

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

TANY SIQUEIRA REGES

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO GENE *MBL* (MANNOSE
BINDING-LECTIN) EM MULHERES (GRÁVIDAS E MÃES)
PORTADORAS DO HIV-1 (*Vírus da Imunodeficiência humana 1*) NO
ESTADO DO TOCANTINS.

BELÉM - PARÁ
2009

TANY SIQUEIRA REGES

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO GENE *MBL* (MANNOSE
BINDING-LECTIN) EM MULHERES (GRÁVIDAS E MÃES)
PORTADORAS DO HIV-1 (*Vírus da Imunodeficiência humana 1*) NO
ESTADO DO TOCANTINS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal do
Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Antonio Carlos R. Vallinoto

BELÉM - PARÁ
2009

TANY SIQUEIRA REGES

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO GENE *MBL* (MANNOSE
BINDING-LECTIN) EM MULHERES (GRÁVIDAS E MÃES)
PORTADORAS DO HIV-1 (*Vírus da Imunodeficiência humana 1*) NO
ESTADO DO TOCANTINS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Prof^o. Dr^o. Antonio Carlos Rosário
Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA
(orientador)

Prof^a. Dr^a. Maristela Gomes da Cunha
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof^a. MsC. Vânia Nakauth Azevedo
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Belém, 15 de dezembro de 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof^o. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Virologia.

Ao Prof^o. Dr^o. Luiz Fernando Machado pelo exemplo de postura profissional e sobretudo pessoal, meu profundo agradecimento.

Aos meus amigos do Laboratório, agradeço o companherismo, o apoio e a atenção sincera de todos nesses três anos de convívio e em especial agradeço a Felipe Freitas pela dedicação e paciência desde o início deste projeto, demonstrando ser um grande amigo.

À minha família, que em todos os momentos difíceis pelo qual passei ao longo do curso sempre estiveram ao meu lado me dando força e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	iii
RESUMO	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A FAMÍLIA RETROVIRIDAE	2
1.1.1 <i>O Vírus da Imunodeficiência humana 1 (HIV-1)</i>	2
1.1.2 Morfologia e Organização Genômica do HIV-1	3
1.1.3 Replicação do HIV-1	4
1.2 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)	6
1.2.1 Estrutura protéica e função biológica	7
1.2.2 Polimorfismo no Éxon 1 do gene <i>MBL</i>	8
1.3 OBJETIVOS	11
1.3.1 Objetivo Geral	11
1.3.2 Objetivos Específicos	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS	12
2.1.1 Pacientes HIV-1 soropositivos	12
2.1.2 Indivíduos Controles Soronegativos para o HIV-1	12
2.2 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	13
2.2.1 Extração do DNA	13
2.2.2 Investigação molecular das formas alélicas do gene <i>MBL</i>	13
2.2.3 Eletroforese	14
2.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA E DE LINFÓCITOS T CD4	14
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
3. RESULTADOS	15
3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS	15
3.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÕES DE LINFÓCITOS TCD4+ E DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA	17
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS	26

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

FIGURAS:

Figura 1 – Estrutura morfológica do HIV-1	3
Figura 2 – Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV-1	5
Figura 3 – Estrutura da molécula de MBL	8
Figura 4 - Esquema demonstrando os polimorfismos no éxon 1 do gene <i>MBL</i>	10

TABELAS:

Tabela 1 – Distribuição das frequências alélicas para o gene <i>MBL</i> entre os grupos estudados.	15
Tabela 2 – Distribuição das frequências genotípicas do gene <i>MBL</i> entre os grupos estudados.	16
Tabela 3 – Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene <i>MBL</i> entre os indivíduos infectados e o grupo controle	17
Tabela 4 – Polimorfismos do gene <i>MBL</i> e a quantificação de células TCD4+ nos indivíduos infectados.	18
Tabela 5 – Polimorfismos do gene <i>MBL</i> e a quantificação da carga viral	18
Tabela 6 – Distribuição das frequências genotípicas entre os grupos de MNT e MT.	19
Tabela 7- Distribuição das frequências genotípicas entre os grupos de crianças soronegativas e soropositivas	20

RESUMO

No presente estudo foram investigadas as frequências dos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* em um grupo de 50 amostras de grávidas e mães infectadas pelo HIV-1 e de seus respectivos filhos, portadores ou não da infecção, e um grupo controle de 45 indivíduos soronegativos com o objetivo de avaliar uma possível associação entre os polimorfismos e a infecção pelo HIV, assim como sua associação com a transmissão vertical. A identificação dos alelos *MBL** A, *B, *C e *D foi realizada por meio da reação em cadeia mediada pela polimerase, utilizando seqüências de iniciadores específicos e posterior digestão enzimática (RFLP). As análises das frequências alélicas e genotípicas do éxon 1 não mostraram qualquer significância estatística entre os grupos ($p>0,05$). As associações entre mães transmissoras do vírus e as não transmissoras com os polimorfismos do gene *MBL* não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, assim como as análises da frequência da distribuição genotípica entre os grupos de crianças soronegativas e crianças soropositivas. As associações entre o número de linfócitos TCD4+, a carga viral plasmática e os polimorfismos do gene *MBL* não foram estatisticamente significantes. Desse modo, pode-se sugerir a ausência de uma correlação entre estes polimorfismos e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, assim como na transmissão vertical.

1. INTRODUÇÃO

O *Vírus da Imunodeficiência humana* (HIV), agente etiológico da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida) foi inicialmente identificado no tecido linfóide de um paciente masculino, homossexual, de 33 anos de idade, em 1983 (Barre-Sinoussi *et al*, 1983). Inicialmente o grupo de risco era composto principalmente por homossexuais e usuários de drogas injetáveis, entretanto, no decorrer dos últimos 20 anos, a infecção passou a ser observada com ascensão em mulheres que tinham contato com parceiros infectados e em crianças.

O Programa Conjunto das Nações Unidas em HIV/AIDS (UNAIDS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que o número de indivíduos vivendo com o HIV em 2008 é em média 33,4 milhões de pessoas. As mulheres representam metade desse total e estão sob risco mais alto de infecção, especialmente em localidades em que a via de contaminação heterossexual é a predominante. Estima-se que 85% dessas mulheres estejam em idade reprodutiva, o que chama atenção especial para a prevenção da transmissão vertical do HIV. O número total de pessoas vivendo com o vírus em 2008 foi 20% maior que no ano 2000, e a prevalência foi aproximadamente três vezes maior que em 1990. Em 2008, estima-se 2,7 milhões novas infecções por HIV, onde, em média, 430.000 dessas novas infecções são em crianças menores de 15 anos. (UNAIDS/WHO, 2009).

No Brasil, uma pesquisa de abrangência nacional feita pelo Ministério da Saúde (MS) em 2004, estimou que no país cerca de 593 mil pessoas, entre 15 a 49 anos de idade, vivem com HIV e AIDS. Deste número, aproximadamente 208 mil são mulheres e 385 mil são homens. A atual predominância heterossexual da transmissão do HIV tem levado ao aumento da infecção entre as mulheres, acarretando, por sua vez, o aumento dos casos de crianças infectadas por transmissão materno-infantil (TMI). Também denominada de transmissão vertical, a TMI pode ocorrer durante a gestação, o parto e a amamentação, sendo que cerca de 65% dos casos ocorrem durante o trabalho de parto.

Segundo o Boletim Epidemiológico de 2007-2008, o número de notificações de gestantes infectadas pelo HIV-1 entre os anos de 2000 a 2008 no Brasil totalizam 41.777 casos, destes 1.698 foram notificados na região Norte, sendo esta a região que apresentou o menor número de notificações. O estado do Tocantins notificou

nesses oito anos 146 casos de gestantes HIV soropositivas. A partir dos dados do Estudo de Prevalência do HIV em Parturientes, realizado em 2006, estimou-se para esse ano 12.962 casos de gestantes infectadas pelo HIV. Foram notificados 6.014 casos, o que representa apenas 50% dos casos esperados para o país nesse ano, revelando uma provável subnotificação da infecção no país.

No ano de 2006 o MS identificou 561 casos de AIDS em menores de cinco anos, correspondendo a uma taxa de incidência de 3,1/100.000 hab. Segundo as regiões de residência, essas taxas são: 2,9 na Região Norte, 2,0 na Região Nordeste, 3,3 na Região Sudeste, 5,7 na Região Sul e 2,3 na Região Centro-Oeste. Esses dados revelam que a disseminação da infecção ultrapassa os limites de um problema de saúde pública, tendo sérias implicações políticas e econômicas.

1.1 A FAMÍLIA *RETROVIRIDAE*

1.1.1 *O Vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1)*

O HIV pertence ao gênero *Lentivirus*, o qual está incluído na família *Retroviridae* (Gallo, 1991), identificado como o agente causador da AIDS em 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo, *et al.*, 1984; Levy, *et al.*, 1984).

A partícula viral dos retrovírus mede aproximadamente 100 nm de diâmetro e consiste de um envelope lipoprotéico formado pela membrana plasmática oriunda da célula hospedeira, altamente glicosilada com glicoproteínas de superfície e transmembranas (Sleasman *et al.*, 2003). No interior do vírus, encontra-se um capsídeo protéico, formado pela proteína p24, que constitui o nucleocapsídeo ou core. O nucleocapsídeo apresenta-se em forma cônica e armazena em seu interior proteínas do nucleocapsídeo, enzimas necessárias para replicação viral (transcriptase reversa, protease e integrase) e o genoma viral. O genoma destes vírus consiste de duas moléculas de RNA de polaridade positiva, idênticas, que medem cerca de 7 a 10 Kilobases (Kb) de comprimento. Estas servem como molde para a transcrição de uma molécula de DNA polimerase RNA dependente (transcriptase reversa), que posteriormente será integrada ao genoma da célula hospedeira sob forma de provírus. (Temim & Mitzutani, 1970).

Os retrovírus patogênicos ao homem incluem os *Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas 1 e 2* (HTLV-1 e HTLV-2), relacionados a distúrbios neurológicos e hematológicos, pertencentes ao gênero *Deltaretrovirus* e o *Vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2* (HIV-1 e HIV-2), classificados no gênero *Lentivírus*, (Gallo, 1991; Liu, 1996). O HIV-1 é dividido em três grupos: M, N e O. O grupo M é subdividido em nove subtipos que vão de A a K e ainda existem mais de quinze formas recombinantes que ocorrem devido as mutações frequentes que o vírus sofre (Greene *et al.*, 2001).

1.1.2 Morfologia e organização genômica do HIV-1

O HIV-1 é um RNA vírus, caracterizado pela complexidade de seu genoma, pois contém além de genes comuns aos retrovírus (*gag*, *pol* e *env*), outros seis genes regulatórios (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*) (Greene, 1991). O envoltório externo do vírus é composto por duas glicoproteínas, as quais se originam de uma proteína precursora, a gp 160: são denominadas glicoproteínas transmembrana gp 41 e de superfície gp 120, responsáveis pela interação com os ligantes (Greene, 1991). Internamente, o vírus apresenta um nucleocapsídeo protéico em formato de cone onde se encontra o genoma viral, a transcriptase reversa, a protease e a integrase (Wong- Staal & Gallo, 1985; Figura 1).

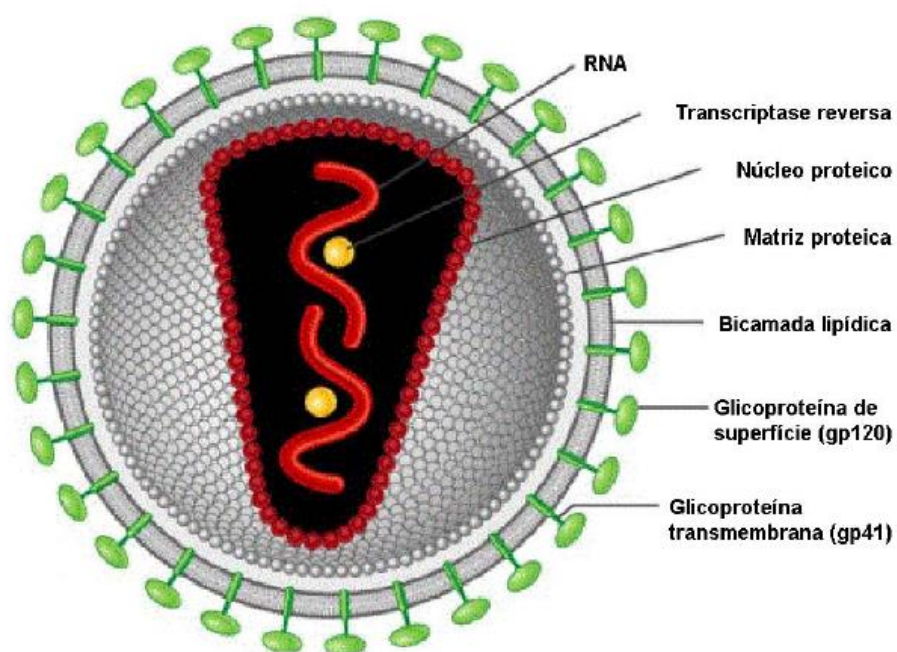


Figura 1 - Estrutura morfológica do HIV. (Fonte: <<http://bio.classes.ucsc.edu/bio80j/Lecture%20Slides/HIV.gif>>).

A produção dos componentes do HIV está sob comando dos genes virais. O gene *gag* é responsável pela formação das proteínas estruturais que compõem o cerne viral, como a matriz protéica (p17), o capsídeo viral (p24) e as proteínas mais internas do nucleocapsídeo (p7 e p9) (Ratner *et al.*, 1985).

A protease, enzima que cliva polipeptídeos precursores codificados pelos genes *gag* e *pol*, é codificada pelo mesmo gene responsável pela produção das seguintes enzimas: a transcriptase reversa, responsável pela replicação do RNA viral, a Rnase que degrada a fita após a síntese da primeira fita de DNA e a integrase, que faz a interação do ácido nucléico viral ao genoma celular (Varmus & Swanstrom, 1985; Levy, 1994).

O gene *env* é responsável pela codificação das proteínas do envelope viral, que são clivadas por proteases celulares em glicoproteínas de superfície (gp120 ou SU) e em glicoproteínas transmembranas (gp 41 ou TM), as quais vão interagir entre si através de forças não-covalentes. (Robey *et al.*, 1985).

Os genes reguladores *tat* e *rev* são essenciais para a replicação viral e os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, são importantes na replicação e infectividade viral. (Desrosiers, 1992)

1.1.3 Replicação do HIV-1

A fase inicial da replicação do HIV-1 inicia-se com a ligação da proteína do envelope viral (gp 120) com moléculas CD4, predominantemente na superfície de linfócitos T auxiliares ou macrófagos (Klatzmann *et al.*, 1984). Após essa interação inicial, a alça V3 da gp120 torna-se exposta e apta à ligação com co-receptores (receptores de citocinas), principalmente CCR5 e CXCR4 (Clapham, 1997), iniciando assim, o tropismo das cepas em M-trópico, cujas cadeias infectam principalmente macrófagos, mas também podem infectar células T, que usam os co-receptores CCR5 (“CC Chemokine Receptor 5”) e como T-trópico, cujas cadeias infectam eficientemente os linfócitos T que usam os co-receptores CXCR4 (Dimmock, Easton & Leppard, 2001)

Após estas interações, ocorre fusão das membranas celular e viral, processo mediado pela gp41 (Caffrey, 1998). O nucleocapsídeo viral penetra no citoplasma

celular, liberando o RNA do vírus, que pela ação da transcriptase reversa é convertido em DNA (Katz, 1994). Uma vez sintetizado, o DNA viral é integrado ao cromossomo celular pela ação da enzima integrase, o DNA integrado do HIV é chamado próvírus. (Figura 2).

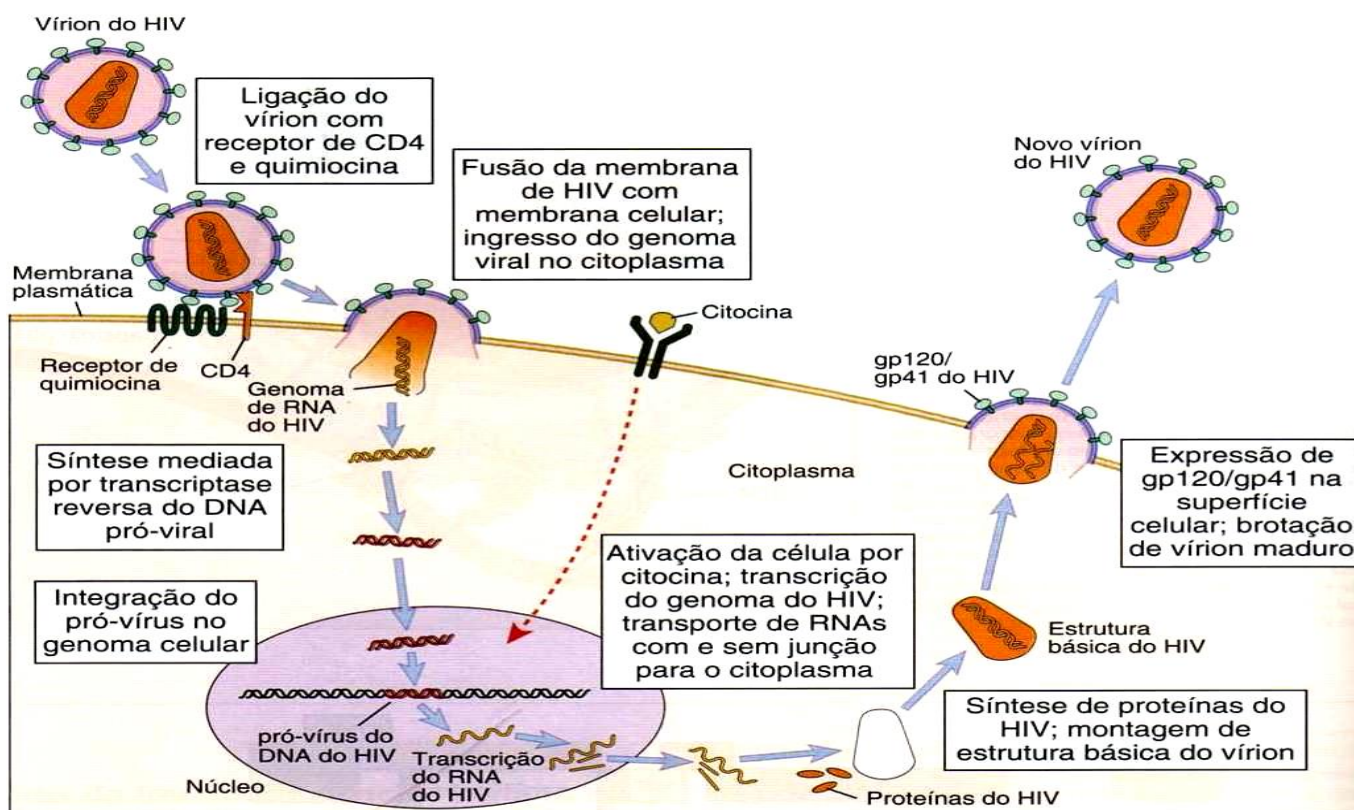


Figura 2 – Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV-1 (Adaptado de Abbas & Lichtman, 2005).

A partir daí, o próvírus pode permanecer inativo em termos de transcrição durante meses ou anos, com pouca ou nenhuma produção de novas proteínas virais ou vírions e, assim, a infecção por HIV de um indivíduo pode ser latente (Abbas & Lichtman, 2005). Quando a célula for ativada ocorrerá transcrição do DNA viral e a formação de novos vírus.

A fase tardia da replicação inicia-se com a ação da enzima RNA polimerase II celular, que transcreve o próvírus em RNA mensageiro viral, que vai para o citoplasma. Os vírions são inicialmente montados próximos à membrana celular na forma de partículas imaturas, compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais. Após ou durante o brotamento, as partículas virais passam por

uma modificação morfológica conhecida como maturação, que consiste na clivagem de poliprotéínas estruturais do capsídeo (Kaplan *et al.*, 1994). O processamento das poliprotéínas no vírion completa o ciclo de replicação do HIV, os vírions maduros são então capazes de infectar outras células.

1.2 A LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

A Lectina Ligadora de Manose (MBL) é uma molécula efetora do sistema imune inato, pois se liga a estruturas de diversos carboidratos presentes na superfície de vários agentes infecciosos, mediando atividade antimicrobiana através da opsonização desses patógenos, ativação da cascata do complemento ou pela simples ligação, promovendo a neutralização de alguns vírus (Holmskov, 2000; Thielens *et al.*, 2002).

A MBL é uma lectina do tipo C (dependente de cálcio), sintetizada principalmente no fígado e secretada na corrente sanguínea (Ezekowitz *et al.*, 1988). Pertence a uma família de proteínas denominadas colectinas, cujos membros possuem domínios de lectina para reconhecimento de carboidratos e regiões de colágeno (Turner, 1996; Jack; Klein; Turner, 2001;2003; Fujita, 2002). Apresenta uma estrutura como um “*bouquet*” muito similar ao C1q e é considerada uma proteína de fase aguda, apesar do seu moderado aumento (entre 1,5 a 3 vezes o valor normal para cada indivíduo) quando comparado à proteína C reativa (aumento de até 1000 vezes o valor normal) (Volanakis, 2001).

O conceito de via das colectinas na ativação do sistema complemento é relativamente recente e é decorrente da observação de resíduos de carboidratos em microorganismos invasores que podiam ativar o complemento na ausência de anticorpo e por um mecanismo independente da via alternativa. A via das lectinas é composta pela MBL e pelas MASP-1, 2, 3 e a Map-19, porém, apenas MASP-1 e 2 apresentam funções definidas. A MBL circula no sangue em um complexo zimogênio da serinoprotease MASP, apresentando a mesma estrutura modular de C1r:C1s (Peterson *et al.*, 2001; Schwable *et al.*, 2002; Prodinger *et al.*, 2003; Janeway *et al.*, 2005).

A MBL constitui o primeiro componente de ativação da via das lectinas do sistema complemento e atua na neutralização de microorganismos patogênicos por um

mecanismo independente de anticorpo (Turner, 1996; Wallis *et al.*, 2000; Guardia *et al.*, 2003). Apresenta em sua estrutura um domínio ligante de carboidratos que interage, eficientemente, com resíduos de oligossacarídeos (Manose e N-acetil glicosamida) presentes na superfície de diferentes microorganismos, assim podendo ativar o sistema complemento ou agir como uma opsonina induzindo à fagocitose desses patógenos por macrófagos (Turner, 2003). A função da MBL está diretamente associada à sua concentração no soro, que é determinada por uma interação entre mutações na região promotora do gene da MBL e mutações no gene estrutural da proteína (Madsen *et al.*, 1995).

A deficiência de MBL foi reconhecida, inicialmente, em 1968, por Miller *et al.*, que descreveram uma criança com 3 meses de idade, do sexo feminino com quadro de eczema refratário, falência de crescimento e episódios intermitentes de diarreia. A criança apresentava história familiar de eczema atópico grave em parentes paternos e um primo materno com quadro de dermatite similar ao seu. A avaliação laboratorial revelou um defeito de opsonização no soro indicando, assim, uma deficiência de algum fator plasmático.

Alguns trabalhos evidenciam a inter-relação entre a MBL e infecções de repetição e sugerem que a proteína desempenhe uma importante proteção adicional contra infecção em crianças durante o período de imaturidade do sistema imune e de suscetibilidade à infecção (Sastry *et al.*, 1993). Em 1989, Super *et al.*, observaram que a deficiência de MBL no soro de humanos era a base para o defeito na opsonização de microorganismos. Dois anos depois, Turner *et al.*, (1991) demonstraram que baixas concentrações da proteína estavam associadas a infecções recorrentes na infância.

1.2.1 Estrutura protéica e função biológica

A MBL humana é composta por polímeros de até seis subunidades, tendo sido relatada a presença de dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros. Cada subunidade de cadeia polipeptídica que compõe o monômero é composta por: domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC), região de dobradiça, região similar ao colágeno e região de ligação cruzada. Cada monômero é formado por três cadeias polipeptídicas semelhantes de 32 KDa, que originarão três domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD), através dos quais a MBL se liga aos carboidratos de diferentes patógenos.

A região de ligação cruzada apresenta resíduos de cisteína que formam pontes dissulfídicas entre as cadeias polipeptídicas, promovendo sua oligomerização. A região similar ao colágeno contém oito potenciais sítios de hidroxilação e quatro sítios de O-glicosilação. A região de dobradiça inicia a trimerização de um polipeptídeo para formar a subunidade estrutural da proteína MBL, contendo uma região similar ao colágeno e três domínios de reconhecimento de carboidrato. O DRC possui 115 aminoácidos e sua principal função é reconhecer estruturas de carboidratos, a exemplo de N-acetilglucosamina, manose, N-acetilmanoseamina, L-fucose e glucose, presentes na superfície de patógenos (Wallis & Drickamer, 1999; Peterson *et al.*, 2001).

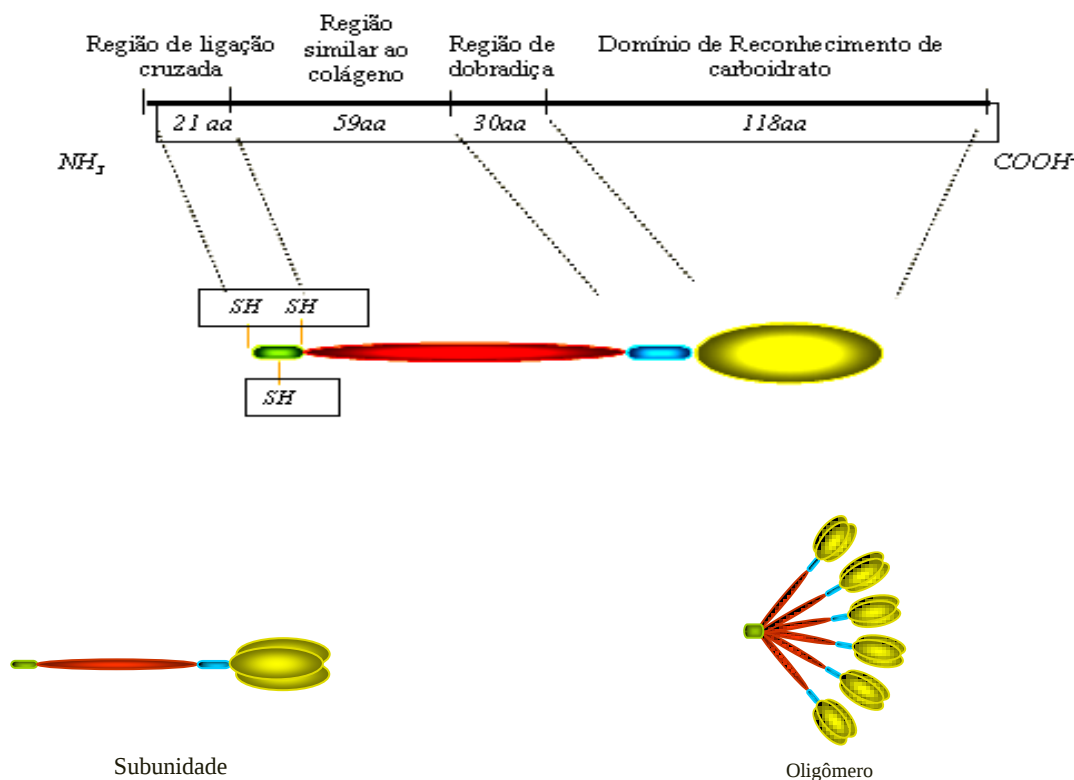


Figura 3 – Estrutura da molécula de MBL (Adaptado de Peterson *et al.*, 2001).

Há evidências de pelo menos quatro funções para a MBL: ativação do sistema complemento, promoção (independente de complemento) da opsonização e da fagocitose, modulação da inflamação e remoção de células apoptóticas (Super *et al.*, 1992; Turner., 1996). A importância desta proteína é demonstrada por um número de estudos clínicos que associam a sua deficiência sérica com aumento da suscetibilidade a

uma variedade de doenças infecciosas (Super *et al.*, 1989; Jack *et al.*, 2001), uma vez que baixos níveis de MBL no soro têm sido reconhecidos como a principal causa de imunodeficiência associada com a atividade opsonizante prejudicada (Kuhlman *et al.*, 1989; Sumiya *et al.*, 1991).

1.2.2 Polimorfismos no Éxon 1 do gene *MBL*

São descritos dois genes relacionados à MBL, o *mbl-1*, um pseudogene e o *mbl-2*, localizado no q11.2-q21 do cromossomo 10, que codifica a proteína (Sastry *et al.*, 1989, Taylor *et al.*, 1989). O gene é composto por quatro éxons: a) o éxon 1 codifica a região 5' não transcrita, um peptídeo sinal, um segmento N-terminal rico em cisteína e a primeira porção da região semelhante ao colágeno rica em glicina; b) o éxon 2 codifica o restante da região semelhante ao colágeno; c) o éxon 3 codifica uma estrutura em espiral α helicoidal, que é conhecida como a região de “pescoço” e d) o éxon 4 codifica o domínio de reconhecimento de carboidrato, que adota uma configuração globular e a região 3' não transcrita (Guardia *et al.*, 2003).

O Éxon 1 do gene *MBL* contém três polimorfismos pontuais de nucleotídeos nos códons 52, 54 e 57 e que dão origem aos alelos mutantes denominados *MBL*D*, *MBL*B* e *MBL*C*, respectivamente, sendo o alelo selvagem designado *MBL*A*. Essas mutações estão associadas a baixos níveis de MBL no soro e à susceptibilidade a infecções severas (Madsen *et al.*, 1994). As baixas concentrações séricas da MBL estão associadas a três variantes alélicas oriundas de mutações pontuais independentes no exon1 do gene *MBL*. Uma no códon 54, o qual resulta na troca de glicina para ácido aspártico (alelo *B*); uma no codon 57, resultando na troca de uma glicina por ácido glutâmico (alelo *C*) e outra no codon 52 levando a substituição de uma arginina por uma cisteína (alelo *D*) (Madsen *et al.*, 1994; Figura 4). Estudos sugerem que todas as três variantes impedem a habilidade da MBL em formar cadeias polipeptídicas com estrutura de tripla-hélice, na região semelhante ao colágeno, nas formas homo ou heterozigotas, ou ainda, tornam as subunidades mais vulneráveis à degradação (Butter *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2001; Garred *et al.*, 1997) conseqüentemente, os alelos *B*, *C* e *D* resultam em deficiência completa ou em níveis séricos baixos da proteína.

As frequências dos polimorfismos estruturais na MBL variam entre os diferentes grupos étnicos. O alelo *B* é comum em populações européias (29%) e asiáticas (37%), enquanto que o alelo *C* é mais freqüente em populações sub-saharianas (50% a 60%). O alelo *D* alcança frequências baixas em todas as populações (Lipscombe *et al.*, 1992; Sasaki *et al.*, 2000; Garcia-Laorden *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001).

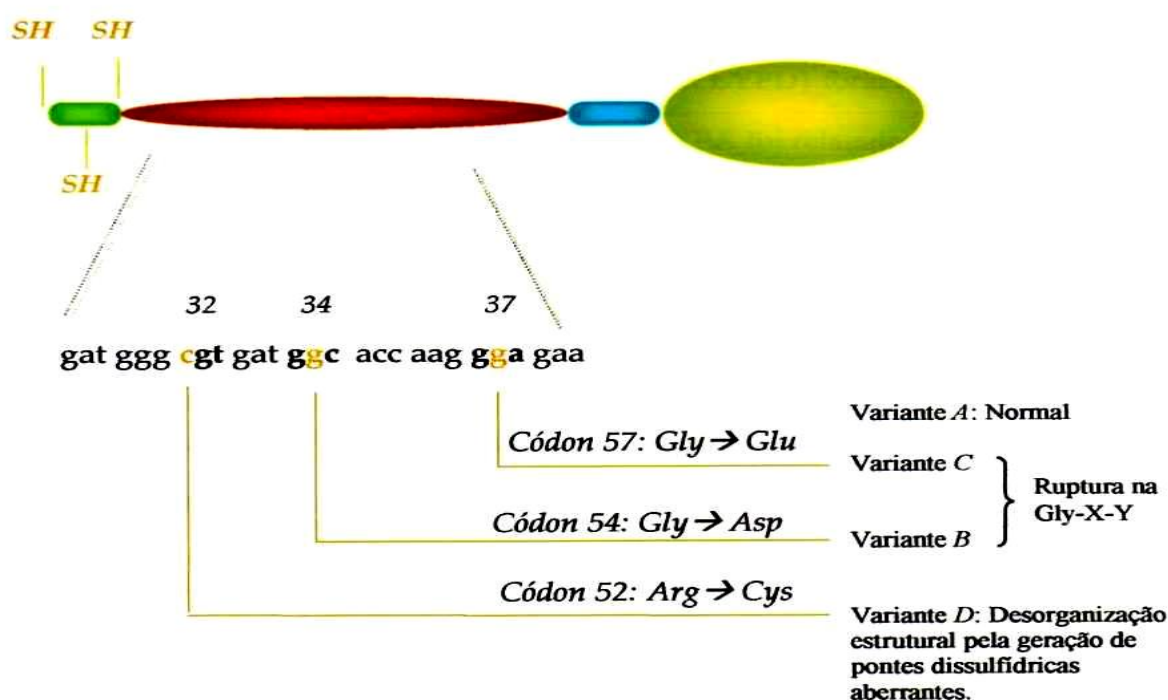


Figura 4 – Esquema demonstrando os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* (Adaptado de Peterson *et al.*, 2001).

As variantes alélicas da MBL podem ter um papel direto na infecção pelo HIV-1. Os oligossacarídeos, com altas concentrações de manose, componentes das glicoproteínas (gp120) do HIV-1 são ligantes para a MBL. A ligação se dá de forma seletiva às células infectadas pelo HIV-1, ativando a ação do sistema complemento, o que leva à inibição da infecção em células TCD4+. Assim sendo, as baixas concentrações séricas da MBL e subsequente redução da ativação do sistema complemento podem contribuir para o aumento da carga viral plasmática (Garred *et al.*, 1997).

Os dados atuais sobre a transmissão vertical do HIV e as possíveis associações com o subtipo viral, com a presença de co-infecções virais e com o perfil

genético do hospedeiro são escassos no Brasil e se referem apenas a algumas regiões do país, principalmente às regiões Sul e Sudeste, sendo desconhecida a epidemiologia molecular do HIV-1 em determinados grupos na região Norte do país. Em virtude disto, faz-se necessário o monitoramento clínico-laboratorial, a avaliação da transmissão vertical do HIV-1, assim como a investigação de possíveis fatores de risco associados a este evento.

1.2.1 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar uma possível associação entre os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL* e a infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana 1* (HIV-1).

1.2.2 Objetivos Específicos

- i) Descrever as frequências alélicas e genotípicas do gene *MBL* (exon1), na população de grávidas e mães portadoras do HIV-1, assim como na população controle, composta por indivíduos não infectados pelo vírus;
- ii) Determinar o impacto dos polimorfismos no gene *MBL* na carga viral plasmática do HIV-1 e no número de linfócitos T CD4⁺ ;
- iii) Investigar uma possível associação entre os polimorfismos no gene *MBL* e a transmissão vertical do HIV-1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

2.1.1 Pacientes HIV-1 soropositivos

O presente estudo constitui-se em um estudo transversal onde foi avaliado o perfil genético de 50 indivíduos: 05 grávidas soropositivas, 26 mães todas portadoras do HIV-1, juntamente com 19 amostras de seus filhos, os quais 07 são HIV soronegativos, 03 são soropositivos e 09 foram indeterminados devido à característica de recém-nascidos, totalizando 34 indivíduos soropositivos. As participantes do estudo foram selecionadas de forma aleatória, onde foi realizado um sorteio dentre aquelas cadastradas no Centro de Testagem e Aconselhamento para DST/HIV/AIDS (CTA) em Palmas, Tocantins. Foram coletadas amostras de sangue (8 mL) das mulheres e dos conceptos em um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante e então encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. As amostras de plasma e massa celular foram separadas e congeladas a -20°C até o momento do uso para a realização de testes. Todas as pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no momento da coleta e responderam a um formulário epidemiológico. Foi montado um banco de dados, utilizando-se o programa Access da plataforma Windows, para o preenchimento das informações clínicas e laboratoriais das pacientes envolvidas no trabalho.

2.1.2 Indivíduos Controles Soronegativos para o HIV-1

No presente estudo, amostras de sangue de 45 indivíduos (8 mL), soronegativos para HIV-1, coletadas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante foram utilizadas como grupo controle. As amostras de plasma e de massa celular foram separadas e congeladas a -20°C até o momento do uso. Todos os participantes foram informados sobre o projeto e aqueles que concordaram em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.2.1 Extração do DNA

A Extração de DNA total a partir de leucócitos do sangue periférico foi realizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, por meio do método de fenol-clorofórmio. O procedimento ocorreu seguindo as etapas de lise celular, precipitação e hidratação do DNA.

2.2.2 Investigação molecular das formas alélicas do gene *MBL*

No presente trabalho foi utilizada a técnica de Reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) para a amplificação de 120 pb do éxon 1 do gene *MBL*, a partir do DNA de indivíduos soropositivos para o HIV-1 e de indivíduos controles soronegativos. As amplificações foram realizadas no equipamento termo-ciclador *Mastercycler Personal*, *Eppendorf*.

A reação de amplificação foi realizada em um volume de 50 μL contendo 500ng de DNA extraído, 235 μM de cada dNTP, 5 μM de cada iniciador, KCl 50mM, MgCl_2 2,5mM, Tris-HCl pH 8,3 10mM e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvidos nesta reação foi (mblE01For) 5'-CATCAACGGCTTCCCAGGGCAAGATGGG-3' e (mblE02) 5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG - 3' (Madsen *et al.*, 1995; Tin *et al.*, 2005).

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

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

2.2.3 Eletroforese

Os produtos da amplificação e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/50 minutos) em gel de agarose a 2% e 4%, respectivamente, em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – TrisBase 1,6 M; Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada); contendo 5µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

2.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA E DE LINFÓCITOS T CD4+

Os valores da carga viral e o número de linfócitos T CD4 dos portadores de HIV foram obtidos a partir dos prontuários cadastrados no CTA/TO.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo das frequências alélicas e genótípicas do éxon 1 do gene *MBL* observados nos grupos controle e de grávidas e mães portadoras do HIV-1 foi efetuado por meio de contagem direta.

Para efetuar o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e as análises de comparação das frequências alélicas e genótípicas entre os grupos investigados foi

usado o teste de qui-quadrado (χ^2) e a análise de associação entre o perfil genético e os valores de carga viral plasmática e da contagem de linfócitos TCD4+ foi realizada usando o teste-t, ambos efetuados por meio do programa BioEstat 5.0v (Ayres, *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS

3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

A análise das frequências alélicas no éxon 1 do gene *MBL* indicou uma maior prevalência do alelo *A* tanto em indivíduos soropositivos quanto naqueles soronegativos para o HIV-1, com frequências de 83,82% e 82,22%, respectivamente. Em sequência estão as variantes alélicas *MBL*B*, *MBL*D* e *MBL*C*, onde o alelo *C* não foi encontrado no grupo de infectados, com frequências de 11,76% e 4,42% no grupo soropositivos e 13,33%, 3,34% e 1,11%, no grupo controle. Não foi encontrada significância estatística nas diferenças das frequências alélicas entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das frequências alélicas para o gene *Mbl* entre os grupos estudados.

Alelos	Pacientes HIV-1	Controle soronegativo	χ^2	<i>p</i>
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
<i>MBL *A</i>	57 (83,82)	74 (82,22)		
<i>MBL *B</i>	08 (11,76)	12 (13,33)		

<i>MBL *C</i>	-	01 (1,11)		
<i>MBL *D</i>	03 (4,42)	03 (3,34)		
Total	68 (100,00)	90 (100,00)	0, 961	0, 8106

A distribuição das frequências genotípicas evidenciou 06 genótipos diferentes no grupo controle (*AA*, *AB*, *AC*, *AD*, *BB* e *BD*) e apenas 03 no grupo de infectados (*AA*, *AB* e *AD*). A análise dos resultados demonstrou uma maior frequência no genótipo normal *AA* em ambos os grupos, com frequências de 67,65% no grupo de infectados e 68,90% no grupo controle. Os genótipos *AB* e *AD* prevaleceram nos indivíduos HIV soropositivos, apresentando as frequências de 23,53% e 8,82%, enquanto que no grupo controle esta foi de 20,00% e 4,44%, respectivamente. Os genótipos *AC*, *BB* e *BD* encontrados somente no grupo controle apresentaram frequência de 2,22% para cada genótipo. Essas diferenças nas frequências genotípicas entre os grupos analisados não foram estatisticamente significantes (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das frequências genotípicas do gene *MBL* entre os grupos estudados.

Genótipo	Pacientes HIV-1 n (%)	Controle n (%)	χ^2	<i>P</i>
<i>AA</i>	23 (67,65)	31 (68,90)		
<i>AB</i>	08 (23,53)	09 (20,00)		
<i>AC</i>	-	01 (2,22)		
<i>AD</i>	03 (8,82)	02 (4,44)		
<i>BB</i>	-	01 (2,22)		
<i>BC</i>	-	-		
<i>BD</i>	-	01 (2,22)		
<i>CC</i>	-	-		
<i>CD</i>	-	-		
<i>DD</i>	-	-		
Total	34 (100,00)	45 (100,00)	2, 970	0, 7046

Analisando os genótipos agrupados em AA, AO e OO, onde A é o alelo normal e O representa as variantes alélicas *MBL*B*, *MBL*C* e *MBL*D*, observou-se que os alelos variantes em homozigose OO foram encontrados somente na população controle (4,44%). O genótipo homozigoto normal AA apresentou frequência de 67,65% no grupo de infectados e 68,90% no grupo controle, já o genótipo AO foi mais freqüente no grupo HIV soropositivo com 32,35% enquanto no grupo controle esta frequência foi de 26,66%. Entretanto, essas diferenças entre os grupos estudados não foi estatisticamente significativa.

Além dos genótipos, a distribuição alélica também foi analisada mostrando frequências semelhantes entre os grupos com os valores do alelo A e O de 83,82% e 16,18% no grupo infectado e de 83,30% e 16,70% no grupo controle, respectivamente, portanto, não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene *MBL* entre os indivíduos infectados e o grupo controle.

Perfil	Paciente HIV-1 n (%)	Controle n (%)	χ^2	p
Genótipos				
AA	23 (67,65)	31 (68,90)	-	-
AO	11 (32,35)	12 (26,66)	-	-
OO	-	02 (4,44)	-	-
Total	34 (100)	45 (100)	0,836	0,6582
Alelos				
A	57 (83,82)	75 (83,30)		
O	11 (16,18)	15 (16,70)		
Total	68 (100)	90 (100)	0,007	0,9344

3.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÕES DE LINFÓCITOS TCD4+ E DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA.

A relação entre o número médio de linfócitos TCD4⁺ e os genótipos do exon 1 do gene *MBL* encontrados na população dos infectados está descrita na tabela 4. Do total de 34 prontuários apenas 12 incluíam informações sobre o número de linfócitos TCD4⁺, destas 08 responderam fazer terapia antirretroviral (TARV) e 04 responderam não usar. Sendo assim foram calculadas as médias aritméticas de acordo com os genótipos encontrados. Observou-se uma média de 415,13 células TCD4⁺/mL nos 08 indivíduos com genótipo AA (grupo A), dos quais três não faziam TARV, enquanto os portadores do genótipo AB ou AD (grupo B) apresentaram uma média de 399,5 células TCD4⁺/mL, onde uma paciente não fazia a TARV. A análise estatística mostrou que não houve diferenças significantes entre as quantificações e os genótipos (Tabela 4).

Tabela 4. Polimorfismos do gene *MBL* e a quantificação de células TCD4⁺ nos indivíduos infectados.

Grupos	n	Média (LTCD4 ⁺ /mL)	Comparação	t	p
A	08	451,13	Grupo A vs. Grupo B	0,3659	0,7221
B	04	399,05			

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

A associação entre os valores de carga viral e os polimorfismos também foi analisada. Apenas 09 prontuários dispunham a informação de carga viral, dos quais 05 apresentaram o genótipo AA, onde uma paciente relatou não fazer uso da TARV e 04 apresentando o genótipo AB ou AD, sendo que, também uma paciente respondeu não fazer uso da TARV. As médias aritméticas foram calculadas de acordo com os genótipos encontrados. O grupo A, com indivíduos apresentando o genótipo AA tiveram

uma média aritmética de 10.718 cópias/mm³ e o grupo B, representando os indivíduos com o genótipo *AB* ou *AD* tiveram uma média maior de 37.000 cópias/mm³. A análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Polimorfismos do gene *MBL* e a quantificação da carga viral

Grupos	<i>n</i>	Média (Cópias RNA/mm ³)	Comparação	<i>t</i>	<i>p</i>
A	05	10.718	Grupo A vs. Grupo	-1,	0,2440
B	04	37.000	B	2718	

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

Para a verificação da existência de relação entre os polimorfismos no gene *MBL* e a transmissão vertical do HIV-1 dividiram-se as mães em dois grupos: MNT (mães não transmissoras) e MT (mães transmissoras). Do total de 26 mães, 16 fizeram a coleta de sangue juntamente com seus filhos, resultando em 05 mães que não transmitiram o vírus para seus filhos, 03 que transmitiram o vírus e em 08 mães que não foram possíveis realizar a análise devido à sorologia de seus filhos serem indeterminadas, pois estes eram recém-nascidos. A análise mostrou que o genótipo selvagem *AA* foi mais freqüente nas mães que não transmitiram o vírus para seus filhos (60,00%) e o genótipo heterozigoto foi o mais freqüente entre as mães transmissoras (66,7%), porém a análise dos dados não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das freqüências genótípicas entre os grupos de MNT e MT.

Genótipo	MNT <i>n</i> (%)	MT <i>n</i> (%)	<i>p</i>
<i>AA</i>	03 (60,00)	01 (33,30)	

<i>AO</i>	02 (40,00)	02 (66,70)	
<i>OO</i>	-	-	
Total	05 (100,00)	03 (100,00)	0, 5000

MNT: Mães não transmissoras

MT: Mães transmissoras

Analisando a distribuição das frequências genotípicas entre os grupos das 07 crianças soronegativas (C-) e das 03 crianças soropositivas (C+), observou-se que o genótipo *AA* apresentou frequências de 66.67% nas soropositivas e 57,14% nas soronegativas. O genótipo heterozigoto *AO* apresentou maior frequência nas crianças soronegativas com 42,86%, enquanto nas soropositivas este foi de 33,33%, todavia, a análise dos dados não mostrou diferenças estatisticamente significantes (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das frequências genotípicas entre os grupos de crianças soronegativas e soropositivas.

Genótipo	C + n (%)	C- n (%)	<i>p</i>
<i>AA</i>	02 (66,67)	04 (57,14)	
<i>AO</i>	01 (33,33)	03 (42,86)	
<i>OO</i>	-	-	
Total	03 (100,00)	07 (100,00)	0, 6667

C-: Crianças soronegativas

C+: Crianças soropositivas

3. DISCUSSÃO

Estudos em diversas populações têm mostrado que os polimorfismos no exon 1 do gene *MBL* afeta os níveis séricos da proteína e a susceptibilidade a infecções severas (Lipscombe *et al.*, 1992; Madsen *et al.*, 1994; Steffenssen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004). O papel destes polimorfismos é muito complexo, visto que os alelos variantes *MBL*B*, *MBL*C* e *MBL*D* tem sido associados à susceptibilidade a diversas infecções, podendo ter grande influência no prognóstico da doença (Yuen *et al.*, 1999; Costa, 2004; Pontes *et al.*, 2005 e Vallinoto *et al.*, 2006). Por outro lado, em algumas populações, esses mesmos alelos podem ter um efeito protetor contra determinados agentes infecciosos (Ezekowitz, 2003; Turner, 2003).

No presente trabalho, os valores observados nas frequências alélicas e genotípicas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes que possam sugerir um efeito de susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e transmissão materno-infantil em pacientes portadores das mutações no éxon 1 do gene *MBL*, corroborando com os achados de Dahl *et al.*, (2004) que publicaram um estudo no qual 9.245 pacientes foram avaliados quanto aos níveis séricos e genótipos da *MBL* na tentativa de correlacionar a deficiência da proteína com riscos de infecções ou morbidade aumentada por doenças ou comportamentos sociais associados e não encontraram significância estatística na correlação entre indivíduos com deficiência de *MBL* comparados ao grupo controle.

A distribuição da forma alélica *MBL*A* apresentou as maiores frequências em ambos os grupos estudados, com 83,82% no grupo de infectados e 82,22% no grupo controle corroborando com o estudo de Garcia-Laorden *et al.*, (2006) realizado com espanhóis, onde encontrou frequências de 76% do alelo *A* entre os pacientes soropositivos comparado com 72% encontrado no grupo controle.

O alelo *MBL*C* mostrou-se presente somente na população controle, com apenas uma representante. Esta baixa frequência pode ter ocorrido devido ao pequeno número amostral estudado. Contudo, a ausência deste alelo também já foi verificada em

outros estudos realizados com amostras da população de Belém (Moraes *et al.*, 2003; Costa, 2004). Isto pode ser explicado devido ao fato de que a ancestralidade africana das populações amazônicas é advinda principalmente do Oeste da África, não havendo relatos da contribuição da África Sub-Sahariana (Vergolino-Henry & Figueiredo, 1990), região de maior prevalência para o alelo *MBL**C, alcançando frequências de 50% a 60%.

O alelo *MBL**D tem ocorrido em baixas frequências (5%) nas populações em geral (Garred *et al.*, 1996). No presente estudo este alelo foi mais frequente na população de infectados (4,42%) comparado a população controle (3,34%). Não há muitas evidências sobre a influência deste alelo nas infecções virais e tão pouco se pode inferir sobre os resultados obtidos aqui, pois a diferença nas frequências do alelo *MBL**D vista acima é muito pequena, não sendo significativa.

As frequências dos genótipos *A/B* e *A/D* foram maiores no grupo HIV soropositivo em relação ao grupo controle, enquanto que os genótipos *A/C*, *B/B* e *B/D*, foram observados somente na população controle, porém a análise dos dados não mostrou diferenças significativas nas frequências. A consequência biológica da presença dos heterozigotos *A/B* e *A/D* ainda não está muito clara, todavia, já foi demonstrado que indivíduos portadores destes genótipos são capazes de produzir níveis normais da proteína MBL, devido à expressão do alelo *MBL**A, associado à presença de haplótipos normais da região promotora do gene (Jülicher *et al.*, 2000). Porém o mesmo não acontece com o heterozigoto *B/D* que, como já se sabe, assim como o homozigoto *B/B*, aumenta o risco de susceptibilidade à infecção por agentes infecciosos devido aos baixos níveis de MBL circulante no plasma sangüíneo (Garred *et al.*, 1997; Wallis, 2002).

Neste estudo, o genótipo *O/O* não foi observado na população de infectados indicando que o estado de portador deste genótipo não estaria associado à susceptibilidade à infecção pelo HIV, contrapondo, estudos anteriores de Garred *et al.*, (1997) que sugerem que este genótipo estaria diretamente relacionado ao aumento do risco para infecção pelo HIV-1.

Os valores observados nas frequências genótípicas das mães transmissoras e de suas crianças HIV soropositivas não mostraram indícios da associação dos polimorfismos do gene *MBL* na susceptibilidade à infecção e na transmissão vertical do HIV, corroborando com o estudo realizado em 1999 por Amoroso *et al.*, onde avaliaram

a presença do alelo *B* em crianças HIV soropositivas infectadas por transmissão vertical e em crianças expostas ao risco, porém não infectadas, não havendo diferença significativa na frequência de distribuição entre os grupos. Sabe-se que vários fatores estão associados à transmissão materno-fetal do HIV, tais como o uso de medicação pela gestante durante o período gestacional, administração dos medicamentos logo ao nascimento para recém-nascidos e nas primeiras semanas de vida, o aleitamento materno, o tipo de parto e a carga viral plasmática materna. (Sperling *et al.*, 1996; Newell *et al.*, 1998., Ceballos *et al.*, 2002).

As variantes alélicas do gene *MBL* podem ter um papel direto na infecção pelo HIV-1. Em 1989, Ezekowitz *et al.*, demonstraram a inibição *in vitro* de células TCD4⁺. Pouco tempo depois foi relatado que a ativação do sistema complemento ocorreria após a ligação da MBL a gp120 (Haurum *et al.*, 1993). Dessa maneira as baixas concentrações séricas da MBL e, subseqüentemente, redução da ativação do sistema complemento podem contribuir para o aumento da carga viral plasmática (Garred *et al.*, 1997). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não corroboram com esta hipótese, pois não houve diferenças estatisticamente significantes entre a contagem do número de linfócitos TCD4⁺ e a carga viral com as formas alélicas nos indivíduos infectados. Em concordância com estes achados estão Nielsen *et al.* (1995), em um estudo com 80 pacientes HIV soropositivos no qual evidenciou que a distribuição do nível sérico de MBL nestes indivíduos era semelhante a de pessoas saudáveis, sem influência no risco de infecção pelo HIV. Não se comprovou a associação entre o nível de MBL com o declínio de células TCD4⁺ e com o tempo de soroconversão ou com a duração da doença até a morte. Senaldi *et al.* (1995) descreveram que os níveis séricos de MBL estão elevados em todos os estágios da infecção pelo HIV e são estatisticamente semelhantes aos da população normal. Estes autores também não associaram a deficiência da MBL ao desenvolvimento ou à progressão da infecção pelo HIV.

Outros estudos, todavia, verificaram fortes associações entre estes parâmetros laboratoriais. Prohászka *et al.* (1997) encontraram níveis séricos de MBL significativamente mais baixos em indivíduos HIV soropositivos do que no grupo controle HIV soronegativos; Vallinoto *et al.* (2005), mostraram que os pacientes que tinham o alelo *MBL**A apresentaram um aumento de células TCD4⁺ entre a primeira e a segunda quantificações, característica esta, que não foi evidente entre os indivíduos

infectados que tinham o alelo *MBL*B*. Na avaliação da carga viral plasmática, a primeira quantificação mostrou que os pacientes com o genótipo *AA* apresentaram valores menores do que os pacientes que possuíam a variante *B*. Na segunda quantificação, este valor foi de 9.8 vezes maior entre aqueles que tinham o alelo *B* e adicionalmente, uma redução significativa na carga viral foi observada nos indivíduos com o alelo *A*.

Há poucos estudos desenvolvidos, tentando correlacionar o gene da MBL e o risco da transmissão materno-fetal do HIV e, ainda, a evolução para a AIDS. Além do que, os achados até então obtidos são controversos. As diferenças entre os resultados podem ser devido aos diferentes modelos experimentais utilizados (longitudinal vs. Transversal).

Diante disso, se evidencia a necessidade da realização de estudos que além de buscar os fatores virais, avaliem também os fatores do hospedeiro que impedem a evolução da infecção pelo HIV, com o objetivo de se buscar respostas que possam futuramente, culminar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

5. CONCLUSÕES

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

(ii) As associações entre o número médio de $LTCD4^+$ e da carga viral plasmática com os polimorfismos do gene *MBL* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, sugerindo que as variantes alélicas não estariam influenciando na contagem destas variáveis.

(iii) As análises das frequências alélicas e genotípicas nas mães transmissoras e de suas crianças HIV soropositivas não mostraram associações destes polimorfismos no gene *MBL* com a susceptibilidade à infecção na transmissão vertical do HIV.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K, LICHTMAN, A.H. Imunologia celular e molecular. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 482p, 2005.

AMOROSO, A., BERRINO, M., BONIOTTO, M., CROVELLA, S., PALOMBA, E., SCARLATTI, G., SERRA, C., TOVO, P.A., VATTA, S. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. **AIDS**, **13**: 863–864, 1999.

AYRES, M., AYRES, M. J.R., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Manaus, Sociedade Civil Mamirauá**, 173p, 2008.

BARRE-SINOUSSE F, CHERMANN JC, REY R, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, DAUGUET C, AXLER-BLIN C, VÉZINET-BRUN F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNER L. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** **220**: 868-71, 1983.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – AIDS E DST. Ministério da Saúde. Ano V - nº 1 - 27^a - 52^a - semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2007; Ano V - nº 1 - 01^a - 26^a - semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2008.

BUTTER, G.S, SIM, D., TAM, E., DEVINE, D., OVERALL, C.M. Mannose-binding lectin (MBL) mutants are susceptible to matrix metalloproteinase proteolysis. **Journal of Biological Chemistry**, **227**: 17511-19, 2002.

CAFFREY M, CAI M, KAUFMAN J, STAHL SJ, WINGFIELD PT, COVELL DG *et al*. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIVgp41. **EMBO J** **17(16)**:4572-84, 1998.

CEBALOS, A., DE LOS ANGELES PANDO, M., LIBERATORE, D., BIGLIONE, M., CARDENAS, P.C., MARTINEZ, M., CELADILLA, M.L., AVILA, M.M., PERALTA, L.M. Efficacy of strategies to reduce mother-to-child HIV-1 transmission in Argentina. **Journal of Acquire Immune Deficiency Syndromes**, **31 (3)**: 348-53, 2002.

CLAPHAM PR, WEISS RA. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature** **388(6639)**: 230-1, 1997.

COSTA, M.R.M. **Estudo da Suscetibilidade à infecção pelo HIV-1 e da progressão da AIDS em associação ao polimorfismo do gene *Mbl* (mannose-binding Lectin)**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 44p, 2004.

DAHL, M., TYBJAERG-HANSEN, A., SCHNOHR, P., NORDESTGAARD, B.G. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. **Journal of Experimental Medicine**, **199(10)**: 1391-1399, 2004.

DESROSIERS, R.C. HIV with multiple genes deletions as a live attenuated vaccine for AIDS. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **8**: 411-421, 1992.

DIMMOCK, N., EASTON, A. & LEPPARD, K. **Introduction to Modern Virology**.
Ed. Backwell Science Ltd, 5^a ed., p.449, 2001.

EZEKOWITZ, R. A. B.; DAY, L. E.; HERMAN, G. A. A Human Mannose-Binding Protein Is An Acute-Phase Reactant That Shares Sequence Homology With Other Vertebrate Lectins. **Journal of Experimental Medicine**, **167**: 1034-1046, 1988.

EZEKOWITZ, R.A. Role of the mannose-binding lectin in innate immunity. **Journal of Infectious Diseases**, **187**: S335-S339, 2003.

FUJITA T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, **2(5)**: 346-353, 2002.

GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-II) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, **224**:500-5003, 1984.

GALLO, R. C. Human Retroviruses: a decade of discovery and link with human disease. **Journal of Infectious Disease**, **164**: 235-243, 1991.

GARCIA-LAORDEN, M.I., MANZANEDO, A., FIGUEROLA, A., SANCHEZ-GARCIA, F., RODRÍGUES-GALLEGO, C. Mannose-binding lectin polymorphisms in a Canary Islands (Spain) population. **Genes and Immunity**, **2**: 292-294, 2001.

GARCIA-LAORDEN, M.I., CAMINERO, J.A., GARCIA-SAAVEDRA, A., CAMPOS-HERRERO, M.I., CABALLERO, A., RODRÍGUEZ-GALLEGO, C. Influence of mannose-binding lectin on HIV infection and tuberculosis in a Western-European population. **Molecular Immunology**, **43**: 2143-2150, 2006.

GARRED, P., MADSEN, H.O., SVEJGAARD, A. Genetics of human-binding protein. In: EZEKOWITZ, R.A.B., SATRY, K.N., M REID, K.B.M., (Eds), *Collectins and innate immunity*. **Springer, Heidelberg**: 139-164, 1996.

- GARRED, P., MADSEN, H.O., BALSLEV, U., HOFMANN, B., PEDERSEN, C., GERSTOFT, J., SVEJGAARD, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, **349**: 236-240, 1997.
- GREENE, W.C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, **324**: 8-17, 1991.
- GUARDIA, A, LOZANO, F. Mannose-binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. **Rev. Med. Microbiol.** **14**: 41-52, 2003.
- HAURUM, J.S., THIEL, S., JONES, I.M., FISHER, P.B., LAUREN, S.B., JENSENIUS, J.C. Complement activation upon binding of mannose-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**, **7**: 1307-1313, 1993.
- HOLMSKOV U. Collectins and collectin receptors in innate immunity. **APMIS Suppl. Review**, **100**: 1-59, 2000.
- JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunological Reviews**, **180**: 86-99, 2001.
- JANEWAY JUNIOR, J.C., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHI, K. **Immunology: the immune system in healthy and disease**. 6thed. New York, Garland Science: 8.1-8.52, 2005.
- JÜLIGER, S., LUCKNER, D., MORDMÜLLER, B., MAY, J., WEIERICH, A., LELL, B., LUTY, A., KREMSNER, P.G., KUN, J.F.J. Promoter Variants of the Mannose-Binding Lectin Gene Show Different Binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **275**: 617-622, 2000.
- KATZ, R.A, SKALKKA AM. The retroviral enzymes. **Ann Rev Biochem**, **63**:133-73, 1994.

- KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CJAMARET, S., GRUEST, J., GUETARD, D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J.D., MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T-4 molecule behaves as the receptor for human retroviral LAV. **Nature**, **312**: 767-768, 1984.
- KUHLMAN, M., JOINER, K., EZEKOWITZ, R.A. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. **Journal of Experimental Medicine**, **169**:1733–1745, 1989.
- LEE, S. G., YUM, J.S., MOON, H.M., KIM, H.J., YANG, Y.J., KIM, H.J., YOON, Y., LEE, S., SONG, K. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. **Molecular Immunology**: 1-9, 2004.
- LEVY, J. A., HORRMAN, A. D., KRAMER, S. M. LANDIS, J. A., SHIMABUKURO, J. M., OSHIRO, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, **225**: 840-842, 1984.
- LEVY, J.A. HIV and pathogenesis of AIDS. **American Society for Microbiology**, Washington, DC, p.9, 1994.
- LIPSCOMBE, R.J., SUMYA, M., HILL, A.V., LAU, Y.L., LEVINSKY, R.J., SUMMERFIELD, J.A., TURNER, M.W. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Human Molecular Genetics**, **1**: 709-715, 1992.
- LIU, H.F. Genomic diversity and molecular phylogeny of human and simian T-cell lymphotropic viruses. **Katholieke University Leuven**, 105p, 1996.
- MADSEN, H.O., GARRED, P., KURTZHALS, J.A., LAMM, L.U., RYDER, L.P., THIEL, S. ET AL. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannose-binding protein. **Immunogenetics**, **40**:37, 1994.

- MADSEN, H.O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J.A.L., LAMM, L.U., RYDER, L.P., SVEJGAARD, A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of Mannan-Binding Protein. **Journal of Immunology**: 3013-3020, 1995.
- MILLER, M.E., SEALS, J., KAYE, R., LEVITSKY, L.C. A familial, plasma associated defect of phagocytosis. **Lancet**, **II**:60-63, 1968.
- MORAES, M.F, SALGADO, C.G., VALLINOTO, A.C.R., COSTA, M.R.M., ALVES, A.E.M., SANTOS, S.E.B. Estudo das Variantes Alélicas do Gene MBL (Mannose-Binding Lectin) como Fator de Suscetibilidade à Hanseníase na População de Belém. In: **XXXIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**, Belém, PA, 2003.
- NEWELL, M.L. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. **AIDS**, **12**: 831-837, 1998.
- NIELSEN, S.L., ANDERSEN, P.L., KOCH, C., JENSENIUS, J.C., THIEL, S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. **Clinical and Experimental Immunology**, **100**: 219–222, 1995.
- PETERSON, S.V, THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, **38**: 133-149, 2001.
- PONTES, G.S., TAMEGÃO-LOPES. B., MACHADO, L.F.A., AZEVEDO, V.N., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R., LEMOS, J.A.R., VALLINOTO, A.C.R. Characterization of Mannose-binding lectin gene polymorphism among human T-cell lymphotropic virus 1 and 2 infected asymptomatic subjects. **Human Immunology**, **66**: 892-896, 2005.
- PRODINGER, W.H, WÜRZNER, R., STOIBER, H., DIERICH, M.P. *et al.* Complement. **Fundamental Immunology**. 5ed. Philadelphia, p.1077-103, 2003.

- PROHASZKA, Z., THIEL, S., UJHELYI, E., SZLAVIK, J., BANHEGYI, D., FUST, G. Manna-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of disease. **Immunology Letters**, **58**: 171-175, 1997.
- RATNER, L., GALLO, R.C., WONG-STAAAL, F., HTLV-II, LAV, ARV are variants of the same AIDS virus. **Nature**, **313**: 636-637, 1985.
- ROBEY, W.G., SAFAI, B., OROZLAN, S., ARTHUR, L.O., GONDA, M.A., GALLO, R.C., FISCHINGER, P.J. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-II with sera from AIDS patients. **Science**, **228**: 593-595, 1985.
- SASAKI, K., TSUTSUMI, A., WAKAMIYA, N., OHTANI, K., SUZUKI, Y., WATANABE, Y., NAKAYAMA, N., KOIKE, T. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. **Scand Journal Gastroenterology** 35:960-965, 2000.
- SASTRY, K., HERMAN, G.A., DAY, L., DEIGNAN, E., BRUNS., G., MORTON, C.C., EZEKOWITZ, R.A. The human mannose-lectin protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **Journal of Experimental Medicine**, **170**: 1175-1189, 1989.
- SASTRY, K., EZEKOWITZ, R.A. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr. Opin. Immunol*, **5**: 59-66, 1993.
- SCHWAEBLE, W., DHAL, M.R., THIEL, E., STOVER, C., JENSENIUS, J.C. The manna-binding lectin-associated serine protease (MASPs) and MAp19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. **Immunology**, **205**: 455-466, 2002.
- SENALDI G., DAVIES, E.T., MAHALINGAM, M., LU, J., POZNIAK, A., PEAKMAN, M., REID, K.B., VERGANI, D., Circulating levels of mannose binding protein in human immunodeficiency virus infection. **The Journal of infection**, **31**: 145-148, 1995.

- SLEASMAN, J. W. & GOODENOW, M. HIV-1 infection. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**, **11** (2): 582-592, 2003.
- SPERLING, R.S., SHAPIRO, D.E., COOMBS, R.W., TODD, J.A., HERMAN, S.A., MCSHERRY, G.D, O`SULLIVAN, M.J., VAN DYKE, R.B., JIMENEZ, E., ROUZIOUX, C., FLYNN, P.M., SULLIVAN, J.L. Maternal viral load, zidovudine treatment and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. **New England Journal of Medicine**, **335**(22): 1621-1629, 1996.
- STEFFENSEN, R., THIEL, S., VARMING, K., JERSILD, C., JENSENIUS, J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Journal of Immunology Methods**, **241**: 33–42, 2000.
- SUMYA, M., SUPER, M., TABONA, P., LEVINSKY, R.J., ARAI, T., TURNER, M.W., SUMMERFIELD, J.A. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, **337**: 1569-1570, 1991.
- SUPER, M., THIEL, S., LU, J., LEVINSKY, R.J., TURNER, M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet** **2**:1236–1239, 1989.
- SUPER, M.; GILLIES, S.D.; FOLEY, S. *et al.* Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. **Nature Genetics** **2**: 50-55, 1992.
- TAYLOR, M.E., BRICKELL, P.M., CRAIG, R.K., SUMMERFIELD, J.A. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **The Biochemical Journal**, **262**: 763-771, 1989.
- TEMIM H.M., MIZUTAMI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. **Nature** **226**: 1211-1213, 1970.

- THIELENS, N.M., TACNET-DELOREME, P., ARLAUD, G.J. Interaction of C1q and mannose-binding lectin with viruses. **Immunobiology** **205**: 563-574, 2002.
- TURNER, M. W. Deficiency of Mannan Binding Protein – A New Complement Deficiency Syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, **86(1)**: 53-56, 1991.
- TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, **17(11)**: 532-540, 1996.
- TURNER, M. W. The Role of Mannose-binding Lectin in Health and Disease. **Molecular Immunology**, **40**: 423-429, 2003.
- UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: Dezembro 2007, World Health Organization. Disponível em http://www.unaids.org/en/HIV_data/epi2007/. Acesso em 20 maio 2009.
- VALLINOTO, A.C.R, COSTA, M.R.M, ALVES, A.E.M, MACHDO, L.F.A, AZEVEDO, V.N, SOUZA, L.L.B, ISHAK, M.O.G, ISHAK,R. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. **Molecular Immunology**: IN PRESS
- VARMUS, H.E., SWANSTROM, R. Replication of retrovirus In: **RNA Tumor Virus**. Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., New York, Cold Spring Harbour Laboratory, p. 75-134, 1985.
- VERGOLINO-HENRY, A., FIGUEIREDO, N. A presença africana na Amazônia colonial uma notícia histórica. **Arquivo Público do Pará** **1** : 27-66,1990.
- VOLANAKIS, J.E. Human C-reactive protein: expression, structure and function. **Molecular Immunology**, **38**: 189-197, 2001.

WALLIS, R., DRICKAMER, K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, **274**: 3580-3589, 1999.

WALLIS R, DODD R.B. Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases. **Journal of Biological Chemistry** **275** (40): 30962-9, 2000.

WALLIS, R. Dominant effects of mutations in the collagenous domain of mannose-binding protein. **Journal of Immunology** **168**: 4553-4558, 2002.

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

YUEN, M.F., LAU, C.S., LAU, Y.L., WONG, C.C., CHENG, C.L. Manose binding lectin gene mutatuions are associeted with progression of liver diseasse in chronic hepatitis B infection. **Hepatology**, **29**: 1248-1251, 1999.