

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

Maíra Oliveira Yonamine

**Genotipagem das mutações do gene humano que codifica a lectina ligante da manose de voluntários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências.**

# **Maíra Oliveira Yonamine**

**Genotipagem das mutações do gene humano que codifica a lectina ligante da manose de voluntários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências.**

**Co-orientador:** Me. Diego Peres Alonso

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Monografia apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências - UNESP- para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas Modalidade Médica.

**Botucatu –SP**

**- 2008-**

Dedico essa monografia às duas pessoas  
que sempre estiveram ao meu lado,  
meus pais Jorge e Rose.

*Agradecimentos*

---

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus familiares que sempre me apoiaram e torceram por mim. Aos meus avôs, Sebastiana e Antônio, Justina e Tokuzi por seus ensinamentos e conselhos que sempre me acompanharão, nunca me esquecerei dos momentos que passamos juntos.

Aos meus pais, Rose e Jorge, seria impossível expressar minha gratidão e amor por vocês. Agradeço a Deus todos os dias por ter me presenteado com uma família tão maravilhosa. Admiro a competência, determinação e caráter de vocês dois. Espero que algum dia eu possa retribuir tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Ao meu irmão Rafael, pelas visitas à Botucatu e pela companhia nos finais de semana em São Paulo. Sou grata pelos seus conselhos e palavras de encorajamento.

Ao meu namorado e companheiro Fernando Endrigo, pela amizade incondicional. Por fazer um momento simples se tornar inesquecível. Agradeço pelas orientações e apoio que você tem me dado.

Aos amigos da Turma XLII pelos anos de convivência e aprendizado. Em especial à Azia, Minu e Pipis, por dividirem comigo os momentos de alegria, risos, incertezas... Vocês são muito importantes pra mim!

Ao Diego, muito obrigada pelo tempo que você se dedicou para ajudar na elaboração desta monografia, sem a sua ajuda eu seria incapaz de tê-la feito. Agradeço pela paciência ao me ensinar tantas coisas!

Ao meu orientador Paulo, pela sua compreensão e orientação. Obrigada por proporcionar todas as condições necessárias para a elaboração desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia e aos integrantes do Laboratório de Entomologia Molecular, pelo convívio, discussões e amizade.

Aos voluntários das amostras, muito obrigada por me ajudarem na realização deste trabalho, a ajuda de vocês foi imprescindível.

“Concedei-nos Senhor, Serenidade necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, Coragem para modificar aquelas que podemos e Sabedoria para distinguirmos umas das outras.”

Reihold Niebuhr

## Resumo

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, possuindo uma variedade de formas clínicas. A mais severa é a Leishmaniose visceral, que no Brasil é causada por *L. chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomia longipalpis*. O cão, tanto o doméstico como o selvagem, é o principal reservatório no ciclo zoonótico da doença, que no Brasil ocorre principalmente na região nordeste.

Através de estudos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas, notou-se que apesar do elevado número de pessoas infectadas, poucas manifestavam a doença. Isso pode ser explicado pelo estado nutricional e imunológico do paciente, infecção por HIV e variabilidade das cepas, visto que a heterogeneidade genética e diversidade clonal estão relacionadas a variações nos fatores de virulência do parasita.

A lectina que se liga à manose (Mannose-Binding Lectin), ou MBL, é uma proteína que pode estar relacionada ao desenvolvimento da doença, uma vez que pode se ligar a carboidratos na membrana externa de patógenos, agindo como uma opsonina e facilitando assim a ação de macrófagos. Altas concentrações desta proteína podem ser desvantajosas, uma vez que pode facilitar a infecção por LV. Genes mutados podem contribuir para a variação do nível sérico da proteína diminuindo as taxas de transcrição do gene.

Concluindo, o projeto tem o intuito de identificar e genotipar mutações específicas no promotor e no exon 1 do gene que codifica a MBL em humanos. A realização do estudo permitirá também, a consolidação de uma



base de dados para estudos posteriores envolvendo a genética populacional da Lectina Ligante de Manose.

# Índice

## Resumo

1) Introdução	
1.1) <i>Lectina Ligante da Manose</i> .....	11
1.2) <i>Leishmaniose Visceral</i> .....	18
2) Objetivos .....	27
3) Material e Métodos	
3.1) <i>Amostras</i> .....	29
3.2) <i>PCR</i> .....	29
3.3) <i>Purificação dos Produtos de PCR</i> .....	29
3.4) <i>Reação de mini-sequenciamento</i> .....	29
4) Resultados .....	32
5) Discussão .....	34
6) Referências .....	37

*Introdução*

---

## 1.1 LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL)

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). Foi descrita pela primeira vez em 1968, através do estudo de uma paciente de 2 anos de idade que possuía um defeito de fagocitose soro-dependente. Essa criança apresentava um quadro de infecções sucessivas do trato respiratório superior, além de um quadro de diarreias recorrentes. Mesmo com a utilização de tratamentos à base de antibióticos, a paciente não mostrava nenhuma melhora clínica (Miller, 1968). Descobriu-se, então, que o problema da paciente era humoral, uma vez que seus leucócitos tinham 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. Desse modo, através do uso do plasma de doadores, utilizados no mesmo ensaio, conseguiu-se melhorar o quadro clínico da paciente. Como esse defeito fagocítico foi descoberto na mãe da menina e também em alguns parentes, surgiu uma hipótese de que provavelmente essa característica pudesse ser herdada (Garret et al., 2003).

Na década de 1970 a MBL foi pela primeira vez isolada do soro de coelho (Kawasaki et al., 1978). Já na década seguinte, descobriu-se que o defeito fagocítico estava relacionado ao Sistema Complemento. Através de experimentos, observou-se que C3b e iC3b eram depositados em menor quantidade na superfície de leveduras incubadas com soro de pessoas afetadas (Turner et al., 1981). No entanto, não foi percebida nenhuma

anormalidade do Sistema Complemento. Sendo assim, havia uma hipótese de existência de um co-fator que estivesse relacionado a essa disfunção. Nesse mesmo período, observou-se também que o defeito de opsonização estava diretamente ligado ao aparecimento de infecções recorrentes.

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 freqüentemente 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.

Essa molécula é principalmente produzida pelo fígado, pertence à família das colectinas. Possui um domínio de colágeno e outro de lectina, sendo classificada como uma lectina sérica tipo C.

A MBL possui um Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD), este auxilia no reconhecimento de grupos específicos de açúcares, tais como, manose, fucose e glicose. Estes açúcares estão presentes na superfície externa de microorganismos, de modo que dessa forma ocorre a distinção do que é ou não é parte constituinte do organismo (Dommett et al., 2006).

Estudos da caracterização do sítio de ligação do domínio de reconhecimento de carboidrato da MBL, realizados em ratos mostraram que a

interação MBL/ ligante seguia um padrão de ligação, chamado de “micro-padrão”. No entanto, essa ligação é de baixa afinidade ( $\sim 10^5$  M), para que seja um ligação de alta afinidade é preciso que os açúcares terminais no ligante permaneçam distantes entre si 45 Å (Kawasaki et al., 1983). Este tipo de ligação geométrica é presente em vários patógenos, mas não em glicoproteínas próprias (Sheriff et al., 1994). Desse modo, o “reconhecimento de padrão” é dependente tanto de um micro quanto de um macro padrão (Hoffmann et al., 1999).

Além de ativar a cascata do Sistema Complemento (via da MBL ou via das lectinas), a MBL também é capaz de promover a opsonização independente do Sistema Complemento. No primeiro caso está associada a uma família de proteases denominadas serino proteases associadas à MBL (MASPs), já no segundo 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).

A MBL está diretamente relacionada ao processo de fagocitose por macrófagos. Esta liga-se à células apoptóticas, expondo os açúcares terminais do citoesqueleto, de modo a permitir o reconhecimento da MBL, facilitando a fagocitose.

O gene que codifica a MBL está localizado no cromossomo 10 (10q11.1-q21), no entanto, nessa mesma região cromossômica um pseudogene expresso da MBL (*mb1* 1) também foi descoberto, o que pareceu ser o homólogo do gene funcional *mb1*-A presente no camundongo e no Rhesus (*Macaca mulatta*) (Guo et al., 1998). A região que codifica a proteína do gene *mb1*2 consiste de quatro exons interrompidos por 3 introns de 600, 1350 e 800

pares de base (Taylor et al., 1989). A seqüência da região promotora desse gene contém vários elementos que sugerem a MBL como uma proteína participante de fase aguda em infecções (figura 1).

Existem três mutações que estão relacionadas às concentrações séricas da MBL. A primeira mutação (variante B) ocorre no códon 54, mudando a seqüência de GGC para GAC, levando a uma substituição do aminoácido ácido aspártico pelo aminoácido glicina na proteína traduzida. A segunda mutação (variante C), por sua vez, ocorre no exon 1, códon 57, levando a uma troca de glicina por ácido glutâmico (Limpscombe et al., 1992). Já a terceira mutação (variante D) está no códon 52 do mesmo exon, provocando a substituição de arginina por cisteína (Madsen et al., 1994). O alelo selvagem é denominado A.

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 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.

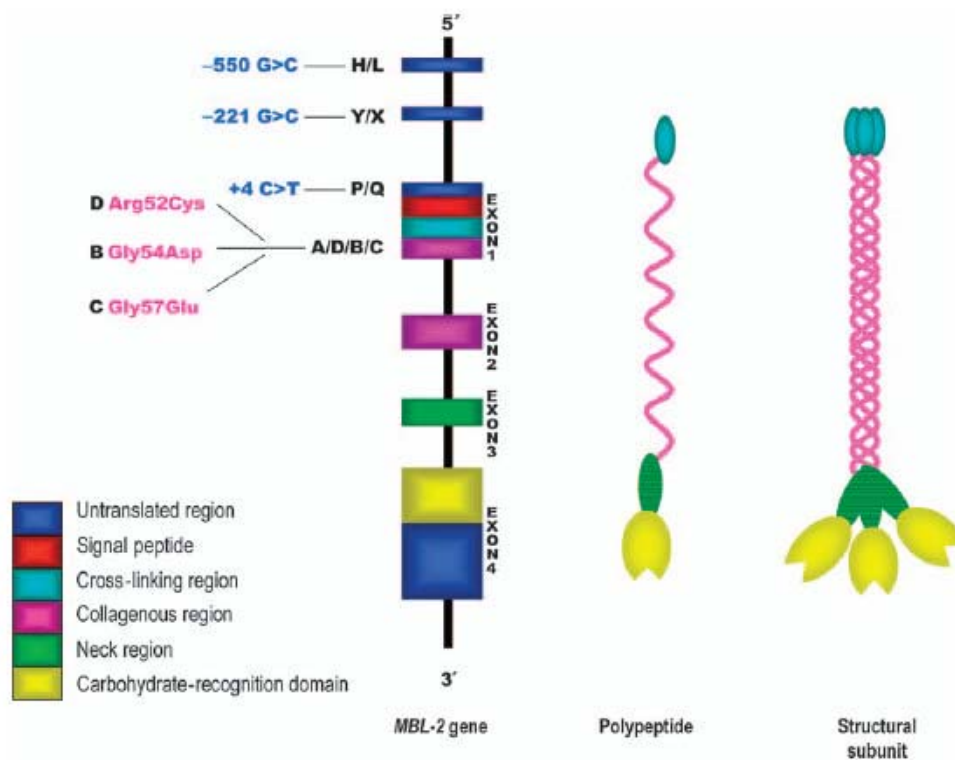


Figura 1. Estrutura do gene *mbi2*, e o produto protéico codificado. Diferentes regiões da proteína são codificadas por diferentes exons. As posições de todos os polimorfismos do exon 1 e da região promotora também está mostrada. Adaptado de Dommet et al., 2006.



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: 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).

A MBL desempenha importante função na primeira linha de defesa contra muitos microorganismos, principalmente no período que ocorre após a diminuição de anticorpos maternos e antes que ocorra uma produção efetiva desses. Sendo assim, a MBL desempenha uma função ante-anticorpo (Ezekowitz, 1991), ou seja, antecede os anticorpos no combate a microorganismos 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 freqüência relativamente alta em diversas populações. Por isso, freqüentemente 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 freqüência 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).

## 1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitida através da picada de fêmeas de mosquitos da família *Plebotomidae* (Figura 2). As formas clínicas da leishmaniose são particularmente variadas, representando um complexo de doenças: leishmaniose visceral (LV), que pode ser letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como uma doença mutiladora; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença provocada por uma resposta imune celular deficiente; e leishmaniose cutânea (LC), que causa um 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 distribuída em 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 intermitente, hepatoesplenomegalia, anemia e debilidade progressiva, levando frequentemente a óbito. Duas espécies do complexo *donovani* transmitem a doença para o homem: *Leishmania donovani* e *Leishmania*



Figura 2: Flebotomíneo sobre a pele, principal vetor da Leishmaniose Visceral.  
Fonte OMS, 1996.

*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) (Figura 3).

No Brasil a LV é causada por *L.chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, os principais reservatórios que participam do ciclo zoonótico são canídeos selvagens e cães domésticos (Figura 4), a região nordeste é a mais afetada, com 90% dos 3 a 4 mil casos do país (Figura 5). A doença, que era tipicamente rural, a partir de 1980 passou a ser responsável por epidemias urbanas, inicialmente em Teresina – PI e em São Luís – MA. 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).

Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas mostram que apesar do número relativamente alto de pessoas infectadas com LV, somente uma



Figura 3: Principais áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral no mundo.  
Fonte: WHO, 2000.



Figura 4: Reservatórios da *Leishmania*. (A) Cão Assintomático com infecção por *L.chagasi*. (B) Cão com sinais clínicos da Leishmiose Visceral: ulceração na orelha e conjuntivite.

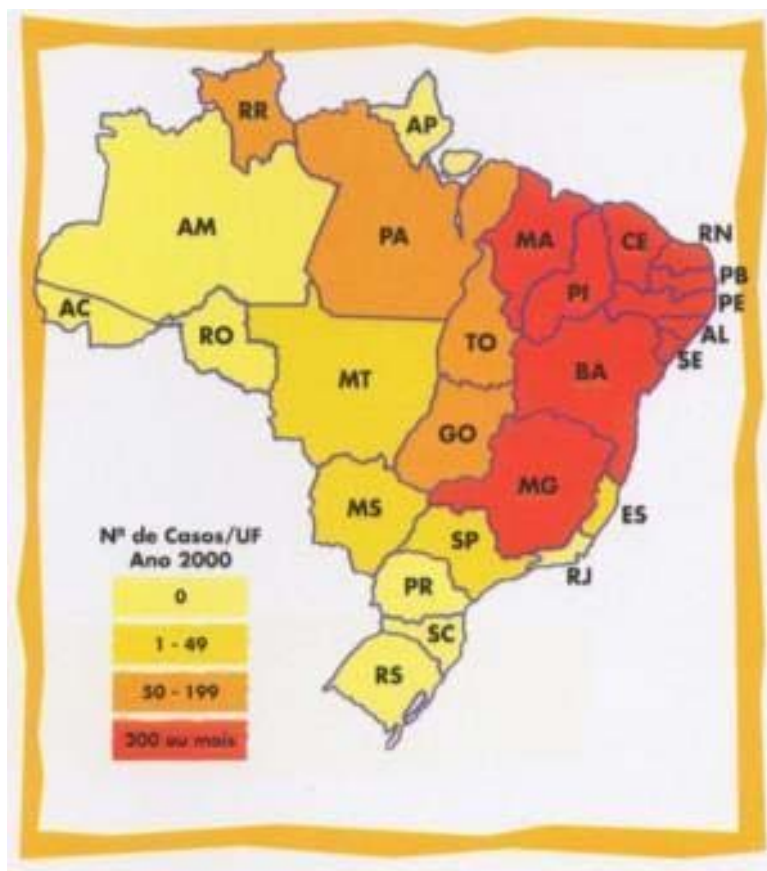


Figura 5: Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral Humana no Brasil.  
Fonte: FUNASA, 2001



pequena proporção chega a desenvolver a doença (Badaró *et al.*, 1986). A maioria dos pacientes permanece assintomática, a menos que ocorra uma depressão imunológica (Alvar, 1994). Desnutrição, pouca idade e infecção por HIV são fatores de risco para a LV (Badaró *et al.*, 1986; Alvar, 1994), porém outros fatores de susceptibilidade do hospedeiro ainda são desconhecidos. Diferenças existentes entre cepas do parasita também podem ter um importante papel na epidemiologia da doença, uma vez que heterogeneidade genética e diversidade clonal, que levam a uma variabilidade na virulência do parasita, são comuns aos representantes do gênero *Leishmania* (Garin *et al.*, 2001).

A lectina que se liga à manose (Mannose-Binding Lectin), ou MBL, é uma proteína que pode estar relacionada ao desenvolvimento da doença. Por ser uma lectina sérica componente da imunidade inata, ela tem a capacidade de se ligar a carboidratos presentes na membrana celular externa de vários patógenos, incluindo *Leishmania sp.*, agindo como uma opsonina e facilitando a fagocitose pelos macrófagos (Ezekowitz, 1991). A baixa concentração sérica da MBL, no homem, é a base de um defeito comum, envolvendo o processo de opsonização, frequentemente relacionado a infecções recorrentes durante a infância (Super *et al.*, 1989). Por outro lado a alta concentração pode ser desvantajosa em alguns casos, pois ela pode facilitar a infecção por parasitas intracelulares, como é o caso da *Leishmania sp.* (Garred *et al.*, 1994).

A deficiência na MBL está relacionada à presença de genes mutados que codificam três variantes estruturais que reduzem a quantidade sérica da proteína funcional (Madsen *et al.*, 1995). Substituições únicas de nucleotídeos (SNPs) no códon 54 (alelo B) e no códon 57 (alelo C), no exon 1 do gene que

codifica a MBL, resultam em falha na estrutura em forma de tripla hélice do colágeno pela substituição de um resíduo essencial de glicina por ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente. Uma substituição nucleotídica no códon 52 do mesmo exon (alelo D) causa a troca de arginina por cisteína . Além disso, duas mutações presentes no promotor do gene da MBL, uma na posição -550 (genótipo H/L) e outra na posição -221 (genótipo X/Y), sendo ambas uma troca única de G para C, parecem contribuir para a variação do nível sérico da proteína diminuindo as taxas de transcrição do gene (Madsen *et al.*, 1995).

Um estudo populacional caso-controle realizado por nosso Laboratório no município de Teresina - PI mostrou que pacientes com diagnóstico positivo para Leishmaniose Visceral apresentaram um nível maior de MBL sérica em relação aos indivíduos controle, além disso, a frequência dos alelos variantes foi significativamente maior nos indivíduos controle do que nos pacientes, evidenciando um caráter protetor das mutações que codificam os alelos variantes dessa lectina.

Indivíduos portadores de genótipos selvagens, ou seja, que facilitam a infecção por *Leishmania chagasi* se apresentaram com pelo menos 6,80 vezes mais chance de necessitar de uma transfusão de sangue ao desenvolver a Leishmaniose Visceral do que indivíduos infectados que permanecem assintomáticos (Alonso *et al.*, 2007).

***Objetivos***

---

De acordo com o exposto, o presente projeto tem por objetivo realizar um estudo genético, com o intuito de identificar e genotipar mutações específicas no promotor e no exon 1 do gene que codifica a MBL em humanos e comparar os resultados encontrados para este projeto com os resultados já obtidos no estudo caso-controle, realizado pelo nosso laboratório, em Teresina-PI. A realização do estudo permitirá também, a consolidação de uma base de dados para estudos posteriores envolvendo a genética populacional da Lectina Ligante de Manose.

## ***Materiais e Métodos***

---

### **3.1 Amostras**

As amostras de DNA serão extraídas do sangue dos pacientes em nosso laboratório com o kit GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare) conforme as recomendações do fabricante. O DNA obtido será armazenado a -20°C até o momento do uso.

### **3.2 PCR**

Quatro pares de oligonucleotídeos, referentes ao exon 1 e ao promotor do gene da MBL, (Madsen *et al.*, 1995) serão utilizados na reação de PCR para a amplificação das regiões contendo as mutações. As condições da reação são: 2 min à 94 °C, depois 35s ciclos de 30s à 94 °C, 1 min à 58°C e 2 min à 72 °C, com 5 min de extensão final.

### **3.3 Purificação dos Produtos de PCR**

Após a reação de PCR os produtos serão purificados enzimaticamente com o kit ExoSAP- IT (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante.

### **3.4 Reação de mini-sequenciamento**

Para a reação de mini-sequenciamento será utilizado o kit ABI PRISM® Snapshot™ Multiplex que detecta todas as mutações em uma única reação pelo método dideoxi com extensão de uma única base. Após a purificação, 2µl dos fragmentos purificados serão utilizados na reação de mini-sequenciamento, 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 1) e água até completar o volume de 10 µl. As reações serão realizadas

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.

**Tabela 1. 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´- CCCCTACCTGGTCCCCCTTTCT - 3´</b>
<b>POSIÇÃO -550</b>	<b>5´- CCCCCCCCCCCCCCGCTTACCCAGGCAAGCCTGT- 3´</b>
<b>POSIÇÃO -221</b>	<b>5´- CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCATTGTTCTCACTGCCAC - 3´</b>

*Resultados*

---



Através dos dados genotípicos analisados, foram obtidos 5 haplótipos mais frequentes (LXA, LYA, HYA, HYB e LYB), dentre os 13 existentes. O gráfico mostra a distribuição desses haplótipos nas amostras obtidas dos voluntários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências – Unesp Botucatu.

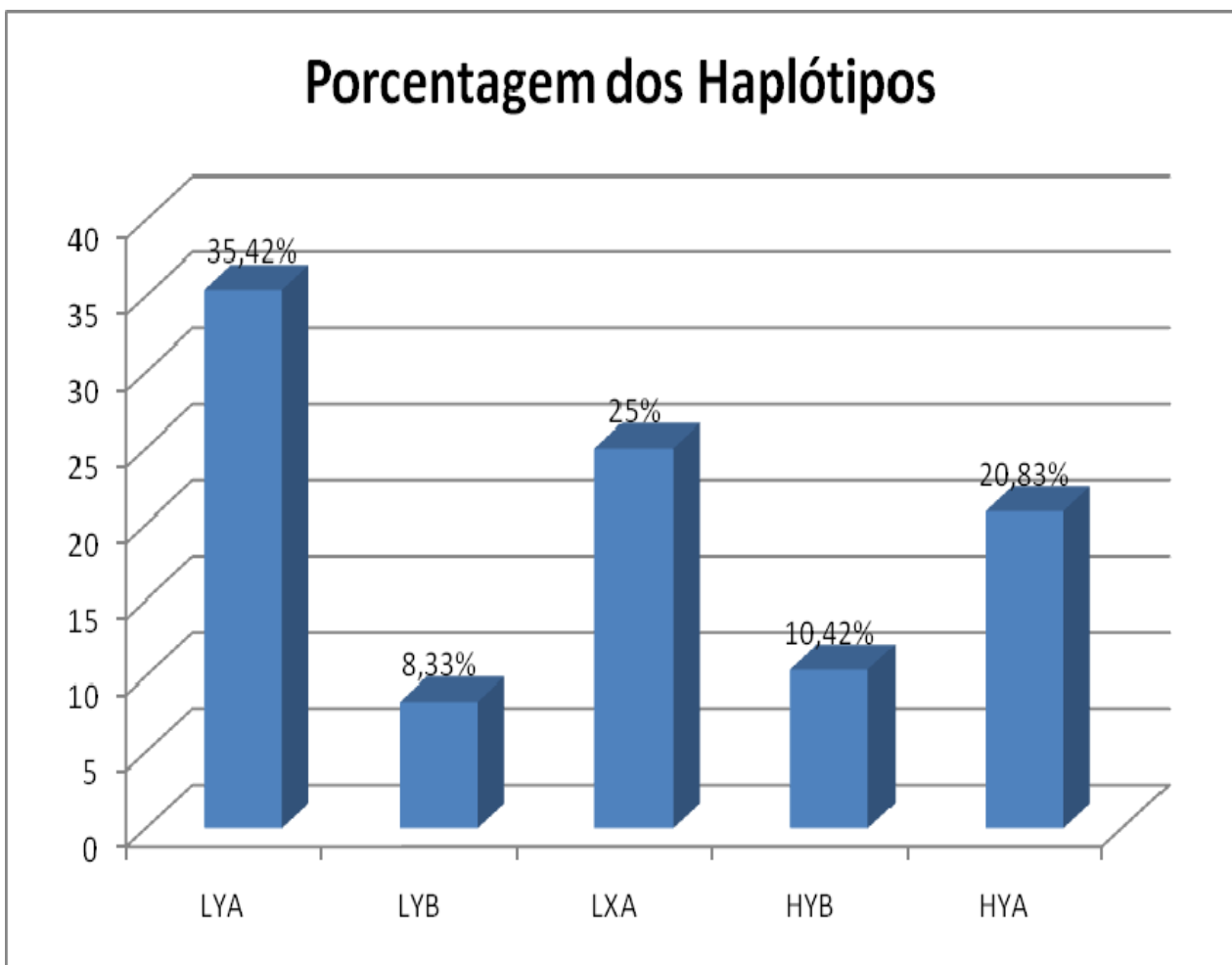


Figura 6: Gráfico mostrando a distribuição e frequência dos haplótipos obtidos para a MBL.

*Conclusão*

---

Um estudo caso-controle realizado pelo nosso laboratório com amostras obtidas em Teresina- PI sustentou a hipótese de que indivíduos com níveis baixos de MBL sérica seriam parcialmente protegidos de uma infecção do patógeno intracelular *Leishmania chagasi*. Tais indivíduos teriam, portanto, alelos variantes do gene *mbi2*.

Essa conclusão foi obtida através da análise de dados da distribuição dos haplótipos de casos de Leishmaniose Visceral, nos controles vizinhos ao caso e nos controles populacionais. O genótipo que confere altos níveis séricos da MBL (YA/YA e YA/XA) foi encontrado em maior frequência nos indivíduos com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, quando comparado ao grupo controle ( $P=0,025$ ).

Dos haplótipos foram observados no total, cinco deles são bem freqüentes (LYA, HYA, HYB, LYB e LXA). Desses, 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).

Comparando-se os dados obtidos com as amostras dos voluntários do Departamento de Parasitologia e da população de Teresina-PI, podem-se observar algumas diferenças em relação à distribuição dos haplótipos. Enquanto em Teresina os três haplótipos mais freqüentes são: LYA (27,64%), HYA (27,46) e LYB (19,76), nas amostras obtidas em Botucatu são: LYA (35,42%), LXA (25%), HYA (20,83%).

A distribuição desses haplótipos está ligada à etnia dos indivíduos, uma vez que as observações de Garred, Madsen, Lozano e colaboradores (Garred et al., 2006; Madsen et al., 1998; Lozano et al., 2005) 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%).

De acordo com os estudos citados, concluiu-se que a MBL está diretamente ligada na aquisição e no desenvolvimento da leishmaniose visceral. Desse modo, a genotipagem nos pacientes pode auxiliar na escolha do tratamento a ser administrado, tornando-o mais eficaz.

## *Referências*

---

Alonso, D.P., Ferreira, A.F., Ribolla, P.E., Santos, I.K., Cruz, M.do S., Carvalho, F.A., Abatepaulo, A.R., Costa, D.L, Werneck, G.L., Farias, T.J., Soares, M.J., Costa, C.H. – 2007. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *Journal of Infectious Diseases*, 195 (8): 1212-1217.

Alvar, J. – 1994. Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitology Today* 10:160–163.

Badaro', R. T. C. Jones, R. Lorenço, B. J. Cerf, D. Sampaio, E. M. Carvalho, H. Rocha, R. Teixeira, and W. D. Johnson, Jr. – 1986 . A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 154:639 –649.

Desjeux P – 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, 27:305 – 318.

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.

Ezekowitz, R. A. B. – 1991. Ante-antibody immunity. *Current Biology*, 1:60–62.

Garin YJ, Sulahian A, Pratlong F – 2001. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infectious Immunology*, 69:7365 – 7373.

Garred, P., M. Harboe, T. Oettinger, C. Koch, and A. Svejgaard. – 1994 . Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis?. *European Journal of Immunogenetics*,. 21:125–131

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

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

Super, M., S. Thiel, J. Lu, R. J. Levinsky, and M. W. Turner. 1989. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. *Lancet*:1236–1238.