

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

Diego Peres Alonso

**Mutações no gene que codifica a lectina ligante da manose  
e suas relações com a infecção por *Leishmania chagasi*.**

Dissertação de Mestrado

2007

**DIEGO PERES ALONSO**

**Mutações no gene que codifica a lectina ligante da manose  
e suas relações com a infecção por *Leishmania chagasi*.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - área de concentração Genética - para obtenção do título de Mestre.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Vera e Sérgio.

Além de exemplos para mim, nada pode se igualar ao carinho, dedicação, confiança e incentivo depositados ao longo desses sete anos fora de casa.

Espero um dia poder retribuir **tudo** a vocês.

*Agradecimientos*

---

Agradeço primeiramente a minha família!...Meus avós, Werter e Marina, minha avó Nair... nesses últimos meses a distância foi grande, mas não foi maior do que o amor, respeito, e a grande saudade que eu tenho de vocês todos os dias... meus tios, meu primo Gabriel, obrigado por todos os momentos alegres e de descontração!!... Maria!!... Ai que saudade da sua comidinha!

Aos meus Pais, por me darem a vida, e por nunca medirem esforços para me proporcionar as mais importantes coisas da vida: educação, dignidade e caráter, passamos por momentos bem difíceis, mas hoje estamos aqui... minha irmã Julia por ter me aturado na infância, não deve ter sido nada fácil... nunca pensei que iríamos juntos à Europa!... Que viagem!... por incrível que pareça boa parte dessa dissertação de mestrado foi pensada nessa viagem! (Tá bom, tá bom!...podem rir...mas eu juro que é verdade!).

Aos amigos aqui de Botucatu!!... Smurf, Margá, Peky e Gira's... obrigado por tudo, vocês foram companheiros para todas as horas... foi uma honra dividir 4 anos (pelo menos) da minha vida com vocês!!... sinto muito a falta de vocês... minha irmã loira... não poderia esquecer de você, Coli's!... amiga, conselheira, você sempre me trouxe coisas boas e nos momentos difíceis foi sempre quem me estendeu a mão !... Adoro você!

A todos os colegas da XXXVI, vocês foram incríveis!

Ao meu orientador Paulo, pela sua amizade, incentivo, pela convivência cotidiana, por acreditar na minha capacidade e principalmente por me abrir as portas de um "admirável mundo novo"!

Ao laboratório de Entomologia Molecular, pela ótima convivência: Jayme, Aline, Karina, Leticinha, Bianca, Élen, Alberto, Soneca, Fábio, Neto. Um "time" como esse não é pra qualquer um...

Ao Newton e Lúcia pela amizade e os momentos de descontração!

A todos os funcionários da Parasitologia, a todo pessoal da salinha BBB...  
é muito bom trabalhar com vocês por perto...

E finalmente, agradeço a Deus e a vida, pela a oportunidade de ter conhecido o meu grande amor, Letícia. Agradeço a você por todo amor, carinho, dedicação, ternura e companhia... estar ao seu lado me faz perceber o quanto a vida é maravilhosa... você sempre desperta o melhor de mim. E como se não bastasse ainda me deu uma família nova!

Zeinho e Dú, obrigado por serem os meus "pais" nos fins de semana... sempre me senti muito bem recebido aí em Capivari!!... Obrigado Família Amaral!

Juarez, meu "cunhado", por sempre perder para mim no vídeo-game, hehe... apesar de ser Corinthiano é uma ótima pessoa, obrigado também pelos churrascos de fim de semana na companhia da Taisinha e do Tobbinho!!

Minhas "cunhadas de Botucatu": Xé, Kominha, Conga, Piry's, Piston, e Xura... obrigado por me aceitarem na "Família", adoro vocês!!

Agora falando um pouco de trabalho:

Agradeço à Dra. Isabel Santos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelos testes sorológicos.

Ao Dr. Carlos Costa e À Dra. Maria do Socorro Cruz por cederem as amostras utilizadas no estudo e assim iniciar uma frutífera colaboração.

À CAPES pelo apoio financeiro e pela minha formação.

*“Se um homem começar com certezas, ele deverá  
terminar em dúvidas; mas se ele se satisfizer em  
começar com dúvidas, ele certamente terminará em  
certezas.” (Sir Francis Bacon)*

*Resumo*

---



A Leishmaniose Visceral (LV) é causada pela infecção do fígado e baço por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A doença é quase sempre letal quando não tratada. Contudo, grande parte dos indivíduos infectados permanece assintomática. A lectina ligante de manose (MBL), uma opsonina sérica, é uma proteína que potencialmente desempenha um papel na infecção, podendo levar a doença, já que ela é capaz de facilitar a infecção, promovendo a fagocitose desses parasitos intracelulares. Mutações no exon 1 e no promotor do gene da MBL humana resultam em níveis séricos baixos da proteína, o que pode proteger contra o desenvolvimento da doença. O presente estudo avaliou o papel da MBL na infecção por *L.chagasi*, o agente etiológico de Leishmaniose Visceral no Brasil, na população de Teresina - PI. A frequência dos genótipos selvagens e variantes, e os níveis de MBL foram determinados em indivíduos com diagnóstico positivo para LV, em indivíduos com infecção assintomática e em indivíduos não infectados por *L.chagasi*. Genótipos que resultam em níveis de MBL que promovem a infecção por *L.chagasi* foram mais frequentes entre os casos de LV ( $P=0,010$ ), e entre casos de LV complicados por anemia severa ( $P=0,001$ ), do que entre indivíduos com infecção assintomática. Os fenótipos para a MBL (níveis séricos) também se mostraram associados com a infecção: os níveis se mostraram mais altos entre os indivíduos que desenvolveram a doença do que entre os indivíduos com infecção assintomática. Os nossos resultados sugerem que a MBL intensifica a infecção pelo patógeno intracelular *L.chagasi*, e que os seus genótipos podem ser empregados para prognosticar o risco de desenvolver a Leishmaniose Visceral e suas complicações.

*Abstract*

---

Visceral leishmaniasis (VL), caused by infection of the liver and spleen with protozoa of the *Leishmania* species, is almost always lethal if not treated. Paradoxically, however, most infections are clinically silent. Mannan-binding lectin (MBL), a serum opsonin, is a candidate molecule for modifying progression of infection to disease because it may enhance infection with this intracellular parasite. Mutations in the structural gene and/or promoter of MBL result in low serum levels of the protein, which, in turn, may protect against development of VL. This study examines the role of MBL in the outcome of infection with *L. chagasi*, the causative agent of VL in Brazil, in a population of Teresina - PI. Frequencies of wild type and variant genotypes and the levels of MBL were determined in unrelated individuals presenting with a documented history of VL, in individuals with asymptomatic infection, and in individuals not infected with *L. chagasi*. Genotypes that result in levels of MBL predicted to enhance infection with *L. chagasi* were more frequent among individuals with a history of VL ( $P = 0.010$ ), and among cases of VL complicated by severe anaemia ( $P = 0.001$ ) than among infected asymptomatic individuals. Phenotypes for MBL (baseline serum levels) were also associated with the outcome of infection with *L. chagasi*: levels were higher ( $P = 0.011$ ) in individuals with a history of VL than in those with asymptomatic infections. Our findings suggest that MBL enhances infections with the intracellular pathogen *L. chagasi* and that its genotypes may be employed for predicting the risk of developing visceral leishmaniasis and complications.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estrutura e organização da MBL.	21
<b>Figura 2.</b> Modelo de reconhecimento de carboidratos proposto para MBL.	23
<b>Figura 3.</b> Comparação entre a via clássica e a via da MBL de ativação do complemento.	25
<b>Figura 4.</b> Estrutura do gene <i>mbl2</i> , e o produto protéico codificado.	28
<b>Figura 5.</b> Distribuição dos níveis séricos de MBL em relação aos genótipos observados.	30
<b>Figura 6.</b> Distribuição dos níveis séricos de MBL em relação aos haplótipos simplificados YA e XA.	32
<b>Figura 7.</b> Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município.	38
<b>Figura 8.</b> Formas da <i>Leishmania chagasi</i> . (A) forma flagelada promastigota. (B) forma aflagelada amastigota.	39
<b>Figura 9.</b> Fêmea ingurgitada de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , espécie vetora da Leishmaniose Visceral no Brasil.	43
<b>Figura 10.</b> Ciclo da Leishmaniose visceral	45
<b>Figura 11.</b> Esquema da reação com o kit ABI PRISM® Snapshot™ Multiplex.	55
<b>Figura 12.</b> Reação de PCR do exon 1 do gene da MBL	60
<b>Figura 13.</b> Reação de PCR do promotor do gene da MBL	60
<b>Figura 14.</b> Imagem do gel mostrando a separação por tamanho dos oligos referentes às três mutações presentes no exon 1 do gene da MBL.	61
<b>Figura 15.</b> Imagem do gel mostrando a separação por tamanho dos oligos referentes às duas mutações adicionais na região promotora do gene da MBL.	62

<b>Figura 16.</b> Concentração sérica de MBL e os 5 genótipos definidos pelos alelos variantes e os alelos do promotor.	<b>63</b>
<b>Figura 17.</b> <i>Box-whisker plots</i> das concentrações séricas de MBL de acordo com as categorias clínico-epidemiológicas de indivíduos infectados por <i>L. chagasi</i> na região endêmica para LV de Teresina-PI.	<b>67</b>
<b>Figura 18.</b> Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL na população de Teresina-PI.	<b>68</b>
<b>Figura 19.</b> Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL no grupo de casos de LV.	<b>69</b>
<b>Figura 20.</b> Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL no grupo de controles vizinhos aos casos de LV.	<b>69</b>
<b>Figura 21.</b> Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL no grupo de controles populacionais.	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos usados na genotipagem da MBL humana.	53
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos usados na reação de mini-sequenciamento.	56
<b>Tabela 3.</b> Caracterização dos sítios dos cinco SNPs do gene da MBL humana.	57
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos genótipos do gene <i>mbl2</i> gene na população de Tersina-PI expostos a <i>L. chagasi</i> , e apresentando infecção assintomática ou leishmaniose visceral.	65
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos genótipos do gene <i>mbl2</i> em indivíduos infectados assintomáticos e em casos de leishmaniose visceral apresentando ou não complicações clínicas.	66
<b>Tabela 6.</b> Frequências dos alelos da região promotora e do exon 1 do gene <i>mbl2</i> .	70

# ÍNDICE

Resumo	
<i>Abstract</i>	
Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
1. Introdução	
1.1 Lectina Ligante da Manose.....	18
1.1.2 Histórico.....	18
1.1.3 Estrutura e função da MBL.....	20
1.1.4 Genética da MBL humana.....	27
1.1.5 MBL e associação com doenças.....	33
1.2 Leishmaniose Visceral.....	35
1.2.1 Características Epidemiológicas no Brasil.....	36
1.2.2 Agente etiológico.....	37
1.2.3 Reservatórios.....	40
1.2.4 Vetores.....	41
2. Objetivos.....	48
3. Material e Métodos	
3.1 Pacientes.....	50
3.2 Extração de DNA do sangue.....	52
3.3 <i>PCR</i> .....	52
3.4 Purificação dos produtos de <i>PCR</i> .....	53
3.5 Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	53
3.6 Precipitação.....	54
3.7 Análise das seqüências.....	54
3.8 Reação de mini-sequenciamento.....	55
3.9 Remoção dos ddNTPs não incorporados.....	56
3.10 Análise dos fragmentos.....	57
3.11 Determinação dos haplótipos e frequências alélicas da MBL.....	57

3.12 Análise Estatística.....	58
4. Resultados	
4.1 PCR.....	60
4.2 Sequenciamento.....	61
4.3 Reação de mini-sequenciamento.....	61
4.4 Comparação dos genótipos com os níveis séricos de MBL.....	63
4.5 Genótipos da MBL X Leishmaniose Visceral.....	64
4.6 Genótipos da MBL X Complicações da Leishmaniose Visceral.....	66
4.7 Níveis Séricos X Status da infecção por <i>L. chagasi</i> .....	67
4.8. Freqüências haplotípicas e alélicas da MBL.....	68
5. Discussão.....	72
6. Referências Bibliográficas.....	80



# *1. Introdução*

---

## 1.1 Lectina Ligante de Manose (MBL)

### 1.1.2 Histórico

A lectina ligante de manose (MBL) é uma lectina sérica membro da família das colectinas e uma importante constituinte da imunidade inata. Além disso, é uma das mais de trinta moléculas do sistema complemento (Turner, 2003). A história moderna da MBL data de 1968, quando uma paciente com um defeito de fagocitose soro-dependente foi descrita. A paciente, uma menina de 2 anos de idade sofria de infecção recorrente no trato respiratório superior e quadros diarréicos persistentes e quase nenhuma melhora clínica foi observada como resposta ao tratamento com antibióticos (Miller, 1968). Os leucócitos polimorfonucleares da paciente revelaram uma capacidade diminuída em fagocitar partículas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus* inativadas por calor. Contudo, as mesmas partículas eram fagocitadas normalmente em soro heterólogo, indicando que o problema era humoral. O defeito era revertido quando plasma de outros doadores era utilizado no mesmo ensaio, o que resultou na melhora clínica. Um defeito fagocítico semelhante foi descoberto no soro da mãe da paciente, e em vários de seus parentes. Tal constatação sugeriu que essa condição provavelmente pudesse ser herdada (Garred et al., 2003).

Estudos posteriores nas décadas de 70 e 80 confirmaram a relação entre esse defeito na opsonização e o aparecimento de infecções recorrentes, e mais do que isso, mostraram que esse defeito era relativamente comum (5-8%) em indivíduos aparentemente saudáveis (Soothill e Harvey, 1976).

A MBL foi pela primeira vez isolada do soro de coelho no final da década de 70 (Kawasaki et al. , 1978). Já no começo dos anos 80 o defeito fagocítico foi

relacionado ao sistema complemento, C3b/iC3b eram depositadas em quantidades menores do que a normal na superfície de leveduras incubadas com soro de indivíduos afetados (Turner et al., 1981). Porém, nenhuma anormalidade na função do sistema complemento pôde ser detectada, indicando que um co-fator até então desconhecido era o principal mediador dessa disfunção.

Em 1987, (Ikeda et al., 1987) foi demonstrado que a MBL tinha a capacidade de ativar o sistema complemento pela via clássica, propondo então os mecanismos que levavam a essa imunodeficiência, hoje se sabe que esse processo de ativação do complemento, na realidade, constitui uma nova via de ativação denominada frequentemente de via da MBL, que é capaz de ativar o complemento de maneira independente de anticorpo e de C1q (Dommett et al., 2006). Pouco tempo depois foi demonstrado que o defeito opsônico dependente de C3 era causado pela falta de MBL, a reconstituição do soro defeituoso com MBL purificada eliminava o problema (Super et al., 1989). A partir dessa descoberta começavam as pesquisas para desvendar as bases moleculares da deficiência da MBL.

### 1.1.3 Estrutura e função da MBL

A MBL pertence a uma família de proteínas chamada colectinas, que possuem tanto um domínio de colágeno quanto um de lectina, sendo classificada como uma lectina sérica do tipo C. É uma proteína de fase aguda produzida principalmente no fígado, porém outros sítios de produção são propostos, monócitos humanos, por exemplo, são capazes de produzir MBL *in vitro* (Downing et al., 2003).

A proteína consiste, estruturalmente, em múltiplos de cadeias polipeptídicas idênticas de 25 kDa. Cada cadeia possui um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) cálcio-dependente na porção C-terminal, uma região hidrofóbica tipo “neck”, uma região colagenosa contendo 19 trincas Gly-Xaa-Xaa, e uma região N-terminal rica em cisteína (Dommett et al., 2006). A subunidade da MBL é formada por três cadeias polipeptídicas que formam uma tripla hélice estabilizada por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre as cadeias, dentro da região N-terminal rica em cisteína. As subunidades agregam-se em estruturas oligoméricas maiores em forma de buquê (Figura 1), o oligômero encontrado mais comumente no soro humano é a estrutura formada por 6 subunidades, ou seja 18 cadeias polipeptídicas (Presanis et al., 2003).

A MBL é uma importante molécula “reconhedora de padrões” do sistema imunológico inato. Ela é capaz de reconhecer, através de seu domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), grupos específicos de açúcares, tais como; manose, N-acetil-d-glucosamina, N-acetil-manosamina, fucose e glicose presentes na superfície externa de vários microorganismos, permitindo assim a distinção entre o que é ou não, próprio do organismo (Dommett et al., 2006).

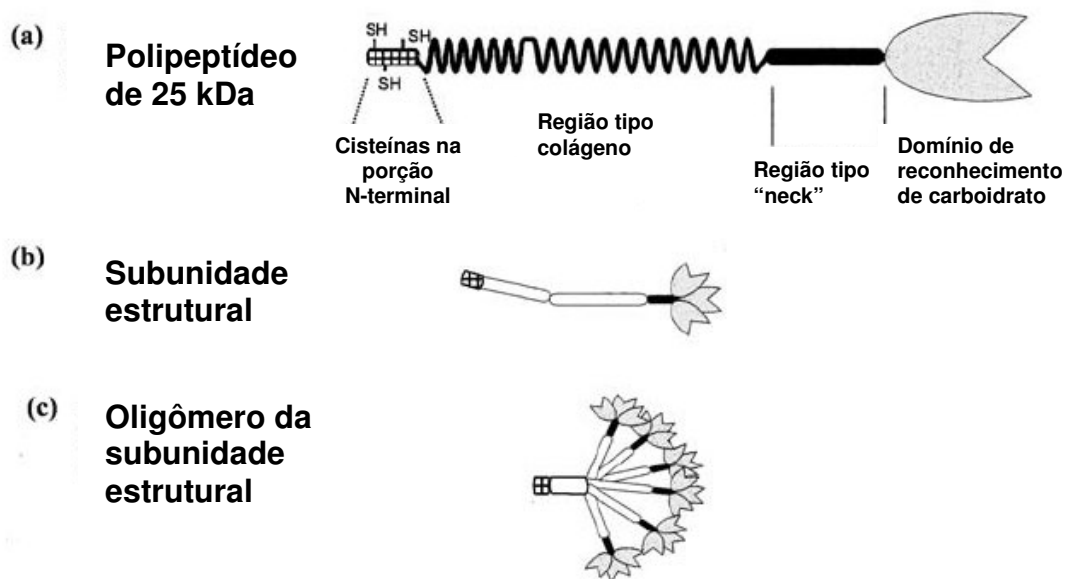


Figura 1. Estrutura e organização da MBL. (a) a MBL consiste de uma região N-terminal rica em cisteína, de uma região tipo colágeno, uma tipo "neck" e um domínio de reconhecimento de carboidrato. Esses peptídeos se "trimerizam" para formar a subunidade estrutural (b) que é achada no soro na forma oligomérica. Adaptado de Presanis et al., 2003.

Os patógenos reconhecidos pela MBL incluem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e alguns vírus (Fraser et al., 1998).

Estudos estruturais para a caracterização do sítio de ligação do domínio de reconhecimento de carboidrato da MBL de rato foram realizados usando como ligante um oligossacarídeo com manose terminal. Foi observado que a interação MBL/ligante seguia um padrão de ligação chamado posteriormente de “micro-padrão” de ligação. Esse padrão é ditado pela orientação das hidroxilas presentes em C3 e C4 da molécula ligante (Weis et al., 1992). Esse tipo de geometria do ligante está presente nos grupos de açúcares citados anteriormente, mas não nos açúcares galactose e ácido siálico que constituem os açúcares terminais da maioria das glicoproteínas presentes nos mamíferos. Essa ligação, porém é de baixa afinidade ( $\sim 10^5 M$ ), e para que aconteça uma ligação com alta afinidade é necessário que os açúcares terminais do ligante fiquem distantes entre si 45 Å (Kawasaki et al., 1983). Essa orientação geométrica está presente em vários patógenos, mas não em glicoproteínas próprias (Sheriff et al., 1994). Por isso, o “reconhecimento de padrão” é dependente tanto de um micro quanto de um macro padrão (Figura 2) (Hoffmann et al., 1999).

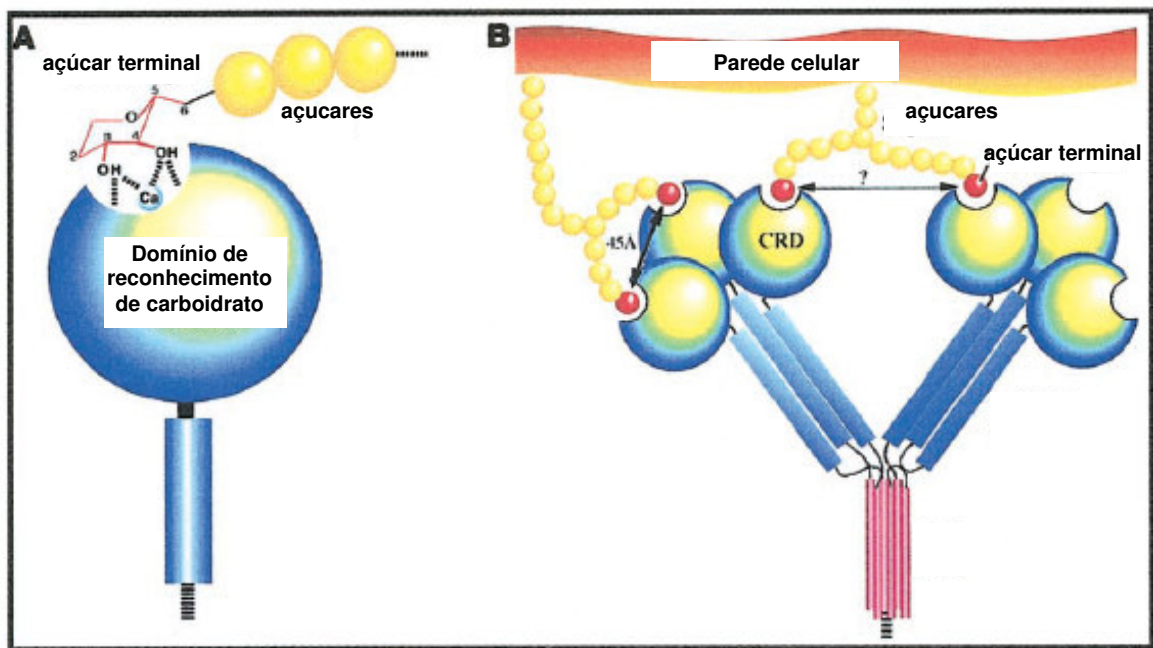


Figura 2. Modelo de reconhecimento de carboidratos proposto para MBL. (A) micro-padrão de reconhecimento. (B) macro-padrão de reconhecimento. Adaptado de Ezekowitz, 2003.

Como descrito anteriormente, a MBL é capaz de ativar a cascata do complemento (Figura 3). Nessa nova via de ativação denominada via da MBL, ou via das lectinas a MBL aparece associada a uma família de proteases denominadas serino proteases associadas à MBL (MASPs), que incluem MASP-1, MASP-2, MASP-3 (Matsushita e Fujita, 1992; Thiel, Vorup-Jensen et al., 1997; Dahl, 2000) e a truncada versão de MASP-2 chamada Map19 (Stover, Thiel et al., 1999; Takahashi, Endo et al., 1999). Diferentes evidências indicam que MASP-2 é a mais importante na ativação do complemento (Thiel, Vorup-Jensen et al., 1997). O complexo MBL-MASPs torna-se ativo após a sua ligação ao microorganismo alvo, através do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da MBL a carboidratos da superfície microbiana. MASP-2 apresenta atividade enzimática similar a C1s que resulta em uma clivagem seqüencial de C4 e C2. O fragmento C4b gerado liga-se covalentemente a superfície microbiana e subseqüentemente interage com C2 que também será clivado por MASP-2. O complexo C4b2a criado apresenta atividade de C3 convertase similar as C3 convertases geradas nas vias clássica e alternativa. A seguir esse complexo é capaz de gerar o fragmento C3b através de sua ação enzimática sobre C3 amplificando a ativação do sistema complemento (Super, et al., 1989; Turner, 2003).



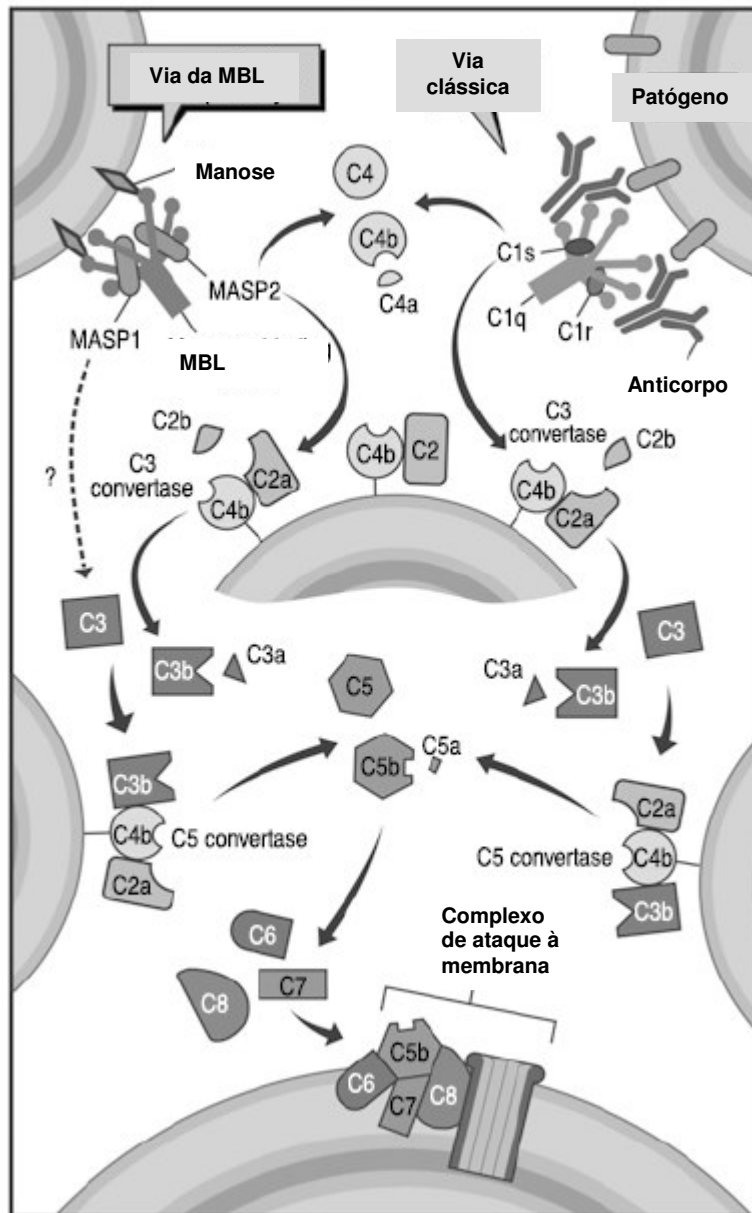


Figura 3. Comparação entre a via clássica e a via da MBL de ativação do complemento. Adaptado de Worthley et al., 2005.

A MBL também apresenta a capacidade de promover a opsonização independentemente do sistema complemento. Nesse processo a MBL está associada a vários receptores ou proteínas ligantes da MBL como; cC1qR/calreticulina (Malhotra et al., 1990), C1qRp (Tenner et al., 1995) e CR1 (Klickstein et al., 1997; Ghiran et al., 2000).

Recentes estudos com doenças têm aumentado evidências de uma provável função da MBL na modulação da inflamação. O mecanismo ainda não está claro, mas sugere-se que a proteína exerça um efeito modulador sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos (Jack et al., 2001).

Outras evidências têm indicado que a MBL (assim como C1q) pode ligar-se a células apoptóticas e mediar seu ataque por macrófagos (Ogden et al., 2001). A MBL é capaz de se ligar diretamente a células apoptóticas que expõem os açúcares terminais de proteínas do seu citoesqueleto, permitindo então o reconhecimento pela MBL, o que acaba facilitando diretamente a fagocitose pelos macrófagos.

#### 1.1.4 Genética da MBL humana

Em 1988, um clone de cDNA humano que codificava a MBL foi isolado pela primeira vez (Ezekowitz et al., 1988). No ano seguinte o gene da MBL humana (*mbl2*) foi clonado e seqüenciado independentemente por Taylor et al. e Sastry et al. (Taylor et al., 1989; Sastry et al., 1989). O gene foi localizado no cromossomo 10 (10q11.1-q21), porém, na mesma região cromossômica um pseudogene expresso da MBL (*mbl1*) foi também descoberto, o que pareceu ser o homólogo humano do gene funcional *mbl-A* presente no camundongo e no Rhesus (*Macaca mulatta*) (Guo et al., 1998).

A região que codifica a proteína do gene *mbl2* consiste de quatro exons interrompidos por 3 introns de 600, 1350 e 800 pares de base (Taylor et al., 1989). O exon 1 codifica o peptídeo sinal, um domínio rico em cisteína e 7 cópias de um motivo típico para a formação da tripla hélice de colágeno, Gly-Xaa-Yaa. Esse padrão é interrompido por uma dupla de Glicina-Glutamina e continuado por mais 12 repetições Gly-Xaa-Yaa no exon 2. O exon 3 codifica uma região tipo "neck" e o exon 4 codifica o domínio de reconhecimento de carboidrato (Figura 4) (Garred et al., 2006).

A seqüência da região promotora do gene *mbl2* contém vários elementos que sugerem a MBL como uma proteína participante de fase aguda, nas infecções. De particular interesse é a região de aproximadamente 1 kb anterior ao exon 1. Essa região contém um exon alternativo, que foi chamado exon 0, que é capaz de iniciar a transcrição do gene *mbl2* (Naito et al., 1999). Esse exon não é traduzido em proteína, por isso, o transcrito alternativo codifica a mesma proteína do transcrito iniciado no exon 1.

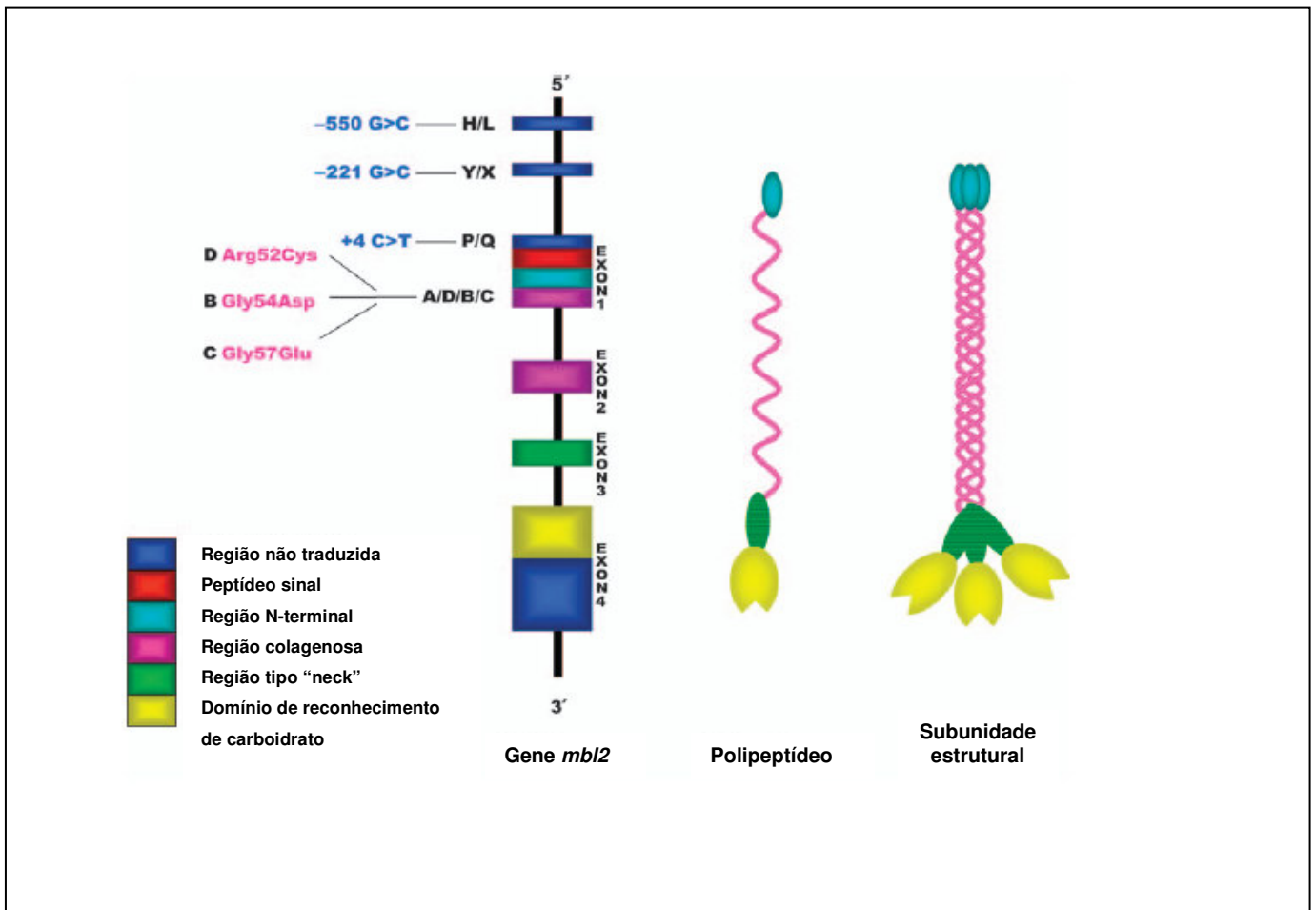


Figura 4. Estrutura do gene *mbl2*, e o produto protéico codificado. Diferentes regiões da proteína são codificadas por diferentes exons. As posições de todos os polimorfismos do exon 1 e da região promotora também está mostrada. Adaptado de Dommet et al., 2006

A grande maioria da MBL produzida no fígado se origina dos transcritos iniciados no exon 1, porém de 10 a 15% do total é codificada a partir do exon 0 (Seyfarth et al., 2005).

Em 1991, a seqüência nucleotídica dos 4 exons do gene humano *mbl2* foi determinada em duas crianças britânicas que apresentavam infecções recorrentes e níveis baixos de MBL (Sumiya et al., 1991). Em ambos os indivíduos, uma mutação pontual foi detectada no codon 54, mudando a seqüência de GGC para GAC e provocando a substituição do aminoácido ácido aspártico pelo aminoácido glicina na proteína traduzida. Estudos familiares confirmaram que o defeito era herdado de forma autossômica dominante. Em 1992 foi identificada uma segunda mutação no exon1, desta vez no códon 57, o que provocava a substituição de glicina por ácido glutâmico (Lipscombe et al., 1992), e em 1994 uma terceira mutação no códon 52 do mesmo exon foi relatada, provocando a substituição de arginina por cisteína (Madsen et al., 1994). Essas mutações são comumente chamadas de variantes B, C e D respectivamente, sendo denominado A o alelo selvagem. As três mutações apresentam um efeito pronunciado nas concentrações séricas de MBL, medidas num ensaio de ELISA de captura. A figura 5 (Garred et al., 2003) mostra o resultado das medições nos soros de 1183 indivíduos, e os genótipos de MBL correspondentes. Em homozigotos variantes e heterozigotos compostos não se detectou a proteína (limite de detecção 20µg/l). Já nos heterozigotos para as mutações, o efeito mais

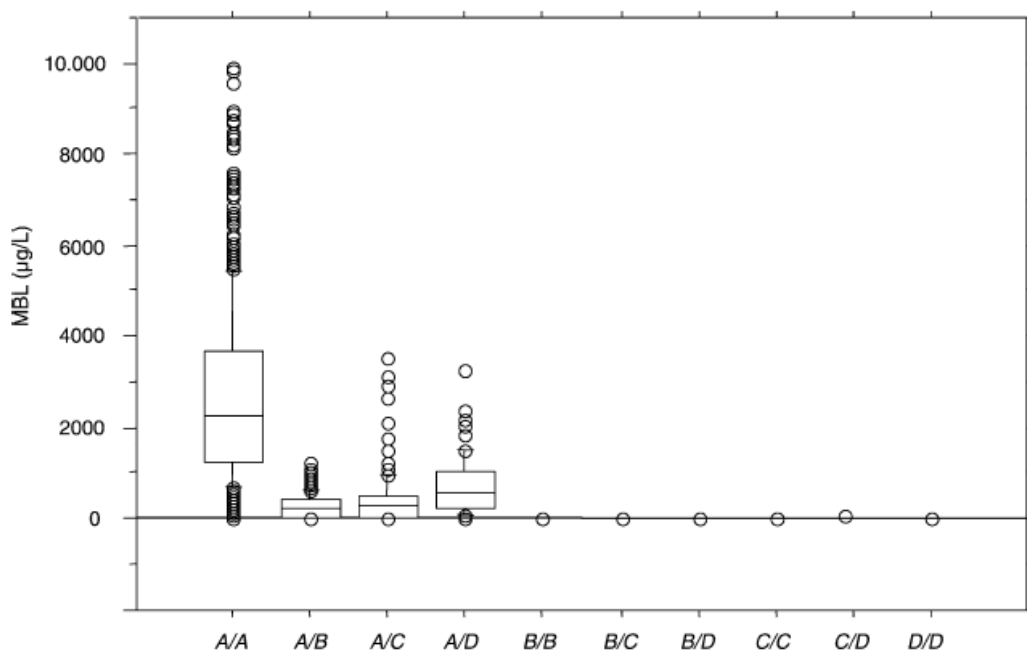


Figura 5. Distribuição dos níveis séricos de MBL em relação aos genótipos observados. A indica o alelo normal, B indica o alelo variante no códon 54, C indica o alelo variante no códon 57 e D indica o alelo variante no códon 52. A mediana, o interquartil, e o 90º percentil são mostrados. (Kruskall-Wallis  $P < 0.0001$ ). Garred, 2003.

profundo foi observado para o alelo B e para o C, enquanto que o alelo D não foi capaz de provocar diminuição semelhante.

Além disso, alelos na região promotora do exon 1 contribuem para variações adicionais na concentração sérica da MBL (Madsen et al., 1995; Madsen et al., 1998).

Inicialmente, dois sítios polimórficos na região promotora foram descritos nas posições -550 (variantes H/L) e -221 (variantes X/Y), ambos são substituições nucleotídicas únicas de G para C. Com relação a suas posições no cromossomo, os seguintes haplótipos puderam ser identificados: *HYA*, *LYA*, e *LXA* em um cromossomo A normal, e *HYD*, *LYB* e *LYC* nos cromossomos carregando alelos estruturais variantes (Madsen et al., 1995). Os haplótipos *HYA*, *LYA* e *LXA* se correlacionam muito bem com níveis altos, intermediários e baixos de MBL, respectivamente. Contudo, o haplótipo *LYA* pôde ser subdividido em haplótipos adicionais quando um outro polimorfismo (P/Q) localizado na porção 5' não traduzida do exon 1 (posição +4) foi descoberto (Madsen et al., 1994). Então o tipo *LY*, na verdade, consiste dos seguintes haplótipos: *LYPA*, *LYPB*, *LYQA* e *LYQC*.

Para facilitar a interpretação dos efeitos nas concentrações séricas relacionados a todos os haplótipos encontrados para a MBL, usualmente, os dados são apresentados de uma maneira mais simplificada (Figura 6): os alelos variantes B, C e D são agrupados e classificados como O, mostrando somente o alelo da posição -221 (X/Y) do promotor por ser o que mais significativamente altera os níveis de MBL (Garred et al., 1999; Graudal et al., 2000).

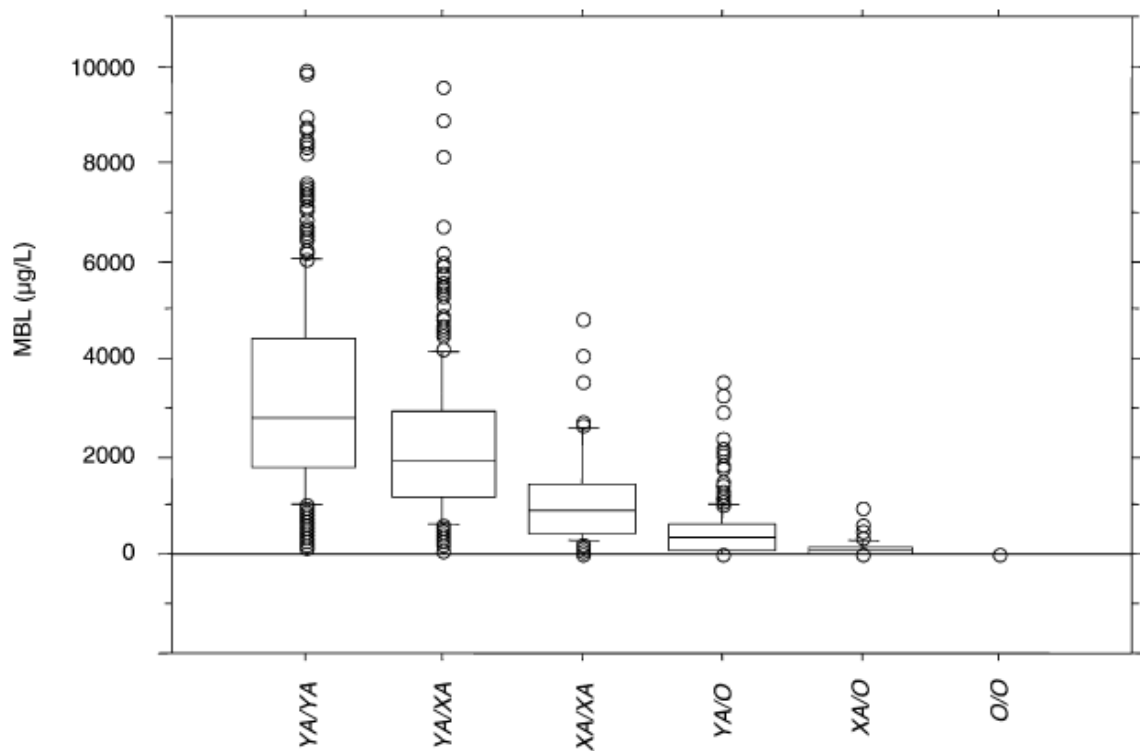


Figura 6. Distribuição dos níveis séricos de MBL em relação aos haplótipos simplificados YA e XA. O indica qualquer alelo variante (B,C ou D), O alelo X corresponde ao alelo de transcrição baixa da MBL na posição -550, e o alelo Y corresponde ao alelo de transcrição alta. A mediana, o interquartil, e o 90º percentil são mostrados. (Kruskall-Wallis  $P < 0.0001$ ). Garred, 2003.



### 1.1.5 MBL e a associação com doenças

Como já mencionado, a deficiência da MBL foi inicialmente reconhecida em crianças com um defeito funcional de opsonização, o qual estava associado à presença de infecções recorrentes e *déficit* de crescimento (Super et al., 1989). Foi então sugerido nesse trabalho que a principal função desta proteína estaria em proteger as crianças durante a janela de vulnerabilidade que ocorre após diminuição dos anticorpos maternos, antes do desenvolvimento de uma efetiva produção de anticorpos. Trabalhos posteriores demonstraram que a MBL de fato possui um papel importante na primeira linha de defesa contra muitos microorganismos antes da produção de anticorpos. Essa função atribuiu à MBL um papel de ante-anticorpo (Ezekowitz, 1991), isto é, anteceder os anticorpos no combate a micro-organismos invasores.

A deficiência de MBL foi associada com aumento na susceptibilidade a muitas doenças infecciosas, principalmente para patógenos extracelulares (Summerfield et al., 1997) e particularmente com microorganismos que causam infecções agudas do trato respiratório durante a infância (Koch et al., 2001).

Os alelos variantes da MBL e, portanto, a deficiência da proteína são observados com frequência relativamente alta em diversas populações. Por isso, frequentemente se sugere que esses alelos variantes possam conferir vantagens relativas aos hospedeiros, representando um sistema genético balanceado (Garred et al., 1992; Lipscombe et al., 1992).

Microorganismos intracelulares, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* e as várias espécies do gênero *Leishmania*, usam parcialmente a opsonização pelo sistema complemento e possivelmente a MBL para invadir as

células do hospedeiro (Santos et al., 2001). Uma das hipóteses propostas para explicar a alta frequência dos alelos variantes da MBL em diferentes populações é a provável vantagem que os níveis baixos de MBL conferem ao hospedeiro, ao reduzir as quantidades de complemento depositadas na superfície externa de patógenos intracelulares, que exploram o complemento e os receptores de complemento (CRs) para invadir as células hospedeiras (Garred et al., 1994).

Um estudo realizado no Brasil, no município de Teresina - PI, com pacientes que apresentavam diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, cujo agente causador é o protozoário *Leishmania chagasi*, mostrou que esses pacientes apresentavam um nível maior de MBL sérica do que em indivíduos controle saudáveis (Santos et al., 2001). Porém, apesar da frequência dos alelos variantes ter sido maior nos indivíduos controle em relação aos pacientes com a doença, a associação não foi significativa.

Posto isso, o presente trabalho buscou elucidar, através da genotipagem das mutações tanto do exon 1 quanto da região promotora do gene da MBL humana (*mbl2*), a relação entre essa proteína sérica e a susceptibilidade e progressão da leishmaniose visceral.

## 1.2 Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitidas através da picada de fêmeas de mosquitos da família *Plebotomidae*. As formas clínicas das leishmanioses são particularmente variadas, representando um complexo de doenças: leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave, que pode ser letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como uma doença mutiladora causando deformidades irreversíveis principalmente na face dos pacientes; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença persistente provocada por uma resposta imune celular deficiente; e leishmaniose cutânea (LC), que provoca o aparecimento de inúmeras ulcerações na pele dos pacientes.

A epidemiologia é extremamente diversa: 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem, e 30 espécies de flebotomíneos são vetoras. Existem duas classificações epidemiológicas para a doença: zoonose, que inclui animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, e antroponose, na qual o homem é a única fonte de infecção para o mosquito vetor. A doença se acha amplamente distribuída, atingindo um total de 88 países: 72 são países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos (Desjeux, 2004).

Dentre todas as formas clínicas a mais severa é a leishmaniose visceral, a doença, conhecida também como calazar ou febre dum-dum, é caracterizada por febre persistente, hepatoesplenomegalia, anemia e debilidade progressiva, levando frequentemente a óbito. Duas espécies do complexo *donovani* transmitem a doença para o homem: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum/Leishmania chagasi*. Atualmente 90% dos casos de LV ocorrem em

áreas rurais pobres e subúrbios de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil, representando uma incidência anual de 500,000 casos com aproximadamente 59,000 mortes oficiais (Desjeux, 2004).

### **1.2.1 Características Epidemiológicas no Brasil**

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 hab (Ministério da Saúde, 2006).

A doença apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Ministério da Saúde, 2006).

Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do País.

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Região Oeste do Estado de São Paulo (Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente),

Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Ministério da Saúde, 2006). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 7.

### 1.2.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra sem flagelo aparente ou amastigota (Figura 8) nos tecidos dos vertebrados.

Na LV, três espécies estão envolvidas com a infecção dependendo da região geográfica onde a doença ocorra: (i) *Leishmania (Leishmania) donovani* Laveran & Mensil, 1903 foi o parasito originalmente descrito, responsável pela forma visceral clássica (antropozoonose) e pela leishmaniose dérmica pós-calazar na Ásia; (ii) *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 é uma espécie amplamente distribuída no Velho Mundo: Ásia, Europa e África; (iii), *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 ocorre nas Américas, sendo responsável pela LVA em seres humanos e cães (Lainson & Shaw, 1987; Marzochi *et al.*, 1994).

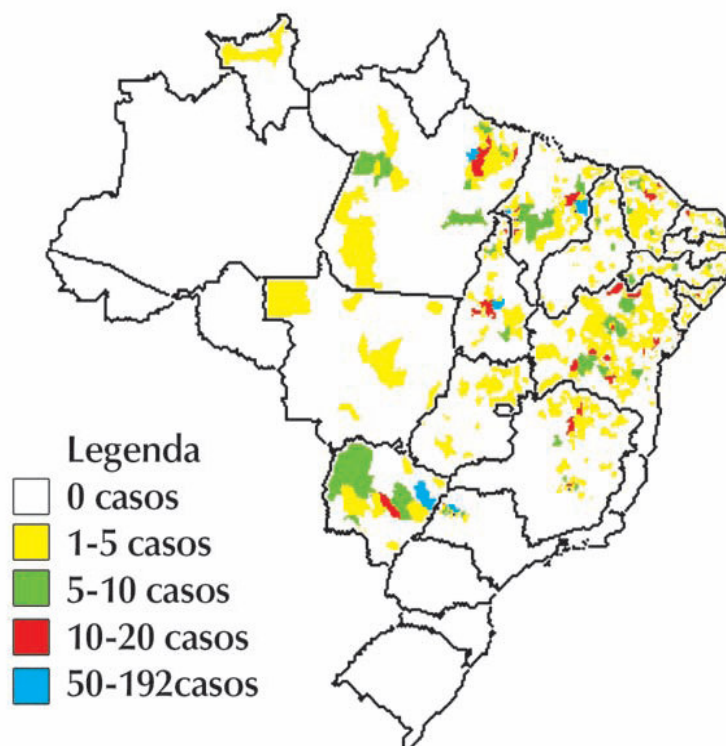


Figura 7 - Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município, Brasil 2002. Fonte: SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS

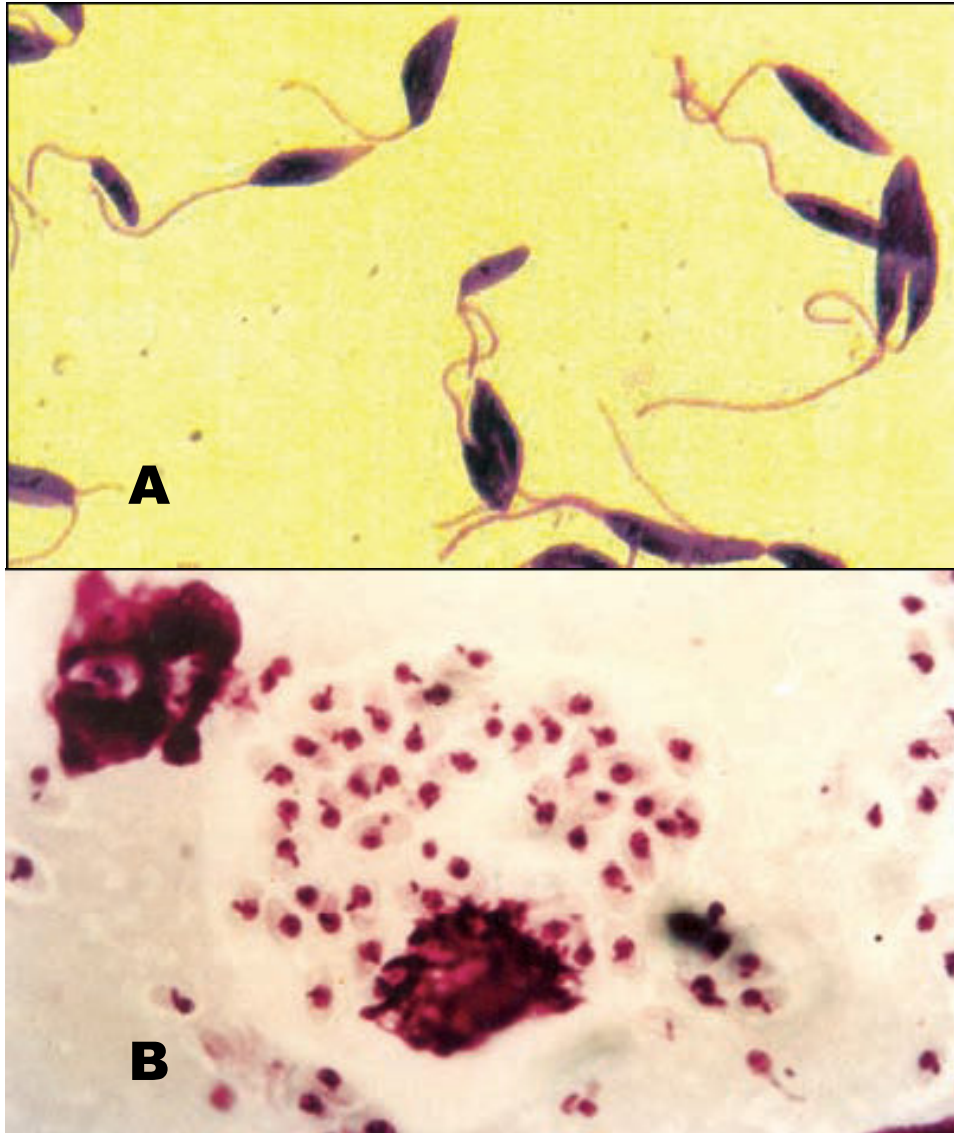


Figura 8. Formas da *Leishmania chagasi*. (A) forma flagelada promastigota. (B) forma aflagelada amastigota. Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.

### 1.2.3 Reservatórios

Os reservatórios do parasito são animais mamíferos, principalmente canídeos, sendo os mais importantes a raposa (no ciclo silvestre e rural) e o cão (no ciclo rural e, particularmente, nas áreas urbanas).

O papel do cão como reservatório da *Leishmania* foi aventado pela primeira vez por Nicolle, em 1908, na Tunísia, quando experimentalmente foi comprovada a infecção deste animal. Posteriormente, em inquérito realizado naquele País, foi comprovada a transmissão natural em cães e assim registrado o primeiro foco de LV canina no mundo.

No Brasil, as primeiras evidências de transmissão da LVA canina foram em Abaeté (PA), como resultado dos trabalhos desenvolvidos por comissão instituída pelo Instituto Oswaldo Cruz para a avaliação dessa problemática. Porém, apenas em 1955, é que foi estabelecido por Deane & Deane (1955) o papel do cão como reservatório da LVA, quando constatada a transmissão em cães residentes em zona urbana do município de Sobral (CE), verificando-se freqüência muitas vezes intensa do parasitismo cutâneo. Brener, em 1957, concluiu, frente aos achados de outros autores e aqueles por ele encontrado, que o cão tinha papel fundamental na epidemiologia da LVA no Brasil.

Nos ambientes rural e urbano o cão doméstico - *Canis familiaris* vem sendo descrito como o principal reservatório da *L. chagasi*, tanto no Brasil como nas Américas (Lainson & Shaw, 1987, Marzochi *et al.*, 1994, OMS 1990, Vieira & Coelho, 1998).

Entre os canídeos silvestres, reservatórios da *L. chagasi*, destacam-se nos ciclos silvestre e rural, a raposa - *Dusicyon vetulus* (= *Lycalopex vetulus*), no



Nordeste do Brasil, em especial no estado do Ceará (Deane & Deane 1955, Deane, 1956; Alencar, 1961) e a espécie *Cerdocyon thous*, na Amazônia brasileira, no estado do Pará (Lainson *et al.*, 1969; Lainson & Shaw ,1971; Silveira *et al.*, 1982). Os gambás também têm sido apontados como reservatórios do parasita no estado da Bahia, onde se isolou o parasita de *Didelphis albiventris* (Sherlock *et al.*, 1984) e, na Colômbia, *Didelphis marsupialis* parece ter importância significativa na epidemiologia da LV (Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1994).

#### 1.2.4 Vetores

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste.

Nas regiões Norte e Nordeste, a *L. longipalpis* era encontrada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e sua adaptação a este ambiente foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos.

Recentemente, ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na Região Sudeste, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio.

Na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos. (Ministério da Saúde, 2006).

O ciclo biológico da *Lutzomyia longipalpis* (Figura 9) se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto.

Após a cópula as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo e com alto teor de matéria orgânica. Os ovos eclodem geralmente de 7 a 10 dias após a postura. As larvas alimentam-se vorazmente e desenvolvem-se em média entre 20 a 30 dias, podendo entrar em diapausa de acordo com as condições do meio ambiente.

Após esse período as larvas de quarto estágio transformam-se em pupas, que, permanecem imóveis e fixas ao substrato, pela extremidade posterior. O período pupal em condições favoráveis tem duração em média de uma a duas semanas.

O desenvolvimento do ovo ao inseto adulto decorre um período de aproximadamente 30 a 40 dias de acordo com a temperatura. As fêmeas são hematófagas obrigatórias, apresentam hábitos ecléticos podendo realizar o



**Figura 9. Fêmea ingurgitada de *Lutzomyia longipalpis*, espécie vetora da Leishmaniose Visceral no Brasil. Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.**

repasto sangüíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive em humanos. Em áreas urbanas, o cão parece ser a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico. A longevidade das fêmeas é estimada em média de 20 dias.

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. No intra e peridomicílio, a *L. longipalpis* é encontrada, principalmente, próximas a uma fonte de alimento. Durante o dia, estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais.

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (Figura 10).

Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão

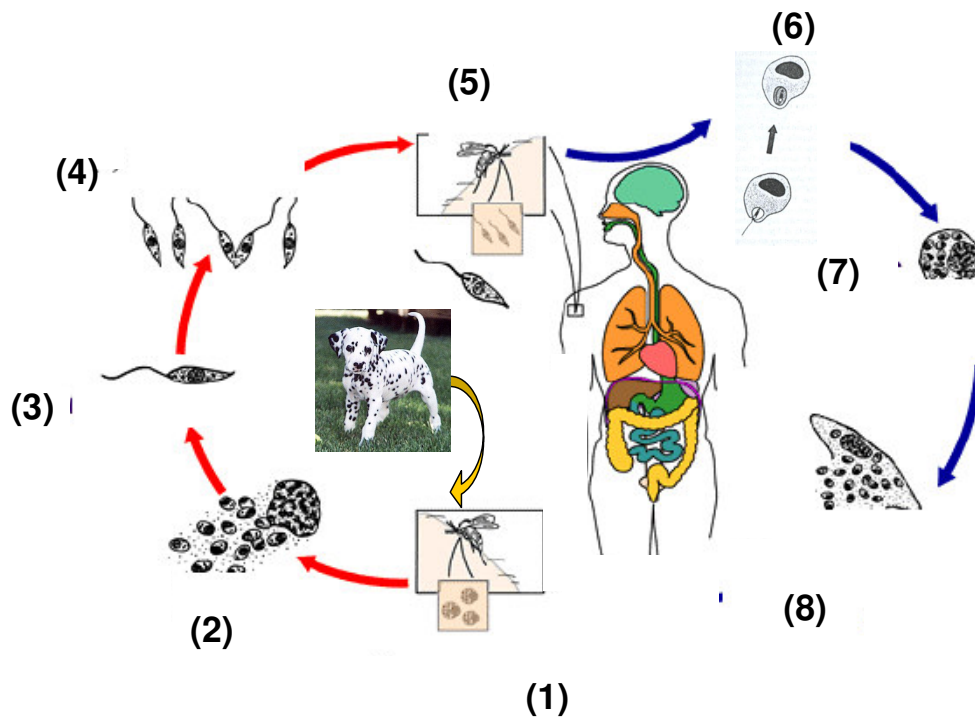


Figura 10. Ciclo evolutivo da *Leishmania chagasi*.

- (1) Mosquito ingere sangue infectado do cão.
- (2) Ingestão de células parasitadas.
- (3) Amastigotas se transformam em promastigotas no estômago do mosquito.
- (4) Promastigotas se multiplicam no estômago do mosquito transmissor.
- (5) Mosquito retira sangue do hospedeiro e injeta promastigotas.
- (6) Promastigotas são fagocitados pelos macrófagos.
- (7) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos.
- (8) Amastigotas são liberados e infectam outras células.

fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. (Rey, 1991; Lainson & Shaw, 1987).

## *2. Objetivos*

---

## 2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo populacional caso-controle, buscando relacionar a presença de mutações específicas no promotor e no exon 1 do gene que codifica a MBL em humanos com a resistência à infecção por *Leishmania chagasi* na área endêmica de Teresina - PI.

## 2.2 Objetivos específicos

- Correlacionar níveis séricos da MBL com os genótipos encontrados para o gene *mbl2*
- Determinar a frequência dos haplótipos, bem como a frequência dos alelos variantes do gene *mbl2* em indivíduos com diagnóstico confirmado para Leishmaniose visceral; em indivíduos infectados assintomáticos; e em indivíduos saudáveis.
- Relacionar a distribuição genotípica do gene *mbl2* com complicações da Leishmaniose visceral



### *3. Material e Métodos*

---

### 3.1 Pacientes

Indivíduos desse estudo caso-controle são de uma população de Teresina, Piauí onde a epidemia urbana de LV tem ocorrido desde 1980 (Costa et al., 1990). Todos os dados clínico-epidemiológicos (idade, sexo, data de internação, data de realização e resultado dos exames sorológicos e clínicos) foram obtidos do banco de dados do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela em Teresina-PI, sob supervisão do Dr. Carlos Henrique Nery Costa. Consentimento informado de todos os participantes e aprovação institucional foram obtidos para o estudo.

As frequências dos alelos selvagens e mutados e os níveis de MBL foram determinados em indivíduos não relacionados com diagnóstico confirmado para LV ( $n = 60$ ), em indivíduos não relacionados assintomáticos, mas com infecção por *L. chagasi*, determinada por um teste de Montenegro (leishmanina) positivo para hipersensibilidade tardia na pele (DTH) e/ou pela presença de anticorpos *anti-Leishmania* em teste sorológico de imunofluorescência indireta ( $n = 90$ ), em indivíduos não relacionados saudáveis sem nenhuma evidência de infecção por *L. chagasi* determinada por um teste de Montenegro negativo e pela ausência de anticorpos *anti-Leishmania* ( $n = 87$ ), e ainda em indivíduos saudáveis ( $n = 54$ ) cuja condição de infecção não pode ser determinada.

Todos os testes sorológicos e os testes de Montenegro foram realizados pelo Dr. Carlos Henrique Nery Costa, e pela Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz da Universidade Federal do Piauí. A idade dos indivíduos variou de 6 meses à 73 anos (média,  $22.7 \pm 18.1$  anos). Indivíduos saudáveis infectados e não-

infectados foram divididos em dois grupos, vizinhos imediatos dos casos de LV ( $n = 125$ ) e indivíduos aleatoriamente selecionados da população de Teresina ( $n = 106$ ), essa divisão se fez necessária a fim de se eliminar possíveis interpretações tendenciosas relacionadas a uma distribuição espacial heterogênea da população de estudo.

O diagnóstico de LV foi confirmado pelo isolamento de parasitas da medula óssea, pacientes com LV foram classificados em três categorias: categoria 1 inclui pacientes que não apresentaram complicações, pacientes na categoria 2 necessitaram de transfusões de sangue e pacientes na categoria 3 necessitaram de cuidados intensivos. As concentrações séricas de MBL foram medidas por ELISA de captura (Staten Serum Institute, Copenhagen, kit 030, clone Hyb-131-01) pela Dra. Isabel Santos na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP); após a extração de DNA genômico do sangue dos indivíduos e posterior amplificação dos fragmentos de interesse por PCR, foi realizado o sequenciamento dos fragmentos obtidos para a detecção inicial das mutações, posteriormente os polimorfismos de base única (SNPs) para o exon 1 e para o promotor do gene da MBL (*mbl2*) foram genotipados, com o SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems) usando primers específicos para cada SNP.

### 3.2 Extração de DNA do sangue

As amostras de DNA que ainda não tinham sido extraídas do sangue dos pacientes foram extraídas em nosso laboratório com o kit GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare) conforme as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### 3.3 PCR

As reações foram realizadas em ensaios contendo concentração final de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , tampão 10X, 0,4  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  de cada um dos oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*), 0,1 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* polimerase, 5 $\mu\text{L}$  da amostra de DNA, e água até completar volume final de 25 $\mu\text{L}$ /reação. Dois pares de oligonucleotídeos (tabela 1), referentes ao exon 1 e ao promotor do gene da MBL, (Madsen et al., 1995) foram utilizados na reação de PCR para a amplificação das regiões contendo as mutações.

As condições da reação são: 2 min a  $94^{\circ}\text{C}$ , depois 35 ciclos de 30s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $58^{\circ}\text{C}$  e 2 min a  $72^{\circ}\text{C}$ , com 5 min de extensão final.

Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8 $\mu\text{L}$  do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2 $\mu\text{L}$  de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL<sup>®</sup>) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV. Os produtos amplificados foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados na genotipagem da MBL humana.

MBL exon 1	Forwad	5´- AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG - 3´
	Reverse	5´- AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG - 3´
MBL Promotor	Forwad	5´- GAAGCTTAGACCTATGGGGCTAG - 3´
	Reverse	5´- AACTGCAGGGAAGGTTAATCGCAGTT - 3´

### 3.4 Purificação dos produtos de PCR

Após a reação de PCR os produtos foram purificados com o kit GENOMICS Millipore® para o posterior sequenciamento, conforme as recomendações do fabricante, e armazenados a -20°C até o momento do uso.

### 3.5 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se 4µl de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl pH9,0, 10mM MgCl<sub>2</sub>), 4µl de BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 µmol dos oligonucleotídeos, e 4µl do DNA genômico a 5ng/µl. As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4, com rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o *primer* foward e outra para o reverse.

### 3.6 Precipitação

A cada reação de seqüenciamento foram adicionados 80µl de isopropanol 65%, incubando a T.A. por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 30 min a 2000xg a T.A. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 60% e centrifugou-se a velocidade máxima por 5 min a 2000xg a T.A. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas em T.A. e o DNA foi eluído em 2µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM ® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 min e rapidamente transferidas para o gelo.

### 3.7 Análise das seqüências

As seqüências de bases geradas automaticamente foram alinhadas com auxílio do programa MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e analisadas com auxílio do programa CLUSTAL X, e então comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Após a confirmação das mutações 5 oligonucleotídeos foram desenhados com tamanhos diferentes, um para cada região flanqueadora dos sítios mutacionais, para a utilização do o kit ABI PRISM® Snapshot™ Multiplex, em uma reação de

mini -sequenciamento que detecta todas as mutações em um única reação pelo método dideoxi marcado com fluorescência com extensão de uma única base.

### 3.8 Reação de mini - sequenciamento

Após a reação de PCR os produtos foram purificados ezimaticamente com o kit ExoSAP- IT (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, 2µl dos fragmentos purificados foram utilizados na reação de mini-sequenciamento (Figura 11), juntamente com 1µl de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl pH9,0, 10mM MgCl<sub>2</sub>), 1µl de Snapshot™ Multiplex mix , 0,4 pmol de cada oligonucleotídeo (tabela 2) e água até completar o volume de 10 µl. As reações foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 58°C por 5 seg, 60°C por 30 seg, com rampa de 1°C/seg.

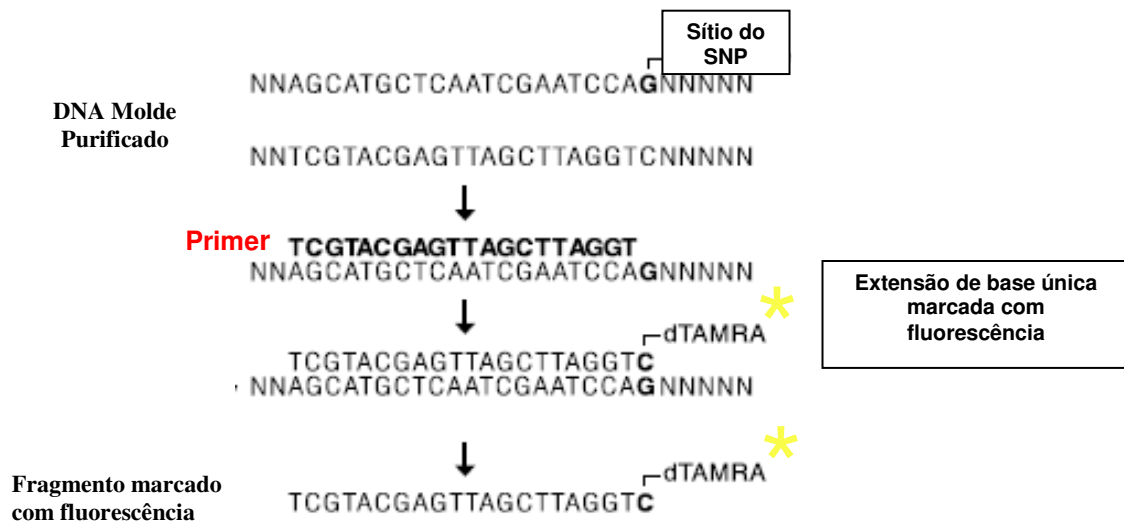


Figura 11. Esquema da reação com o kit ABI PRISM® Snapshot™ Multiplex.

Tabela 2. Oligonucleotídeos usados na reação de mini-sequenciamento.

<b>CODON 52</b>	<b>5' - CCCCCCCCCCGCTTCCCAGGCAAAGATGGG - 3'</b>
<b>CODON 54</b>	<b>5' - CCCCTTTTCTCCCTTGGTG - 3'</b>
<b>CODON 57</b>	<b>5' - CCCCTACCTGGTCCCCCTTTTCT - 3'</b>
<b>POSIÇÃO -550</b>	<b>5' - CCCCCCCCCCCCCCGCTTACCCAGGCAAGCCTGT- 3'</b>
<b>POSIÇÃO -221</b>	<b>5' - CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCATTGTCTCACTGCCAC - 3'</b>

### 3.9 Remoção dos ddNTPs não incorporados

Os dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência que sobram na reação podem co-migrar com os fragmentos de interesse produzidos na reação. Faz-se necessário, então, o tratamento de cada reação com 1µl de uma enzima fosfatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare) para a alteração do perfil de migração dos ddNTPs marcados. Após o tratamento as reações são diluídas 1:1 com tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM ® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 min e rapidamente transferidas para o gelo.



### 3.10 Análise dos fragmentos

Após a corrida eletroforética os fragmentos foram analisados e com base nas diferentes cores e tamanhos os 5 SNPs foram identificados conforme a tabela 3.

Tabela 3. Caracterização dos sítios dos cinco SNPs do gene da MBL humana.

POSIÇÃO DO SNP	TAMANHO DO PRIMER	POLIMORFISMO	COR OBTIDA NA IMAGEM DO GEL
CODON 52	30 pb	C para T	AMARELO/VERMELHO
CODON 54	20 pb	C para T	AMARELO/VERMELHO
CODON 57	25 pb	C para T	AMARELO/VERMELHO
POSIÇÃO -550	35 pb	G para C	AZUL/AMARELO
POSIÇÃO -221	40 pb	G para C	AZUL/AMARELO

### 3.11 Determinação dos haplótipos e das frequências alélicas da MBL

A técnica utilizada na genotipagem dos SNPs permite a identificação dos 5 loci no gene da MBL de forma independente, ou seja, a genotipagem informa o genótipo, mas o haplótipo (fase gamética) permanece indeterminado.

Para a obtenção dos haplótipos reconstruídos foi utilizado o algoritmo ELB que consta do pacote de *softwares* do programa arlequin versão 3.01 (Excoffier et al., 2005).

A determinação das frequências alélicas foi realizada por contagem simples.

### 3.12 Análise Estatística

Todos os testes estatísticos utilizados nas análises dos dados (*Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis* e *Qui-quadrado*) fazem parte do programa SigmaStat para Windows versão 3.1.

O teste de *Mann-Whitney* com a correção de Bonferroni para comparações par a par foi empregado para testar se os valores das medianas nas distribuições dos níveis séricos de MBL diferiram significativamente para três grupos de estudo: casos de Leishmaniose Visceral, controles assintomáticos e controles saudáveis.

O teste de *Kruskal-Wallis* foi empregado para testar se os valores das medianas nas distribuições dos níveis séricos de MBL entre as 5 classes genóticas encontradas diferiram significativamente, mostrando assim uma correlação níveis séricos X genótipos.

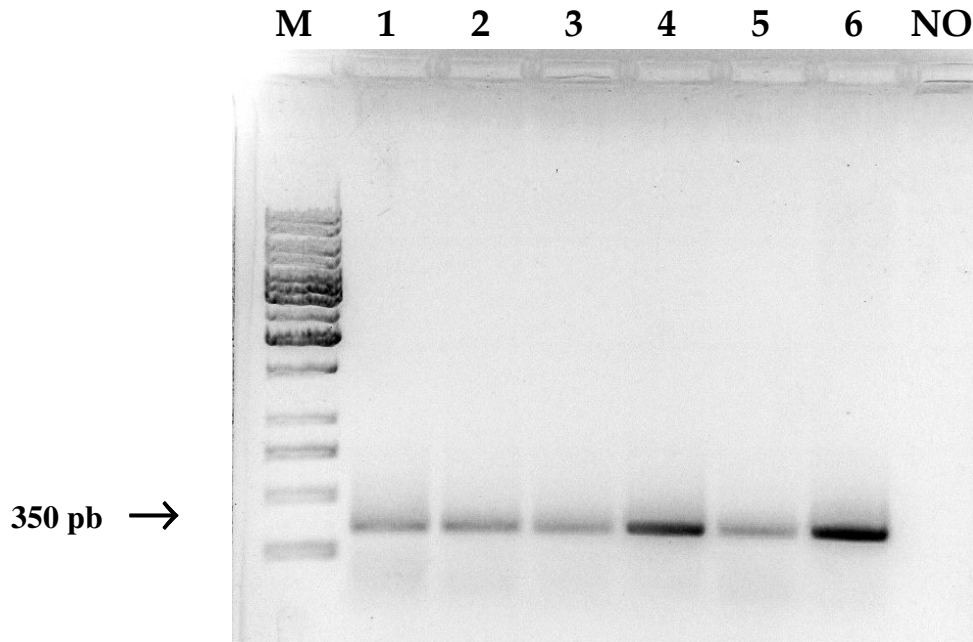
O teste do *Qui-quadrado* foi utilizado nas análises de dados em tabelas de contingência, utilizadas nas comparações dicotômicas dos genótipos de MBL (genótipos que conferem altos níveis de MBL X genótipos que conferem níveis intermediários ou baixos de MBL) em relação aos grupos clínico-epidemiológicos apresentados.

## *4. Resultados*

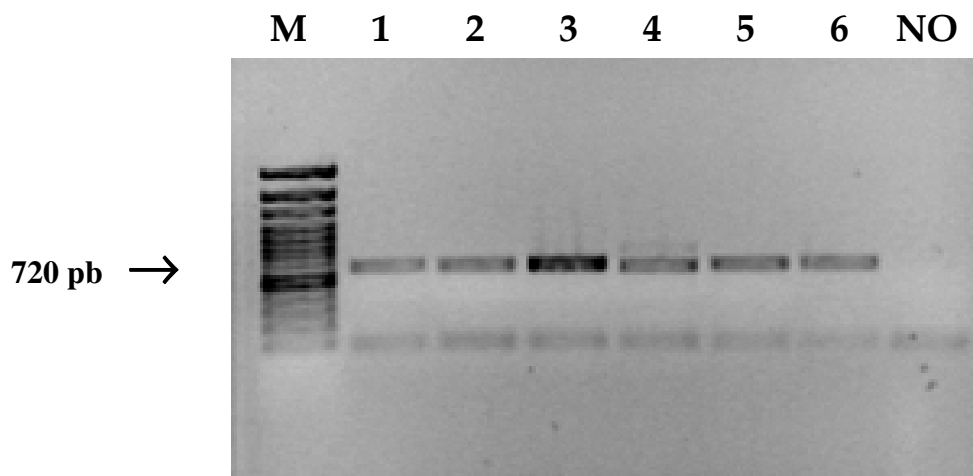
---

#### 4.1 PCR

Os fragmentos de interesse foram amplificados com sucesso a partir dos oligos utilizados no estudo como mostram a figura 12 e 13 abaixo.



**Figura 12. Reação de PCR do exon 1 do gene da MBL.** (M) Padrão de peso molecular (1Kpb), colunas de 1 a 5 correspondem ao produto da amplificação de 350pb do exon 1 da MBL humana, (6) controle positivo e (NO) controle negativo.



**Figura 13. Reação de PCR do promotor da MBL.** (M) Padrão de peso molecular (250pb), colunas de 1 a 5 correspondem ao produto da amplificação de 720pb do promotor da MBL humana, (6) controle positivo e (NO) controle negativo.

## 4.2 Sequenciamento

O sequenciamento inicial revelou as três mutações no exon 1 : no códon 52, códon 54 e códon 57 e duas no promotor: na posição -550 e na posição -221. As seqüências obtidas serviram de base para o desenho dos oligonucleotídeos específicos para a detecção de cada uma das mutações na reação de mini-sequenciamento com o Snapshot™ Multiplex kit.

## 4.3 Reação de mini - sequenciamento

A figura 14 mostra a imagem do gel de poliacrilamida obtida na genotipagem de cinco amostras de fragmentos amplificados do exon 1 do gene da MBL dos cinco SNPs realizada com o kit Snapshot™ Multiplex , a figura 15 mostra duas amostras genotipadas da região promotora do gene.

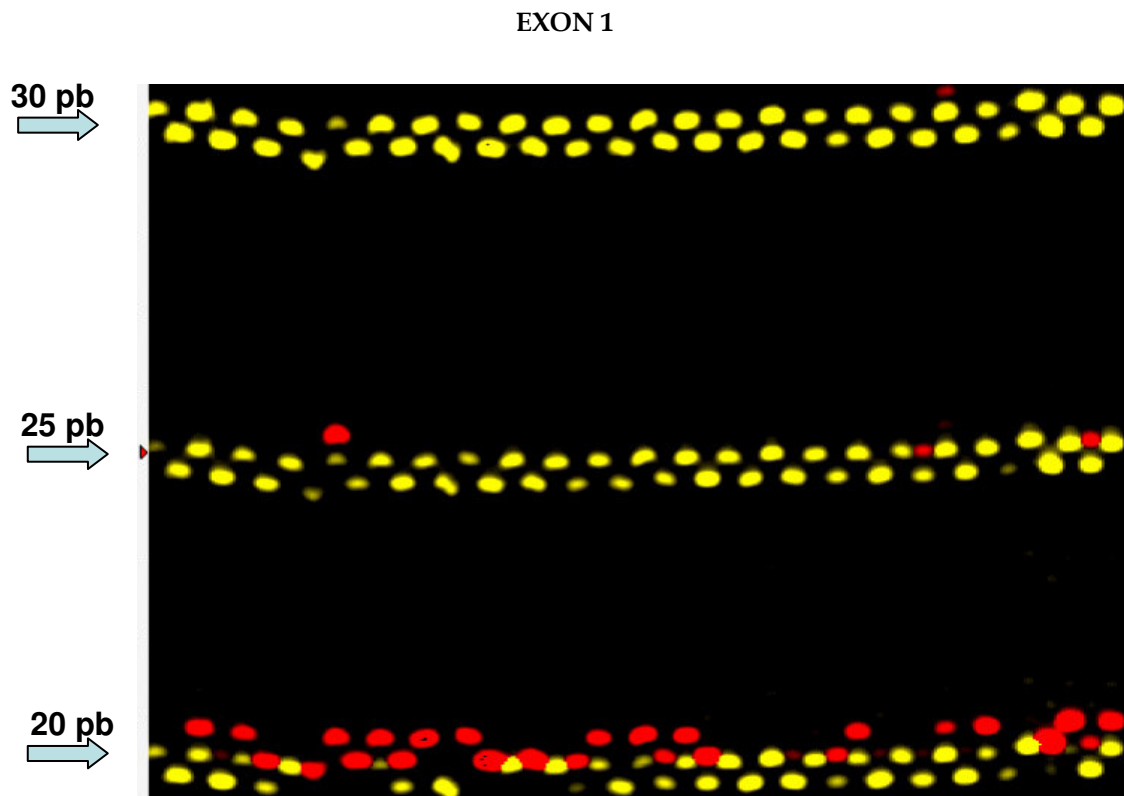


Figura 14. Imagem do gel mostrando a separação por tamanho dos oligos referentes às três mutações presentes no exon 1 do gene da MBL. A cor amarela representa o alelo selvagem nos três SNPs analisados e a cor vermelha o alelo mutado.

REGIÃO PROMOTORA

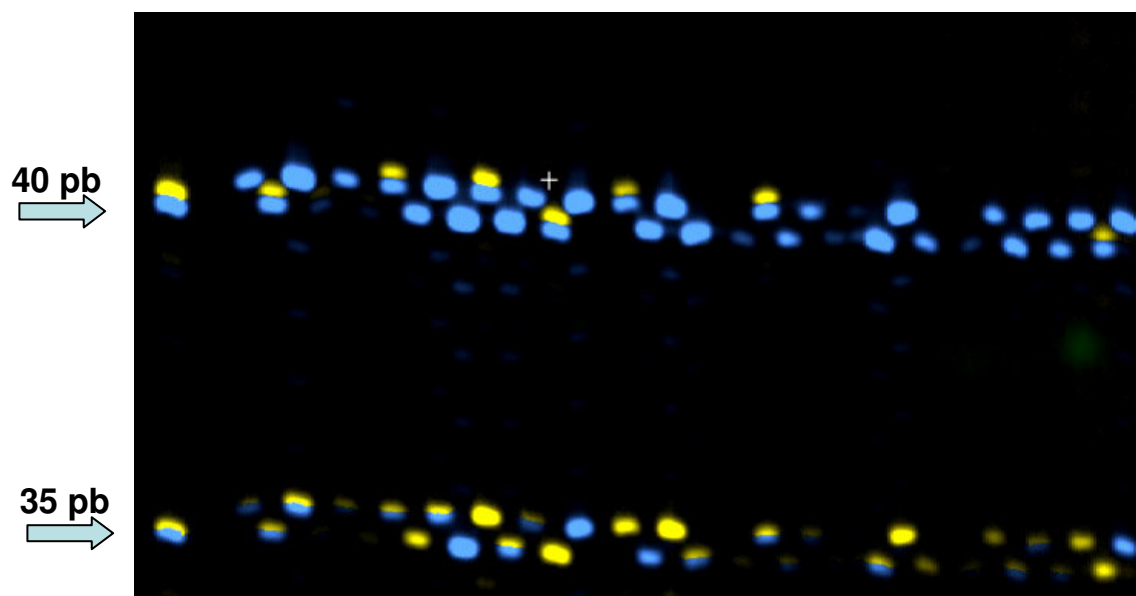


Figura 15. Imagem do gel mostrando a separação por tamanho dos oligos referentes às duas mutações adicionais na região promotora do gene da MBL. Para os dois SNPs do promotor analisado, a cor azul representa o alelo de alta transcrição e o amarelo o de baixa transcrição.

#### 4.4 Correlação dos genótipos com os níveis séricos de MBL

A presença do genótipo estrutural selvagem foi representada pelo alelo A. Todos os alelos variantes (B, C, e D) foram agrupados e designados como alelo O para evitar grupos muito pequenos, todos os duplo-heterozigotos e os homozigotos variantes foram representados por O/O. Apenas o alelo da posição -221 (X/Y) por ser o que altera mais significativamente os níveis séricos de MBL (Garred et al., 1999) foi utilizado nas análises dos dados. Com base nesses alelos e os seus efeitos nos níveis séricos de MBL, 5 genótipos do gene *mb12* puderam ser determinados. A distribuição dos níveis séricos de MBL em relação aos genótipos de MBL são mostradas na figura 16.

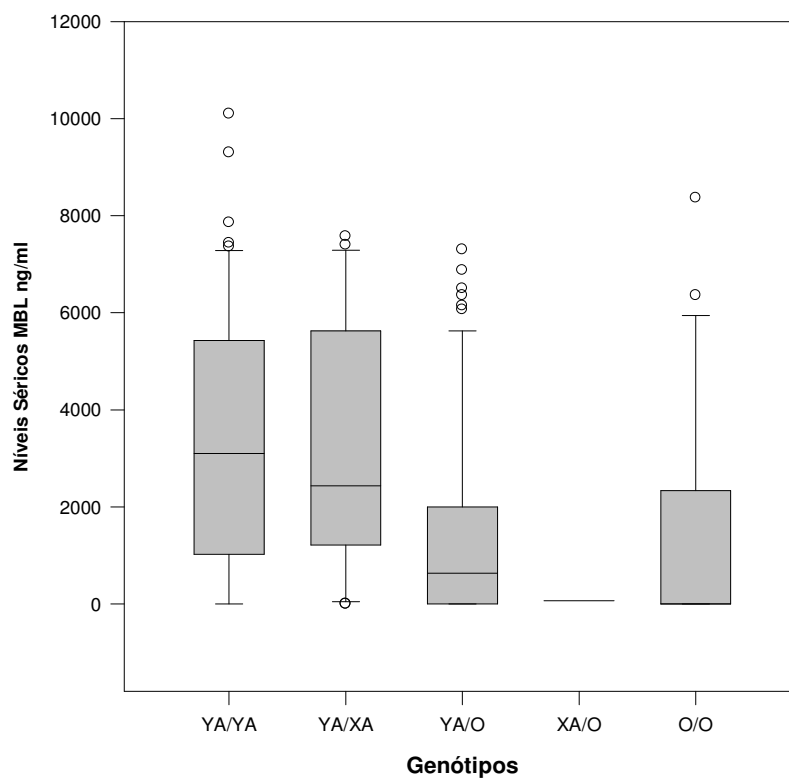


Figura 16. Concentração sérica de MBL e os 5 genótipos definidos pelos alelos variantes e os alelos do promotor. O gráfico mostra o 10º, 25º, 50º, 75º, e 90º percentis. ( $P < 0,001$ ), teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.5 Genótipos de MBL X Leishmaniose Visceral

Foi empregado o teste do  $\chi^2$  para examinar a proporção dos genótipos do gene *mbl2* dentro do grupo de casos e dos dois grupos controle e sua associação com o desfecho da infecção por *L. chagasi* (Tabela 4). Os genótipos que resultam em altos níveis de MBL e que teoricamente favorecem a infecção por *L. chagasi* foram significativamente mais freqüentes entre indivíduos com diagnóstico confirmado para LV do que: (1) entre indivíduos infectados, porém assintomáticos (vizinhos e indivíduos selecionados aleatoriamente);  $P = 0.010$ , (2) entre vizinhos infectados ( $P = 0.028$ ), (3) entre indivíduos infectados selecionados aleatoriamente ( $P = 0.044$ ), (4) entre vizinhos não-infectados ( $P = 0.044$ ), (5) entre vizinhos independente do status de infecção por *L. chagasi* ( $P = 0.017$ ), (6) e entre indivíduos saudáveis em geral, independente do status de infecção por *L. chagasi* ( $P = 0.025$ ). Indivíduos com genótipos que resultam em altos níveis de MBL se apresentaram com pelo menos duas vezes mais chance de desenvolver LV do que indivíduos com genótipos que resultam em níveis séricos baixos de MBL. Apesar do grande número de indivíduos do sexo masculino e crianças apresentando LV, não houve associação significante entre os genótipos de MBL e idade e sexo dos indivíduos (dados não mostrados). A taxa de infecção por *L. chagasi* foi maior entre os vizinhos de casos de LV (58,24%) do que entre os indivíduos selecionados aleatoriamente (41,76%), porém a diferença não foi significativa ( $P = 0.322$ ).



Tabela 4. Distribuição dos genótipos do gene *mbi2* gene na população de Tersina-PI expostos a *L. chagasi*, e apresentando infecção assintomática ou leishmaniose visceral.

Grupos clínico-epidemiológicos	Genótipos		Odds ratio	95% CI	valor <i>P</i> <sup>a</sup>
	No. Altos*	No. Intermediários/Baixos*			
LV <sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9</sup>	35	25			
Infectedos <sup>1,10</sup>	32	58	2.4	1.2-4.6	<sup>1</sup> <b>0.010</b>
Infectedos, Vizinhos <sup>2</sup>	19	34	2.4	1.2-4.6	<sup>2</sup> <b>0.028</b>
Infectedos, Aleatórios <sup>3</sup>	13	24	2.4	1.0-5.8	<sup>3</sup> <b>0.044</b>
Não-infectedos <sup>4,10</sup>	37	50	1.8	0.9-3.6	<sup>4</sup> 0.086
Não-infectedos, Vizinhos <sup>5</sup>	16	28	0.7	0.4-1.3	<sup>10</sup> 0.426
Não-infectedos, Aleatórios <sup>6</sup>	21	22	1.9	0.8-4.4	<sup>5</sup> <b>0.044</b>
Aleatórios <sup>6</sup>	21	22	1.7	0.7-3.9	<sup>6</sup> 0.451
Total**, controles <sup>9</sup>	95	136	2.0	1.1-3.5	<sup>9</sup> <b>0.025</b>
Vizinhos <sup>7,11</sup>	48	77	2.2	1.2-4.2	<sup>7</sup> <b>0.017</b>
Aleatórios <sup>8,11</sup>	47	59	1.7	0.9-3.3	<sup>8</sup> 0.116
			0.8	0.4-1.3	<sup>11</sup> 0.435

\*Altos: genótipos que resultam em níveis altos de MBL (YA/YA, YA/XA); Intermediários/Baixos: genótipos que resultam em níveis séricos baixos ou intermediários de MBL (YA/O, XA/O, O/O).

\*\*Incluem indivíduos cuja condição de infecção não foi determinada, porém são saudáveis.

<sup>a</sup>: teste  $\chi^2$ .

#### 4.6 Genótipos de MBL X Complicações da Leishmaniose Visceral

A proporção dos genótipos resultando em altos níveis séricos de MBL foi maior entre indivíduos com LV que necessitaram de transfusão de sangue do que entre indivíduos com LV não-complicada, mas a diferença não foi significativa. Contudo, indivíduos portadores de genótipos que facilitam a infecção por *L. chagasi* se apresentaram com pelo menos 6,80 vezes mais chance de necessitar de uma transfusão de sangue ao desenvolver a LV do que indivíduos infectados que permanecem assintomáticos ( $P = 0,001$ ) (tabela 5).

**Tabela 5. Distribuição dos genótipos do gene *mb12* em indivíduos infectados assintomáticos e em casos de leishmaniose visceral apresentando ou não complicações clínicas.**

Grupos clínico-epidemiológicos	Genótipos		Odds ratio	95% CI	valor $P^c$
	No. Altos *	No. Intermediários/Baixos *			
LV: Não-complicada <sup>1,2</sup>	17	18			
<sup>a</sup> LV: Anemia severa <sup>1,3</sup>	15	4	0.25	0.07-0.91	<sup>1</sup> $P = 0.06$
<sup>b</sup> LV: Cuidado intensivo	3	3			
a + b <sup>2,4</sup>	18	7	0.37	0.12-1.10	<sup>2</sup> $P = 0.121$
Infectados assintomáticos <sup>3,4</sup>	32	58	6.80 4.66	2.08-22.22 1.76-12.34	<sup>3</sup> $P = 0.001$ <sup>4</sup> $P = 0.002$

\* Altos: genótipos que resultam em níveis altos de MBL (YA/YA, YA/XA); Intermediários/Baixos: genótipos que resultam em níveis séricos baixos ou intermediários de MBL (YA/O, XA/O, O/O).

<sup>c</sup>: teste  $\chi^2$ .

#### 4.7 Níveis séricos de MBL X Status da infecção por *L. chagasi*

Foi examinada então a associação entre desfecho clínico da infecção por *L. chagasi* e MBL como uma característica quantitativa. Os resultados na Figura 17 mostram que os fenótipos para a MBL estão associados ao desfecho clínico da infecção: os níveis foram significativamente menores (Mann-Whitney rank sum test com a correção de Bonferroni,  $P = 0.033$ ) em indivíduos infectados assintomáticos do que em indivíduos com diagnóstico para LV; os níveis de MBL foram também menores em indivíduos não infectados, porém não houve diferença estatística. Além disso, os níveis de MBL foram mais baixos entre vizinhos infectados assintomáticos do que entre os casos de LV, porém sem diferença estatística (dados não mostrados).

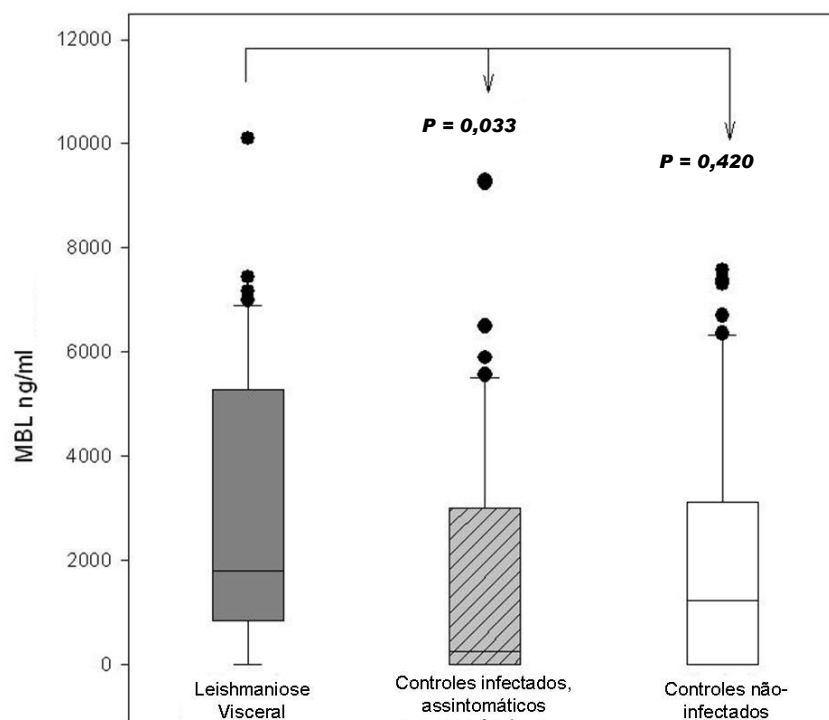


Figura 17. Box-whisker plots das concentrações séricas de MBL de acordo com as categorias clínico-epidemiológicas de indivíduos infectados por *L. chagasi* na região endêmica para LV de Teresina-PI. O gráfico mostra o 10°, 25°, 50°, 75°, e 90° percentis

#### 4.8 Frequências haplotípicas e alélicas da MBL

Com a reconstrução dos haplótipos, a partir dos dados genotípicos obtidos para a MBL, foram obtidos 13 haplótipos no total, sendo 4 os mais frequentes: LYA, HYA, LYB, LXA. As figura 18, 19, 20, 21 mostram a distribuição dos haplótipos na população de Teresina como um todo, no grupo de casos de LV, no grupo de controles vizinhos aos casos e no grupo de controles aleatórios, respectivamente. A tabela 6 mostra as frequências alélicas obtidas para os 5 loci estudados, novamente, na população e nos três grupos estudados.

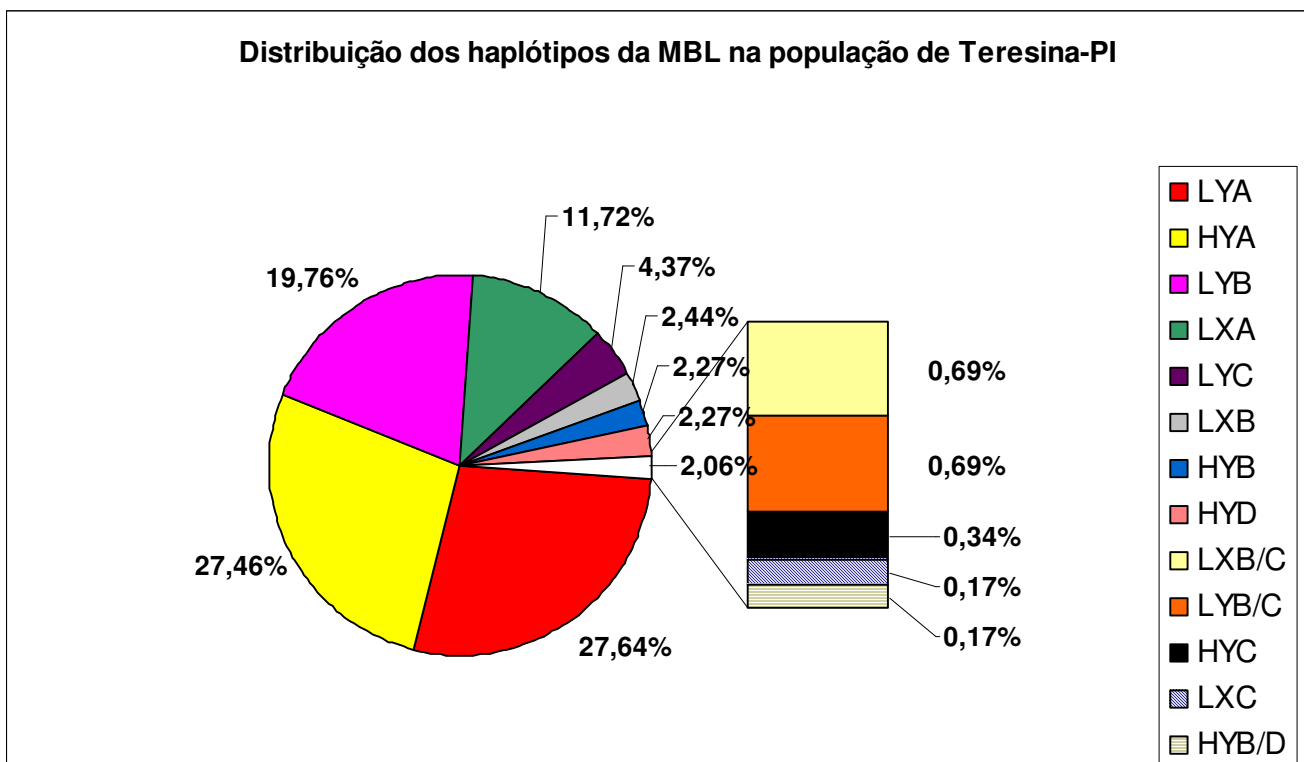


Figura 18. Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL na população de Teresina-PI,  $n = 291$ .

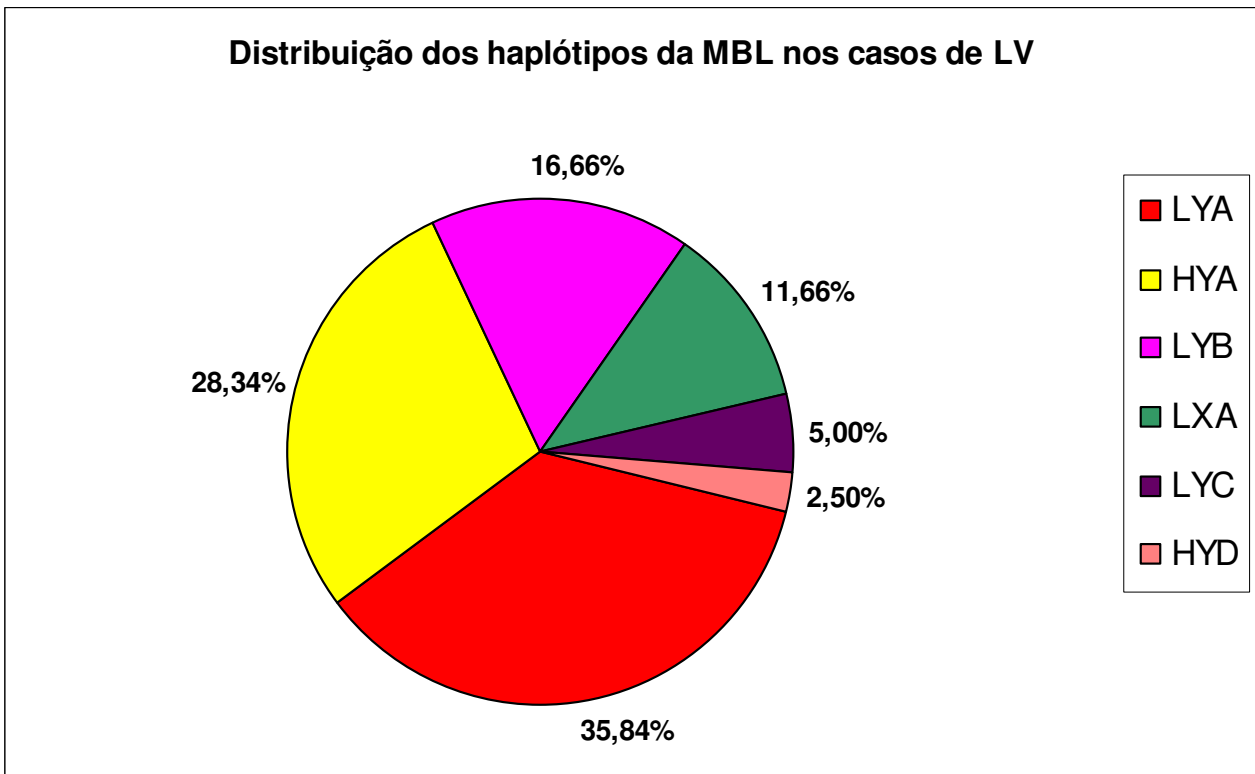


Figura 19. Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL no grupo de casos de LV,  $n = 60$ .

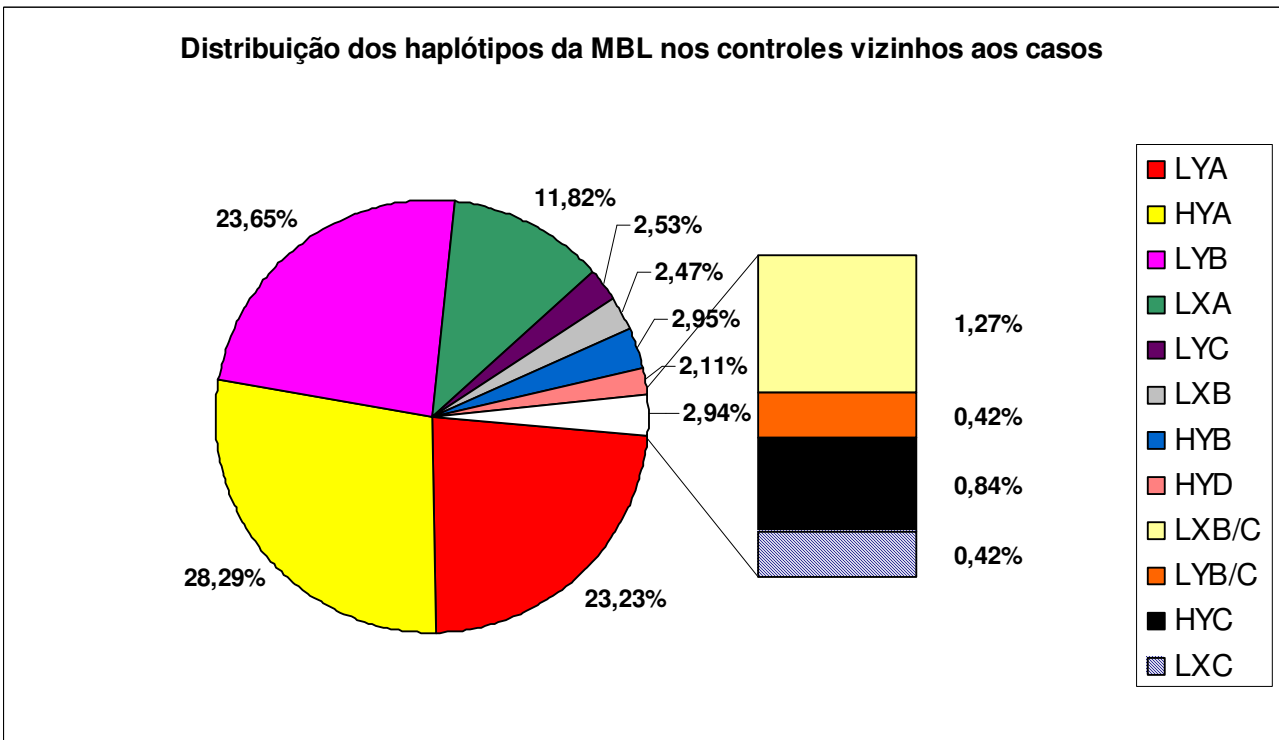


Figura 20. Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL no grupo de controles vizinhos aos casos de LV,  $n = 125$ .

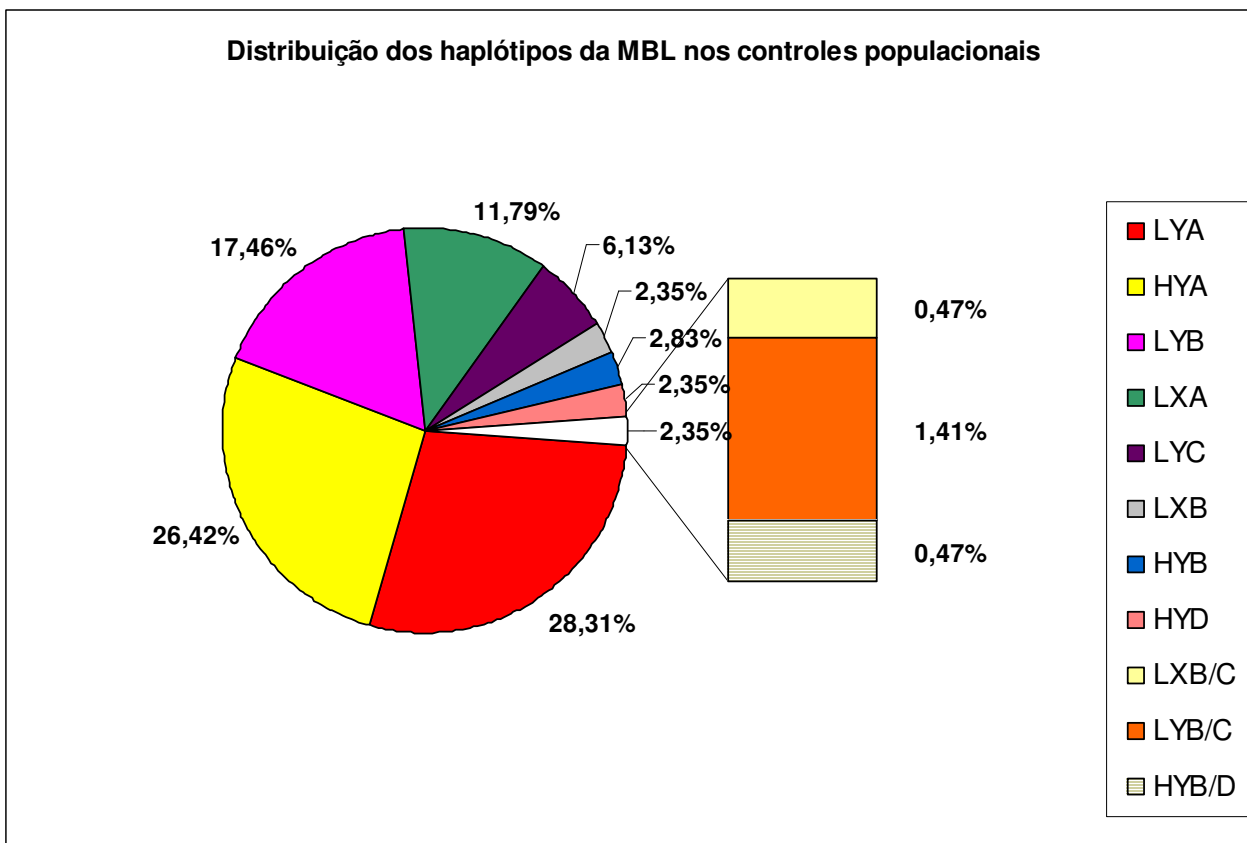


Figura 21. Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL no grupo de controles populacionais,  $n = 106$ .

Tabela 6. Frequências alélicas para o gene da MBL. Exon, alelos: A, B, C e D. Promotor, alelos: H, L, X e Y.

Alelo	Casos LV	Controles população	Controles vizinhos	População Geral
<b>A</b>	0,759	0,642	0,610	0,654
<b>B</b>	0,166*	0,250	0,316*	0,260
<b>C</b>	0,050	0,080	0,054	0,062
<b>D</b>	0,025	0,028	0,020	0,024
<b>H</b>	0,308	0,320	0,337	0,325
<b>L</b>	0,691	0,679	0,662	0,674
<b>X</b>	0,116	0,146	0,170	0,150
<b>Y</b>	0,883	0,853	0,829	0,849

\* Frequências alélicas diferiram significativamente, teste  $\chi^2 = 7,92$ ;  $P=0,005$ . Para todas as outras comparações da tabela, não houve diferença estatística significativa.

## *5. Discussão*

---

A partir da identificação da deficiência da MBL como sendo a causa do freqüente defeito opsônico citado anteriormente, inúmeros estudos de associação a doenças buscaram definir o real papel dessa proteína sérica. Os primeiros estudos concentraram-se em populações de crianças, e sugeriu-se que a MBL poderia prover uma atividade capaz de substituir a dos anticorpos durante a “janela de vulnerabilidade” (aproximadamente de 6 a 24 meses de idade), quando os níveis de anticorpos (IgG) maternos diminuem e a resposta imune adaptativa da criança é ainda imatura (Super et al.,1989). Contudo, estudos realizados com adultos sugeriram que provavelmente exista um papel para a MBL durante toda a vida, agindo na primeira linha de defesa contra microorganismos antes do início da produção de anticorpos.

Muitas evidências apontam um papel complexo da MBL em várias doenças. A deficiência da proteína tem sido associada à susceptibilidade aumentada para várias doenças infecciosas, principalmente nas doenças causadas por patógenos extracelulares, entre elas: (a) infecção pneumocócica invasiva: em estudo realizado na Inglaterra, 12% de 229 pacientes infectados com *Streptococcus pneumoniae* foram homozigotos para os alelos variantes da MBL enquanto que somente 5% dos 353 controles apresentaram essa condição (Roy et al., 2002); (b) doença meningocócica: em outro estudo na Inglaterra a presença de homozigotos variantes da MBL foi significativamente maior em indivíduos infectados por *Neisseria meningitidis* (7,7%) do que em indivíduos controles (1,5%) (Hibberd et al., 1999); (c) Aspergillose pulmonar necrosante: um estudo realizado por Crosdale e colaboradores mostrou que alelos variantes



da MBL estavam presentes em 70% dos pacientes infectados por *Aspergillus fumigatus*, contra 26% dos controles (Crosdale et al., 2001).

Outro resultado interessante obtido a partir dos trabalhos de associação da MBL a doenças é o fato de que as variantes alélicas da MBL que resultam em níveis séricos baixos da proteína se apresentam em frequências relativamente altas em todas as populações de estudo, com raras exceções. Esse fato levanta a possibilidade de que existam pressões seletivas favorecendo a sobrevivência dos portadores desses alelos variantes, em outras palavras, concentrações baixas de MBL em alguns casos podem ser vantajosas, conferindo benefícios relativos aos portadores (Lipscombe et al., 1992; Garred et al., 1994). Por isso, polimorfismos no gene da MBL provavelmente são mantidos por heterose (vantagem para indivíduos heterozigotos) em analogia ao exemplo clássico do alelo da hemoglobina *HbS* que resulta na anemia falciforme na África Sub-sahariana (Garred et al., 2006).

Em certos grupos Indígenas da América do Sul como os *Quechua* e os *Aymara* no Peru, o alelo B quase substituiu o alelo selvagem A, com uma frequência de 80% e com mais de 60% da população homozigota para esse alelo variante (Garred et al., 2006). Essas frequências muito altas podem ter surgido somente por efeitos fundadores, ou por deriva genética, nesse caso a MBL aparece como uma proteína sem importância, cuja função provavelmente é substituída por outras proteínas. Contudo, por terem sido relatadas associações da MBL com doenças, e por ter sido descoberto que os estados frequentes de deficiência achados em populações africanas (alelo C com frequência de até 32%) e da América do sul (alelo B) são causados por eventos moleculares

independentes, tem se sugerido a hipótese de que pelo menos parcialmente essas frequências elevadas foram causadas por pressões de seleção positiva (Madsen et al., 1998).

Apesar de não ser possível determinar com certeza se essas pressões ocorrem e estão operando nas populações de hoje, a análise da sequência de um haplótipo estendido do gene *mbl2*, em grupos étnicos diferentes nos Estados Unidos indica um grau de heteroziguidade maior do que o esperado no gene *mbl2*, o que suporta a noção de que forças seletivas ainda estão em ação, mesmo nos dias de hoje (Bernig et al., 2004).

Uma possível causa para as frequências relativamente altas dos alelos variantes da proteína se baseia no fato de que alelos selvagens do gene *mbl2*, por conferirem níveis altos de proteína circulante, contribuem para a opsonização eficiente de patógenos intracelulares, o que potencialmente intensifica a disseminação hematogênica e a fagocitose desses patógenos, aumentando sua virulência (Garred et al., 1992). Por isso, indivíduos com alelos variantes para a MBL apresentam níveis séricos baixos da proteína, o que confere uma vantagem relativa a esses indivíduos no que diz respeito à susceptibilidade a doenças causadas por tais parasitas intracelulares.

Alguns estudos de associação a doenças causadas por microorganismos intracelulares têm corroborado essa hipótese. Um estudo realizado na Etiópia demonstrou que a deficiência de MBL conferia proteção contra a infecção por *Mycobacterium leprae* (Garred et al., 1994). Outro estudo realizado na África mostrou que o alelo B da MBL estava relacionado à proteção contra a infecção pulmonar e meningeal por *Mycobacterium tuberculosis* (Hoal-Van Helden et al.,

1999). Mais recentemente, em um estudo realizado na Dinamarca, foi demonstrado que a presença de um genótipo associado a níveis baixos de MBL (XA/O) era significativamente mais freqüente entre os controles (13% de 250 indivíduos) do que entre os pacientes (3% de 109 indivíduos) envolvidos no estudo de associação com infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Søborg et al., 2003).

Os resultados obtidos no presente trabalho também dão suporte à idéia de que níveis baixos de MBL sérica podem conferir vantagens relativas aos seus portadores. Nesse caso, indivíduos com alelos variantes do gene *mbl2* estariam pelo menos, parcialmente protegidos de uma infecção pelo patógeno intracelular *Leishmania chagasi*.

A Tabela 4 mostra que no grupo de 60 pacientes com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, genótipos que conferem altos níveis de MBL (YA/YA e YA/XA) foram significativamente mais freqüentes ( $P=0,025$ ) do que no grupo de 231 controles. Essa diferença é ainda mais significativa ( $P=0,010$ ) quando comparados o grupo de casos com indivíduos infectados, porém assintomáticos.

Esse dado também é corroborado pelos resultados mostrados na Figura 17, comprovando que o desfecho clínico da infecção por *L. chagasi* está associado aos níveis séricos de MBL. Os níveis foram significativamente menores (Mann-Whitney rank sum test,  $P=0.011$ ) em indivíduos infectados assintomáticos do que em indivíduos com diagnóstico para leishmaniose visceral.

A Figura 16 mostra uma forte correlação entre os 5 genótipos simplificados encontrados para a MBL e seus respectivos níveis séricos, ( $P < 0,001$ ), teste de *Kruskal-Wallis*. Geralmente os genótipos e fenótipos para a MBL mostram uma boa correlação, e os estudos envolvendo a proteína frequentemente utilizam somente um desses dados para inferir a deficiência. Porém, segundo Dommet, Klein e Turner (Dommet et al., 2006) é importante, sempre que possível, realizar a genotipagem dos alelos e medir a quantidade sérica da proteína, pois só assim é possível se ter a certeza da validade do estudo.

Outro resultado interessante do presente trabalho é apresentado na Tabela 5. Indivíduos portadores de genótipos que conferem níveis séricos altos de MBL, o que favorece a infecção por *L. chagasi*, se apresentaram com pelo menos 4,66 vezes mais chance de necessitar de uma transfusão de sangue e de cuidados intensivos ao desenvolver a LV do que indivíduos infectados que permanecem assintomáticos ( $P = 0,002$ ). Por isso, genótipos da MBL podem ser úteis para estimar o risco de desenvolvimento da LV em áreas de alta transmissão, e uma vez que o paciente apresente a doença, determinar o risco de desenvolver anemia severa e outras complicações.

As figuras 18, 19, 20 e 21 mostram as frequências haplotípicas do gene *mb12* na população de estudo. Treze haplótipos foram observados no total, quatro deles são bem frequentes (LYA, HYA, LYB e LXA). Desses quatro, dois estão relacionados com níveis altos de proteína circulante (LYA e HYA), o haplótipo LXA está associado a níveis intermediários e o haplótipo LYB se apresenta associado a níveis baixos ou deficientes de MBL (Garred et al., 2003).

O restante dos haplótipos aparece em menor número, todos eles relacionados com níveis baixos da proteína.

A distribuição dos haplótipos no grupo de controles populacionais (Figura 21) não foi muito diferente do que na população em geral (Figura 18). Já no grupo dos casos (Figura 19) houve um excesso de haplótipos que conferem níveis altos de MBL sérica em relação ao haplótipo LYB, que se apresentou menos freqüente. O contrário acontece no grupo de vizinhos (Figura 20), onde há um excesso de haplótipos que conferem níveis baixos de MBL, em detrimento dos haplótipos que conferem níveis altos.

A população de estudo no presente trabalho representa uma mistura de 21% de Caucasianos, 31% de Africanos e 48% de Ameríndios (Arpini-Sampaio et al., 1999). As distribuições dos haplótipos da MBL encontradas, juntamente com as freqüências alélicas obtidas para as variantes do exon 1 (Tabela 6) parecem confirmar essas proporções étnicas, pois estão de acordo com as observações de Garred, Madsen, Lozano e colaboradores (Garred et al., 2006; Madsen et al., 1998; Lozano et al., 2005) em trabalhos que descrevem a constituição haplotípica e alélica de diferentes populações representando vários grupos étnicos ao redor do mundo. Esses trabalhos mostram essencialmente: (a) Populações indígenas naturais da América do Sul apresentam freqüências alélicas altas para o alelo B da MBL (42-80%); (b) Caucasianos europeus apresentam freqüências alélicas relativamente baixas do alelo variante B (12-14%); (c) Populações africanas apresentam freqüências intermediárias do alelo variante C (7-34%); (d) O alelo D em todas as populações apresenta freqüências baixas (0-7%). A miscigenação dessas populações, portanto, poderia explicar as

freqüências alélicas obtidas na população de estudo: freqüência de B de 26%, freqüência de C de 6,2% e freqüência de D de 2,4%.

A Tabela 6 também mostra que a freqüência do alelo variante B no grupo de controles vizinhos aos casos de leishmaniose visceral é quase o dobro da freqüência obtida para o grupo de casos (16,6-31,6%; $P=0,005$ ; dados não mostrados), chegando a 37% quando se considera somente os controles vizinhos infectados. Isso sugere um papel protetor desse alelo mutante na população uma vez que ele confere níveis baixos de MBL sérica, em outras palavras, mesmo com uma exposição semelhante a do grupo de casos para a infecção por *L. chagasi*, indivíduos vizinhos não se infectam, justamente, por apresentarem uma freqüência relativamente maior de genótipos resultantes em níveis baixos de MBL, resultado da alta freqüência do alelo variante B nesses indivíduos.

Os dados aqui apresentados mostram o papel da MBL na aquisição e desenvolvimento da leishmaniose visceral no homem. Esta proteína pode ter um papel importante na evolução dos casos de leishmaniose visceral, sendo que sua genotipagem nos pacientes poderia contribuir para uma melhor estratégia de tratamento, resultando em melhor prognóstico para esses pacientes.

## *6. Referências Bibliográficas*

---

Alencar, J.E.- 1961. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 3: 175-80.

Arpini-Sampaio, Z., Costa, M. C. B., Melo, A. A., Carvalho, M. F. V. A., Deus, M. S. M., Simões, A. A. - 1999. Genetic polymorphisms and ethnic admixture in African-derived black communities of northeastern Brazil. *Human Biol.* 71:67-77.

Bernig, T., Taylor, J. G., Foster, C. B., Staats, B., Yeager, M. and Chanock, S. J. - 2004. Sequence analysis of the mannose-binding lectin (MBL2) gene reveals a high degree of heterozygosity with evidence of selection. *Genes Immun* 5: 461-476.

Brener, Z. Calazar canino em Minas Gerais. Belo Horizonte, 1957 [Tese de Doutorado Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG]: 90 pp.

Corredor, A., Gallego, J.F., Tesh, R.B., Morales, A., Ferro de Carrasquilla, C., Young, D.G., Kreutzer, R.D., Boshell, J., Palar, M.Y., Cáceres, E., Pelaez, D. - 1989. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 480 - 6.

Crosdale, D. J., Poulton, K. V., Ollier, W. E., Thomson, W., Denning, D. W. - 2001. Mannose-binding lectin gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 184: 653-6.

Dahl, M. R., Thiel, S., Willis, A. C., Vorup-Jensen, T., Christensen, T., Petersen, S. V., Jensenius, J. C. - 2000. Mannan-binding lectin associated serine protease 3 (MASP-3)-a new component of the lectin pathway of complement activation. *Immunopharmacology* 49: 79.

Deane, L.M., Deane, M.P. - 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem e do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. *Hospital, R. Janeiro*, 48: 61-76.



Deane, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.

Desjeux, P. - 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbio Infect Dis*, 27:305 - 318.

Dommet, R. M., Klein, N., Turner, M. W. - 2006. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*. 68: 193 -209.

Downing, I., Koch, C., Kilpatrick, D. C. - 2003. Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin. *Immunology*. 109: 360-4.

Ezekowitz, R. A. B., Day, L. E., Herman, G. A. - 1988. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med* 167: 1034-1046.

Ezekowitz, R. A. B. - 1991. Ante-antibody immunity. *Curr Biol* 1(1): 60-2.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider - 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Fraser, I. P., Koziel, H., Ezekowitz, R.A. - 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol*. 10:363-372.

Garred, P., Madsen, H. O., Kurtzhals, J. A. L., Lamm, L. U., Thiel, S., Hey, A. S., Svejgaard, A. - 1992. Diallelic polymorphism may explain variations of blood

concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. *Eur J Immunogenet* 19 :403–412.

Garred, P., Harboe, M., Oettinger, T., Koch, C., Svejgaard, A. - 1994. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet* 21: 125–31.

Garred, P., Pressler, T., Madsen, H. O., Frederiksen, B., Svejgaard, A., Hoiby, N., Schwartz, M., Koch, C. - 1999. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 104: 431–437.

Garred, P., Larsen, F., Madsen, H. O., Koch, C. - 2003. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol Immunol* 40: 73–84.

Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R., Madsen, H. O. - 2006. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 7 (2):85-94.

Ghiran, I., Barbashov, S. F. et al. - 2000. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* 192(12): 1797-808.

Graudal, N. A., Madsen, H. O., Tarp, U., Svejgaard, A., Jurik, A. G., Graudal, H. K., Garred, P. - 2000. The association of variant mannosebinding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 515–521.

Guo, N., Mogue, T., Weremowicz, S., Morton, C. C., Sastry, K. N. - 1998. The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. *Mamm Genome* 9: 246–249.

Hibberd, M. L., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Booy, R., Levin, M. - 1999. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with

susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 353: 1049-53.

Hoal-van Helden, E., Epstein, J., Victor T. C., Hon D., Lewis, L. A., Zurakowski, D., Ezekowitz, R. A. B., van Helden, P. D. - 1999. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediatr Res* 45:459-464

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway C. A., Ezekowitz, R. A. - 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-8

Ikeda, K., Sannoh, H., Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I. - 1987. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem.* 262: 7451-4.

Jack, D. L., Read, R. C., Tenner, A. J., Frosch, M., Turner, M. W., Klein, N. J. - 2001. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis* 184:1152-62.

Kawasaki, T., Etoh, R., Yamashina, I. - 1978. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 81: 1018-24.

Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I. - 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J Biochem (Tokyo).* 94:937-947.

Klickstein, L. B., Barbashov, S. F. - 1997. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 7(3): 345-55.

Koch, A., Melbye, M., Sorensen, P., Homoe, P., Madsen, H. O., Molbak, K., Hansen, C. H., Andersen, L. H., Hahn, G. W., Garred, P. - 2001. Acute

respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 285:1316-1321.

Lainson R, Shaw, J.J, Lins, Z.C. - 1969. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63: 741-5.

Lainson R, Shaw, J.J. Epidemiological considerations of the Leishmaniasis with particular reference to the New World. In: Ecology and Physiology of Parasites. A.M.Fallis (Editor), University of Toronto Press: 21-57, 1971.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution: In: Peter, W. & Killick-Kendrick R. (eds.) - 1987. The Leishmaniasis in biology and medicine, vol. 1, London, Academic Press.

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. *Hum Mol Genet* 1: 709-715.

Lozano, F., Suarez, B., Munoz, A. et al. - 2005. Novel MASP2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens* 66: 131-5.

Madsen, H. O., Garred, P., Kurtzhals, J. A. L., Lamm, L. U., Ryder, L. P., Thiel, S., Svejgaard, A. - 1994. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 40:37-44.

Madsen, H. O., Garred, P., Thiel, S., Kurtzhals, J. A. L., Lamm, L. U., Ryder, L. P., Svejgaard, A. - 1995. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 155: 3013-3020.

Madsen, H. O., Satz, M. L., Høgh, B., Svejgaard, A., Garred, P. - 1998. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *J Immunol* 161:3169-3175.

Malhotra, R., Thiel, S. et al. - 1990. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J Exp Med* 172(3): 955-9.

Marzochi, M.C.A., Marzochi, K.B.F., Carvalho, R.W. - 1994. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Par. Today* 10 (1): 37-34.

Matsushita, M., Fujita, T. - 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176(6): 1497-502.

Miller, M. E., Seals, J., Keye, R., Levitsky, L. C. - 1968. A familial, plasma associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection. *Lancet* 2: 60-3.

Ministério da saúde. Brasil - 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

Naito, H., Ikeda, A., Hasegawa, K., Oka, S., Uemura, K., Kawasaki, N., Kawasaki, T. - 1999. Characterization of human serum mannan-binding protein promoter. *J Biochem (Tokyo)* 126: 1004-1012.

Ogden, C. A., de Cathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., Henson, P. M - 2001. C1q and mannan binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194:781-795.

[OMS]. Organización Mundial de La Salude. Lucha contra las Leishmaniasis. Ginebra. (OMS - Serie de Informes Técnicos, 793), 1990.

Presanis, J. S., Kojima, M., Sim, R. B. - 2003. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochem Soc Trans* 31 (4): 748 - 752.

Rey L. *Parasitologia - parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. O complexo "Leishmania donovani" e a leishmaniose visceral. p. 215-26, 1991.

Roy, S, Knox, K., Segal, S., Griffiths, D., Moore, C. E., Welsh, K. I. *et al.* and the Oxford Pneumococcal Surveillance Group - 2002. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet* 2002 359: 1569-73.

Santos, I. K., Costa, C. H., Krieger, H., *et al.* - 2001. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69:5212-5.

Sastry, K., Herman, G. A., Day, L., Deignan, E., Bruns, G., Morton, C. C., Ezekowitz, R. A. B. - 1989. The human mannose-binding protein gene—exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med* 170: 1175-1189.

Seyfarth, J., Garred, P., Madsen, H. O - 2005. The 'involution' of mannose binding lectin. *Hum Mol Genet* 14:2859-2869.

Sheriff, S., Chang, C.Y., Ezekowitz, R. A. - 1994. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1:789-794 [erratum: *Nat StrucBiol* 1996; 3:103].

Sherlock, I.A, Miranda, J.C, Sadigursky, M, Grimaldi, Jr G. - 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 511.

Silveira, F.T., Lainson, R, Shaw, J.J., Povoá, M.M. - 1982. Leishmaniasis in Brazil. XVII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian Visceral Leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 830-2.

Soothill, J. F., Harvey, B. A. M. - 1976. Defective opsonization: a common immunity deficiency. *Arch Dis Child* 51: 91-9.

Søborg, C., Madsen, H. O., Andersen, A. B., Lillebaek, T., Kok-Jensen, A., Garred, P. - 2003. Mannose-Binding Lectin Polymorphisms in Clinical Tuberculosis. *J Infect Dis* 188: 777-782.

Stover, C. M., Thiel, S. et al. - 1999. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol* 162(6): 3481-3490.

Sumiya, M., Super, M., Tabona, P., Levinsky, R. J., Arai, T., Turner, M. W., Summerfield, J. A. - 1991. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337:1569-1570.

Summerfield, J. A., Sumiya, M., Levin, M., Turner, M. W. - 1997. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 314: 1229-32.

Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R. J., Turner, M. W. - 1989. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. *Lancet* 2:1236-19.

Takahashi, M., Endo, Y. et al. - 1999. A truncated form of mannose-binding lectin associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative

polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol* 11(5): 859-63.

Taylor, M. E., Brickell, P. M., Craig, R. K., Summerfield, J. A. - 1989. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J* 262: 763-771.

Tenner, A. J., Robinson, S. L. et al. - 1995. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. *Immunity* 3(4): 485-493.

Thiel, S., Vorup-Jensen, T. et al. - 1997. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386(6624): 506-10.

Travi, B.L., Jaramillo, C., Montoya, J.A.A., Segura, I., Gonçalves, A., Velez, I.D. - 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 557-65.

Turner, M. W., Mowbray, J. F., Robertson, D. R. - 1981. A study of C3b deposition on yeast surfaces by sera of known opsonic potential. *Clin Exp Immunol.* 46: 412-9.

Turner, M. W. - 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 40(7): 423-9.

Vieira, J.B.F., Coelho, G.E. - 1998. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 (2): 85-92.

Weis, W. I., Drickamer, K. - 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360(6400): 127-134.



