMUSSEN, K., WANG, P. Association between combined properdin and mannose-binding

lectin deficiency and infection with *Neisseria meningitides*. **Molecular Immunology**: IN PRESS.

BAUER, P.G., BARTH, O. M., PEREIRA, M. S. Endocytosis of the human immunodeficiency virus *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **82**: 449-450, 1987.

BELLAMY, R., RUWENDE, C., MCADAM, K.P., THURSZ, M., SUMIYA, M., SUMMERFIELD, J., GILBERT, S.C., CORRAH, T., KWIATKOWSKI, D., WHITTLE, H.C., HILL, A.V. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. [QJM : monthly journal of the Association of Physicians](#), **91**: 13-18, 1998.

BEWLEY, C.A., OTERO-QUINTERO, S. The potent anti-HIV protein cyanovirin-N contain two novel carbohydrate binding sites that selectively bind to Man(8) DID3 nd Man(9) with nanomolar affinity: Implications for binding to the HIV protein gp120. **Journal of American Chemistry Society**, **123**: 3892-3902, 2001.

BORREGAARD, N., ELBACH, P., GANZ, T., GARRED, P. & SVEJGAARD, A. Innate immunity: from plants to humans. **Immunology today**, **21**: 68-70, 2000.

CHANG, L.C., BEWLEY, C.A. Potent inhibition of HIV-1 fusion by *cyanovirin N*-requires only a single high affinity carbohydrate binding site: Characterization of low affinity carbohydrate binding-site knockout mutants. **Journal of Molecular Biology**, **318**: 1-18, 2002.

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

- COFFIN, J. M., B., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (Eds.). **the general retroviral lifecycle.** VIROLOGY, FIELDS. Disponível em: <http://www.micro.msb.te.ac.uk/335/retroviruses.html>, Lippincott Raven, Philadelphia pp.1768-1848 ed. 3, 1996.
- COSTA, M.R.M. **Estudo da susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e da Progressão da AIDS em associação ao polimorfismo no gene *MBL* (*Mannose-binding lectin*).** Dissertação (Mestrado em em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Belém, Universidade Federal do Pará, 2004.
- CROSDALE, D.J., POULTON, K.V., OLLIVER, W.E., THOMSON, W., DENNING, D.W. Manose-binding lectin gene polymorphism as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergilosis. **Journal of Infectious Disease**, **184**: 653-656, 2001.
- DAHL, M.R., THIEL, S., MATSUSHITA, M., FUJITA, T., WILLIS, A.C., CHRISTENSEN, T., VORUP-JENSEN, T., JENSENIUS, J.C. A new mannan-binding lectin associated serine protease, MASP-3, and its association with distinct complexes of the MBL complement activation pathway. **Immunity**, **15**: 1-10, 2001.
- DEORA, A., RATNER, L. Viral Protein U (Vpu) - mediated enhancement of human Immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of Cellular proliferation. **Journal of Virology**, **75**: 6714-6718, 2001.
- DIAZ, R. S. Genetic diversity of HIV. **Revista de Microbiologia**, **28**: 69-75, 1997.

- DUMESTRE-PERARD, C., PONARD, D., ARLAUD, G.J., MONNIER, N., SIM, R.B., COLOMB, M.G. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin fuction in human plasma. **Molecular Immunology**, **39**: 465-473, 2002.
- ENDO, Y., SATO, T., MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Exon structure of the gene encoding the human mannose-binding protein-associated serine protease light chain: comparison with complement C1r and C1s genes. **International Immunology**, **8**:1355-1358, 1996.
- ESQUEMA** representativo do ciclo de replicação do HIV-1  
<[http://www.flstdHivptc.com/html/Hiv\\_aids.html](http://www.flstdHivptc.com/html/Hiv_aids.html)> Acesso em: 16 julho 2004.
- EZEKOWITZ, R.A., KUHLMAN, M., GROOPMAN, J.E., BYRN, R.A. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. **Journal of Experimental Medicine**, **169**:185-196, 1989.
- FEARON, D.T., LOCKEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, **272**: 50-53, 1996.
- FÖRSTER-WALDL, E., COKOJA, L., FÖSTER, O., MAURER, W. Mannose-binding lectin: comparison of two assays for the quantification of MBL in the serum of pediatric patients. **Journal of Immunological Methods**, **276**: 143-146, 2003.
- FORTIR, J.F., CANTIN, R., TREMBLAY, M.J. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. **Journal of Virology**, **72**: 2105-2112, 1998.

- FUJITA, T., MATSUSHITA, M. Ficolins, a group of complement activating plasma lectins. **The Twentieth International Lectin Meeting (Interlec 2002) 2002. Fukushima Medical University: 960-1295, 2002.**
- FUJITA, T., TAIRA, S., KODAMA, N., MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Mannose-binding protein recognizes glioma cells: in vitro analysis of complement activation on glioma cells via the lectin pathway. **Japanese Journal of Cancer Research, 86: 187-192, 1995.**
- GADJEVA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of the innate immune response. **Current Opinion Immunology, 13: 74-78, 2001.**
- GALLO, R. C. Human Retroviruses: a decade of discovery and link with human disease. **Journal of Infectious Disease, 164: 235-243, 1991.**
- GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F. Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. **Blood, 60: 545-557, 1982.**
- GARRED, P., HARBOE, M., OETTINGER, T., KOCH, C., SVEJGAARD, A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? **European Journal of Immunogenetics, 21: 125-131, 1994.**
- GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN, H.O., KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Molecular Immunology, 40: 73-84, 2003**
- GARRED, P., MADSEN, H.O., BALSLEV, U., HOFMANN, B., PEDERSEN, C., GERSTOFT, J., SVEJGAARD, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannanose binding lectin. **Lancet, 349: 236-240, 1997a.**

- GARRED, P., MADSEN, H.O., HALBERG, P., PETERSEN, J., KRONBORG, G., SVEJGAARD, A., ANDERSEN, V., JACOBSEN, S. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatism**, **42**: 2145-2152, 1999b.
- GARRED, P., MADSEN, H.O., HOFMANN, B., SVEJGAARD, A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. **Lancet**, **346**: 941-943, 1995.
- GARRED, P., MADSEN, H.O., KURTZHALS, J.A., LAMM, L.U., THIEL, S., HEY, A.S., SVEJGAARD, A. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. **European Journal of Immunogenetics**, **19**: 403-412, 1992a.
- GARRED, P., PRESSLER, T., MADSEN, H.O., FREDERIKSEN, B., SVEJGAARD, A., HOIBY, N., SCHWARTZ, M., KOCH, C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, **104**: 431-437, 1999a.
- GARRED, P., RICHTER, C., ANDERSEN, A.B., MADSEN, H.O., MTONI, I., SVEJGAARD, A., SHAO, J. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. **Scandinavian Journal Immunology**, **46**: 204-208, 1997b.
- GARRED, P., THIEL, S., MADSEN, H.O., RYDER, L.P., JENSENIUS, J.C., SVEJGAARD, A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum

- concentrations. **Clinical and Experimental Immunology**, **90**: 517-521, 1992b.
- GELDERBLOM, H. R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. **AIDS**, **5**: 671-678, 1991.
- GERGERFELT, A. S. V., LISKA, V., LI, P.L., MCCLURE, H.M., HORIE, K., NAPPI, F., MONTEFIORI, D.C., PAVLAKIS, G.N., MARTHAS, M.L., RUPRECHT, R.M., FELBER, B.K. Rev-Independent Simian immunodeficiency virus strains are nonpathogenic in neonatal macaques. **Journal of Virology**, **76**: 96-104, 2002.
- GLOSTER, S.E., NEWTON, P., CORNFORTH, D., LIFSON, J., WILLIAMS, I., SHAW, G.M., BORROW, P. Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. **AIDS** **18**: 749 - 755, 2004.
- GREEN, P.J., FEIZI, T., STOLL, M.S., THIEL, S., PRESCOTT, A., MCCONVILLE, M.J. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. **Molecular of Biochemical Parasitology**, **66**: 319-328, 1994.
- GREENE, W. C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, **324**: 308-317, 1991.
- HAKANSSON, K., REID, K.B. Collectin structure: a review. **Protein Science**, **9**: 1607-1617, 2000.
- HAKOZAKI, Y., YOSHIBA, M., SEKIYAMA, K. Manose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. **Liver**, **35**: 29-34, 2002.

- HART, M. L., SAIFUDDIN, M., UEMURA, K., BREMER, E.G., HOOKER, B., KAWASAKI, T., SPEAR, G.T. High Mannose Glycans and Sialic Acid on gp120 Regulate Binding of Mannose-Binding Lectin (MBL) to HIV Type I. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **17**: 1311-1317, 2002.
- HAURUM, J.S., THIEL, S., JONES, I.M., FISCHER, P.B., LAURSEN, S.B., JENSENIUS, J.C. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**, **7**: 1307-1313, 1993.
- HEISE, C.T., NICHOLLS, J.R., LEAMY, C.E., WALLIS, R. Impaired secretion of rat mannose-binding protein resulting from mutations in the collagen-like domain. **Journal of Immunology**, **165**: 1403-1409, 2000.
- HOAL-VAN HELDEN, E.G., EPSTEIN, J., VICTOR, T.C., HON, D., LEWIS, L.A., BEYERS, N., ZURAKOWSKI, D., EZEKOWITZ, A.B., VAN HELDEN, P.D. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. **Pediatrics Research**, **45**: 459-464, 1999.
- HOLMSKOV, U., MALHOTRA, R., SIM, R.B., JENSENIUS, J.C. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. **Immunology Today**, **15**: 67-74, 1994.
- IKEDA, K., SANNOH, T., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T., YAMASHINA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **Journal of Biological Chemistry**, **262**: 7451-7454, 1987.
- JI, X., GEWURS, H., SPEAR, G.T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. **Molecular Immunology**, **42**: 145 - 152, 2005.
- JI, Y.H., FUJITA, T., HATSUSE, H., TAKAHASHI, A., MATSUSHITA, M., KAWAKAMI, M. Activation of the C4 and C2 components of complement by a

- proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. **Journal of Immunological**, **150**: 571-578, 1993.
- JI, Y.H., MATSUSHITA, M., OKADA, H., FUJITA, T., KAWAKAMI, M. The C4 and C2 but not C1 components of complement are responsible for the complement activation triggered by the Ra-reactive factor. **Journal of Immunological**, **141**: 4271-4275, 1988.
- JÜLLIGER, S., LUCKNER, D., MORDMÜLLER, B., MAY, J., WEIERICH, A., LELL, B., LUTY, A., KREMSNER, P.G., KUN, J.F.J. Promoter variants of the human Mannose-binding lectin gene show different binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **275**: 671- 622, 2000.
- KAHN, S.J., WLEKLINSKI, M., EZEKOWITZ, R.A., CODER, D., ARUFFO, A., FARR, A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infection and Immunity**, **64**: 2649-2656, 1996.
- KAMEOKA, M., RONG, L., GOTTE, M., LIANG, C., RUSSELL, R.S., WAINBERG, A. Role for human immunodeficiency virus type 1 Tat protein in suppression of viral reverse transcriptase activity during late stages of viral replication. **Journal of Virology**, **75**: 2675-2683, 2001.
- KELLY, P., JACK, D.L., NAEEM, B., POLLOK, R.C., KLEIN, N.J., TURNER, M.J. FARTHING, M.J. Mannose-binding lectin is a complement of innate mucosal defence against *Cryptosporidium parvum* in AIDS, **Gastroenterology**, **119**: 1236-1242, 2000.
- KHAN, M.A., ABERHAM, C., KAO, S., AKARI, H., GORELICK, R., BOUR, S., STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged

into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA.

**Journal of Virology, 75:** 7252-7265, 2001.

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

**Biochimica et Biophysica Acta 1572:** 401-413, 2002b

KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity.

**Transfusion Medicine, 12:** 335-351, 2002.

KLABUNDE, J., BERGER, J., JENSENIUS, J.C., KLINKERT, M.Q., ZELCK, U.E.,

KREMSNER, P.G., KUN, J.F. Schistosoma mansoni: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms.

**Experimental Parasitology, 95:** 231-239, 2000.

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

KREMSNER, P.G. & KUN, J.F. Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system.

**Parasitology Research, 88:** 113-117, 2002.

KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CJAMARET, S. GRUEST, J., GUETARD,

D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J. D., MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T-4 molecule behaves as the receptor for human retroviral LAV. **Nature, 312:**

767-768, 1984.

KORBER, B., MULDOON, M., THEILER, J., GAO, F., GUPTA, R., LAPEDES, A.,

HAHN, B.H., WOLINSKY, S., BHATTACHARYA, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain. **Science, 288:** 1789-1796, 2000.

KOSTRIKIS, L. G., BAGDADES, E., CAO, Y., ZHANG, L., DIMITRIOU, D., HO, D.

D. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from

- patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. **Journal of Virology**, **69**: 6122-6130, 1995.
- KOWALSKI, M., POTZ, J., BASIRIPOUR, L., DORFMAN, T., GOH, W. C., TERWILLIGER, E., DAYTON, A. ROSEN, C., HASELTINE, W., SODROSKI, J. Functional regions of the envelope protein of human immunodeficiency virus type 1. **Science**, **237**: 1351-1355, 1987.
- KUIPERS, S., AERTS, P.C., DIJK, H.V. Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **36**: 33-39, 2003.
- KURATA, H., CHENG, H.M., KOZUTSUMI, Y., YOKOTA, Y., KAWASAKI, T. Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, **191**:1204-1210, 1993.
- KURITZKES, D.R. HIV pathogenesis and viral markers. **HIV/AIDS Clinical Management 2**: 1-27, 2000.
- LEE, R.T., ICHIKAWA, Y., KAWASAKI, T., DRICKAMER, K., LEE, Y.C. **Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein.** *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 299: **129-136**, 1992.
- LEVY, J. A. HIV and the pathogenesis of AIDS. **American Society for Microbiology**, Washington, DC, p. 9, 1994.
- LIFSON, J. D., FEINBERG, M. R., REYES, G. R., RABIN, L., BASIRIPOUR, B., CHAKBARTI, S., MOSS, B., WONG-STAAAL, F., STEIMER, K. S., ENGLEMAN, E. G. Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. **Nature**, **323**: 725-728, 1986.

- LIPSCOMBE, R.J., SUMIYA, M., HILL, A.V., LAU, Y.L., LEVINSKY, R.J., SUMMERFIELD, J.A., TURNER, M.W., 1992. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Human Molecular Genetics**, **1**: 709-715, 1992.
- LIPSCOMBE, R.J., SUMIYA, M., SUMMERFIELD, J.A., TURNER, M.W. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. **Immunology**, **85**: 660-667, 1995.
- LIU, H., JENSEN, L., HANSEN, S., PETERSEN, S.V., TAKAHASHI, K., EZEKOWITZ, A.B., HANSEN, F.D., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses. **Scandinavian Journal Immunology**, **53**: 489-497, 2001.
- LIU, H-F. Genomic diversity and molecular phylogeny of human and simian T-cell lymphotropic viruses. Katholieke University Leuven, 105p, 1996.
- LOBST, S.T., WORMALD, M.R., WEIS, W.I., DWEK, R.A., DRICKAMER, K. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 15505-15511, 1994.
- LOVELESS, R.W., HOLMSKOV, U., FEIZI, T. Collectin-43 is a serum lectin with a distinct pattern of carbohydrate recognition. **Immunology**, **4**: 651-659, 1995.
- LU, J.H., THIEL, S., WIEDEMANN, H., TIMPL, R., REID, K.B. Binding of the pentamer/ hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates

- the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. **Journal of Immunology**, **144**: 2287-2294, 1990.
- MA, Y., SHIDA, H., KAWASAKI, T. Functional expression of human mannan-binding proteins (MBPs) in human hepatoma cell lines infected by recombinant vaccinia virus: post-translational modification, molecular assembly, and differentiation of serum and liver MBP. **Journal of Biochemical Tokyo**, **122**: 810-818, 1997.
- MAAS, J., RODA HUSMAN, A.M., BROUWER, M., KROL, A., COUTINHO, R., KEET, I., VAN LEEUWEN, R., SCHUITEMAKER, H. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. **AIDS**, **12**: 2275- 2280, 1998.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., KURTZHALS, J.A., LAMM, L.U., RYDER, L.P., THIEL, S., SVEJGAARD, A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, **40**: 37-44, 1994.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J.A.L., LAMM, L.U., RYDER, L.P., SVEJGAARD, A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of Mannan-Biding Protein. **Journal of Immunology**, **155(6)**: 3013-3020, 1995.
- MADSEN, H.O., SATZ, M.L., HOGH, B., SVEJGAARD, A., GARRED, P. Different molecular events result in low protein levels of mannan binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **Journal of Immunology**, **161**: 3169-3175, 1998.

- MATSUSHITA, M., EZEKOWITZ, R.A., FUJITA, T. The Gly-54\_Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. **Biochemistry Journal**, **311**: 1021-1023, 1995.
- MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **Journal of Experience Medical**, **176**: 1497-1502, 1992.
- MATSUSHITA, M., FUJITA, T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. **Immunobiology**, **194**: 443-448, 1995.
- MATSUSHITA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J.C., TERAJ, I., FUJITA, T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectina associated serine protease. **Journal of Immunology**, **165**: 2637-2642, 2000.
- MCBRIDE, M.O., FISCHER, P.B., SUMIYA, M., MCCLURE, M.O., TURNER, M.W., SKINNER, C.J., WEBER, J.N., SUMMERFIELD, J.A. Mannose-binding protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. **International Journal of STD & AIDS**, **9**: 683-688,1998.
- MICHINGTON, R. M., DEAN, M. M., CLARK, T.R., HEALEY, S., MULLIGHAN. Analysis of Realtionship between Mannose-Binding Lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. **Journal of Immunology**, **56**: 630-641, 2002.
- MILLER, M. P. Tools for population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3v. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. **Department of Biological Sciences Nothern Arizona University**. 1999

MYERS, G., BERZOFKY, J. A., KORBER, B., SMITH, R. F., PAVLAKIS, G. N.

In: **Human Retroviruses and AIDS 1992: a compilation and analysis of acid nucleic and aminoacid sequences**. Los Alamos, NM, Los Alamos National Laboratory, 1993.

NAITO, H., MA, Y., UEMURA, K., ARANO, Y., KAWASAKI, T. Metabolic properties of normal and mutant mannan-binding proteins in mouse plasma.

[Biochemical and Biophysical Research Communications](#), **256**: 231-234, 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.

NIELSEN, S.L., ANDERSEN, P.L., KOCH, C., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. The

level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. [Clinical and Experimental Immunology](#), **100**: 219-222, 1995.

OHTA, M., OKADA, M., YAMASHINA, I., KAWASAKI, T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding

protein. **Journal Biological Chemical**, **265**: 1980-1984, 1990.

OKA, S., IKEDA, K., KAWASAKI, T., YAMASHINA, I. Isolation and characterization of two distinct mannan-binding proteins from rat serum.

**Archives Biochemistry and Biophysics**, **260** : 257-266, 1988.

PANGANIBAN, A., FIORE, D. Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription. **Science**, **241**: 1064-1069, 1988.

- PASTINI, T., LIITSOLA, K., NIINI, P., ALMINEN, M., SYVÄNEN, A.C. Contribution of the CCR5 and MBL genes susceptibility to HIV type I infection in the Finnish population. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **14**: 171 -175, 1998.
- PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, **38**: 133-149, 2001.
- PETERSLUND, N.A., KOCH, C., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. Association between deficiency of mannan-binding lectin and severe infections after chemotherapy. **Lancet**, **358**: 637-638, 2001.
- POIGNARD, P., MOULARD, M., GOLEZ, E., VIVONA, V., FRANTI, M., VENTURINI, S., WANG, M., PARREN, P.W., BURTON, D.R. Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies. **Journal of Virology**, **77**: 353-365, 2003.
- PROHASZKA, Z., THIEL, S., UJHELYI, E., SZLAVIK, J., BANHEGYI, D., FUST, G. Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of disease. **Immunology Letters**, **58**: 171-175, 1997.
- RATNER, L., GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F. HTLV-III, LAV, ARV are variants of the same AIDS virus. **Nature**, **313**: 636-637, 1985.
- REITTER, J.N., MEANS, R.E., DESOISERS, R.C. A role for carbohydrate in immune evasion in AIDS. **Nature Medicine**, **4**: 378-684, 1998.
- ROBEY, W. G., SAFAI, B., OROZLAN, S., ARTHUR, L. O., GONDA, M. A., GALLO, R. C., FISCHINGER, P. J. Characterization of envelope and core

- structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. **Science**, **228**: 593-595, 1985.
- RUGONFALVI-KISS, S., ENDRESZ, V., MADSEN, H.O., BURIAN, K., DUBA, J., PROHASZKA Z., KARADI, I., ROMICS, L., GÖNCZÖL, E., FÜST, G., GARRED, P. Association of *Chlamydia pneumoniae* with Coronary Artery Disease and its progression is dependent on the modifying effect of Mannose-Binding Lectin. **Circulation**, **106**: 1071-1076, 2002
- SASAKI, K., TSUTSUMI, A., WAKAMIYA, N. Manose-binding lectin polymorphism in patients with hepatitis C virus infection. **Scand Journal of Gastroenterology**, **35**: 960-965, 2000.
- SASTRY, K., HERMAN, G.A., DAY, L., DEIGNAN, E., BRUNS, G., MORTON, C.C., EZEKOWITZ, R.A. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **Journal of Experimental Medicine**, **170**: 1175-1189, 1989.
- SASTRY, K., ZAHEDI, K., LELIAS, J.M., WHITEHEAD, A.S., EZEKOWITZ, R.A. Molecular characterization of the mouse mannose binding proteins. The mannose-binding protein A but not C is an acute phase reactant. **Journal of Immunology**, **147**: 692-697, 1991.
- SAWAYA, B.E., KHALILI, K., GORDON, J., TAUBES, R., AMINI, S. Cooperative interaction between HIV-1 regulatory protein Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. **The Journal of Biological Chemistry**, **275**: 35209 - 35214, 2000.

- SCALAN, C.N., PANTOPHLET, R., WORMALD, M.R., OLMANN SAPHIRE, E., STANFIELD, R., WILSON, I.A., KATINGER, H., DEWEK, A., RUDD, P.M., BUTTON, D.R. The broadly neutralizing anti-immunodeficiency virus type I antibody 2G12 recognize a cluster of alpha 1→2 mannose residues on the outer face of gp120. **Journal of Virology**, **76**: 7306-7321, 2002.
- SENALDI, G., DAVIES, E.T., MAHALINGAM, M., LU, J., POZNIAK, A., PEAKMAN, M., REID, K.B., VERGANI, D. Circulating levels of mannose binding protein in human immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infection**, **31**: 145-148, 1999.
- SHERIFF, S., CHANG, C.Y., EZEKOWITZ, R.A. Human mannose binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. **Nature Structural Biology**, **1**: 789-794, 1994.
- SMITH, M.W., CARRINGTON, M., WINKLER, C., LOMB, D., DEAN, M., HUTTLEY, G., O'BRIEN, S.J. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. **Nature Medicine**, **3**: 1052-1053, 1997.
- 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 Immunology Methods**, **241**: 33-42, 2000.
- STOVER, C.M., THIEL, S., THELEN, M., LYNCH, N.J., VORUP JENSEN, T., JENSENIUS, J.C., SCHWAEBLE, W.J. 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.
- SULLIVAN, K.E., WOOTEN, C., GOLDMAN, D., PETRI, M. Mannose binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumathoids**, **39**: 2046-2051, 1996.
- SUMIYA, M., SUPER, M., TABONA, P., LEVINSKY, R.J., ARAI, T., TURNER, M.W., SUMMERFIELD, J.A. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, **337**: 1569-1570, 1991.
- SUMMERFIELD, J.A., SUMIYA, M., LEVIN, M., TURNER, M.W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **British Medical Association**, **314**:1229-1232, 1997.
- SUPER, M., GILLIES, S.D., FOLEY, S., SASTRY, K., SCHWEINLE, J.E., SILVERMAN, V.J., EZEKOWITZ, R.A. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. **Nature Genetics**, **2**: 50-55, 1992.
- SUPER, M., THIEL, S., LU, J., LEVINSKY, R.J., TURNER, M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonization. **Lancet**, **2**:1236-1239, 1989.
- TAKADA, F., TAKAYAMA, Y., HATSUSE, H., KAWAKAMI, M. A new member of the C1s family of complement proteins found in a bactericidal factor, Ra-reactive factor, in human serum. Biochem. **Biophysical Research Communication**, **196**: 1003-1009, 1993.

- TAKAHASHI, M., ENDO, Y., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. **International Immunology**, **11**: 859-863, 1999.
- TAKAYAMA, Y., TAKADA, F., TAKAHASHI, A., KAWAKAMI, M. A 100-kDa protein in the C4-activating component of Ra-reactive factor is a new serine protease having module organization similar to C1r and C1s. **Journal of Immunology**, **152**: 2308-2316, 1994.
- TAKEBE, Y., KUSAGAWA, S., MOTOMURA, K. Molecular Epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. **Pediatrics International**, **46**: 236-244, 2004.
- 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. **The Biochemical Journal**, **262**: 763-771, 1989.
- TEMIN, H. M., MIZUTAMI, S. RNA-dependente DNA polimerase in virions of Rous Sarcoma Virus. **Nature**, **226**: 1211-1213, 1970.
- 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 Immunology**, **90**: 31-35, 1992.
- THIEL, S., PETERSEN, S.V., VORUP-JENSEN, T., MATSUSHITA, M., FUJITA, T., STOVER, C.M., SCHWAEBLE, W.J., JENSENIUS, J.C. Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein Map19. **Journal of Immunology**, **165**: 878-887, 2000.

- THIEL, S., VORUP JENSEN, T., STOVER, C.M., SCHWAEBLE, W., LAURSEN, S.B., POULSEN, K., WILLIS, A.C., EGGLETON, P., HANSEN, S., HOLMSKOV, U., REID, K.B., JENSENIUS, J.C. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, **386**: 506-510, 1997.
- TURNER, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. **Immunobiology**, **199**: 327-339, 1998.
- TURNER, M.W., HAMVAS, R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. **Reviews Immunogenetics**, **2**: 305-322, 2000.
- UNIAIDS/WHO. **AIDS epidemic update**: December 2002, World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epi2002/en>>. Acesso em: 01 agosto 2003.
- VARMUS, H. E., SWANSTROM, R. Replication of retrovirus. In: **RNA Tumor Virus**. Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J. New York, Cold Spring Harbour Laboratory, p. 75-134, 1985.
- VORUP-JENSEN, T., PETERSEN, S.V., HANSEN, A.G., POULSEN, K., SCHWAEBLE, W., SIM, R.B., REID, K.B., DAVIS, S.J., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. **Journal of Immunology**, **165**: 2093-2100, 2000.

- WALLIS, R., CHENG, J.Y. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. **Journal of Immunology**, **163**: 4953-4959, 1999.
- WALLIS, R., DRICKAMER, K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, **274**: 3580-3589, 1999.
- WEI, X., DECKER, J. M., WANG, S., HUI, H., KAPPES, J.C., WU, X., SALAZAR-GONZALES, J.F., SALAZAR, M.G., KILBY, J.M., SAAG, M.S., KOMOVA, N.L., NOWAK, M.A., HAHN, B.H., KWONG, P.D., SHAW, G.M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, **422**: 307-312, 2003.
- WEISS, S., KÖNIG, B., MÜLLER, H-J., SEIDEL, H., GOODY, R.S. Synthetic human tRNA<sup>Lys3</sup> and natural bovine tRNA<sup>Lys3</sup> interact with HIV-1 reverse transcriptase and serve as specific primers for retroviral cDNA synthesis. **Gene**, **111**: 183-197, 1992a.
- WEISS, W.I., DRICKAMER, K., HENDRICKSON, W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, **360**: 127-134, 1992b.
- WINKLER C, MODI W, SMITH MW, NELSON GW, WU X, CARRINGTON M, *et al*. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, **279**: 389-93, 1998.
- WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C. Human T-lymphotropic retroviruses. **Nature**, **317**: 395-403, 1985.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION: HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluation sites: genetics screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of representative viral strains. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **10**: 1927-1943, 1994.
- YING, H., JI, X., HART, M.L., GUPTA, K., SAIFUDDIN, M., ZARIFFARD, M.R., SPEAR, G.T. Interaction of Mannose-Binding Lectin with HIV Type 1 is sufficient for Virus Opsonization but not Neutralization. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **20**: 327-3351, 2004.
- YOKOTA, Y., ARAI, T., KAWASAKI, T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. **Journal of Biochemical**, **117**: 414-419, 1995.
- YONG, M., UEMURA, K., OKA S., KOZUTSUMI, Y., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. Antitumor activity of mannan-binding protein *in vivo* as revealed by a virus expression system: mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America](#), **96**: 371-375, 1999.
- ZHOU, J., AIKEN, C. Nef Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity resulting from intervirion fusion: Evidence supporting a role for Nef at the virion envelope. **Journal of Virology**, **75**: 5851-5859, 2001.

## ANEXO

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre *Avaliação de fatores de natureza viral, de cunho infeccioso (co-infecção) e genéticos do hospedeiro humano, que influenciam o curso da progressão da doença do indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1)*, que está sendo desenvolvida pelas seguintes instituições: Universidade Federal do Pará, Unidade de Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais URE-DIPE SESPA, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ.
2. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
3. O título do projeto é *Avaliação de fatores de natureza viral, de cunho infeccioso (co-infecção) e genéticos do hospedeiro humano, que influenciam o curso da progressão da doença do indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1)*.
4. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Ricardo Ishak, Biomédico, Professor da Universidade Federal do Pará.
5. O objetivo da pesquisa é vigilância epidemiológica molecular de cepas de HIV-1 circulantes na região, correlacionando com os quadros clínicos, com as co-infecções e com os marcadores genéticos do hospedeiro.
6. Durante a pesquisa o paciente deverá responder a um questionário, depois será submetida a coleta de sangue para exame de laboratório.

7. Essa pesquisa oferece riscos, porque os métodos, ou seja as práticas de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5 mL) será coletada para a detecção de marcadores genéticos do vírus e do hospedeiro.
8. Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas, seringas, não oferecendo risco para a pessoa.
9. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
10. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
11. O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar um melhor entendimento sobre os subtipos do HIV-1 circulantes em nossa região, as possíveis associações com marcadores genéticos de resistência e o impacto das co-infecções na progressão para SIDA/ AIDS.
12. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação do participante.

---

**Assinatura do Pesquisador Responsável**

## CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Belém, \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

**Assinatura do participante**

Fone: 3183-1587

Universidade Federal do Pará

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Patologia

Laboratório de Virologia

E-mail: rishak@canal13.com.br