

Lina Fernanda Osorio-Morales

Identificação e análise de polimorfismos
no gene que codifica a Lectina ligante de
Manose (MBL) na espécie *Canis lúpus*
familiaris



Botucatu
2013

Lina Fernanda Osorio-Morales

Identificação e análise de polimorfismos
no gene que codifica a Lectina ligante de
Manose (MBL) na espécie *Canis lúpus*
familiaris

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração, Biomoléculas Estrutura e
Função.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo
Martins Ribolla

Botucatu
2013

Morales, Lina F. O.

Identificação e análise de polimorfismos no gene que codifica a Lectina ligante de Manose (MBL) na espécie *Canis lupus familiaris*

44 páginas

Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. Departamento de Parasitologia.

1. *Leishmania infantum/chagasi*

2. Lectina ligante de manose

I. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências. Departamento de Parasitologia.

Comissão Julgadora:

Dra. Hiro Goto
Profa. Titular

Dr. Hélio Langoni
Prof. Titular

Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
Prof. Adjunto

Dedico este trabalho ao meu filho - o maior presente de minha vida - que vem tendo paciência devido à minha ausência. Amo-te muito filho! Em breve estaremos mais tempo juntos.

Epígrafe

¿Em que momento da sua vida você tem tomado as decisões mais importantes?...

Lina

Agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que colaboram neste trabalho, nossos propósitos chegam ao fim porque temos pessoas que nos ajudam.

Quero agradecer primeiramente a Deus por me permitir cumprir mais um sonho em minha vida!

Ao meu Orientador Paulo Ribolla, pelo incentivo, por me brindar a oportunidade de fazer parte de sua equipe de trabalho, por todo o conhecimento que acrescentou na minha vida, por tudo isso e pelo carinho, muito obrigada professor Paulo!

Ao meu Co-orientador Diego Peres Alonso, pelas dicas, disponibilidade e preocupação que manteve durante o desenvolvimento de meu trabalho, obrigada Diego, depois de tanta correria a gente conseguiu!

A comunidade UNESP em geral, Biblioteca, Pós graduação, Departamento de parasitologia. Muito obrigada!

Ao laboratório de Entomologia Molecular, pelas experiências vividas.

À Dra. Maria do Socorro Cruz por ceder as amostras utilizadas no meu estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de minha formação acadêmica.

A Carine Spenanssato especialmente, por todo o carinho e apoio durante o desenvolvimento do projeto e parte escrita da dissertação, agradeço de coração!

A Esther Camilo, pela amizade e apoio durante a etapa final de meu trabalho.

A Marcela Troncarelli, pela amizade e por me permitir fazer parte de sua família, obrigada amiga!

A Jaysson e Mauro, com muito carinho.

A Francisco Pedraza, por todo seu amor!

Agradeço também a minha família, especialmente e com muita saudade de meus pais, a eles por me acompanhar neste processo desde a distância... Amo vocês com toda minha alma.

Resumo

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias estendidas a nível mundial e representam uma grande variedade de manifestações clínicas que vão desde leishmaniose visceral que é a forma mais grave da doença e com letalidade próxima aos 100% sem tratamento, e a leishmaniose cutânea que é de evolução usualmente benigna. As diferentes formas clínicas dependem da espécie de *Leishmania* que produz a doença e da resposta imune que estabelece cada hospedeiro. A lectina ligante de manose (MBL), é uma proteína que potencialmente desempenha um papel na infecção podendo levar a doença, já que ela é capaz de facilitar a infecção, promovendo a fagocitose desses parasitos intracelulares. Mutações no exon 1 e no promotor do gene da MBL humana resultam em níveis séricos baixos da proteína, o que pode proteger contra o desenvolvimento da doença. O presente estudo avaliou o papel da MBL em cães infectados com leishmaniose visceral (LVC), no Brasil, na população de Teresina – PI. (cidade endêmica para leishmaniose visceral). A procura de polimorfismos foi realizada na região promotora do gene que codifica a mbl canina, (mbl A). O DNA usado foi extraído de amostras de medula óssea de cães infectados provenientes da região. Foram encontradas apenas duas mutações do tipo SNPs na região promotora do gene da MBL. Os nossos resultados sugerem que a sequência do promotor de cães com a doença são bastante estáveis podendo ser usados como base numa possível comparação com cães saudáveis. Essas informações, juntamente com dados dos níveis séricos no plasma sanguíneo podem revelar a correlação entre a *Leishmaniose* visceral e a MBL.

Palavras-chave: *Leishmaniose*, proteína ligante de manose, *Canis lupus familiaris*

Abstract

Leishmaniasis is a group of parasitic diseases extended worldwide and represent a wide variety of clinical manifestations ranging from visceral leishmaniasis - the most severe form of the disease with mortality close to 100 % without treatment , and cutaneous leishmaniasis which evolution is usually benign . The different clinical forms depend on the kind of *Leishmania* which produces the disease and the immune response that establishes each host. The mannose binding lectin (MBL) is a protein that plays a potential role on how the infection may lead to disease, because it is capable of facilitating infection by promoting phagocytosis of these intracellular parasites . Mutations in exon 1 and the promoter of the gene for human MBL result in low serum levels of the protein, which can protect against the development of disease. The present study evaluated the role of MBL in dogs infected with visceral leishmaniasis (VL), in Brazil, in the population of Teresina - PI . (city with visceral leishmaniasis endemic) . It was looked for polymorphisms in the promoter region of the MBL gene encoding the canine (MBL A). The DNA used was extracted from bone marrow samples from dogs infected from that region. We found only two mutations for SNPs in the promoter region of the MBL gene . Our results suggest that the promoter sequence of dogs with the disease are very stable and can be used as the basis of comparison with healthy dogs . This information, together with data of serum blood plasma can reveal the correlation between the *Leishmaniasis* visceral and MBL .

Keywords: *Leishmaniasis*, mannan-binding lectin, *Canis lupus familiaris*

Lista de Figuras

1.1	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> <i>ssp.</i>	5
1.2	Animais silvestres hospedeiros da <i>Leishmania</i> <i>chagasi</i>	7
1.3	Distribuição geográfica da <i>Leishmaniose</i> no mundo.	8
1.4	Distribuição geográfica da <i>Leishmaniose</i> no Brasil.	9
2.1	Estrutura em forma de tulipa da MBL-A.	14
2.2	Estrutura do gene <i>mbl2</i> , e o produto protéico codificado.	16
3.1	O sistema complemento	21
5.1	Gel mostrando o peso molecular (PM)	32
5.2	Resultado do alinhamento entre as 54 amostras	32
5.3	Resultado da busca pela sequência de DNA do promotor da proteína lectina ligante de manose.	33
5.4	Posição do polimorfismo C/T na sequência 1	33
5.5	Posição do polimorfismo C/T na sequência 11	34

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Histórico da leishmaniose visceral	3
1.1.1	Ciclo do parasita	5
1.1.2	Epidemiologia da leishmaniose visceral canina	6
1.2	Visão geral da dissertação e contribuições	9
2	Polimorfismos da MBL em <i>Canis lupus familiaris</i>	11
2.1	Lectina ligante de manose	11
2.1.1	Estrutura da MBL	12
2.2	Genética da MBL	14
2.2.1	Fenótipos	15
2.2.2	Polimorfismos na região promotora	17
2.2.3	Maiores sitios de expressão	18
3	O sistema complemento	19
3.1	Introdução	19
3.2	Função da MBL no sistema complemento	20
3.3	Relação da MBL com <i>Leishmania chagasi</i>	21
4	Materiais e Métodos	25
4.1	Primeira fase: extração do RNA	25

4.1.1	Material biológico	25
4.1.2	Isolamento e tratamento do RNA total	26
4.1.3	Transcrição reversa para obtenção de cDNA	26
4.1.4	Amplificação MBL-C	26
4.2	Segunda fase: extração do DNA	27
4.2.1	Material biológico	27
4.2.2	Extração do DNA	27
4.2.3	Condições de Amplificação	27
4.2.4	Purificação dos produtos de PCR	29
4.2.5	Quantificação dos produtos de PCR purificados	29
4.2.6	Sequenciamento	29
4.2.7	Análise dos dados – Alinhamento das sequências	30
5	Resultados	31
5.1	Caracterização molecular	31
5.2	Alinhamento da sequência consenso e a MBL canina padrão	31
5.3	Alinhamento entre as sequências do promotor da MBL nos cães infectados	32
6	Discussão	35
	Referências Bibliográficas	39

Capítulo 1

Introdução

A lectina ligante de manose (do inglês *mannan-binding lectin* - MBL) é uma proteína sérica membro da família das colectinas, sendo uma importante constituinte da imunidade inata. Também é uma das mais de trinta moléculas do sistema complemento (Dommett et al., 2006). Miller *et al.* descreveram uma falha na opsonização de bactérias em uma paciente que sofria de infecções recorrentes no trato respiratório e não apresentava melhora clínica quando tratada. Um defeito fagocítico semelhante foi descoberto no soro da mãe da paciente, como também em vários de seus parentes (Miller et al., 1968).

A MBL é vista como uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo. A possibilidade do reconhecimento do próprio e do não-próprio é dada graças à especificidade da ligação da MBL (Fraser et al., 1998). Uma vez que o Sistema Complemento é ativado, uma cascata de reações acontece, resultando na clivagem do terceiro componente do complemento (C3), a qual se denomina Via da Ativação.

Existem três vias de ativação:

1. a clássica, que é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo;
2. a alternativa, ativada por micro-organismos;

3. a das lectinas, ativada por domínios de reconhecimento de carboidratos.

A via das lectinas envolve receptores de reconhecimento-padrão, como a lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas, que são uma família de proteínas estruturalmente semelhantes às colectinas, possuindo um domínio de colágeno ligado a um domínio fibrinogênio-*like*. A MBL pode atuar como uma opsonina, ligando-se a carboidratos de patógenos e, posteriormente, interagindo com os receptores da MBL em células fagocíticas. Entretanto, ela também pode desencadear a opsonização do complemento, o que resultaria na deposição de C3b/iC3b nos alvos e simulando a fagocitose (Presanis et al., 2003).

O gene que codifica a MBL foi caracterizado em galinha e em alguns mamíferos, como o chimpanzé, boi, camundongo, entre outros e o mais estudado até agora é o humano. O gene da MBL em cães ainda não foi localizado, contudo, sua versão predita já está disponível, a qual é similar a lectina ligante de manose (A), sendo homóloga ao rato, camundongo, boi e chimpanzé.

A deficiência de MBL é associada ao aumento da susceptibilidade a várias doenças infecciosas, principalmente a patógenos extracelulares (Summerfield et al., 1997). Em humanos, a associação da MBL a doenças vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. Já se sabe que pelo menos quatro haplótipos da MBL2 causam a diminuição nas taxas da MBL circulante no soro (Schwaebler et al., 2011).

Uma grande variedade de estudos realizados nas últimas décadas tem demonstrado a importância do sistema complemento na resposta imune da leishmaniose. Diferentes estudos determinaram a ativação das vias clássica e/ou alternativa do complemento por algumas espécies de *Leishmanias*. Uma função imunomoduladora da MBL foi demonstrada na Leishmaniose Visceral por Santos *et al.* que observaram a associação entre a concentração sérica de MBL em pacientes e a suscetibilidade a leishmaniose visceral causada *L. chagasi*. Outro grupo conseguiu relacionar os fenótipos que aumentam as taxas de MBL no soro com a probabilidade de desenvolver leishmaniose visceral (Alonso

[et al., 2007](#)). Deste modo, demonstram que o sistema complemento e a MBL estão envolvidos diretamente no processo de instalação da leishmaniose e também evidenciam que as diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar comportamentos distintos frente a esse sistema.

A MBL e as Leishmanias estão intimamente relacionadas, portanto, é possível que o sistema imune dos cães respondam do mesmo modo ao ataque dos protozoários, relacionado com os níveis séricos da MBL no plasma, que, em humanos, é determinado por mutações no promotor e no exon 1 do gene MBL2. Assim, o presente trabalho busca investigar a existência de interações entre a MBL canina e a Leishmaniose Visceral Canina através de pesquisa de mutações no gene predito codificante da lectina ligante de manose em cães infectados por *Leishmania chagasi*.

1.1 Histórico da leishmaniose visceral

A mais antiga descrição de leishmaniose foi feita por Clarke ([Clarke, 1882](#)) na Rapport Sanitaire de Lássam, em 1882. Ele relatou que a atenção das autoridades sanitárias estava voltada para uma doença conhecida pelos “indígenas” (da Índia, segundo o termo utilizado na época) como calazar (kala-azar), fato corrido em 1869. A primeira descrição do agente etiológico de leishmaniose foi realizada por William B. Leishman, pesquisador britânico que descreveu o caso de um soldado irlandês que veio à óbito pela conhecida febre dum-dum, contraída na Índia. O soldado havia falecido no Royal Victoria Hospital, em Netley, Inglaterra. Leishman acreditava que os parasitas visualizados à microscopia fossem, na verdade, tripanossomas que haviam sofrido alterações *post-mortem*, uma vez que a morte do soldado ocorreu no ano de 1900, mas a publicação ocorreu somente em 1903.

Ainda em 1903, Donovan descreveu, em esfregaços de polpa esplênica de pacientes com clínica compatível com calazar, corpúsculos semelhantes àqueles descritos por

Leishman. Posteriormente, examinando material obtido de pacientes vivos, Donovan afastou a possibilidade de se tratar de tripanossomas degenerados. Embora descrito o parasita, ainda faltava a exata correlação entre o parasita e a doença, fato estabelecido somente por Manson e Low, no Seamen's Hospital de Londres, no mês de dezembro de 1903, quando encontraram os corpúsculos em pacientes portadores de calazar.

A doença também foi descrita fora da Ásia. Na Grécia, em 1835, especificamente na ilha de Spetzia foi relatada uma esplenomegalia febril que acometia principalmente crianças, acompanhada de anemia, que segundo Laveran seria calazar ([Laveran, 1917](#)). Antes dessa descrição, havia vários relatos de epidemias e quadros febris que chegavam a dizimar populações quase inteiras na Índia. Existe a possibilidade de ter havido confusão quanto à etiologia dessas epidemias. Elas podem ter sido atribuídas, por exemplo, à malária, à ancilostomíase ou a outros estados mórbidos. Ainda em 1903, Donovan descreveu, em esfregaços de polpa esplênica de pacientes com clínica compatível com calazar, corpúsculos semelhantes àqueles descritos por Leishman. Posteriormente, examinando material obtido de pacientes vivos, Donovan ([Donovan, 1903](#)) afastou a possibilidade de se tratar de tripanossomas degenerados. Embora descrito o parasita, ainda faltava a exata correlação entre o parasita e a doença, fato estabelecido somente por Manson & Low, no Seamen's Hospital de Londres, no mês de dezembro do ano de 1903, quando encontraram os corpúsculos em pacientes portadores de calazar. Ainda sob o ponto de vista histórico, destaca-se o papel de um brasileiro, o jovem cientista Gaspar Vianna, que, em 1912, aplicou o tártaro emético (antimonial trivalente) no tratamento da leishmaniose tegumentar, obtendo sucesso. Posteriormente, o tártaro emético foi aplicado a portadores do calazar por Castellani ([Castellani and Chambers, 1919](#)), em 1914. Iniciou-se, assim, a estiboterapia (estibogluconato de sódio), que, na grande maioria dos casos, interrompe a evolução natural da doença para a morte.

1.1.1 Ciclo do parasita

O ciclo do parasita pode ser descrito a partir da picada do inseto vetor, que inocula as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado (animal, homem). As formas promastigotas são fagocitadas na epiderme por células dendríticas (macrófagos da pele) e, no seu interior, evoluem para amastigotas. Essas formas apresentam multiplicação intensa intracelular quando vencem as resistências imunológicas oferecidas pelo organismo. Os macrófagos repletos rompem-se e liberam as formas amastigotas no meio tissular. Ao realizar o repasto sanguíneo, o flebótomo ingere células (macrófagos) parasitadas por amastigotas. Essas formas são liberadas no trato digestório do vetor e tornam-se promastigotas, que se multiplicam intensamente, colonizando o esôfago e a faringe do flebótomo e, na porção anterior do sistema digestório, tornam-se promastigotas metacíclicas, considerada a forma infectante. Com um novo repasto sanguíneo, a inoculação do parasita vai ocorrer. O ciclo completo no vetor ocorre em torno de vinte dias (Killick-Kendrick, 1989) (Figura 1.1).

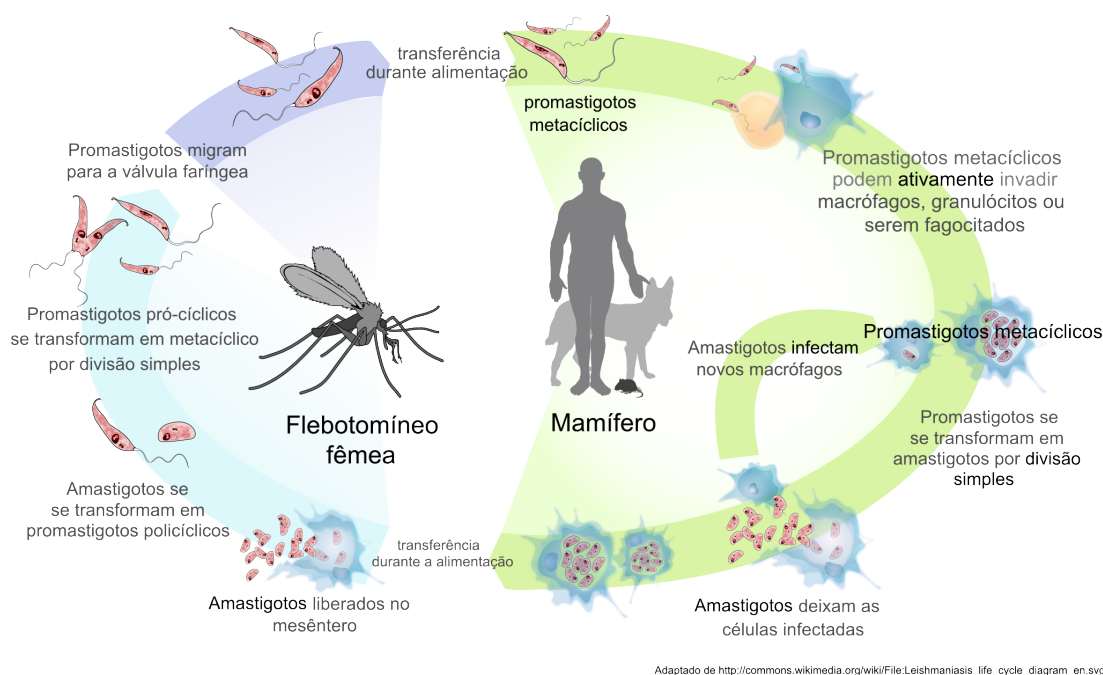


Figura 1.1: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

1.1.2 Epidemiologia da leishmaniose visceral canina

A epidemiologia e distribuição de doenças transmitidas por vetores podem ser afetados por mudanças na ecologia do vetor e nos movimentos de populações humanas e do cão, que por sua vez pode estar ligada a fatores como mudanças climáticas, desmatamento e mudanças nas práticas de uso da terra (Grimaldi Jr et al., 1989). Evidências científicas recentes com base em novos dados históricos e registros sobre Leishmaniose canina (LVC) indicou a disseminação da infecção para as regiões anteriormente consideradas não endêmicas, como é o caso de algumas áreas do norte da Itália (Pozio et al., 1981), no sul do Brasil (Pocai et al., 1998), e no norte da Argentina (Marco et al., 2005). O estabelecimento de LVC em novas áreas geográficas também está associada ao aumento da movimentação de ambas populações infectadas (por exemplo, cães transportados de uma área a outra, ou que foram adotados a partir de áreas endêmicas) e suscetíveis. O número de relatos de cães infectados por *L. infantum* em áreas não endêmicas na Europa, como a Alemanha (Bogdan et al., 2001) e Reino Unido (Longstaffe et al., 1983), estão em ascensão. Isso representa, atualmente, uma grande preocupação, principalmente porque os veterinários e os médicos desses países que geralmente não sabem como lidar com essa doença "exótica". Isso indica a necessidade de maior conscientização por veterinários e donos de cães, bem como a vigilância permanente por parte das autoridades locais e de saúde pública.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) desempenha grande importância na epidemiologia da leishmaniose visceral em áreas endêmicas, pois é o único reservatório doméstico do patógeno. Em áreas silvestres outros canídeos desempenham papel semelhante (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*, além de outros animais já encontrados hospedando *L. chagasi*, como marsupiais didelfídeos (Corredor et al., 1989) (Figura 1.2).

Existem também relatos indicando roedores como reservatórios da leishmaniose visceral em áreas rurais e periurbanas (Yaghoobi-Ershadi et al., 2001). Outros animais podem compor o cenário epidemiológico da leishmaniose visceral em áreas endêmicas,



(a)



(b)

Figura 1.2: Animais silvestres hospedeiros da *Leishmania chagasi* (a) *Cercopithecus thous*; (b) *Didelphis marsupialis*

pois, mesmo com a retirada de todos os cães soropositivos, o ciclo de transmissão da doença ainda pode existir, embora o número de casos humanos tenha diminuído ([Ashford et al., 1998](#)).

O agente etiológico mais importante de LVC é a *Leishmania infantum* (sinônimo da *Leishmania chagasi*) que produz também a forma visceral em humanos. A LVC é frequente em aproximadamente 50 países, principalmente na América do Sul e na região do Mediterrâneo, onde são transmitidas por dípteros hematófagos pertencentes à família *Psychodidae* nas Américas e do gênero *Phlebotomus* na África Europa e na Ásia. ([Grimaldi Jr et al., 1989](#)) (Figura 1.3).

O primeiro caso de Leishmaniose visceral autóctone do Brasil foi registrado em 1913 por Migone (?). Diferentes autores sugerem que a *L. chagasi* é de fato uma subpopulação *L. infantum* que surgiu importado de estirpes Europeias, e indicam a possibilidade do parasita ter desembarcado em cães infectados ([Kuhls et al., 2008](#)).

A leishmaniose visceral (LV) ocorre no estado do Piauí desde 1934. A doença tipicamente rural começou a aparecer em áreas urbanas ao longo do tempo, sendo concentrada principalmente em Teresina, capital do Piauí. Teresina também foi afetada

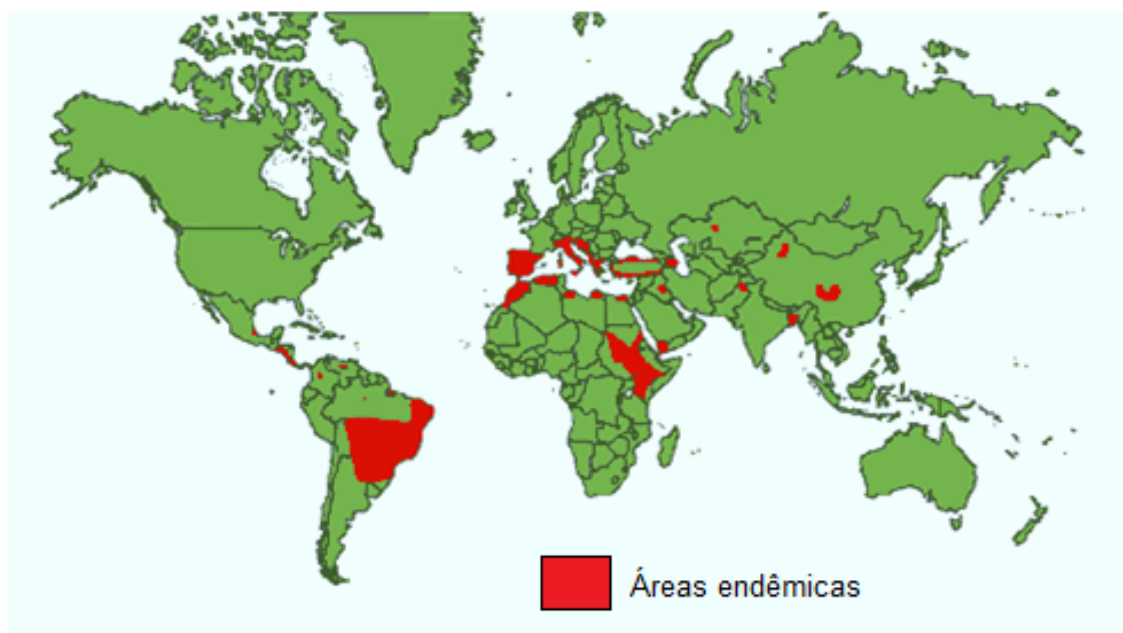


Figura 1.3: Distribuição geográfica da *Leishmaniose* no mundo. Adaptado de http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish_map/en/ em 16 de novembro de 2013.

pela primeira epidemia urbana de LV no Brasil. Mais de 1.000 casos da doença foram notificados durante a urbanização (1981-1986). O crescimento da população humana e da migração levou à ocupação da terra na periferia de Teresina. Esses fatores têm contribuído para a proliferação do vetor, aumentando a incidência de LV. Atualmente no Piauí, a incidência da doença humana e canina é bastante elevada e descontrolada. Parece que algumas medidas, tais como a eliminação de cães soropositivos, não conseguiram reduzir significativamente o número de casos novos de LV em Teresina. Apesar dos estudos realizados anteriormente, pouco se sabe sobre a epidemiologia da LV em áreas urbanas. Na primeira, a LV foi principalmente uma doença rural no Brasil. No entanto, ele acaba de se espalhar para áreas urbanas de médio e grande porte (Figura 1.4).

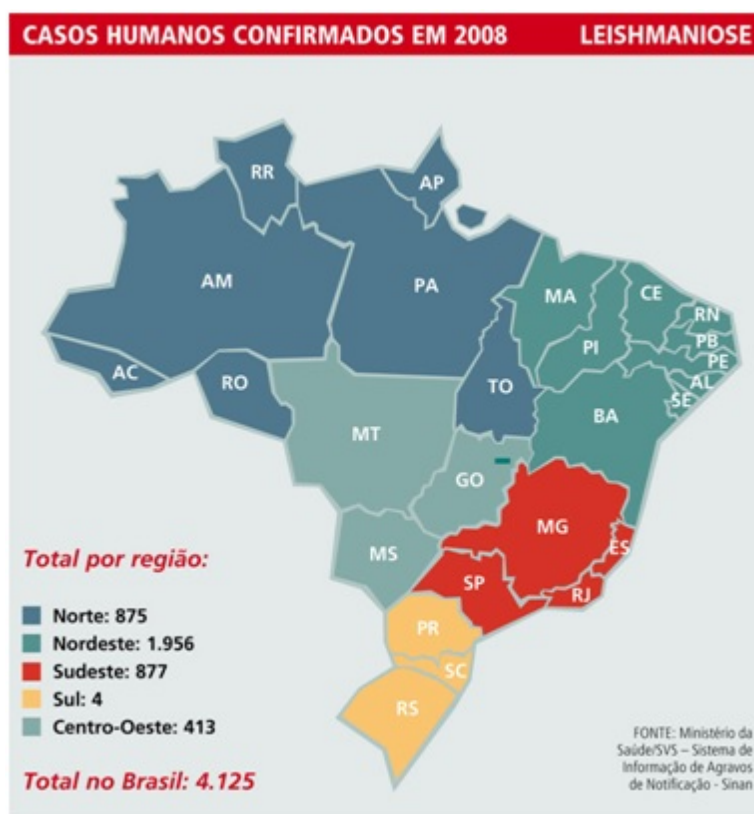


Figura 1.4: Distribuição geográfica da *Leishmaniose* no Brasil.

1.2 Visão geral da dissertação e contribuições

Considerando-se a importância da região promotora da MBL na alteração dos níveis séricos dessa proteína no organismo, buscou-se neste trabalho avaliar se cães com leishmaniose possuíam polimorfismos nessa região quando comparados à cães normais. Dada a importância da MBL, a partir desse estudo foi possível avaliar quantos dados experimentais ainda faltam para que uma análise consistente possa ser feita e assim relacionar a ação dessa proteína ao desenvolvimento da doença.

Capítulo 2

Polimorfismos da MBL em *Canis* *lúpus familiaris*

Motivados pelo fato de que somente uma certa proporção de indivíduos infectados com *Leishmania* são susceptíveis a desenvolver manifestações clínicas da doença leishmaniose, nós tentamos descobrir como os polimorfismos na região promotora da proteína lectina ligante de manose determina o progresso clínico da doença.

É sabido que baixos níveis séricos de MBL estão associados à susceptibilidade de um grande número de doenças. Quando esses baixos níveis estão associados a outras imunodeficiências, sua importância é potencializada.

2.1 Lectina ligante de manose

A lectina ligante de manose é uma proteína componente da imunidade inata. Os primeiros relatos foram realizados há cerca de 60 anos, por Sir Frank Macfarlane Burnet e John McCrea, que descreveram três inibidores séricos de microorganismos, denominados α , β e γ , sendo posteriormente caracterizado o inibidor β , como MBL. A partir deste período diferentes pesquisas vêm sendo realizadas em áreas como imuno-bioquímica,

genética molecular e microbiologia, para complementar as informações sobre a clínica e caracterização de suas funções (Dommett et al., 2006).

A MBL é sintetizada principalmente no fígado e serve como um mecanismo de defesa de primeira linha do hospedeiro. O nível sérico de MBL aumenta durante os três primeiros meses de vida, posteriormente se estabiliza aos níveis basais de adulto, sendo um importante componente do sistema de defesa antimicrobiano neste período, com significativo papel no combate as infecções (Thiel et al., 1995). Cada indivíduo apresenta uma concentração plasmática de MBL que lhe é característica, mas sua produção hepática é aumentada durante a fase aguda da resposta imune inata, quando forma um complexo com duas proteases zimogênicas (MASP-1 e MASP-2) para se ligar à superfície dos patógenos (Casanova and Abel, 2004).

Ao menos quatro funções distintas são exercidas pela MBL: 1) ativação do complemento; 2) promoção de opsonofagocitose independente de complemento, por meio do reconhecimento da região de colágeno por fagócitos mononucleares; 3) modulação da inflamação em processo dose-dependente da liberação de citocinas pelos monócitos e 4) promoção de apoptose, por meio da ligação de células T e neutrófilos polimorfonucleares à região CRD. (Turner, 2003).

As descobertas no conhecimento da estrutura e propriedades da MBL têm sido encaminhadas fundamentalmente ao mecanismo pelo qual a MBL une-se a superfície dos parasitas, tanto helmintos como protozoários, e sua participação no sistema complemento.

2.1.1 Estrutura da MBL

A MBL, previamente conhecida como proteína de união à manose (MBP) é uma lectina sérica tipo-C ou dependente de cálcio, com especificidade primária por açúcares dependentes de D-mannose, N-acetil glicosamina (GlcNAc), N-acetil manosamina (ManNAc) e L-fucose, presentes na superfície de grande parte dos patógenos. Sua

presença promove a opsonização e facilita a fagocitose do patógeno pelos macrófagos ([Kawasaki et al., 1983](#)). Carboidratos como a galactose, que possuem o grupo hidroxil na vertical, e o ácido siálico – comumente encontrado em superfícies celulares de mamíferos - apresentam afinidade indetectável à MBL, tornando os organismos que contêm ácido siálico em sua superfície, resistentes ao ataque da MBL. A MBL circula no soro como uma subunidade estrutural sob forma de tetrâmeros, pentâmeros ou hexâmeros de estrutura básica em associação com um grupo de serinas proteasas associadas a MBL, proteína de serina associadas á lectina unida á manose 1 (MASP1) e proteínas de serina associadas á lectina associada a manose 2 (MASP2), conhecidas como (MASPs) ([Matsushita and Fujita, 1992](#)). A MBL possui domínios com estrutura semelhante ao colágeno classificando-se dentro do grupo das colectinas.

As MASPs, apresentam estrutura semelhante à C1r e C1s, respectivamente, para formar um grupo com atividade esterásica sobre o C4 e C2, parecida à macromolécula do componente C1 que participa na formação da convertase do C3. Tem se reportado associação da MBL a MASP 3 e a uma proteína denominada MAp19. A MBL é um polipeptídeo de aproximadamente 32 kDa, com uma região rica em cisteína N-terminal, um domínio de colágeno, e uma região com múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) no extremo C-terminal ([Medzhitov et al., 2000](#)) (Figura 2.1).

Os CRD reconhecem ou se ligam a padrões de polissacarídeos na superfície de muitos microorganismos e auto-componentes incluindo as células apoptóticas, fosfolipídios, e complexos imunes. Por reconhecimento de carboidratos na superfície celular nas células apoptóticas, a MBL desenvolve uma função essencial no controle não só da resposta imune inata, mas também da homeostase celular imune. O reconhecimento dos hidratos de carbono nas células pode induzir à inflamação e ruptura da homeostase. ([van Kooyk and Rabinovich, 2008](#)). Por meio do domínio de reconhecimento de carboidrato – que se liga a um íon de cálcio, possibilitando a formação de pontes coordenadas com os açúcares - a MBL determina a seleção de carboidratos por intermédio da presença

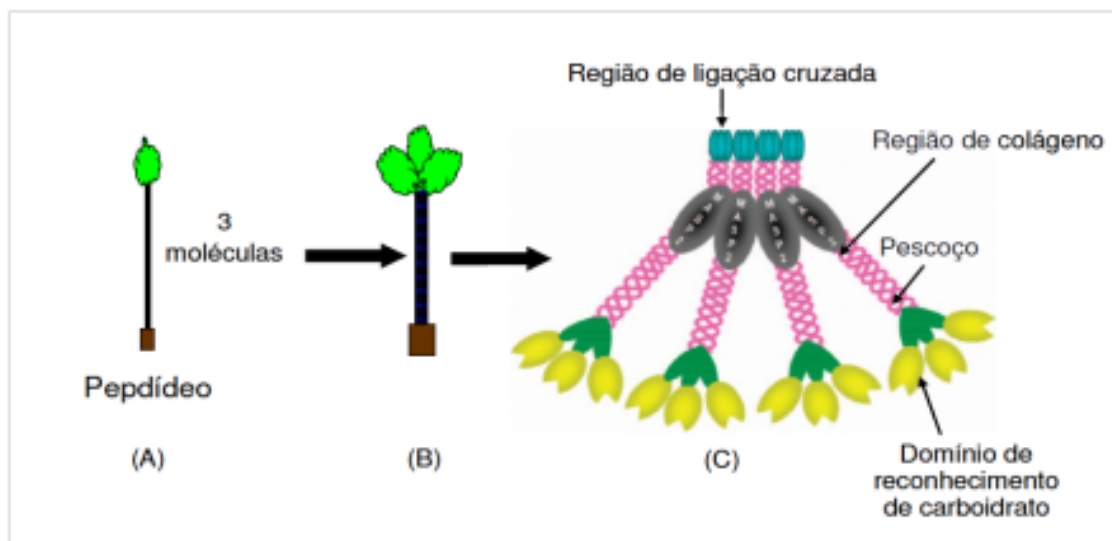


Figura 2.1: Estrutura em forma de tulipa da MBL-A. (a) unidade estrutural básica (peptídeo); (b) homotrímero de peptídeos (estrutura básica); (c) forma da MBL em tulipas composta de várias unidades básicas destacando: o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), a zona de interação com as proteínas MASP e as pontes dissulfetos.

horizontal do grupo hidroxila nas posições 3' e 4' do anel de piranose, na presença de cálcio.

A MBL é capaz de reconhecer carboidratos específicos oriundos de diversos micro-organismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, protozoários, alguns vírus, células apoptóticas, DNA livre e outros parasitas. Ela também é capaz de evitar o reconhecimento do próprio, e é capaz de se ligar em diversos sítios simultaneamente, assegurando um funcionamento eficiente (Fujita, 2002)

2.2 Genética da MBL

O gene que codifica a MBL foi caracterizado em galinha e em alguns mamíferos, como o chimpanzé, boi, camundongo, entre outros animais e o mais estudado até agora é o ser humano. O gene da MBL em cães ainda não foi localizado, contudo, sua versão

predita já está disponível, a qual é similar a lectina ligante de manose (A), gerada a partir de dados que indicam uma similaridade em 7 EST (*expressed sequences tags*) e 32 proteínas, localizadas no cromossomo 4 do cão (número de acesso no GenBank: cromossomo - LOC 479260, proteína - XP 536402.2), sendo homólogo ao rato, camundongo, boi e chimpanzé.

Em 1988, Ezekowitz e colaboradores isolaram pela primeira vez o cDNA e os clones genômicos da MBL humana. Foi dado o nome de mbl2 ao gene que codifica a MBL humana, pois também existe um pseudogene, chamado de mbl1. Ambos estão situados no mesmo cromossomo, próximos um do outro. Em camundongos também foi relatada a existência de duas formas do gene, a mbl-a e mbl-c, mas estes se encontram em cromossomos distintos. Os genes mbl1 e mbl2 foram encontrados no macaco Rhesus, enquanto que em chimpanzés e humanos, a MBL só é representada pelo gene mbl2 (Garred, 2008).

Em humanos, a região codificadora da proteína é constituída por quatro exons e três introns. O exon 1 codifica o peptídeo sinal, o domínio rico em cisteína e sete cópias de Gly-Xaa-Yaa –formação da tripla hélice de estruturas de colágeno- essas cópias são repetidas mais 12 vezes no exon 2. O exon 3 codifica a região do pescoço (“neck”) e o exon 4 o domínio de ligação do carboidrato (CRD) (Dommett et al., 2006) (Figura 2.2).

2.2.1 Fenótipos

O gene MBL2 (que codifica a proteína humana MBL), juntamente com outras colectinas, faz parte de um agrupamento fortemente interligado de genes encontrados no cromossomo 10 (Guo et al., 1998). A deficiência de MBL é herdada de maneira autosômica co-dominante com heterozigotos tendo, cerca de 10% do nível funcional da MBL normal e os homozigotos tendo menos de 1% dos níveis de MBL, o que afeta as concentrações séricas. Mutações pontuais (SNPs) que são três no exon 1 e dois na região promotora do gene MBL levam a uma diminuição dramática das concentrações séricas

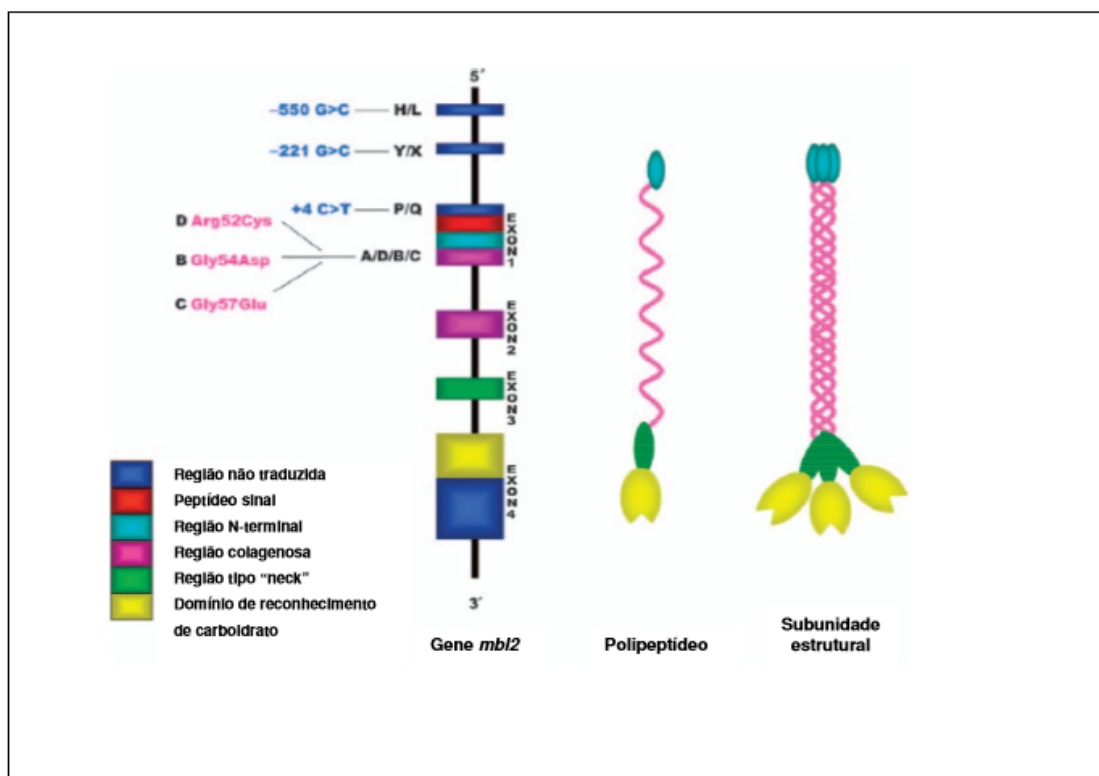


Figura 2.2: Estrutura do gene *mbl2*, e o produto proteico codificado. Diferentes regiões da proteína são codificadas por diferentes exons. As posições de todos os polimorfismos do exon 1 e da região promotora também está mostrada. Adaptado de Dommet et al., 2006

de MBL. A transcrição da MBL é regulada por dois promotores alternativos (chamados 0 e 1) onde o promotor 0 é uma região de início 5'UTR codificada por um exon extra (exon 0). Baixos níveis extra-hepáticos de mRNA de MBL2 foram encontrados predominantemente no intestino delgado, tecido testicular e foram quantitativamente dominados pelos transcritos do promotor 1. Além do mais, estes transcritos variam devido ao uso de sítios aceptores de *splice* alternativo posicionados dentro do exon 1.

Polimorfismos no exon-1

Acredita-se que mutações do exon 1 no produto proteico comprometem a correta oligomerização levando à deficiência funcional. Estas mutações pontuais são comumente conhecidas como os alelos B,C,D e coletivamente denotadas por “ O “ com variante A, indicando esta o tipo selvagem.

Variante B

É uma mutação observada no exon 1, no códon 54, no qual a glicina é substituída por um ácido aspártico (GGC para GAC), ao se estudar a população Euro-asiática, a frequência é de aproximadamente 25%. Esta mutação associa-se níveis baixos de MBL em soro, e o defeito de opsonização nas infecções bacterianas recorrentes.

Variante C

Esta mutação no exon 1 está no códon 57, no qual a glicina é substituída por um ácido glutâmico (GGA para GAA). Ao se estudar população africana Subsaariana, a frequência é de 50 a 60%.

Variante D

Esta mutação no exon 1 está no códon 52, no qual a arginina é substituída por uma cisteína (CGT para TGT), esta cisteína extra, pode causar a formação de ligações dissulfídicas que provoca uma alta formação de oligômeros.

2.2.2 Polimorfismos na região promotora

Uma vez que polimorfismos no exon 1 não explicam variações nos níveis séricos de MBL suficientemente, a variação dos níveis séricos de MBL entre indivíduos revelaram dois polimorfismos (H/L e X/Y) nas posições 550 e 221 respectivamente com relação ao sítio de início de transcrição. Diferentes combinações destes polimorfismos do promotor

resultam em diferentes haplotipos, (H/Y e L/Y e L/X) alto, médio e baixo níveis séricos de MBL respectivamente. Depois, um polimorfismo P/Q no 5'UTR do gene foi também identificado o qual esta associado com baixo nível de MBL.

Polimorfismos no promotor e mutações no exon 1 se agrupam num padrão de desequilíbrio de ligação. O impacto das variações do genótipo de MBL ou concentrações séricas tem sido estudado intensivamente para diferentes doenças humanas. A deficiência de MBL está associada com o aumento da suscetibilidade a infecções com *Neisseria meningitis*, e a severidade da doença arteroesclerótica. Recentes descobertas têm mostrado a correlação entre deficiência de MBL e infecções por *Pseudomonas* em pacientes com fibrose cística, sugerindo que a MBL esta envolvida na limpeza de potencial patógenos que entram no corpo.

2.2.3 Maiores sitios de expressão

MBL é sintetizada no fígado e circula no soro. No entanto a expressão extra-hepática da MBL também é observada. A expressão da MBL funcional já esta amplamente determinada geneticamente. A MBL é considerada como uma proteína de fase aguda, (seus níveis séricos aumentam durante a inflamação). Mas diferentemente de outras proteínas lectínicas, que aumentam drasticamente, a MBL aumenta somente de duas a três vezes.

Capítulo 3

O sistema complemento

3.1 Introdução

O Sistema Complemento (SC) é composto por mais de 30 proteínas plasmáticas e de superfície celular. É um sofisticado sistema de defesa do hospedeiro que pode ser acionado tanto pelo sistema imune inato quanto pelo mecanismo de imunidade mediada por anticorpos. As proteínas do SC são sintetizadas nos hepatócitos e macrófagos, além de outros tecidos. Já as proteínas reguladoras ligadas à membrana celular são sintetizadas nas células sobre as quais são expressas ([Møller-Kristensen et al., 2007](#)). Uma vez que o SC é ativado, uma cascata de reações acontece, resultando na clivagem do terceiro componente do complemento (C3), a qual se denomina Via da Ativação. Existem três vias: a Clássica, que é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo; a Alternativa, ativada por micro-organismos e a das Lectinas, ativada por domínios de reconhecimento de carboidratos. A via das lectinas envolve receptores de reconhecimento-padrão, como a lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas, que são uma família de proteínas estruturalmente semelhantes às colectinas, possuindo um domínio de colágeno ligado a um domínio fibrinogênio-like. A MBL aparece associada a uma família de proteases, conhecidas com MASPs (serino-protease associada à MBL). A associação entre a

MASP-1 e a MASP-2 com as ficolinas (1, 2 e 3) e com a MBL são essenciais para a ativação da cascata do complemento (Iturry-Yamamoto, 2001; Weiss, 2007) que, após acionado, culmina em quatro importantes efeitos biológicos: opsonização de patógenos, ativação dos leucócitos, morte dirigida de patógenos e modulação da inflamação (Fujita, 2002; Turner, 2003). A remoção de células apoptóticas pela MBL e pelo C1q foi comprovada por Ogden e colaboradores em 2001 e, em estudo posterior, foi confirmada a ligação tanto da MBL quanto do C1q em diversas fases da apoptose e também a ligação da MBL com células necróticas (Nauta, 2003). A MBL pode se associar a pelo menos quatro MASPs, a MASP-1, MASP-2, MASP-3 e MASp19, uma forma truncada da MASP-2.

3.2 Função da MBL no sistema complemento

A MBL pode atuar como uma opsonina, se ligando a carboidratos de patógenos e, posteriormente, interagindo com os receptores da MBL em células fagocíticas. Entretanto, ela também pode desencadear a opsonização do complemento, o que resultaria na deposição de C3b/iC3b nos alvos e simularia a fagocitose pela via dos receptores C3, CR1, CR3 e CR4 (Presanis, 2003). O reconhecimento de um corpo estranho ao organismo, tanto pela via clássica como pela das lectinas, leva à ativação da cascata de proteases que clivam os componentes dos complementos C2 e C4, levando à formação do complexo C4b2a que, por sua vez, cliva o C3 em C3a e C3b. O C3b é um componente central no SC graças às suas diversas interações de ligações. Ele se liga covalentemente às superfícies ativadoras do complemento –formando o subproduto iC3b– atuando com opsonina para fagocitose e o C3b também pode se ligar à C3 convertase, formando a C5 convertase. A C5 convertase inicia o complexo de ataque a membrana (MAC). O C3a atua mediando a resposta inflamatória (figura 5) (Presanis et al., 2003). Segundo estudos realizados por Schweinle e colaboradores, em 1993, a região colégono-like da

MBL é necessária para a ativação do sistema complemento (Figura 3.1).

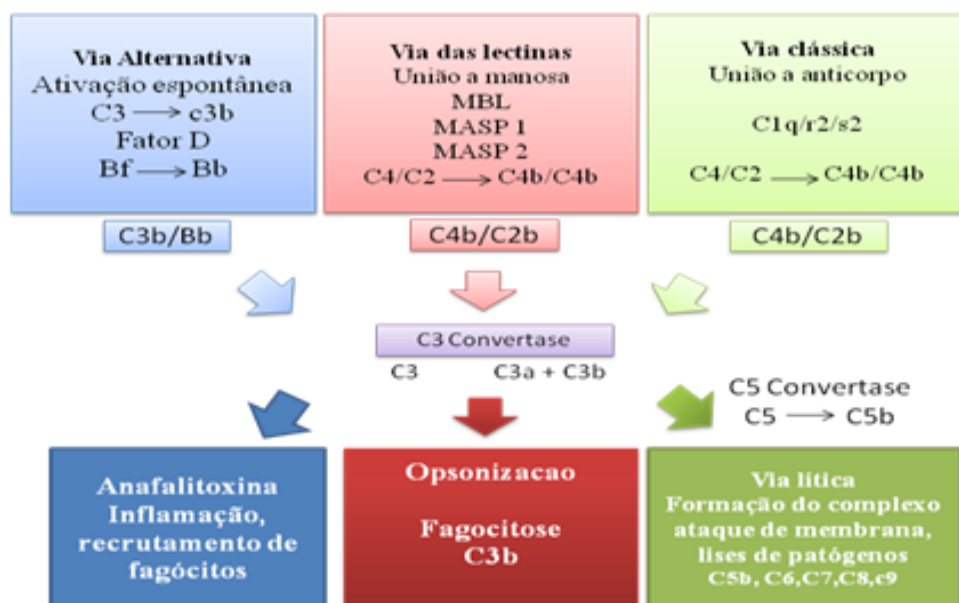


Figura 3.1: O sistema complemento

A molécula de reconhecimento-padrão da via clássica é o $C1q$, a qual é similar à estrutura quaternária da MBL (Presanis et al., 2003). O complexo MBL-MASP, assim como o $C1s$, é capaz de clivar o $C2$ e o $C4$, produzindo a C3 convertase ($C4bC2a$) (Matsushita and Fujita, 1992), que por sua vez pode clivar centenas de moléculas $C3$ em $C3a$ e $C3b$, o que irá culminar na interação do alvo na membrana celular, formando o complexo terminal do complemento (TCC) (Garred, 2009), porém, apenas a MASP-2 demonstrou possuir esta atividade, enquanto que a função da MASP-1 e da MASP-3 permanece em discussão (Weiss et al., 2007).

3.3 Relação da MBL com *Leishmania chagasi*

Uma grande variedade de estudos realizados nas últimas décadas tem demonstrado a importância do sistema complemento na resposta imune da leishmaniose. Na década de 80, foi demonstrado o efeito lítico do soro humano fresco em promastigotas de *L.*

donovani, efeito este não observado sobre a forma amastigota. Os autores também observaram que o aquecimento do soro humano a 56°C por 30 minutos retirava este efeito, ficando assim evidente que o sistema complemento era o responsável por este fenômeno (Pearson and Steigbigel, 1980). Nessa mesma década diferentes estudos determinaram a ativação das vias clássica e/ou alternativa do complemento por algumas espécies de Leishmanias. Mosser demonstrou a ativação da via clássica por formas promastigotas de *L. donovani*, assim como da alternativa por formas promastigotas de *L. major*, *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. braziliensis guyanensis* (Mosser et al., 1986). Em outro estudo esses autores demonstraram que a ativação do complemento e a deposição de fragmentos como C3b na superfície do parasito promove um aumento da sua fagocitose. Na década de 90, Mosser realizou um trabalho com o objetivo de verificar a importância do receptor CR3 na ligação de espécies de Leishmania a macrófagos humanos. O resultado obtido mostrou que as formas promastigotas de Leishmania necessitam da ativação do complemento ou mais especificamente, da deposição de C3bi na sua superfície, para que possam ser fagocitadas pelos macrófagos via receptor CR3. Como a fagocitose é uma importante etapa na instalação de doenças causadas por microorganismos intracelulares como as Leishmanias, estes resultados forneceram evidências de como estes parasitos utilizam o sistema imune do hospedeiro mamífero para instalação da doença. Uma função imunomoduladora da MBL foi demonstrada na Leishmaniose Visceral. Santos *et al.* observaram a associação entre a concentração sérica de MBL em pacientes e a suscetibilidade a leishmaniose visceral causada *L. chagasi*. Esses autores observaram que a fagocitose das formas promastigotas opsonizadas com MBL induz a secreção de alta concentração de fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 por monócitos humanos, demonstrando assim que a MBL pode modular o curso clínico da doença e a função dos monócitos infectados (de Miranda Santos et al., 2001). Em 2007, outro grupo conseguiu relacionar os fenótipos que aumentam as taxas de MBL no soro com a probabilidade de desenvolver leishmaniose

visceral (Alonso et al., 2007). Todos estes estudos demonstram que o sistema complemento e a MBL estão envolvidos diretamente no processo de instalação da leishmaniose e também evidenciam que as diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar comportamentos distintos frente a esse sistema. A MBL e as *Leishmanias* estão intimamente relacionadas, portanto, é possível que o sistema imune dos cães respondam do mesmo modo ao ataque dos protozoários, relacionado com os níveis séricos da MBL no plasma, que em humanos é determinado por mutações no promotor e no exon 1 do gene *mbl2*. Assim, o presente trabalho buscou investigar a existência de interações entre a MBL e a LVC.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Na primeira fase deste trabalho houve a tentativa de extração do RNA para amplificação da MBL-C em cães a qual falhou. Na segunda fase, o DNA foi extraído e o promotor da MBL foi amplificado com sucesso. Abaixo a descrição detalhada dos dois procedimentos.

4.1 Primeira fase: extração do RNA

4.1.1 Material biológico

Para a realização da extração do RNA total foram selecionadas várias amostras de tecido hepático de cães provenientes do Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista FMVZ-UNESP Botucatu, São Paulo, obtidas em colaboração com a Professora, Noheme Souza Rocha. O tecido obtido se conservou em RPMI Glicerol 10

O soro foi obtido em colaboração com o Centro de Zoonoses do Departamento de Saúde Pública da Universidade Estadual Paulista FMVZ-UNESP Botucatu, São Paulo. Amostras de cães doentes por diversas afecções foram cedidas pelo Professor Hélio Langoni e armazenadas para sua subsequente medição dos níveis séricos da proteína MBL em cães.

4.1.2 Isolamento e tratamento do RNA total

O RNA total foi isolado do tecido hepático canino por meio do reagente TRIzol (Gibco) de acordo com instruções do fabricante. Após extração as amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

Esse RNA foi então tratado em microtubos nos quais foram adicionados $1\mu\text{g}$ de RNA total, $1\mu\text{l}$ de tampão de reação 10X, $1\mu\text{l}$ de DNase, completando com H_2O livre de nucleases para um volume final de $10\mu\text{l}$ e em seguida foram colocados a 37°C por 30 minutos. Após este período foi adicionado $1\mu\text{l}$ de EDTA 25 mM, e em seguida foi incubado a 65°C por 10 minutos, e resfriado em gelo.

4.1.3 Transcrição reversa para obtenção de cDNA

À reação descrita acima foi adicionado $1\mu\text{l}$ de oligo dT, $1\mu\text{l}$ de dNTP mix (10 mM), incubando-se a 70°C por 5 minutos. Em seguida, o tubo foi resfriado e a ele adicionado $4\mu\text{l}$ de tampão 5X (5X first-strand buffer), $1\mu\text{l}$ de DTT (0,1 M), $0,5\mu\text{l}$ de RNase OUT (40 units/ μl), $0,5\mu\text{l}$ de SuperScriptTMIII RT e $1\mu\text{l}$ de H_2O livre de nucleases. Posteriormente a reação foi incubada a 42°C por 60 minutos e inativada através de uma incubação a 70°C por 15 minutos. O produto destas reações foi armazenado a -20°C .

4.1.4 Amplificação MBL-C

Os oligonucleotídeos utilizados para os testes de amplificação do gene da MBL-C a partir de cDNA obtido através das amostras de caes foram: 5'-GTGAGGACCATGTC CCTGTT-3' (*sense*) e 5'-CAGGGTCTCCTTTTTGGCC-3' (*antisense*). Estes oligonucleotídeos foram desenhados em uma região conservada através do alinhamento de sequências homologas da MBL (bovino, humano, camundongo-A, camundongo-C; rato da Noruega-A; rato da Noruega-C; suíno; Macaco Rhesus-A; Macaco Rhesus-C; chimpanze-C; babuíno-A, babuíno-C; gorila-A; gorila-C; galinha) descritos por Podolsky e colaboradores ([Podolsky et al., 2006](#)). A PCR foi efetuada utilizando $3\mu\text{l}$ de cDNA,

12,5 μ l de GoTaq Colorless Master Mix (Promega), 1 μ L de cada oligonucleotídeo e 7,5 μ l de H₂O livre de nucleases.

Todas as reações foram realizadas em termociclador DNAEngine (Bio-Rad). Cada reação foi verificada para contaminação pelo uso de controles negativos utilizando todos os reagentes exceto o cDNA. Todas as reações foram realizadas de acordo com os seguintes ciclos de amplificação: 25 ciclos de 98°C durante 15 segundos, 55°C durante 1 minutos, e 72°C durante 1 minuto.

4.2 Segunda fase: extração do DNA

4.2.1 Material biológico

Para este estudo, utilizamos 100 amostras biológicas (medula óssea), de cães provenientes de Teresina – PI, obtidas em colaboração com a Prof. a Dra Maria do Socorro Pires e Cruz do departamento de Morfofisiologia Veterinária (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

4.2.2 Extração do DNA

O DNA das amostras biológicas foi isolado utilizando Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit (GE- Healthcare). Após a extração o DNA foi armazenado em freezer a -20 até o momento do uso.

4.2.3 Condições de Amplificação

Para a amplificação do DNA da região promotora do gene da MBL canina, dois pares de oligonucleotídeos (ONTs) específicos foram delineados. O primeiro corresponde a sequência descrita na Tabela 4.1, a qual amplificou perfeitamente nas amostras usadas em nosso estudo.

Tabela 4.1: Sequencias de ONTs utilizadas para obtenção de DNA da MBL-C.

Oligonucleotídeo	<i>Sense (5'-3')/Antisense (5'-3')</i>	Amplicon (pb) ^a	T _A (°C) ^b
MBLproF	AGATGCAGTGGTCAGGGAAC	996 pb	62
MBLproR	AACATGGTCCTGAACCTTCG		

^aPares de bases (pb), ^bTemperatura de anelamento (T_A).

No entanto, o segundo par de oligonucleotídeos (ONTs) descritos na Tabela 4.2 não amplificou.

Tabela 4.2: Sequencias de ONTs utilizadas para obtenção de DNA da MBL-C que não amplificou.

Oligonucleotídeo	<i>Sense (5'-3')/Antisense (5'-3')</i>	Amplicon (pb) ^a	T _A (°C) ^b
MBLproR1	ATCATTGTGTCCCCTCTTGC	920 pb	62
MBLproF1	GGGATTAGAGGCCAGAGAGG		

^aPares de bases (pb), ^bTemperatura de anelamento (T_A).

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 μ l, contendo 3 μ l de DNA molde, 12,5 μ l de Gotaq® Colorless Master Mix (master mix 2X, Taq DNA polimerase, tampão (pH 8,5), 400 μ M dNTPs e 3mM MgCl₂), 1 μ l de cada oligonucleotídeo à 10 pmol e 7,5 μ l de água livre de nucleases. Todas as reações foram realizadas em termociclador DNAEngine (Bio-Rad). Cada reação foi checada para contaminação pelo uso de controles negativos utilizando todos os reagentes exceto o DNA, bem como um controle de amplificação (controle positivo) utilizando todos os reagentes mais uma amostra de DNA extraída de um cão sabidamente positivo, a qual foi utilizado em estudos anteriores em nosso laboratório. A temperatura de anelamento foi determinada por gradiente de temperatura em termociclador TGradiente (Biometria), seguindo os

seguintes ciclos de amplificação: 1 ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55-65°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Posteriormente as amostras foram testadas para a presença de produtos amplificados utilizando 8 μ l do de cada produto de PCR os quais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ 0,5 μ g/ml segundo recomendação do fabricante (Biotium). Os fragmentos amplificados foram comparados com DNA Ladder 1Kb (Ludwig Biotec), utilizado como padrão e visualizados em transluminador UV. O restante dos produtos de PCR foi utilizado para o sequenciamento.

4.2.4 Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos de PCR das amostras amplificadas foram purificados por reação enzimática adicionando-se 2 μ l da enzima ExoStar (GE Healthcare) à 5 μ l do produto de PCR, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo a seguir submetidos a quantificação e ao sequenciamento.

4.2.5 Quantificação dos produtos de PCR purificados

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) contendo GelRed™ (Biotium). Os fragmentos purificados foram comparados com um marcador de massa Low Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies) e visualizados em um transluminador UVDI (Major Science). O restante dos produtos foi utilizado para o sequenciamento.

4.2.6 Sequenciamento

As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador capilar “3500 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), realizada pelo Departamento Micro e Imunobiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu seguindo as seguintes condições:

para cada reação de sequenciamento foi utilizando 1,9 μ l de 5 x “save Money” (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 0,5 μ l “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 pmol do oligonucleotídeo sense ou antisense, 10 ng/ μ l do produto de PCR purificado e H₂O para complementar o volume final de 10 μ l. As reações foram realizadas em temperatura programadas para: 25 ciclos de 95°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min, com rampa de 1°C/s, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foi realizada uma única reação com o oligonucleotídeos sense e antisense.

4.2.7 Análise dos dados – Alinhamento das sequências

Os electroferogramas das sequências sense e antisense, gerados automaticamente, foram analisadas utilizando o software MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) para a construção das sequências consenso de cada amostra. Após esta etapa as sequências foram alinhadas utilizando o programas CLUSTALW 2.1 (Larkin et al., 2007). As sequências foram então, comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Capítulo 5

Resultados

5.1 Caracterização molecular

As reações testadas para a padronização da PCR que apresentaram maior eficiência foram as realizadas com anelamento a 62 ° C (Figura 5.1), sendo esta utilizada para todas as amplificações deste estudo, obtendo-se amplificação de 54 amostras das 100 amostras testadas. Entretanto, após o sequenciamento somente 55 foram viáveis para as análises. Os 996 pb da sequências do gene da MBL foram alinhadas e um fragmento de 794 pb foi utilizado para as análises (Figura 5.2).

5.2 Alinhamento da sequência consenso e a MBL canina padrão

Para avaliar a diferenças entre as sequências do promotor do gene MBL dos cães utilizados neste estudo, buscou-se a sequência padrão para o *Canis lupus familiaris*. Averiguou-se que a proteína lectina ligante de manosa ainda não foi caracterizada para essa espécie. No GenBank somente foi encontrada a sequência de RNAm predita (Figura 5.3).

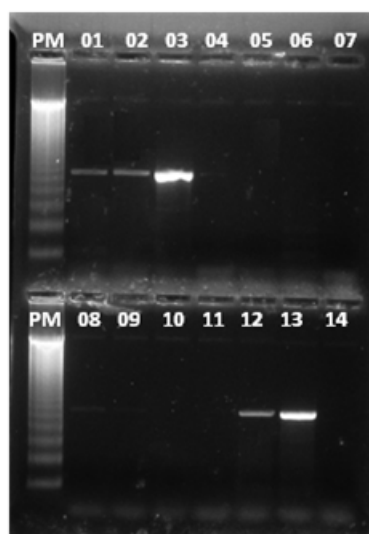


Figura 5.1: Gel mostrando o peso molecular (PM), 01 - 12 amostras cães do estudo, 13 controle positivo e 14 controle negativo.

```

1   CTGGGCCCTGTTGGGCAGCAGACCTAGCAGGGGCCATCATGACTCTTGGCTTGACATCACTCCCGAACTACTGGGGACGCGGACACATGAAAAGTGCAGA
101 GGTGCTTTAGGGATGCGAAAACAGAGGGACTCCAACAGAGCCGCTGACGCAGGAGAGACAGGCCAGGGCCCCGTGCTCCCCCACCACCCACCCCCCGGC
201 TTGGCGATCGCAGCTGGCCCTCCCTGGGGCCCTGACCGCCTGTGAGAGCTGTGGCCACGGCTCCTCCTTCTTGAATCCCTTCCGAGGTCCAGGGTGCC
301 TCAGTTTCCCTCTTCTGCTTCCTACGGACCCCTAAAGTTAGACTGAACCTCTAGCAGGTAGCCCCGCGGCCCAAGACTCATTTCATGGCCGGCCTGGGT
401 TATGGCATCCATTCTCTCATTTCACCTAAAAAGCCCTTATTCCAGGCTCCATCTGCCCTCAGGATCAGCCTCAGCTGTTTCCAGGCAGCTTGTCATCA
501 TCTTGTAGGAAGTCTCTACTGTGTGACAGGCCCTTGCTGGGGGTGGGAGTGGGGGTGGGAGTGGGGCTCAGGACCCGGAGTGCTCCCGAGGGCACTTGAT
601 CCTGGCTGGATGAGACGGATTCTCCTTCCCTTGGCTTGAGATTTTCTGCGGAGAGGTCATTTTGGCAGCCAGCACCCGGGCTCCAGAAATTTCTGTTC
701 ACGCTGGACCTGTCCAGCTGTCTGCTCTTGTTCCTTCTCCTGGCAGGATCCTCTGCATGCTGCCAGATGTCTCCCTGGCTTTCGCGTCCCATCC

```

Figura 5.2: Alinhamento das sequências. Somente dois SNPs foram encontrados. Nesta figura é mostrado o polimorfismo na posição 779 da sequência 1.

5.3 Alinhamento entre as sequências do promotor da MBL nos cães infectados

Do alinhamento entre as 54 sequências de cães infectados, foram encontrados dois SNPs: um do tipo C/T na posição 779 da sequência 1 (Figura 5.4) e outro do tipo C/T também, na posição 481 da sequência 11 (Figura 5.5).

A partir desses resultados, pode-se concluir que a sequência dos promotores de cães com a *Leishmania* visceral são bastante conservadas, isto é, em 96 % dos casos elas são idênticas.

NCBI

Resources

How To

Nucleotide

Nucleotide

Limits

Advanced

Display Settings:

GenBank

Send:

PREDICTED: Canis lupus familiaris mannose-binding protein A-like (LOC479260), transcript variant X2, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_536402.4

[FASTA](#)

[Graphics](#)

Go to:

LOCUS

XM_536402

927 bp

mRNA

linear

MAM 24-SEP-2013

DEFINITION

PREDICTED: Canis lupus familiaris mannose-binding protein A-like

Figura 5.3: Resultado da busca pela sequência de DNA do promotor da proteína lectina ligante de manose.



Figura 5.4: Polimorfismo C/T situado na sequência 1, na posicao 779 mostrado pelo programa Clustalw



Figura 5.5: Polimorfismo C/T situado sequência 11, na posição 481 mostrado pelo programa Clustalw.

Capítulo 6

Discussão

Informações de mbl em outros animais nos levaram a pesquisar a caracterização desta proteína em cães. Baseados na informação descrita por Podolky 2006, tentamos identificar a função desta proteína no cão, obtendo resultados insatisfatórios para nosso estudo. Oligonucleotídeos da MBL equina foram utilizados como base para o desenho de nossos ONTs, já que apresentavam uma região para essa proteína bastante conservada, homologa entre as várias espécies de animais como também para a mbl humana.

Infelizmente não foi possível sua identificação. Sem resultados satisfatórios nesta primeira etapa do projeto, foi utilizado o gene predito para MBL em cães depositado no GenBank para a amplificação da região promotora em 100 amostras de cães com *Leishmaniose* visceral provenientes de Piauí (região endêmica para esta doença).

O estudo da região promotora, justifica-se a partir dos trabalhos de Alves e colaboradores (Alves, 2010), que em 2010 não encontraram polimorfismos nas regiões do exon1 e exon 2 em 96 amostras analisadas de cães infectados com *Leishmaniose* visceral. Só no fragmento do intron1, oito amostras apresentaram heterozigose.

Diversos estudos de associação a doenças buscam definir o real papel da lectina ligante de manose (MBL) no controle principal de infecções bacterianas, virais e fúngicas, porém a importância da MBL na resistência do hospedeiro aos protozoários permanece

pouco caracterizada.

No Brasil, um estudo populacional caso-controle feito em humanos, que buscou relacionar a presença de mutações específicas no promotor e no exon 1 do gene que codifica a MBL humana com a resistência à infecção por *Leishmania chagasi* deram suporte à idéia de que níveis baixos desta proteína sérica podiam conferir vantagens relativas aos seus portadores. Altos níveis de MBL foram significativamente mais frequentes no grupo de pacientes com doença ativa do que no grupo controle. Nesse caso, indivíduos com alelos variantes do gene *mbl2* estariam pelo menos, parcialmente protegidos de uma infecção pelo patógeno intracelular *Leishmania chagasi* (Alonso et al., 2007). Na tentativa de dar continuidade a nossos estudos na procura de polimorfismos em cães, como já dito anteriormente, desenhamos dois pares de oligonucleotídeos da região promotora para o gene predito *mbl A* canina. Um dos pares amplificou sem problemas a região esperada (Tabela 1). Com o outro par de ONTs, não foi possível a amplificação.

Assim o presente trabalho visou à identificação de polimorfismos no gene que codifica a MBL canina em amostras de cães com *Leishmaniose* visceral, provenientes de Teresina - região endêmica para essa doença - no intuito de correlacionar possíveis polimorfismos na região promotora do gene MBL com a susceptibilidade à infecção. Isto poderia representar uma importante ferramenta no estudo deste reservatório de alto significado epidemiológico para a *Leishmaniose* visceral. Não foi possível, no entanto a realização do estudo do gene da *mbl2* em cães sadios dado o tempo limitado de um projeto de mestrado. A dificuldade da identificação do gene *mbl2* em cães em bancos de dados de sequências pode estar acontecendo por dois motivos: a) em cães, o gene *mbl2* perdeu sua função e não é mais expresso, tendo se tornado um pseudo-gene ou b) o gene *mbl2* ainda não foi caracterizado em cães. Independentemente da explicação para o fato de não termos encontrado o gene *mbl2* em cães, parece que nesta espécie a evolução destes dois genes foi diferente da encontrada em suínos, onde (os dois genes expressos, sendo que *mbl1* apresenta variantes genotípicos) e em humanos (*mbl1* se tornou um

pseudo-gene).

Uma possível causa para as frequências relativamente altas dos alelos variantes da proteína em humanos se baseia no fato de que alelos selvagens do gene *mbl2*, por conferirem altos níveis de proteína circulante, contribuem para a opsonização eficiente de patógenos intracelulares, o que potencialmente intensifica a disseminação hematogênica e a fagocitose desses patógenos, aumentando sua virulência. Por isso, indivíduos com alelos variantes para a MBL apresentam níveis séricos baixos da proteína, o que confere uma vantagem relativa a esses indivíduos no que diz respeito à susceptibilidade a doenças causadas por tais parasitas intracelulares ([Garred, 2008](#)).

Em nossos estudos foram encontrados dois polimorfismos em duas amostras nas sequências 11 e 1, nas posições 481 e 779 respectivamente. Por isso, polimorfismos no gene da MBL provavelmente são mantidos por heterose (vantagem para indivíduos heterozigotos pela sua ação protetora) em analogia ao exemplo clássico do alelo da hemoglobina HbS que resulta na anemia falciforme na África Sub-sahariana ([Garred et al., 2006](#)).

Por isso, estudos com genótipos da MBL podem ser úteis para estimar o risco de desenvolvimento da LVC em áreas de alta transmissão, e uma vez que o paciente apresente a doença, determinar o risco de desenvolver outras complicações clínicas. É assim de suma importância a caracterização da proteína na espécie *canis lupus familiaris*, permitindo também o aprofundamento na pesquisa de outras afecções nesta espécie.

Contudo, relações de níveis séricos e sua relação com a predisposição do parasita causar as formas graves da doença em humanos, neste estudo, não foram avaliadas. Com base em dados obtidos por outros pesquisadores, futuros estudos para a caracterização da MBL se mostram necessários em cães. Uma vez que se apresenta uma clara correlação entre as mutações encontradas na região promotora e no exon 1 da MBL humana seria interessante comparar a região promotora da MBL humana com os achados das mutações do promotor da MBL em cães. Outro ponto interessante seria a avaliação

dos níveis séricos dessa proteína e seu aporte na clínica e no prognóstico da LVC, assim como sua interação com outras doenças em cães.

Referências Bibliográficas

- Alonso, D. P., Ferreira, A. F. B., Ribolla, P. E. M., de Miranda Santos, I. K., e Cruz, M. d. S. P., de Carvalho, F. A., Abatepaulo, A. R. R., Costa, D. L., Werneck, G. L., Farias, T. J., et al. (2007). Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *Journal of Infectious Diseases*, 195(8):1212–1217.
- Alves, C. (2010). Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. *Dissertacao de mestrado*.
- Ashford, D. A., David, J. R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., Eulalio, M. d. C., Sampaio, D. P., Badaro, R., et al. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in jacobina, bahia, brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(1):53–57.
- Bogdan, C., Schönián, G., Bañuls, A.-L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rölinghoff, M., and Mertens, R. (2001). Visceral leishmaniasis in a german child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical infectious diseases*, 32(2):302–306.
- Casanova, J.-L. and Abel, L. (2004). Human mannose-binding lectin in immunity friend, foe, or both? *The Journal of experimental medicine*, 199(10):1295–1299.
- Castellani, A. and Chambers, A. J. (1919). *Manual of tropical medicine*. William Wood.

- Clarke, J. J. (1882). Kala azar, the black disease. *Appendix A*, pages 36–37.
- Corredor, A., Gallego, J. F., Tesh, R. B., Morales, A., De Carrasquilla, C. F., Young, D. G., Kreutzer, R. D., Boshell, J., Palau, M. T., and Caceres, E. (1989). Epidemiology of visceral leishmaniasis in colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 40(5):480.
- de Miranda Santos, I. K., Costa, C. H., Krieger, H., Feitosa, M. F., Zurakowski, D., Fardin, B., Gomes, R. B., Weiner, D. L., Harn, D. A., Ezekowitz, R. A. B., et al. (2001). Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection and immunity*, 69(8):5212–5215.
- Dommett, R., Klein, N., and Turner, M. (2006). Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue antigens*, 68(3):193–209.
- Donovan, C. (1903). The etiology of one of the hetero geneous fevers of india. *British Medical Journal*, 2(2239):1401.
- Fraser, I. P., Koziel, H., and Ezekowitz, R. A. B. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. In *Seminars in immunology*, volume 10, pages 363–372. Elsevier.
- Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(5):346–353.
- Garred, P. (2008). Mannose-binding lectin genetics: from a to z. *Biochemical Society Transactions*, 36(6):1461.
- Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R., and Madsen, H. (2006). Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes and immunity*, 7(2):85–94.

- Grimaldi Jr, G., Tesh, R. B., and McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(6):687–725.
- Guo, N., Mogues, T., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Sastry, K. N. (1998). The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-a gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. *Mammalian genome*, 9(3):246–249.
- Kawasaki, N., Kawasaki, T., and YAMASHINA, I. (1983). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *Journal of biochemistry*, 94(3):937–947.
- Killick-Kendrick, R. (1989). The life-cycle of leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 65:37–42.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Mauricio, I., et al. (2008). Differentiation and gene flow among european populations of leishmania infantum mon-1. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(7):e261.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal w and clustal x version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948.
- Laveran, C. L. A. (1917). *Leishmanioses: kala-azar, bouton d'Orient, leishmaniose américaine*. Masson.
- Longstaffe, J., Jefferies, A., Kelly, D., Bedford, P., Herrtage, M., and Darke, P. (1983). Leishmaniasis in imported dogs in the united kingdom; a potential human health hazard. *Journal of Small Animal Practice*, 24(1):23–30.

- Marco, J. D., Barroso, P. A., Calvopiña, M., Kumazawa, H., Furuya, M., Korenaga, M., Cajal, S. P., Mora, M. C., Rea, M. M., Borda, C. E., et al. (2005). Species assignment of leishmania from human and canine american tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north argentina. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(5):606–611.
- Matsushita, M. and Fujita, T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel c1s-like serine protease. *The Journal of experimental medicine*, 176(6):1497–1502.
- Medzhitov, R., Janeway, C., et al. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews*, 173(1):89–97.
- Miller, M., Seals, J., Kaye, R., and Levitsky, L. (1968). A familial, plasma-associated defect of phagocytosis: a new cause of recurrent bacterial infections. *The Lancet*, 292(7559):60–63.
- Møller-Kristensen, M., Thiel, S., Sjöholm, A., Matsushita, M., and Jensenius, J. C. (2007). Cooperation between masp-1 and masp-2 in the generation of c3 convertase through the mbl pathway. *International immunology*, 19(2):141–149.
- Mosser, D. M., Burke, S. K., Coutavas, E. E., Wedgwood, J. F., and Edelson, P. J. (1986). Leishmania species: Mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Experimental parasitology*, 62(3):394–404.
- Pearson, R. D. and Steigbigel, R. (1980). Mechanism of lethal effect of human serum upon leishmania donovani. *The Journal of Immunology*, 125(5):2195–2201.
- Pocai, E. A., Frozza, L., Headley, S. A., and Graça, D. L. (1998). Leishmaniose visceral (calazar). cinco casos em cães de santa maria, rio grande do sul, brasil. *Ciência Rural*, 28(3).

- Podolsky, M. J., Lasker, A., Flaminio, M., Gowda, L. D., Ezekowitz, R. A. B., and Takahashi, K. (2006). Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 343(3):928–936.
- Pozio, E., Gradoni, L., Bettini, S., and Gramiccia, M. (1981). Leishmaniasis in tuscany (italy): Vi. canine leishmaniasis in the focus of monte argentario (grosseto). *Acta tropica*, 38(4):383.
- Presanis, J., Kojima, M., and Sim, R. (2003). Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (mbl). *Biochemical Society Transactions*, 31(4):748–752.
- Schwaeble, W. J., Lynch, N. J., Clark, J. E., Marber, M., Samani, N. J., Ali, Y. M., Dudler, T., Parent, B., Lhotta, K., Wallis, R., et al. (2011). Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18):7523–7528.
- Summerfield, J. A., Sumiya, M., Levin, M., and Turner, M. W. (1997). Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *Bmj*, 314(7089):1229.
- Thiel, S., Bjerke, T., Hansen, D., Poulsen, L., Schiøtz, P., and Jensenius, J. (1995). Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system. *Pediatric Allergy and Immunology*, 6(1):20–23.
- Turner, M. W. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular immunology*, 40(7):423–429.
- van Kooyk, Y. and Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 9(6):593–601.

- Weiss, G., Madsen, H. O., and Garred, P. (2007). A novel mannose-binding lectin-associated serine protease 1/3 gene variant. *Scand J Immunol*, 65(5):430–434.
- Yaghoobi-Ershadi, M., Hanafi-Bojd, A., Akhavan, A., Zahrai-Ramazani, A., and Mohebali, M. (2001). Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniosis due to leishmania major in ardestan town, central iran. *Acta tropica*, 79(2):115–121.