

CLÁUDIA HELENA ZEN

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GÊNICO DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE
NA SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA E PROGRESSÃO DA SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de mestre, pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor
de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara de Messias-Reason

**CURITIBA
2005**

Zen, Cláudia Helena

Influência do polimorfismo gênico da lectina ligante de manose na suscetibilidade à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida / Cláudia Helena Zen. Curitiba, 2005.

xiv, 107 f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara de Messias-Reason

Dissertação (Mestrado) - Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Lectina ligante de manose. 2. Vírus da imunodeficiência humana.
3. Síndrome de imunodeficiência adquirida. I. Título. II. Messias-Reason, Iara.



PARECER

Aos dezesseis dias do mês de junho do ano de dois mil e cinco, a banca examinadora, constituída pelos Professores: Dra. Lílian Pereira Ferrari, Dra. Iara José de Messias Reason e Dr. Sérgio Ossamu Ioshii, exarou o presente parecer sobre a Dissertação elaborada por Cláudia Helena Zen, do **Programa de Pós-Graduação em Medicina – Mestrado** da Universidade Federal do Paraná, intitulada: **“INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GÊNICO DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE NA SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E PROGRESSÃO DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA”**.

A Banca Examinadora considerou que **Cláudia Helena Zen** apresentou trabalho adequado para **Dissertação de Mestrado** e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "10,0", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de *Mestre em Medicina/Ciências da Saúde* e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 16 de junho de 2.005.


Prof. Dra. Lílian Pereira Ferrari


Prof. Dra. Iara José de Messias Reason


Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

DEDICATÓRIA

***AOS MEUS FILHOS, Cássio e Lucas
Pela imensa alegria de ser mãe
E pelo sentido que trouxeram à minha vida.***

***AO MEU ESPOSO, Eduardo
Pelo carinho e apoio em todos os momentos
E pelos sonhos compartilhados.***

***AOS MEUS PAIS, Max e Lilian
Pelo exemplo
E oportunidades que tive na vida.***

***“Eu te agradeço, Senhor, de todo o meu coração;
Quando te chamei, tu me ouvistes,
E aumentastes a força em minha alma.”***

Salmos 138, v.1,3

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho o meu mais sincero agradecimento, em especial:

À minha querida família: meus pais, esposo e filhos, meu irmão Paulo e a Ana Christina, sempre presentes com seu carinho e palavras de incentivo;

À Prof.^a Dr.^a Iara de Messias-Reason pela orientação, conhecimento, estímulo, apoio e palavras de fé com que norteou todos os passos deste trabalho, meu sincero respeito e admiração;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. José Gastão de Carvalho, por ter me aceito como aluna;

À direção do LACEN, em especial a Célia Fagundes da Cruz, diretora da Divisão de Biologia Médica, que através do seu incentivo, amizade e confiança possibilitou a realização do trabalho prático;

Às minhas amigas do Setor de Biologia Molecular do LACEN, Déborah Buba, Helena Misugi, Ieda Carvalho, Irina Riediger, Sandrely Rocha e Me. Sueli Nakatani, pelas palavras de estímulo, amizade e apoio;

Aos colegas do grupo de estudos do HC, Prof.^a Dr.^a Iara, Prof.^a Dr.^a Shirley, Me. Renato, Me. Altair, Luciana, Elisandra, João, pelos momentos vividos juntos e pelo conhecimento compartilhado;

Aos colegas da pós-graduação, em especial a Me. Maria Lúcia Pedroso e Sonia Farah, pelas palavras de incentivo e amizade;

À Dr.^a Angélica Boldt, Dr.^a Marion Burger e Dr.^a Lilian Pereira Ferrari, pela colaboração com os protocolos de pesquisa;

Aos colegas do Setor de Imunologia do LACEN, Ana Maria Bortolotto, Neide Amaral, Oscar Pessoa e Soraia Gilber, pela colaboração na triagem das amostras;

À Equipe da Coordenação Estadual de DST/AIDS, em especial a Wilza Zenere, pela colaboração na coleta de dados e fichas de investigação dos pacientes;

Aos médicos do Hospital Oswaldo Cruz, em especial ao diretor Dr. Fernando Demário e a Dr.^a Rosana Camargo, pelas orientações recebidas e pelo encaminhamento dos pacientes;

Aos funcionários do Hospital Oswaldo Cruz, em especial ao Nélio e ao Natanael, pela colaboração no levantamento de dados junto aos prontuários médicos dos pacientes, e à enfermeira Clóris e ao psicólogo Wilson, pela colaboração no contato com os pacientes;

À Me. Siumara Túlio, do Hemobanco, pelas amostras do grupo controle deste trabalho;

À Ângela da Matta Silveira Martins pelas análises estatísticas;

A todos os pacientes que enfrentam diariamente a batalha contra a AIDS e que entenderam a importância deste estudo e consentiram em participar dele;

***“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava apenas começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.***

***Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro.”***

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA.....	6
3.1.1 Epidemiologia.....	6
3.1.2 Formas de transmissão.....	7
3.1.3 Características moleculares e biológicas do HIV.....	8
3.1.4 Estrutura e genes do HIV.....	9
3.1.5 Ciclo da infecção pelo HIV.....	9
3.1.6 Imunologia da infecção pelo HIV	14
3.1.7 Características clínicas da infecção pelo HIV.....	16
3.2 O SISTEMA COMPLEMENTO.....	19
3.3 A LECTINA LIGANTE DE MANOSE.....	23
3.3.1 Histórico.....	24
3.3.2 Estrutura molecular.....	24
3.3.3 Função biológica.....	27
3.3.4 Genética e deficiência.....	30
3.4 A MBL E O VÍRUS HIV.....	37
3.4.1 Interação entre a MBL e o HIV.....	38
3.4.2 Ativação do complemento, opsonização e fagocitose do HIV e MBL.....	39
3.4.3 Concentração sérica e genótipos da MBL na infecção pelo HIV e AIDS.....	40

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 PACIENTES.....	42
4.1.1 Diagnóstico de AIDS.....	43
4.1.2 Classificação da infecção pelo HIV.....	45
4.2 METODOLOGIA.....	46
4.2.1 Amostras de sangue.....	46
4.2.2 Contagem de linfócitos T CD4 ⁺	46
4.2.3 Extração do DNA.....	46
4.2.4 Genotipagem da MBL.....	47
4.2.5 Amplificação da região exon 1 do gene.....	48
4.2.6 Detecção e análise do produto amplificado por PCR.....	49
4.2.7 PCR-RFLP dos produtos da região exon 1.....	50
4.2.8 Amplificação da região promotora do gene.....	51
4.2.9 Análise dos resultados.....	53
4.2.10 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS.....	56
5.1 DETECÇÃO DOS ALELOS A, B, C E D DA REGIÃO EXON 1.....	56
5.2 DETECÇÃO DOS ALELOS Y/X DA REGIÃO PROMOTORA.....	57
5.3 FREQUÊNCIA DOS ALELOS A, B, C, D, Y E X E DOS HAPLÓTIPOS EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	58
5.4 GENÓTIPOS E EXPRESSÃO PREDITA DE MBL NOS PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	60
5.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE MBL EM RELAÇÃO AOS DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AIDS.....	63
5.5.1 Genótipo de MBL e tempo de doença após diagnóstico da AIDS.....	63
5.5.2 Tempo de sobrevivência dos pacientes e óbito.....	64
5.5.3 Genótipo de MBL e óbito dos pacientes.....	64
5.5.4 Distribuição dos pacientes em categorias clínicas do CDC em relação ao óbito.....	65
5.5.5 Relação entre o genótipo de MBL e as categorias clínicas do CDC.....	66
5.5.6 Expressão predita de MBL em relação às categorias clínicas do CDC.....	67

5.5.7 Doenças indicativas de AIDS nos pacientes pertencentes à categoria C do CDC.....	68
6 DISCUSSÃO.....	71
6.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ALELOS E HAPLÓTIPOS DO GENE MBL.....	71
6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS E A CONCENTRAÇÃO PREDITA DE MBL NOS PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	72
6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE MBL E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AIDS.....	74
6.3.1 Genótipo de MBL e o tempo de doença após diagnóstico da AIDS.....	74
6.3.2 Genótipo de MBL e óbito.....	75
6.3.3 Associação entre os genótipos de MBL e as categorias clínicas do CDC....	76
6.3.4 Doenças indicativas de AIDS.....	78
7 CONCLUSÕES.....	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	90
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	91
ANEXO 3 – FICHA DE INVESTIGAÇÃO DOS PACIENTES.....	92
ANEXO 4 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS EM ESTUDO.....	93
ANEXO 5 – DOENÇAS INDICADORAS DE AIDS – CDC.....	94
ANEXO 6 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	95
ANEXO 7 – PROTOCOLOS PARA REALIZAÇÃO DE PCR.....	97
ANEXO 8 – PLANILHA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SEQÜÊNCIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE AS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DOS LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E O HIV.....	11
FIGURA 2 - CICLO DA INFECÇÃO PELO HIV.....	13
FIGURA 3 - CURSO DA INFECÇÃO DO HIV EM RELAÇÃO À CARGA VIRAL E CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺	18
FIGURA 4 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	20
FIGURA 5 - ATIVAÇÃO DA VIA CLÁSSICA, DA LECTINA E ALTERNATIVA.....	23
FIGURA 6 - MODELO PROPOSTO PARA O SÍTIO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS (CRD) DA MBL.....	26
FIGURA 7 - ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA MBL.....	26
FIGURA 8 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM TRÍMERO DE MBL E SEUS DOMÍNIOS.....	27
FIGURA 9 - MECANISMO DE FAGOCITOSE MEDIADA PELA MBL.....	28
FIGURA 10 - LIGAÇÃO DA MBL A MICROORGANISMOS.....	29
FIGURA 11 - GENE DA MBL E ESTRUTURAS DA PROTEÍNA.....	30
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL COM RELAÇÃO ÀS VARIANTES ESTRUTURAIS.....	34
FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL COM RELAÇÃO AO GENÓTIPO.....	35
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INTERAÇÃO ENTRE A MBL E O HIV.....	38
FIGURA 15 - ESQUEMA MOSTRANDO OS PADRÕES DE ELETROFORESE ESPERADOS PARA OS ALELOS A, B, C e D APÓS PCR-RFLP.....	50
FIGURA 16 - ESQUEMA MOSTRANDO OS PADRÕES DE ELETROFORESE ESPERADOS PARA OS ALELOS Y E X APÓS PCR-SSP.....	52
FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% APÓS PCR GERAL PARA REGIÃO EXON 1 DO GENE MBL.....	56
FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% APÓS PCR-SDM PARA O ALELO D DO GENE MBL.....	57
FIGURA 19 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% APÓS PCR-SSP PARA OS ALELOS Y E X.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL AGRUPADOS PARA EXON 1 EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	62
GRÁFICO 2 - NÚMERO DE ÓBITOS DE PACIENTES COM AIDS ATÉ 31/12/2004 EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC.....	66
GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA PREDITA DE MBL EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MECANISMOS DA IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV).....	14
TABELA 2 - ESCALA DE SINAIS, SINTOMAS OU DOENÇAS – CRITÉRIO RIO DE JANEIRO / CARACAS.....	43
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV - CDC, 1992.....	45
TABELA 4 - SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR.....	48
TABELA 5 - PROGRAMA DE PCR <i>TOUCH-DOWN</i>	49
TABELA 6 - SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR –SSP PARA DETECÇÃO DOS ALELOS Y E X.....	52
TABELA 7 - PROGRAMA DE PCR-SSP.....	52
TABELA 8 - GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS DE MBL.....	54
TABELA 9 - FREQUÊNCIA DOS ALELOS A, B, C, D, Y E X DO GENE MBL EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	59
TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	61
TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL AGRUPADOS PARA OS ALELOS VARIANTES DA REGIÃO EXON 1 EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	61
TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS COMBINADOS RELACIONADOS À EXPRESSÃO PREDITA DE MBL ENTRE PACIENTES COM AIDS E CONTROLES.....	62
TABELA 13 - RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DE MBL E O TEMPO DE DOENÇA APÓS DIAGNÓSTICO DA AIDS	63
TABELA 14 - SOBREVIDA E ÓBITO DOS PACIENTES DESDE O DIAGNÓSTICO DA AIDS	64
TABELA 15 - IDADE DOS PACIENTES COM AIDS EM RELAÇÃO AO ÓBITO ATÉ 31/12/2004.....	65
TABELA 16 - RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DE MBL E O ÓBITO DOS PACIENTES COM AIDS.....	65
TABELA 17 - GENÓTIPOS DE MBL EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC.....	67

TABELA 18 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA PREDITA DE MBL EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC.....	67
TABELA 19 - DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS OBSERVADAS NOS PACIENTES DA CATEGORIA CLÍNICA C DO CDC.....	69
TABELA 20 - DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS NOS PACIENTES DA CATEGORIA C DO CDC EM RELAÇÃO AO ÓBITO.....	70
TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL EM RELAÇÃO ÀS DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
β	Beta
μ l	Microlitro
Å	Angstrom
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CR	Receptor para o complemento
env	Envelope
pol	Polimerase
gag	Grupo antígeno específico
Ca ⁺⁺	Cálcio
RT	Transcriptase reversa
CCR5	<i>CC-Chemokine Receptor 5</i> – Receptor de quimiocinas
CD4 ⁺	Marcador de membrana de linfócitos T auxiliares
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i> – Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i> – Domínio de reconhecimento de carboidrato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FRET	Hibridização com sondas de transferência de energia
gp	Glicoproteína
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOC	Hospital Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
IF	Interferon
LACEN	Laboratório Central do Estado
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i> – Serina proteases associadas à MBL
MBL	<i>Mannose Binding Lectin</i> – Lectina ligante de manose
M	Molar

ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
n.s.	Não significativo
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> – Razão de probabilidade
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-ASO	PCR por hibridização alelo específica
PCR <i>real time</i>	PCR em tempo real
PCR-RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism-PCR</i> – PCR baseada no polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
PCR-SDM	<i>Site-directed mutagenesis-PCR</i> – PCR por mutagênese sítio específica
PCR-SSP	<i>Sequence-specific primer-PCR</i> – PCR com seqüência específica de primers
PCR-SSCP	PCR baseada no polimorfismo conformacional de fita simples
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
LAV	Vírus associado à linfadenopatia
SP	<i>Surfactant protein</i> – Proteína surfactante
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
HTLV	Vírus linfotrópico das células T humanas
T _m	<i>Melting temperature</i> – Temperatura de melting
TNF	Fator de necrose tumoral
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultra-violeta

RESUMO

A lectina ligante de manose (MBL) é uma lectina cálcio dependente que exerce um importante papel no sistema imune inato mediando a ativação da via clássica do complemento e fagocitose. Entretanto, a MBL parece estar envolvida na regulação de outros aspectos da inflamação, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo isto ser benéfico ou prejudicial ao hospedeiro, dependendo das circunstâncias. O gene MBL é polimórfico e suas variantes têm sido associadas com maior suscetibilidade a diferentes doenças infecciosas e auto-imunes. Três substituições de nucleotídeos na região exon 1 do gene MBL causam uma redução de MBL funcional na circulação e as variantes da região promotora têm influência na expressão da proteína, induzindo estado de deficiência. As variantes alélicas estruturais do gene podem romper a formação dos trímeros ou acelerar a degradação da proteína. Estudos *in vitro* demonstraram que a MBL se liga ao HIV através da glicosilação da gp 120. Neste estudo investigaram-se três mutações pontuais na região exon 1, nos códons 54 (variante B), 57 (variante C) e 52 (variante D), e o polimorfismo na região promotora a -221 (variante X) em 119 pacientes com infecção pelo HIV (99 homens, 29 mulheres; idade média 38,4 anos, entre 19-68), e em 123 controles saudáveis emparelhados de acordo com a idade, sexo e grupo étnico dos pacientes. Os genótipos de MBL foram detectados através de métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-SSP, PCR-SDM e PCR-RFLP). Treze pacientes HIV positivos (13/119, 10,9%) foram homozigotos para variantes alélicas (0/0) em comparação com três do grupo controle (3/123, 2,4%, $p=0,007$, $OR=4,91$, $IC=1,26-2,32$). Assim, pacientes portadores do genótipo 0/0 apresentam um risco 4,91 vezes maior de desenvolver a doença. Não houve associação entre os genótipos de MBL e o óbito ou o tempo de doença a partir do diagnóstico de AIDS no período em estudo. Verificou-se diferenças significativas na distribuição dos genótipos de MBL entre pacientes do grupo C e B do CDC. A diferença principal foi representada pelo genótipo A/A com prevalência de 59,4% nos pacientes do grupo C e 40,6% nos pacientes do grupo B. Entre os pacientes que desenvolveram doenças indicativas de AIDS observou-se uma frequência aumentada do genótipo A/A conferindo um risco 2,60 vezes maior para infecções oportunistas ($p=0,019$, $OR=2,60$, $IC=1,15-5,93$). Os resultados obtidos sugerem que a deficiência de MBL, resultante dos genótipos homozigotos variantes 0/0, predispõe à infecção pelo HIV. Por outro lado, nos pacientes com doença avançada, os genótipos homozigotos para o alelo selvagem A/A podem ter um papel pró-inflamatório, induzindo ativação indesejada da via da lectina do complemento, contribuindo para o desenvolvimento de infecções oportunistas por microorganismos intracelulares.

Palavras-chave: Lectina ligante de manose (MBL), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

ABSTRACT

Mannan-binding lectin (MBL) is a calcium-dependent lectin shown to play an important role in innate immunity by activating the classical complement pathway and mediating phagocytosis. MBL seems also to be involved in the inflammatory response inducing cytokine production, which depending on the circumstances, can be beneficial or harmful to the host. The MBL gene is polymorphic and codes for a protein whose variants have been associated with greater susceptibility to different infectious and auto immune diseases. MBL genetic variants modulate the basal serum concentrations of the protein MBL and low circulating levels are associated with numerous diseases. Three single nucleotide substitutions in exon 1 and promoter variants of the MBL gene cause a dominant decrease of functional MBL in the circulation. The structural variants alleles may disrupt the assembly of MBL trimers or accelerate the degradation of the protein inducing a state of deficiency. *In vitro* studies have shown that MBL binds to HIV through the envelope gp120 glycosylation. Variant alleles in exon 1 at codon 54 (variant *B*), 57 (variant *C*), and 52 (variant *D*) and in the promoter region at -221 (variant *X*) were investigated in 119 HIV-infected patients (99 men, 29 women; mean age 38,4, range 19-68 years) and in 123 healthy controls. The controls were matched for age, sex and ethnic origin with the patients. Genotypes of MBL were detected by methods of Polymerase Chain Reaction (PCR-SSP, PCR-SDM and PCR-RFLP). Thirteen (13/119, 10,9%) HIV-infected patients were homozygous for the variant alleles 0/0 (B+C+D) compared with three of the controls (3/123, 2,4%, $p=0,007$, $OR=4,91$, $IC=1,26-2,32$). Thus, patients carriers of 0/0 genotypes present a significantly higher risk of developing the disease. There was a significant difference in the distribution of MBL genotypes according to the CDC group, with a higher frequency of A/A genotype in the patients of the group C compared with the group B (59,4 vs 40,6%). Among patients with AIDS-defining conditions the genotype A/A represented a risk of 2,60 for opportunistic infections ($p=0,019$, $OR=2,60$, $IC=1,15-5,93$). There was no association between MBL genotypes and death or time of AIDS progression during the period of the study. Our findings suggest that homozygous carriers of variant MBL alleles are at increased risk of HIV infection. On the other hand, among HIV-infected patients with advanced clinical disease, homozygous wild type alleles (A/A) may play a pro-inflammatory role causing undesirable complement activation, contributing to opportunistic infections by intracellular microorganisms.

Keywords: Mannan-binding lectin (MBL), Human Immunodeficiency Virus (HIV), Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS).

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) foi descrita pela primeira vez em 1981 e seu agente etiológico, o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), foi identificado dois anos depois. O grau de mortalidade e morbidade causado pelo HIV e o impacto global sobre os recursos da economia e da saúde pública são enormes e continuam avançando (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Diferentes aspectos da infecção pelo HIV e da AIDS têm sido amplamente investigados, entretanto, a diversidade genética do hospedeiro na história natural da doença ainda é pouco conhecida. O polimorfismo no gene que codifica o receptor de quimiocina CCR5 está associado a uma menor suscetibilidade à infecção pelo HIV e progressão mais lenta da AIDS, demonstrando que fatores genéticos do hospedeiro influenciam o curso da doença (ROGER, 1998; RACHID; SCHECHTER, 2003).

A introdução de potentes anti-retrovirais na prática clínica trouxe uma melhora tanto dos parâmetros clínicos como virológicos e imunológicos das pessoas infectadas pelo HIV, apesar de que nem todos os pacientes alcançam uma resposta favorável. A terapia pode levar à resistência a drogas e sérios efeitos colaterais, além de não ser capaz de erradicar o vírus. Devido a esses fatores sugere-se utilizar novas formas de tratamento, entre elas, a imunoterapia em combinação com anti-retrovirais. Para desenvolver este tipo de modalidade terapêutica é preciso entender melhor sobre a imunopatogênese da infecção pelo HIV (HEGGELUND et al., 2003).

A Lectina Ligante de Manose (MBL) é uma proteína da família das colectinas, produzida no fígado durante a fase aguda da resposta à infecção, que se liga a carboidratos na superfície de microorganismos e leva a ativação da via clássica do complemento, independentemente do anticorpo. Além disso, a MBL atua como opsonina, promovendo a interação de uma variedade de microorganismos diretamente com as células fagocíticas, levando à fagocitose e indução da resposta inflamatória (EZEKOWITZ; DAY; HERMAN, 1988).

A estrutura da MBL humana é composta por polímeros de até seis subunidades, cada qual formado por três cadeias polipeptídicas idênticas, que correspondem ao sítio de reconhecimento de carboidratos, e uma parte terminal formada por uma tripla hélice, correspondente ao sítio de ligação com receptores da colectina (TURNER, 1996).

A formação da tripla hélice é prejudicada por mutações nos códons 52, 54 e 57 da região exon1 do gene que designam as variantes *D*, *B* e *C* respectivamente. Essas mutações levam à degradação enzimática e deficiência funcional da MBL, e são fator importante, responsável pelos valores séricos baixos da proteína, e diminuição ou até ausência de ativação da via da lectina do complemento. A concentração sérica da MBL também varia de acordo com o polimorfismo na região promotora do gene (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001).

Mutações no gene que leva a síntese da MBL foram associados com maior suscetibilidade à infecção pelo HIV e menor sobrevivência após o início da AIDS (GARRED et al., 1997). Demonstrou-se que a MBL se liga ao HIV, principalmente devido a glicosilação na glicoproteína 120 (gp120), representando um mecanismo importante para o reconhecimento do HIV pelo sistema imunológico (SAIFUDDIN et al., 2000).

Durante a última década aumentou o interesse no estudo da MBL não apenas devido a sua importância na imunidade inata, como também devido à associação entre o polimorfismo do gene e doenças auto-imunes e infecciosas de diferentes origens como a hepatite B e hepatite C, leishmaniose, pneumonias, meningites e AIDS (JACK; KLEIN; TURNER, 2001).

Neste estudo investigou-se a influência do polimorfismo gênico da MBL na suscetibilidade à infecção pelo HIV e progressão da AIDS, contribuindo para um melhor conhecimento sobre a imunopatogênese da doença e fornecendo subsídios para possíveis terapias de reposição da proteína em pacientes deficientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o polimorfismo gênico das regiões do exon 1 e promotora -221 do gene MBL em pacientes com AIDS e controles saudáveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as frequências dos alelos e haplótipos de MBL entre o grupo de pacientes e controles;
- Verificar se o polimorfismo gênico da MBL está associado com a suscetibilidade à infecção pelo HIV;
- Analisar a influência das concentrações preditas de MBL na infecção pelo HIV e progressão da AIDS;
- Determinar se o polimorfismo gênico da MBL está relacionado com as diferentes categorias clínicas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), com doenças definidoras de AIDS e com óbito dos pacientes no período do estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi descrita em 1981, nos Estados Unidos, quando foram notificados ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) os primeiros casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* e de sarcoma de Kaposi em homossexuais masculinos previamente saudáveis (RACHID; SCHECHTER, 2003).

A AIDS é caracterizada por profunda imunossupressão com diversas características clínicas, incluindo infecções oportunistas, processos malignos, perda de massa muscular e degeneração do sistema nervoso central (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Em 1983, foi identificado o agente etiológico da AIDS, o vírus denominado HIV ou Vírus da Imunodeficiência Humana. O HIV foi descrito em 1984 por MONTAGNIER e colaboradores, como um novo tipo de retrovírus, semelhante aos vírus linfotrópicos humanos HTLV-I e HTLV-II, mas com características morfológicas, biológicas e imunológicas próprias (GALLO; MONTAGNIER, 2003). Foi denominado como HTLV-III pela equipe de pesquisa americana (GALLO et al. 1984) e LAV (vírus associado a linfadenopatia) pelo grupo de pesquisa francês, liderado pelo pesquisador MONTAGNIER. Posteriormente uniformizou-se a nomenclatura internacional denominando-o como HIV (LEVY, et al., 1984). Em 1986 foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2.

3.1.1 Epidemiologia

Inicialmente a prevalência da AIDS parecia estar restrita a homossexuais masculinos e pacientes com hemofilia. Entretanto, as infecções pelo HIV são doenças sexualmente transmissíveis (DST) que não têm preferência por nenhuma orientação sexual. As infecções pelo HIV já existiam há várias décadas na África

Central onde a prevalência entre homens e mulheres era igual (SCHWARTZ; NAIR, 1999).

Em dezembro de 2003, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), havia 40 milhões de pessoas infectadas pelo HIV no mundo. Cinco milhões de novos casos foram notificados apenas em 2003, superando todos os anos anteriores. Atualmente a Ásia, com 60% da população mundial, têm os dados de crescimento mais rápido da epidemia, aumentando de 6,6 milhões de casos em 2001 para 7,4 milhões em 2003. Na África, ao sul do Saara, estima-se que 25 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HIV, 1 milhão a mais do que em 2001. Entre as 3 milhões de mortes devido a AIDS em 2003, 2,2 milhões (75%) ocorreram na África. Os dados de prevalência do HIV na África estão estáveis nos últimos anos, já que o número de mortes está aumentando da mesma forma que o número de novas infecções (UNAIDS; WHO, 2005).

No Brasil, no início dos anos 80, a epidemia afetava principalmente homo/bissexuais masculinos, brancos e de classe média ou alta, habitantes das grandes metrópoles. Na década seguinte, homens heterossexuais, mulheres, crianças e todas as classes sociais foram atingidos. Em 1985, para cada caso novo de AIDS em mulheres ocorriam 30 novos casos em homens, enquanto que em 1997 esta relação atingiu 1:2 (RACHID; SCHECHTER, 2003).

Até 2003 haviam sido notificados 310.301 casos de AIDS no Brasil. O número de novos casos está diminuindo em todas as regiões do país, com queda de 30.206 casos em 1998 para 9.758 em 2003. A taxa de incidência também foi reduzida de 18,7 para 5,5 casos/100.000 habitantes no mesmo período. A região Sul apresenta a maior taxa de incidência com 8,5 casos/100.000 habitantes (BRASIL-MS/PN DST e AIDS/SINAN, 2004).

3.1.2 Formas de transmissão

A transmissão do HIV pode ocorrer através de contato com fluidos corporais contaminados. Os fluidos corporais celulares como sangue, sêmen, secreção vaginal e leite materno são mais efetivos na transmissão do vírus do que os de baixa celularidade como saliva, urina e lágrima. A transmissão ocorre através da mucosa ou da pele lesada durante a relação homossexual ou heterossexual, ou através da

inoculação de sangue contaminado no uso de drogas intravenosas, transfusão sangüínea ou acidente perfuro-cortante (SCHWARTZ ; NAIR, 1999).

No início da epidemia, sangue e hemoderivados eram responsáveis por parcela significativa da transmissão do HIV mas desde 1985, com o desenvolvimento dos testes de triagem em banco de sangue, essa categoria de transmissão vêm diminuindo. A transmissão sangüínea através de seringas compartilhadas por usuários de drogas injetáveis está aumentando, especialmente no sul do país, e representa um problema de difícil controle (RACHID; SCHECHTER, 2003).

A transmissão de mãe para filho é estimada em 15 a 35% dos casos e pode ocorrer durante a gestação, no momento do parto e durante o aleitamento. Múltiplos fatores podem influenciar a transmissão vertical do HIV, tais como: alta carga viral da gestante, baixo número de linfócitos CD4+, ruptura prematura das membranas amnióticas, parto prematuro, recém-nato de baixo peso, co-infecções principalmente devido a doenças sexualmente transmissíveis e trabalho de parto prolongado (GAYLE; HILL, 2001). A OMS estima que 1/3 dos casos de transmissão vertical ocorre devido ao aleitamento materno. Entretanto, para certas populações onde o índice de mortalidade infantil é muito alto, o risco de morte associado à não amamentação pode ser maior do que o risco de adquirir HIV através do leite materno (SCHWARTZ; NAIR, 1999).

3.1.3 Características moleculares e biológicas do HIV

O HIV é um retrovírus com genoma RNA, da família *Retroviridae* e subfamília *Lentivirinae*. Até o momento foram identificados dois tipos do vírus, designados HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 têm homologia de 75% na seqüência de ácidos nucléicos com o SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia), mas apenas 40 a 50% de homologia com o HIV-1. Devido a estas diferenças sugere-se que o HIV-2 pode ser o protótipo viral originalmente transmitido do macaco para o homem (SCHWARTZ; NAIR, 1999).

A infecção pelo HIV-2 geralmente resulta em um período de incubação mais longo e um curso mais lento da doença. A transmissão materno-fetal do HIV-2 é limitada e a infecção pelo HIV-2 parece fornecer uma proteção natural, estimada em

70%, contra infecção pelo HIV-1 em alguns grupos de alto risco. O HIV-2, inicialmente endêmico na África Ocidental, também está se espalhando pelo mundo inteiro (SCHWARTZ; NAIR, 1999).

O HIV-1 é classificado em três grupos: M, O e N. O grupo M do HIV-1 é dividido em 10 subtipos (de A até J). Em relação ao HIV-2 foram descritos 5 subtipos (de A até E) (SCHÜPBACH; GALLO, 2000).

3.1.4 Estrutura e genes do HIV

O HIV-1 tem um diâmetro aproximado de 1,000 Å. O genoma consiste em 2 fitas simples idênticas não complementares, de ácido ribonucléico (RNA), cada uma com aproximadamente 9,2 kb, localizadas dentro de um capsídeo protéico circundado por um envelope lipoprotéico (SCHWARTZ; NAIR, 1999).

O HIV-1 possui três genes principais: *gag*, *env* e *pol*. O gene *gag* (grupo antígeno específico) é o gene que codifica as proteínas estruturais do core, enquanto que o gene *env* (envelope) codifica o precursor da glicoproteína do envelope viral, glicoproteína (gp) 160, que posteriormente é clivada em gp 120 e gp 41. O gene *pol* (polimerase) codifica a síntese de várias enzimas: protease, integrase, ribonuclease, incluindo a transcriptase reversa (RT), envolvidas na integração e na replicação viral. Outros seis genes codificam as proteínas restantes: *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, importantes na replicação viral. O HIV-2 contém esses genes com exceção do *vpu*, e possui outro gene, o *vpx* que está ausente no HIV (ABBAS; LICHTMAN, 2003; SCHWARTZ; NAIR, 1999).

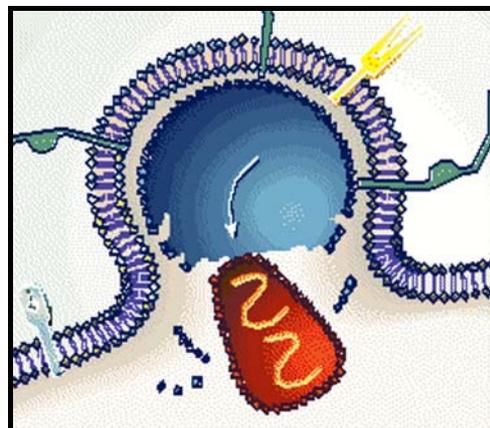
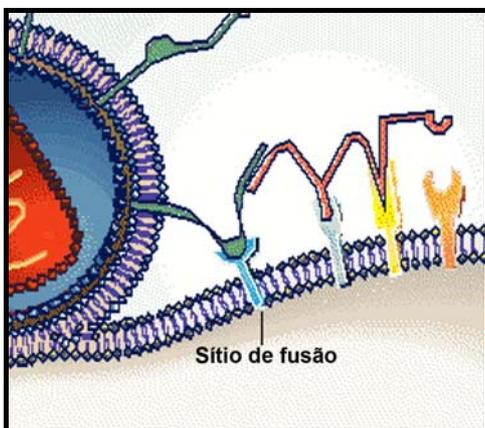
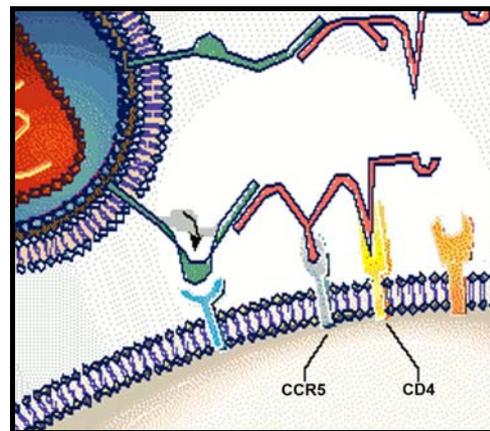
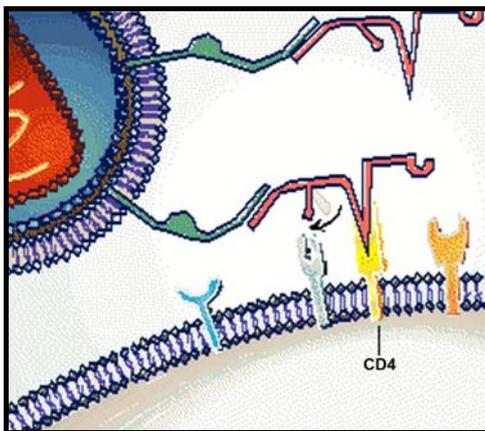
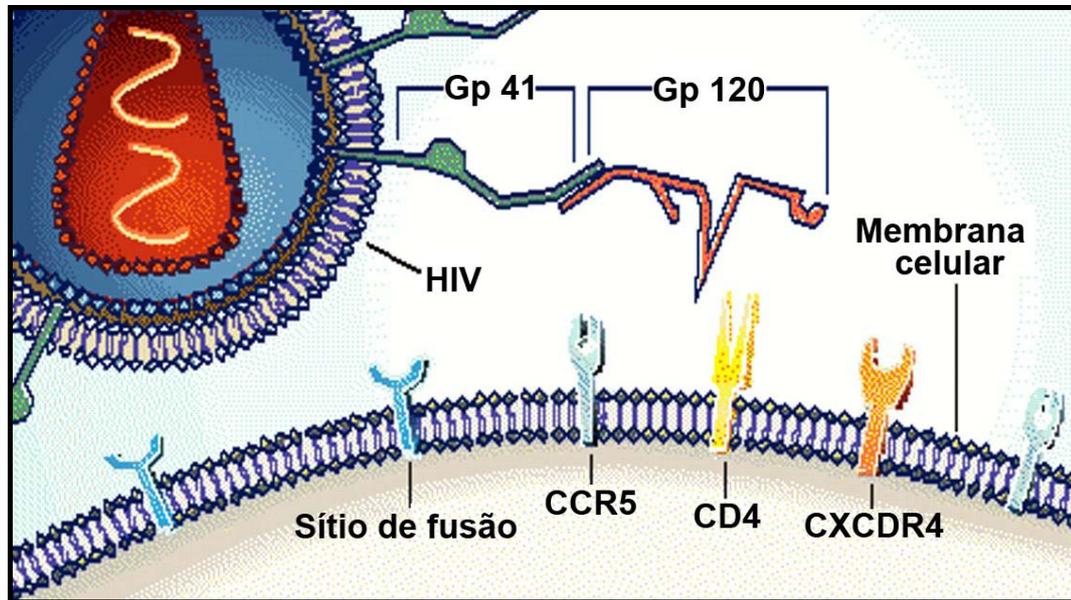
3.1.5 Ciclo da infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV ocorre quando as partículas virais no sangue, no sêmen ou em outros líquidos corporais de um indivíduo infectado ligam-se às células de outro indivíduo (ABBAS; LICHTMAN, 2003), onde as glicoproteínas gp120 e gp41 são essenciais. A primeira fase da infecção pelo HIV é a ligação de alta afinidade da gp 120 ao receptor CD4 da célula hospedeira, levando a uma mudança conformacional e interação do complexo CD4 e gp 120 com os receptores de quimiocinas. As moléculas CD4 são expressas primariamente nos linfócitos T,

macrófagos, células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos (ALKHATIB et al., 1996; DENG et al., 1996; FENG et al., 1996).

Em seguida, a gp 41 se insere na membrana da célula hospedeira, levando a fusão das membranas celular hospedeira e viral (Figura 1). Co-receptores que se ligam a quimiocinas participam desta fase (LEVY et al., 1996). As quimiocinas estão envolvidas no controle da ativação e migração de vários leucócitos aos sítios de infecção. As células de Langerhans ou monócitos/macrófagos expressam o receptor CCR5 de quimiocinas que permite a infecção por cepas com tropismo por monócitos (*M. tropic*). Estas cepas se replicam em monócitos mas não em células de linhagem T ativadas, presentes no início da infecção (FAUCI, 1996). Esta interação é inibida pelos ligantes do CCR5, as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α , receptor MIP-1 β , descritas como fatores de supressão para o HIV (ALKAHATIB et al., 1996). O co-receptor para os linfócitos T CD4⁺ é o CXCR4, que se liga somente a cepas com tropismo para células T (*T.tropic*) que infectam linfócitos T, mas não infectam macrófagos nem monócitos. O receptor CXCR4 possui um ligante natural derivado do fator do estroma (SDF-1). As células T CD4⁺ virgens podem ser infectadas pelas cepas M e T porque possuem co-receptores CCR5 e CXCR4 (FAUCI, 1996).

FIGURA 1 – SEQÜÊNCIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE AS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DOS LINFÓCITOS T CD4⁺ E O HIV



FONTE: LEVY et al., 1996.

Mutações nos genes *ccr5* e *cxcr4* estão associadas à resistência a infecção pelo HIV-1 (HAROUSE et al., 1991; PASTINEN et al., 1998). Indivíduos homozigotos para determinada mutação no gene CCR5, que corresponde a aproximadamente 1% da população caucasiana, são menos suscetíveis à infecção. Já os heterozigotos para esta mesma mutação, aproximadamente 15% das pessoas com ascendência europeia, apresentam progressão mais lenta da AIDS (RACHID; SCHECHTER, 2003).

Pacientes heterozigotos para esta mesma mutação têm uma probabilidade maior de atingirem carga viral indetectável após introdução dos anti-retrovirais em comparação aos pacientes sem a mutação (RACHID; SCHECHTER, 2003).

Algumas células infectadas pelo HIV, como os astrócitos, não expressam moléculas CD4. Neste caso o receptor para a gp 120 é a galactosil ceramida. As células epiteliais do intestino e vagina também expressam galactosil ceramida (HAROUSE et al., 1991).

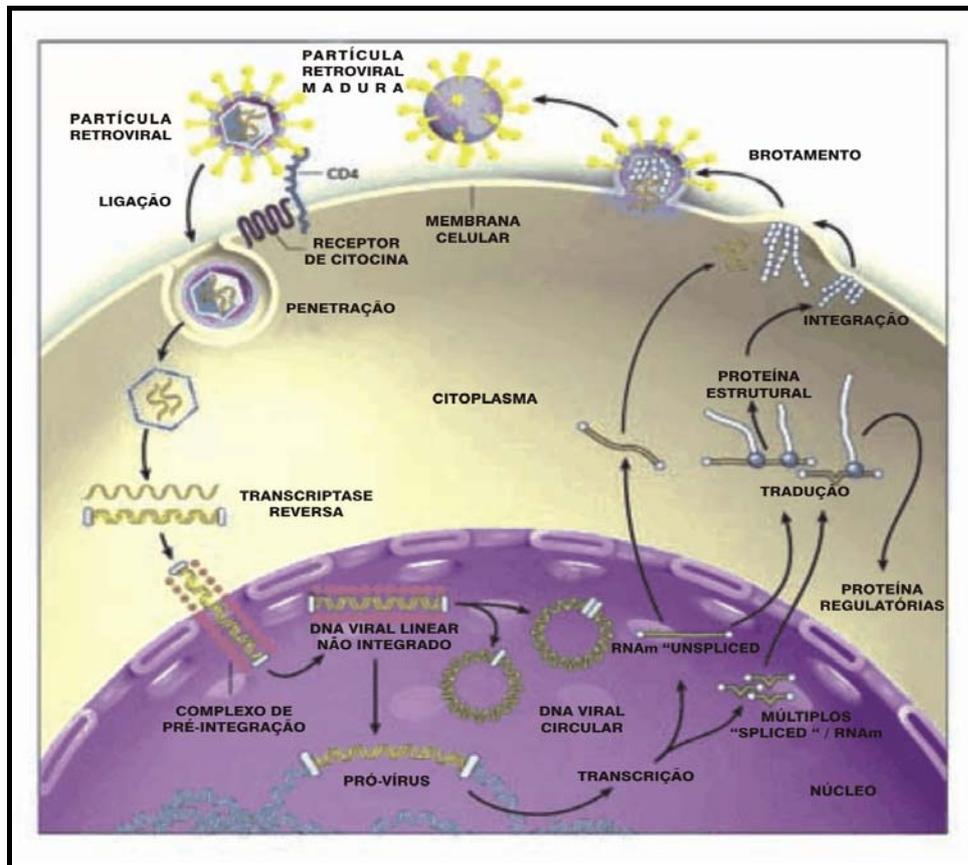
Assim que o vírus penetra na célula, enzimas do complexo nucleoproteico são ativadas e é iniciado o ciclo de reprodução viral através da ação da transcriptase reversa (RT). A região central do vírus se rompe e a RT começa a agir sintetizando o cDNA a partir da fita de RNA. Então a RNaseH degrada o RNA do híbrido cDNA-RNA e em seguida duplica a fita de cDNA. A fita dupla de DNA migra para dentro do núcleo onde é integrada ao genoma do hospedeiro pela ação da integrase (Figura 2). O retrovírus integrado ao genoma do hospedeiro é denominado de provírus (SCHÜPBACH; GALLO, 2000).

O provírus pode permanecer transcricionalmente inativo por meses ou anos, com pouca ou nenhuma produção de partículas virais ou de vírions, e deste modo a infecção de uma célula individual pode ficar latente. O início da transcrição do gene do HIV nas células T está relacionado à ativação fisiológica da célula T por antígenos ou citocinas. Este fato é importante para a patogenia da AIDS pois representa o fim do período de latência e o início da produção de vírus. Além disso, as múltiplas infecções do paciente com AIDS induzem a uma elevação da produção de fator de necrose tumoral (TNF) que acaba estimulando a produção do HIV e infecção de células adicionais (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

A síntese das partículas infecciosas maduras começa depois que os genes virais são expressos como proteínas e são produzidos transcritos do RNA viral

genômico de comprimento total. Em seguida é feita a montagem das partículas através do acondicionamento dos transcritos do RNA dentro de um complexo nucleoproteico. As proteínas são transportadas para a membrana da célula onde os vírus imaturos libertam-se por um processo de gemulação ou brotamento e entram na corrente sangüínea (Figura 2). Estes novos vírus são imaturos e incapazes de infectar outras células. A enzima protease é responsável pela organização das proteínas virais do complexo nucleoproteico e amadurecimento dos vírus. A produção do vírus maduro está associada à lise da célula e é a base do efeito citopático do HIV (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

FIGURA 2 – CICLO DA INFECÇÃO PELO HIV



FONTE: FURTADO et al., 1999.

3.1.6 Imunologia da infecção pelo HIV

A evolução clínica da infecção pelo HIV é representada por uma relação complexa entre os efeitos do vírus sobre as células imunocompetentes e a resposta imune do hospedeiro ao vírus. A infecção causada pelo HIV resulta no comprometimento das funções do sistema imune inato e adquirido. Os defeitos mais proeminentes são os da imunidade mediada por células e podem ser atribuídos a duas causas principais: a deficiência de linfócitos T CD4⁺ e a outros distúrbios do sistema imunológico (Tabela 1).

TABELA 1 – MECANISMOS DA IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

<i>Efeito patológico</i>	<i>Mecanismo</i>
Depleção de células T CD4 ⁺ por efeitos diretos do vírus	Lise de células T CD4 ⁺ causada pela germinação viral e/ou inserção da glicoproteína Env Efeito citopático da ligação intracelular da gp120 à CD4 recém-sintetizada ou reciclada
Depleção de células T CD4 ⁺ por efeitos indiretos do vírus	Lise das células infectadas viralmente devido à resposta imune ao HIV (citotoxicidade celular dependente de CTL e de anticorpos) Inibição da maturação das células T CD4 no timo Apoptose devido à ligação cruzada da gp120 com a CD4
Dano funcional do sistema imune	A gp120 solúvel (isenta de vírus) bloqueia a ligação das células T CD4 ⁺ com classe II do MHC nas APCs Prejuízo da função dos macrófagos e das células NK; mecanismo desconhecido Destruição da rede de células dendríticas e da arquitetura dos linfonodos e do baço Perturbação seletiva das células T de memória e influência na diferenciação da TH2; mecanismo desconhecido

FONTE: ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000.

A maioria das manifestações da imunodeficiência, incluindo infecções e tumores, é devida a uma deficiência de células T CD4⁺. O marco da progressão da doença é a diminuição do número de células T CD4⁺ no sangue periférico, as quais estão presentes normalmente em uma concentração de 1.000 células/mm³ e diminuem para menos de 100 células/mm³ nos pacientes com AIDS desenvolvida (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A perda dos linfócitos T CD4⁺ é a maior razão pela qual os pacientes com AIDS se tornam suscetíveis a tantas infecções, visto que essas células são indispensáveis na indução da resposta imune humoral e celular. A imunodeficiência nos indivíduos infectados pelo HIV também é uma consequência de distúrbios funcionais do sistema imunológico, independentemente da depleção de linfócitos. Isto quer dizer que, mesmo nos períodos em que a contagem de T CD4⁺ é normal, o sistema imune está sofrendo alterações (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Na infecção pelo HIV o sistema imunológico é cronicamente ativado através de eventos como a proliferação de linfócitos, aumento da secreção de citocinas, ativação dos monócitos e ativação das células T CD4⁺ e T CD8⁺. Nos estágios iniciais da doença ocorre hiperplasia dos linfonodos (FAUCI, 1993).

A replicação viral é influenciada por citocinas que regulam o sistema imunológico como o TNF- α e a interleucina 6 (IL-6). As citocinas são produzidas continuamente em níveis baixos porém aumentam com a replicação viral (FAUCI, 1996). Sub-populações de linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th), como Th-1 e Th-2 influenciam na produção de algumas citocinas. As células Th-1 produzem interferon gama (IF- γ), IL-2 e IL-12 que induzem a imunidade mediada por células, enquanto as citocinas produzidas por Th-2 como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 induzem a resposta humoral. Alguns estudos sugerem que a mudança de sub populações Th-1 para Th-2 está associada com a progressão da doença (SCHÜPBACH; GALLO, 2000). O sistema imunológico também é constantemente ativado pela expressão do HIV. A infecção crônica leva a uma constante produção dos antígenos virais como a gp 120, que é capaz de ativar as células CD4⁺ pela sua ligação à molécula CD4, levando a uma hiperativação crônica do sistema imunológico (FAUCI, 1996).

Além dos linfócitos T CD4⁺, os fagócitos mononucleares e as células dendríticas foliculares também são importantes na infecção pelo HIV e progressão da imunossupressão. Os macrófagos expressam níveis baixos de CD4, porém

expressam receptores de quimiocinas e são suscetíveis à infecção pelo HIV, apesar de serem relativamente resistentes aos efeitos citopáticos do vírus. Desta forma, os macrófagos podem se tornar o principal reservatório para o vírus, mas se tornam ineficientes na produção de citocinas e apresentação de antígenos quando infectados pelo HIV. As células dendríticas foliculares (CDFs) dos centros germinativos e do baço aprisionam HIV na sua superfície, mas não são eficientemente infectadas pelo vírus. Essas também são um reservatório do HIV que pode infectar macrófagos e células T CD4⁺ nos linfonodos (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

As funções normais das CDFs ficam comprometidas e essas podem ser destruídas pelo vírus prejudicando o funcionamento do sistema linfóide periférico. (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Os linfonodos e o baço abrigam grandes quantidades de macrófagos, CDFs e células T CD4⁺ e por isto são os sítios de contínua replicação do HIV e de progressão da doença produzida pelo vírus durante o período de latência clínica, após a infecção aguda. Nos tecidos linfóides ocorre contínua produção viral, infecção e destruição de células T, mesmo quando o HIV não é detectável no sangue periférico e os pacientes são assintomáticos. Por este motivo o declínio do número de células T CD4⁺ no sangue periférico é constante, uma vez que as células T do sangue e as dos linfonodos fazem parte da mesma massa recirculante de linfócitos. Na doença avançada as células T dos linfonodos também estão reduzidas e poucas estão infectadas pelo HIV (PANTALEO; GRAZIOSI; FAUCI, 1993).

3.1.7 Características clínicas da infecção pelo HIV

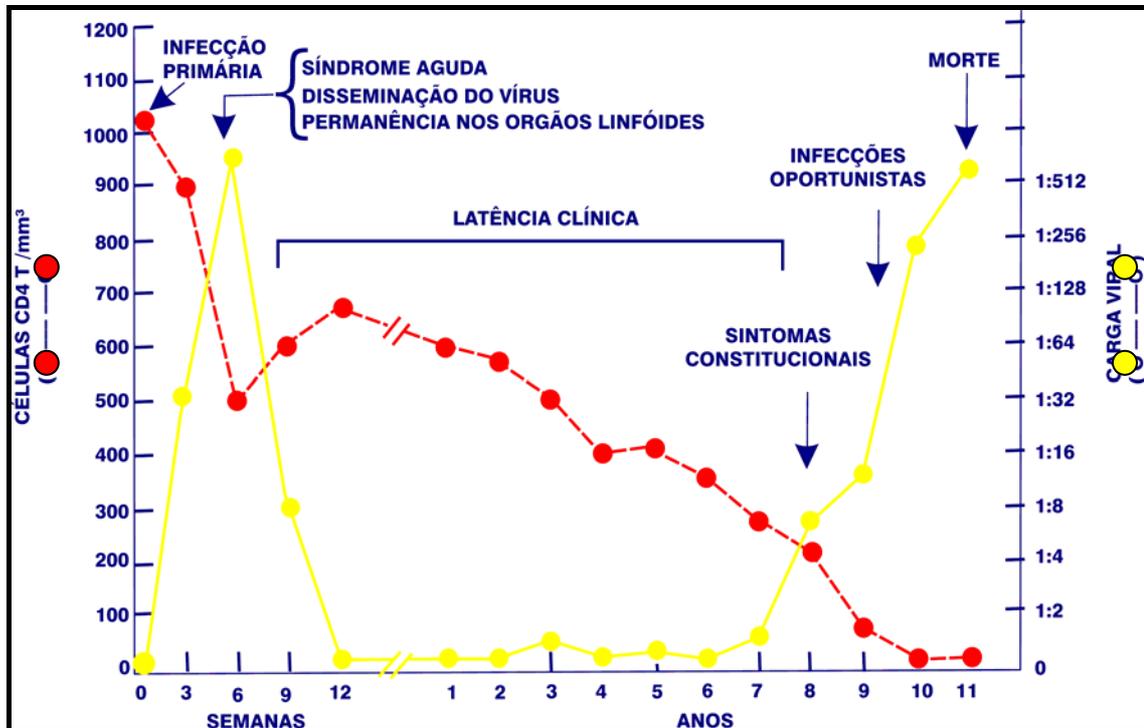
Nos indivíduos contaminados pelo HIV a resposta inicial do sistema imune é semelhante à resposta a outros vírus e de maneira eficaz a maioria dos vírus presentes no sangue e nas células T são eliminados. Mas a resposta imune fica comprometida porque as células T CD4, necessárias para iniciar as respostas imunes protetoras, são mortas ou inativadas pelo vírus e a infecção supera o sistema imunológico (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A infecção pelo HIV se caracteriza por um amplo espectro de manifestações clínicas que se tornam mais complexas e atípicas a medida que a imunodeficiência progride. Para fins didáticos, a infecção pode ser dividida em três fases: a fase aguda ou síndrome da soroconversão, a fase assintomática e a fase sintomática (Figura 3). Na ausência de qualquer intervenção terapêutica, a mediana de progressão da fase aguda até a sintomática é de uma década. Entretanto, a variabilidade é grande e alguns indivíduos desenvolvem AIDS logo após a infecção. Na ausência de tratamento aproximadamente 4% dos pacientes desenvolvem AIDS após três anos de infecção, 50% após 10 anos e 15% permanecem sem manifestações da doença após 20 anos da infecção. Estudos mostram que a mediana de progressão para AIDS foi de 15 anos para os pacientes com idade entre 16 e 24 anos no período da soroconversão, e de seis anos para aqueles com mais de 35 anos (RACHID; SCHECHTER, 2003).

As manifestações clínicas da infecção são muito variáveis mas geralmente seguem um padrão. Cerca de 50 a 70% dos pacientes desenvolvem uma síndrome aguda, semelhante a uma mononucleose, caracterizada por febre, cefaléia, linfadenopatia generalizada, inflamação da garganta com faringite e erupções, 3 a 6 semanas após a infecção primária. Esta fase é caracterizada por alta viremia e queda do número de células T CD4⁺ no sangue periférico. A viremia aguda é seguida pela ativação das células T CD8⁺, que são responsáveis pelo controle da replicação viral, através da citotoxicidade celular e da produção de citocinas. Durante este estágio, o HIV se dissemina nos linfonodos onde ocorre uma resposta imunológica específica com um declínio da viremia. Esta resposta não é suficiente para suprimir a replicação viral e a expressão do HIV persiste nos linfonodos durante a fase de latência clínica da doença (PANTALEO; GRAZIOSI; FAUCI, 1993; SCHWARTZ; NAIR, 1999).

Após a infecção primária em que ocorre a disseminação viral, o aparecimento da imunidade específica e o aparente declínio da replicação viral, a maioria dos pacientes, têm um período de latência clínica que pode ser de vários anos. Nesta fase, apesar de não haver aumento da concentração da carga viral plasmática, ocorre uma deterioração gradual do sistema imunológico, com depleção das células CD4⁺ e replicação viral alta nos linfonodos (PANTALEO; GRAZIOSI; FAUCI, 1993; RACHID; SCHECHTER, 2003).

FIGURA 3 – CURSO DA INFECÇÃO DO HIV EM RELAÇÃO À CARGA VIRAL E CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4⁺



FONTE: PANTALEO; GRAZIOSI; FAUCI, 1993.

A replicação viral contínua nos linfonodos resulta na ruptura dos centros germinativos e das células dendríticas dos linfonodos e na liberação de virions para a circulação. Nesta fase ocorre uma produção maciça de citocinas, como o TNF, GM-CSF e IL-6, com uma mudança de predomínio de linfócitos Th-2 sobre Th-1 e declínio das células CD4⁺ para menos de 50cél/μl. Este declínio está associado com a deterioração do sistema imunológico e o aparecimento de manifestações clínicas da doença, ou seja, a AIDS, constituída de sinais e sintomas como infecções oportunistas, neoplasias, caquexia e demência (SCHWARTZ; NAIR, 1999).

3.2 O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é um dos principais mecanismos pelos quais o reconhecimento do antígeno é convertido em uma defesa efetiva contra uma infecção inicial. Consiste em um grupo de mais de 30 proteínas encontradas no soro e na superfície celular, que interagem com outras moléculas do sistema imunológico e umas com as outras proporcionando muitas das funções efetoras da imunidade humoral e da inflamação (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O complemento é ativado por meio de uma cascata enzimática na qual uma molécula ativada em uma fase pode gerar múltiplas moléculas ativadas, ou fragmentos ativos, na fase seguinte. Inúmeras proteínas do complemento são proteases que se auto-ativam por clivagem proteolítica e são chamadas de zimógenos. Embora os componentes da cascata proteolítica estejam presentes como proteínas solúveis no soro, estas encontram-se inativas ou com baixo nível de ativação espontânea na circulação. A ativação dos zimógenos usualmente ocorre na superfície do patógeno, e os fragmentos do complemento ativados geralmente se ligam ali, ou são inativados por hidrólise. Esta característica do complemento confere proteção contra uma ativação descontrolada. Além disto, existem proteínas de controle do complemento capazes de permitir que o hospedeiro diferencie o próprio do não-próprio, protegendo especificamente células do hospedeiro e permitindo que a ativação do complemento na superfície dos patógenos prossiga (JANEWAY JR; TRAVERS; SERLOMCHIR, 2002).

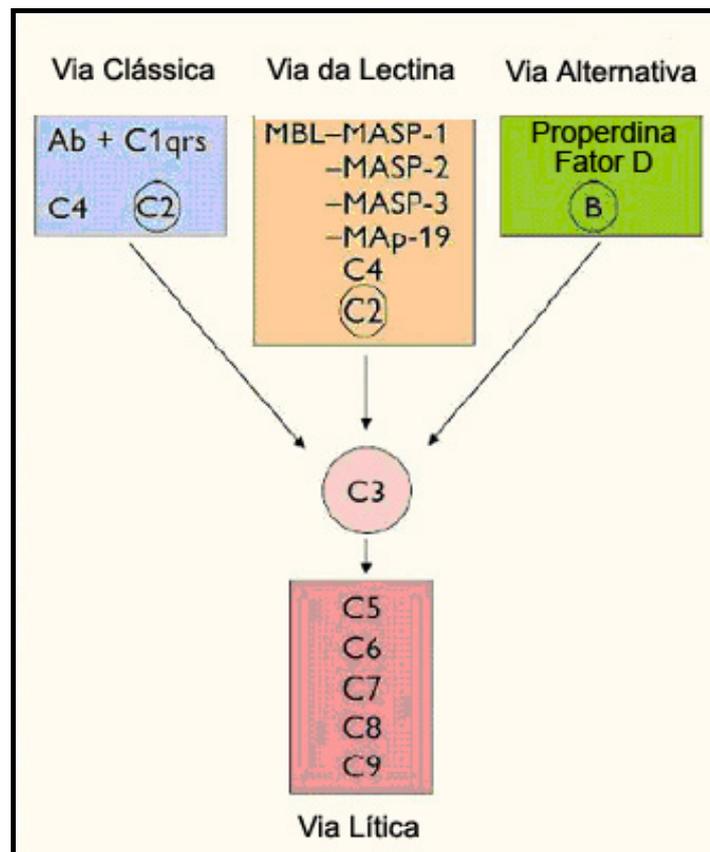
As principais funções biológicas do complemento incluem a geração de um grande número de proteínas ativas que se ligam ao patógeno através de ligações covalentes, opsonizando-o para que seja englobado por fagócitos através dos receptores para o complemento (CR) (FRANK; FRIES, 1991). Além disto, pequenos fragmentos de algumas proteínas atuam como quimioatraentes para recrutar mais fagócitos ao sítio de reação, levando a sua ativação. Os componentes terminais do complemento formam o complexo de ataque à membrana, destruindo sua integridade através da criação de poros na bicamada lipídica. Desta forma patógenos podem ser mortos por lise osmótica. O complemento também atua na solubilização e depuração de complexos imunes e na promoção da resposta imune

humoral, auxiliando a apresentação de antígenos às células B nos centros germinativos (BARRINGTON et al., 2001).

Outra função do complemento inclui a eliminação de células apoptóticas pelos macrófagos, contribuindo para a queda da exposição de auto-antígenos ao sistema imunológico. Os macrófagos interagem com as células apoptóticas através de C1q, proteína C reativa, MBL e IgM, promovendo a destruição das células mortas. Deficiência do complemento pode levar a deposição de complexos imunes e doenças auto-imunes (UTIYAMA; REASON; KOTZE, 2004).

Foram descritas três vias de ativação do complemento: a via clássica, a via da lectina e a via alternativa (Figura 4). Essas vias convergem para gerar o mesmo grupo de moléculas efetoras, mas dependem de moléculas diferentes para sua iniciação (TURNER, 2003).

FIGURA 4 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO



FONTE: TURNER, 2003.

Durante a ativação, tanto a via clássica quanto a alternativa geram complexos multiprotéicos com atividade de C3 convertase.

A via clássica pode ser ativada por anticorpo ou diretamente pela ligação de C1q à superfície do patógeno assim como ocorre na via da lectina (LU, 1997). O C1q é parte do complexo C1 que contém uma única molécula de C1q unida a duas moléculas de zimógenos C1r e C1s. C1q é uma colectina, proteína ligante de açúcar dependente de cálcio, com domínios semelhantes ao colágeno e a lectina. A molécula de C1q possui seis cabeças globulares unidas por uma cauda tipo colágeno que envolve o complexo C1r e C1s. Na ligação de mais de uma cabeça de C1q à superfície do patógeno ocorre uma mudança conformacional no complexo C1r e C1s dando início à ativação enzimática e clivagem de C4 e C2. Os dois fragmentos grandes, C4b e C2a, formam a C3 convertase da via clássica (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

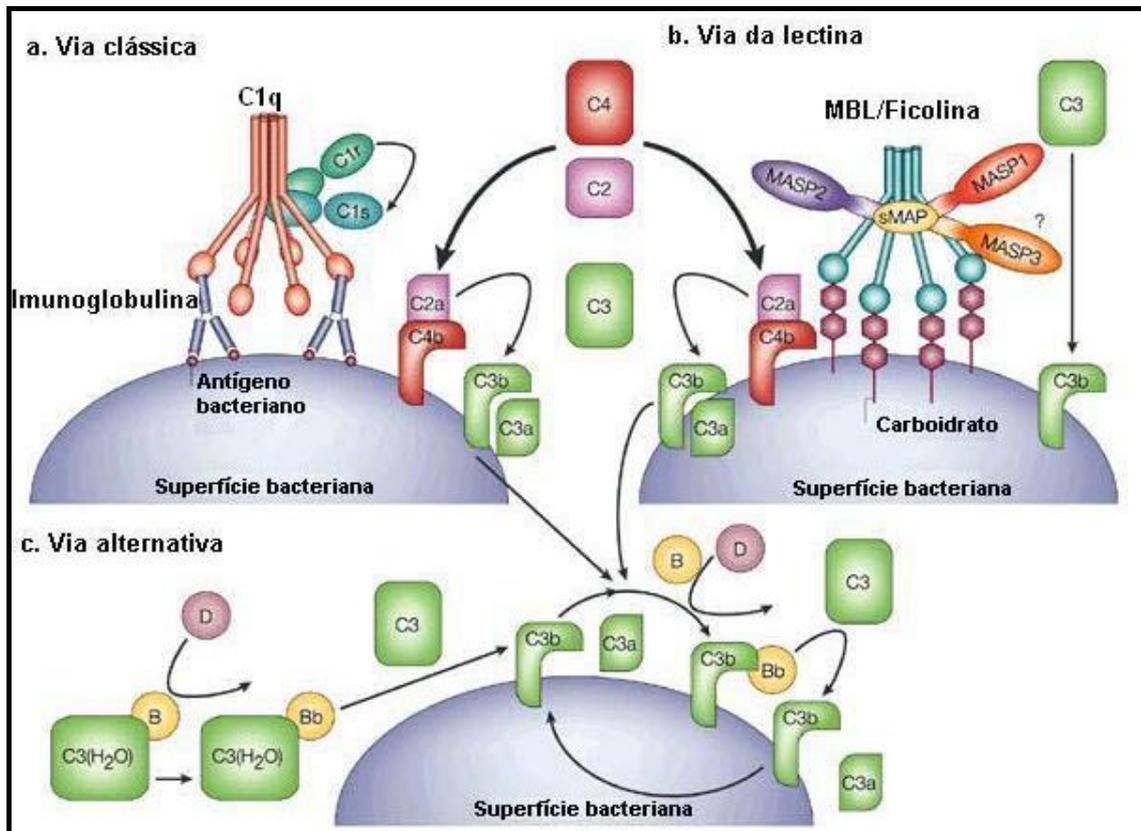
A via da lectina é ativada através do reconhecimento de carboidratos na superfície de patógenos através de duas classes de lectinas colagenosas: a lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas. As serina proteases associadas à MBL (MASPs) têm estrutura e função homóloga às proteases C1r e C1s da via clássica e são responsáveis pela ativação desta via (WONG et al. 1999). A MASP-2 é homóloga à MASP-1 e parece ser a enzima responsável pela ativação da via da lectina, enquanto que o papel da MASP-1 ainda não parece bem claro. Além destas, existe uma forma alternativa de MASP-1, chamada MASP-3 e um derivado de MASP-2, Map19. (EZEKOWITZ, 2003). Quando o complexo MBL/MASPs se liga à superfície do patógeno, as MASPs são ativadas e clivam C4 e C2 (FUJITA, 2002). Portanto, a via da lectina inicia a ativação do complemento da mesma forma que a via clássica, formando C3 convertase a partir do C4b ligado à membrana e complexado com C2a (IKEDA et al., 1987; LU, 1997).

A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo e é um mecanismo da imunidade inata. Nesta via são geradas C3 convertases solúveis e ligadas à membrana, as quais catalisam a hidrólise de C3. A via alternativa está em um estado constante de ativação de baixo-nível devido à reatividade de C3 solúvel com a água. A ativação da fase fluida tem como objetivo promover a ativação da fase sólida sobre a superfície dos patógenos, envolvendo as mesmas fases e proteínas. A cascata da fase fluida é iniciada quando C3 é hidrolisado pela água para formar um

intermediário instável chamado C3i ou C3(H₂O). O C3i liga-se ao fator B formando um complexo suscetível ao fator D, uma serinaprotease. O fator D cliva o fator B, formando um fragmento pequeno Ba que é liberado, e outro fragmento maior Bb que permanece ligado ao C3i. O complexo C3iBb constitui a C3 convertase desta via, onde o fragmento Bb funciona como uma serinaprotease capaz de clivar moléculas adicionais de C3 (Figura 5) (WALPORT, 2001).

A C3 convertase cliva C3 em C3b, principal molécula efetora no sistema complemento, e C3a, peptídeo mediador da inflamação. O fragmento maior C3b liga-se covalentemente à membrana e opsoniza o patógeno, permitindo a sua internalização nos fagócitos. C3b também se liga à C3 convertase para formar a C5 convertase, gerando C5b e C5a. O C5a é o mediador mais importante na inflamação e o C5b ativa os eventos tardios da cascata do complemento. As proteínas restantes envolvidas nesta fase incluem C6, C7, C8, e C9. C6 e C7 ligam-se seqüencialmente e o complexo C5b,6,7 fica inserido diretamente na bicamada lipídica da membrana plasmática, seguindo-se a inserção instável de C8. Nesta fase pode ocorrer a polimerização de até 15 moléculas de C9 em volta do complexo para formar poros líticos na membrana, podendo lisar certos patógenos e células (WALPORT, 2001).

FIGURA 5 – ATIVAÇÃO DA VIA CLÁSSICA, DA LECTINA E ALTERNATIVA



FONTE: FUJITA, 2002.

3.3 A LECTINA LIGANTE DE MANOSE

A MBL é uma lectina do tipo C que pertence à subfamília das colectinas, caracterizada pela presença de uma região de colágeno N-terminal e de um domínio para lectina. As lectinas são proteínas com dois ou mais domínios de reconhecimento e ligação a carboidratos (CRD), de origem não-imune que aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos e glicoproteínas. A atividade da maioria das lectinas é dependente de cálcio (tipo C), ou de grupos tiol (tipo S) (DRICKAMER; DORDAL; REYNOLDS, 1986).

A MBL é sintetizada no fígado e secretada na corrente sanguínea, e tem importante papel no sistema imune inato (TURNER, 1996).

3.3.1 Histórico

A MBL foi isolada pela primeira vez na forma protéica em fígado de coelhos, em 1978. A partir dessa data, proteínas capazes de se ligar a glicoproteínas com grupos terminais de manose foram identificadas tanto no soro de humanos como de bovinos, ratos e coelhos (KAWASAKI; ETOH; YAMASHINA, 1978). Em 1988, SUMMERFIELD e TAYLOR observaram que a MBL é secretada por hepatócitos e atua na forma de uma proteína de fase aguda inflamatória.

Posteriormente observou-se que a MBL é capaz de ativar a via clássica do complemento independentemente de C1q e ainda atuar como opsonina, mediando a fagocitose de diferentes microorganismos (EZEKOWITZ; DAY; HERMAN, 1988). Uma maior compreensão do mecanismo de ativação da via das lectinas está sendo possível graças à identificação das serina proteases associadas à MBL (MASPs). A MBL também pode atuar diretamente como opsonina pela ligação simultânea a açúcares antigênicos e a receptores de colectinas, presentes nas membranas das células fagocíticas (KUHLMAN; JOINER; EZEKOWITZ, 1989; TAYLOR et al., 1989).

3.3.2 Estrutura molecular

A MBL é uma proteína da família das colectinas caracterizada por uma região colagenosa e um domínio de reconhecimento de carboidratos. Nos seres humanos estão incluídas nesse grupo a MBL plasmática e as proteínas surfactantes do pulmão SP-A e SP-D (TURNER, 2003). A porção colagenosa da MBL é importante para a integridade estrutural da proteína, enquanto o domínio da lectina é responsável pelo reconhecimento de carboidratos. A afinidade maior da MBL é por resíduos de açúcares que contém grupos C3-OH e C4-OH em orientação equatorial, os quais são encontrados na superfície celular de vários microrganismos. A MBL se liga a açúcares como N-acetilglucosamina, manose, N-acetilmanosamina, fucose e glucose. Por outro lado, carboidratos como galactose e ácido siálico caracterizam glicoproteínas humanas e não possuem essa característica, não tendo portanto afinidade pela MBL (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992).

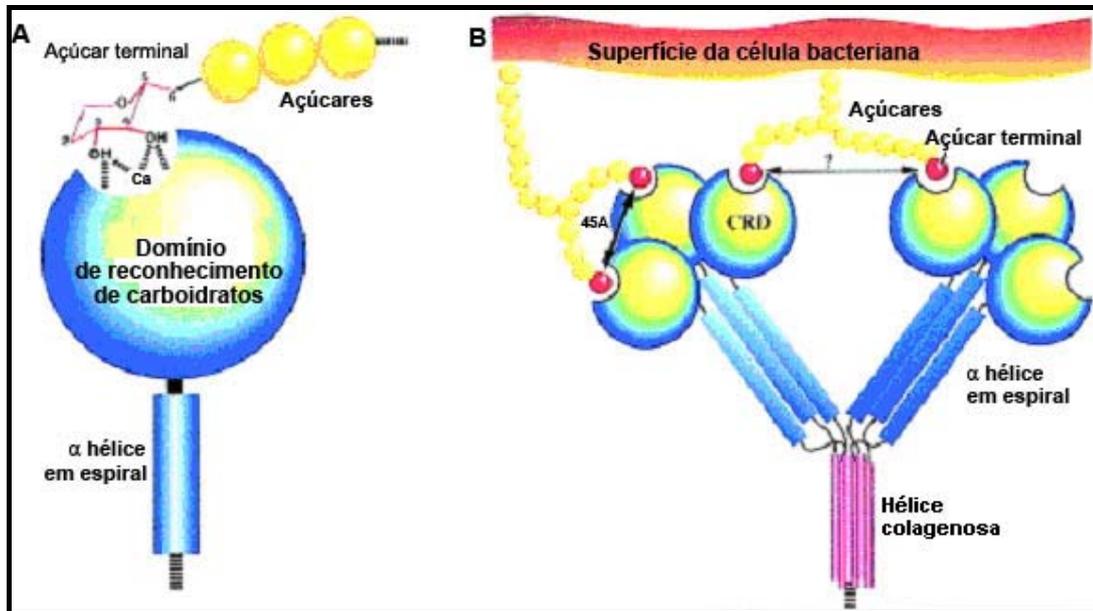
A afinidade entre os CRDs e os açúcares é baixa e cada uma destas ligações tem um K_d de aproximadamente $10^{-3}M$. A avidéz de ligação pode ser

incrementada devido aos múltiplos sítios de ligação da proteína que podem se ligar a vários grupos de açúcar na superfície de microorganismos, multiplicando as constantes de dissociação CRD-açúcar. O arranjo cíclico dos sítios de ligação impede o reconhecimento de ligantes multivalentes próprios, como os oligossacarídeos superiores de manose, encontrados nas imunoglobulinas. Desta forma, a especificidade no reconhecimento de carboidratos é importante na distinção de glicoproteínas próprias e não-próprias (Figura 6) (LEE et al., 1991; WEIS; TAYLOR; DRICKAMER, 1998).

A estrutura da MBL humana é composta por polímeros de até 6 subunidades, cada qual formado por 3 cadeias polipeptídicas idênticas de 32kD cada. As cadeias polipeptídicas formam uma tripla hélice colagenosa típica baseada na repetição de seqüências Gly-Xaa-Yaa. O número pequeno de repetições Gly-Xaa-Yaa forma estrutura semelhante a um ramo de tulipas quando observado através de microscopia eletrônica, enquanto que um número maior de repetições Gly-Xaa-Yaa leva à estrutura cruciforme (Figura 7). Na região N-terminal, composta de duas ou três unidades de cisteína, cada cadeia polipeptídica está associada a outras duas através de pontes dissulfeto. As cadeias se separam na região C-terminal para dar origem a 3 sítios de reconhecimento de carboidrato (CRD) cada um deles contendo dois íons cálcio (Figura 8) (EZEKOWITZ, 2003).

Os trímeros da MBL associam-se uns aos outros para formar desde dímeros até hexâmeros (WEIS; TAYLOR; DRICKAMER, 1998; TURNER, 1996). Apesar da MBL ser encontrada no soro humano na forma de dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros, apenas as moléculas com quatro ou mais unidades parecem ativar o complemento. Os pentâmeros e hexâmeros com 15 CRD e 18 CRD respectivamente, têm uma eficiência maior de ativação do complemento e ligação a carboidratos (BABOVIC-VUKSANOVIC; SNOW; TEN, 1999).

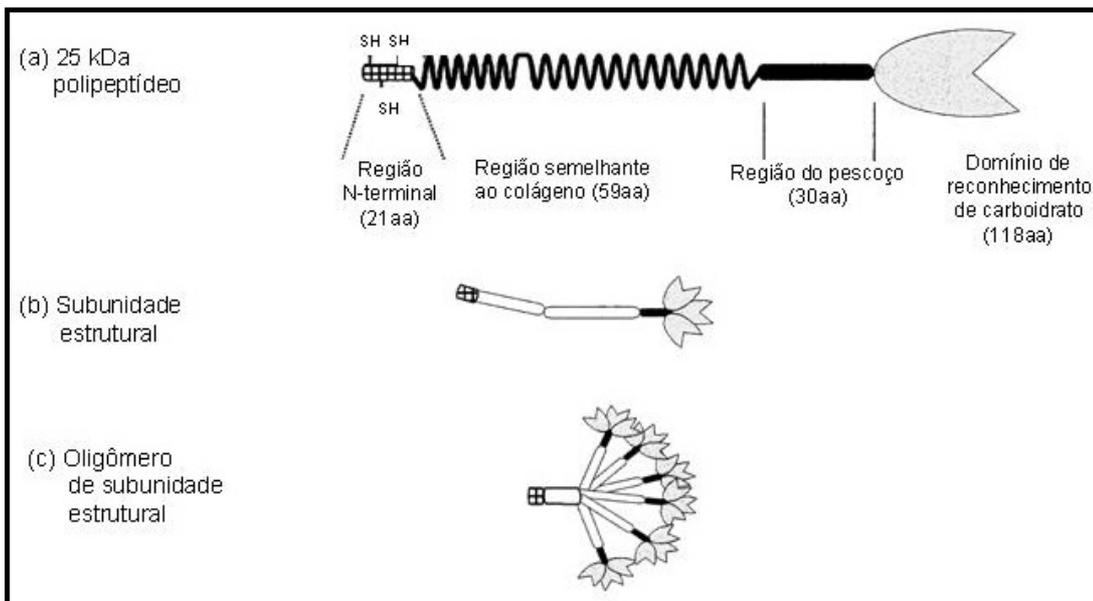
FIGURA 6 – MODELO PROPOSTO PARA O SÍTIO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS (CRD) DA MBL



FONTE: EZEKOWITZ, 2003.

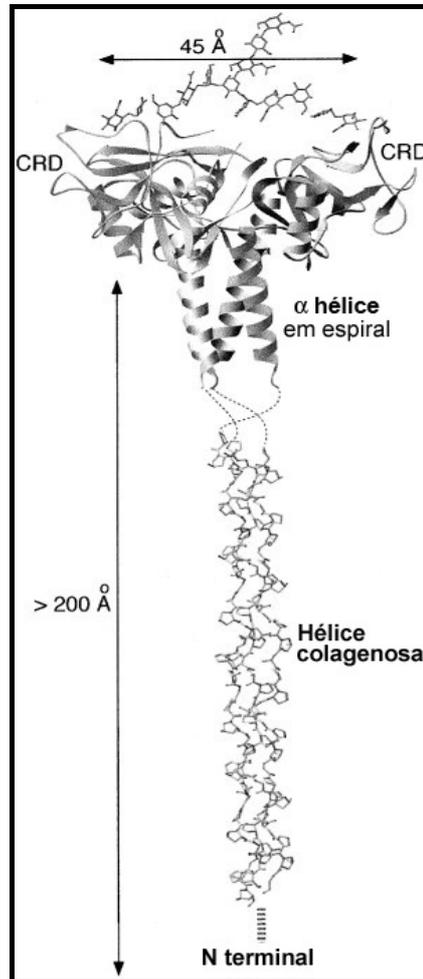
FIGURA 7 - ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA MBL

(a) Cada cadeia de MBL consiste de região N-terminal, região do colágeno, região não colagenosa e CRD. Os polipeptídios de 25 KDa trimerizam para formar a subunidade estrutural (b) que é encontrada no soro na forma de oligômeros (c).



FONTE: TURNER, 1996.

FIGURA 8 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM TRÍMERO DE MBL E SEUS DOMÍNIOS



FONTE: EZEKOWITZ, 2003.

3.3.3 Função biológica

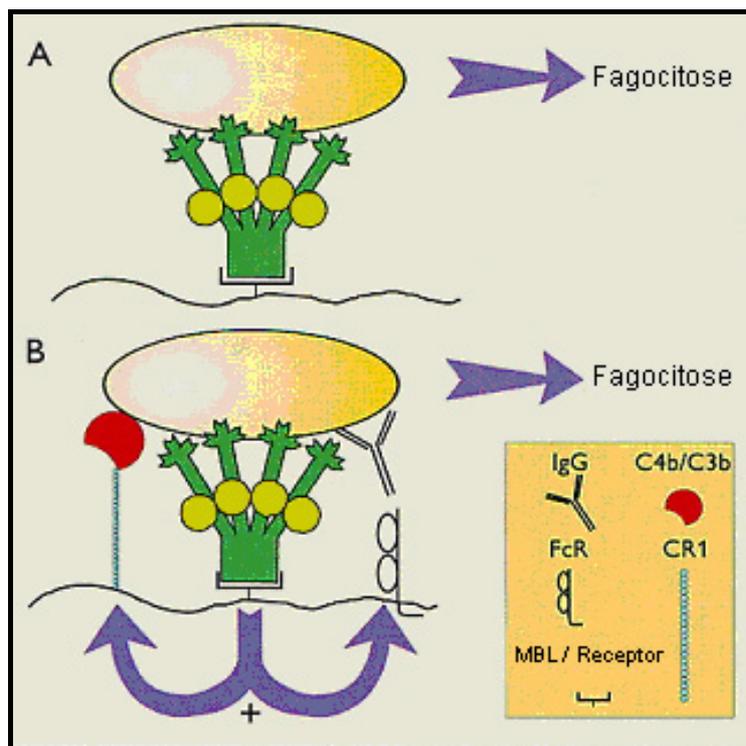
Apesar de fazer parte do sistema imune inato, a MBL expressa algumas das propriedades mais importantes do sistema imune adaptativo. Existem semelhanças funcionais entre a MBL e a IgM, baseadas no fato de que a MBL possui múltiplos pontos de atração e ligação ao alvo capazes de fortalecer cada interação e levar a um aumento da avididade da ligação. Após ligação com a superfície de microorganismos a MBL é capaz de ativar a via clássica do complemento, propriedade similar a da IgM (JACK; KLEIN; TURNER, 2001).

Além disto atua como opsonina podendo promover interação de uma variedade de microorganismos diretamente com as células fagocíticas, promovendo fagocitose e indução da resposta inflamatória (Figura 9) (JACK; TURNER, 2003).

Portanto, a MBL está envolvida na primeira linha de defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Uma vez ligada ao patógeno alvo, a MBL é capaz de levar a uma série de atividades antimicrobianas. A proteína ativa o sistema complemento, podendo mediar a lise de certos microorganismos ou aumentar a sua fagocitose (Figura 10) (JACK; TURNER, 2003).

FIGURA 9 – MECANISMO DE FAGOCITOSE MEDIADA PELA MBL

- A. MBL promove fagocitose através de interação com receptores celulares ou proteínas ligantes.
- B. MBL atua estimulando outros mecanismos de fagocitose através de receptores de imunoglobulinas e de C3b/C4b.



FONTE: JACK; KLEIN; TURNER, 2001.

FIGURA 10 – LIGAÇÃO DA MBL A MICROORGANISMOS

- A. Grupo formado por organismos cuja ligação foi comparada com outros organismos ou padrão.
- B. Grupo formado por organismos que se ligam a MBL mas sem relação quantitativa com outros microrganismos.
- C. Grupo cuja ligação à MBL pode ser inferida através da influência previamente determinada da MBL na resposta imunológica ao microorganismo.

Intensidade de ligação da MBL a diferentes microorganismos (A)				
	Ausente	Baixa	Média	Alta
Sem variação entre as cepas	<i>Clostridium</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> β -haemolytic <i>Streptococcus</i> Group B, <i>S. sanguis</i> <i>S. agalacticae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Streptococcus suis</i> <i>Neisseria mucosa</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i> sporozoites <i>Actinomyces israelii</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Acnes</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>N. cinerea</i> <i>N. Subflava</i>
Com variação entre as cepas	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>Streptococcus pneumoniae</i> </div>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>Candida albicans</i> β-haemolytic group A <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> </div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>Aspergillus fumigatus</i>, <i>Bacteroides</i> sp., <i>Escherichia coli</i>, <i>Eubacterium</i> sp., <i>Fusobacterium</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Veillonella</i> sp. </div>			
Estrutura de superfície	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>Cryptococcus neoformans</i> </div>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> </div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Salmonella enterica</i> serovars Typhimurium and Montevideo </div>			
Ligação da MBL a outros microorganismos (B)				
<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , HIV, influenza A				
Organismos com ligação à MBL inferida (C)				
<i>Leishmania chagasi</i> , <i>Leishmania braziliensis</i>				

FONTE: ADAPTADO DE JACK E TURNER, 2003.

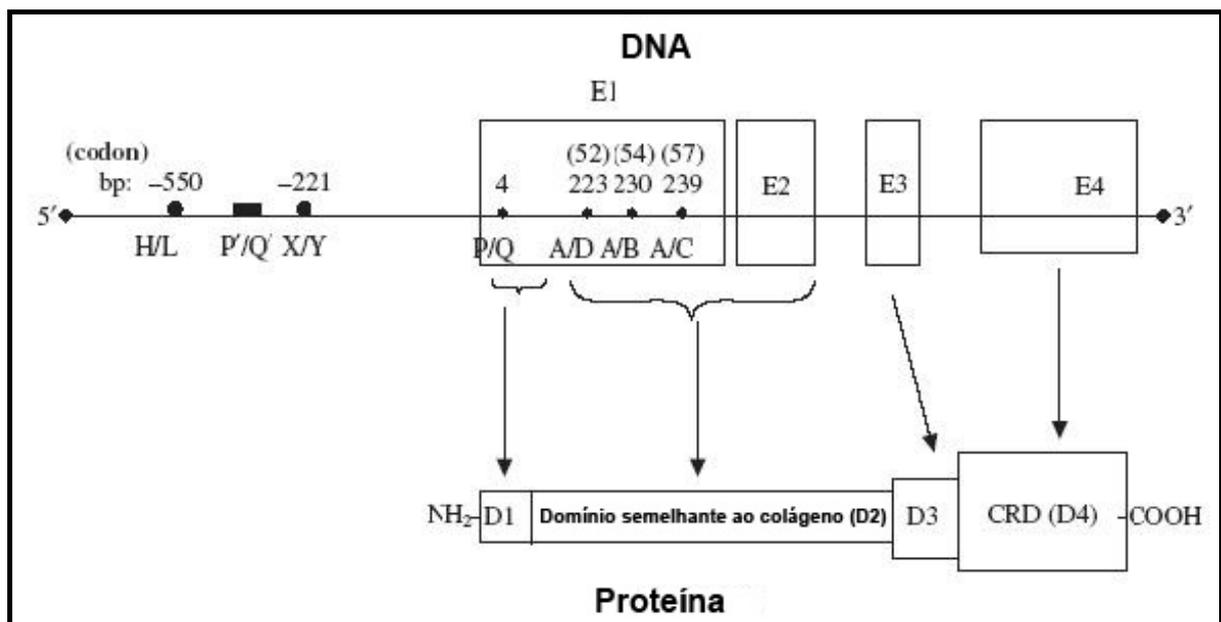
3.3.4 Genética e deficiência

O gene que codifica a MBL situa-se no braço longo do cromossomo 10, no espaço compreendido entre a região 1, banda 1, sub-banda 2 e região 2, banda 1 (10q1 1.2 – q2.1) (SASTRY et al., 1989) e foi seqüenciado no final da década de 80. De acordo com todos os sítios de variabilidade descritos, há possibilidade de ocorrência de 64 alelos (EZEKOWITZ; DAY; HERMAN, 1988).

A porção codificadora da MBL é composta de 4 exons, cada qual correspondente a um segmento diferente da cadeia. Os exons são separados por três introns de 643 pb, 1350 pb e 800 pb (TAYLOR et al., 1989). O tamanho maior do segundo intron corresponde à divisão principal da molécula em porção colagenosa e não colagenosa (Figura 11) (DRICKAMER; DORDAL; REYNOLDS, 1986).

FIGURA 11 – GENE DA MBL E ESTRUTURAS DA PROTEÍNA

O gene MBL tem 4 exons (E1, E2, E3 e E4). O exon 1 do gene estrutural apresenta mutações nos códons 52(D), 54(B) e 57(C). O polimorfismo Y/X na posição -221 da região promotora influencia na concentração da proteína circulante. O produto do gene consiste em 4 domínios (D1, D2, D3 e D4), com o domínio de reconhecimento de carboidratos na região carboxi terminal.



FONTE: KILPATRICK, 2002.

O exon 1 corresponde à região estrutural do gene e codifica para o domínio N-terminal de 21 aminoácidos e parte do domínio de colágeno da cadeia, com um total de 60 aminoácidos ao todo. O domínio N-terminal é composto de uma região com dois a três resíduos de cisteína, formadores das ligações dissulfídicas intercadeia. Esta região é seguida por sete cópias do trio Gly-Xaa-Yaa, onde Xaa e Yaa representam dois aminoácidos quaisquer, diferentes entre si e diferentes da glicina (EZEKOWITZ; DAY; HERMAN, 1988).

O exon 2 codifica para o restante do domínio do colágeno formado por mais 12 repetições Gly-Xaa-Yaa. O domínio do colágeno é responsável pela ligação às MASPs e posterior ativação do complemento (MATSUSHITA; EZEKOWITZ; FUJITA, 1995).

O exon 3 codifica para uma região intermediária, formada por alfa-hélices trimerizadas em uma super-hélice, sendo considerada o sítio de reunião das triplas-hélices do colágeno (EZEKOWITZ; DAY; HERMAN, 1988).

O exon 4 apresenta as seqüências codificadoras do CRD, formado por uma estrutura globular composta de 148 aminoácidos, com dois sítios de ligação para cálcio. O CRD liga-se aos grupos 3-OH e 4-OH dos resíduos de açúcar na superfície dos microorganismos na dependência dos íons cálcio (LEE et al., 1991; WEIS; TAYLOR; DRICKAMER, 1998).

A deficiência da MBL parece ser uma das imunodeficiências mais comuns, sendo determinada por mutações nas regiões do exon 1 e promotora do gene. As três mutações pontuais nos códons 52, 54 e 57 do exon 1 originam as variantes alélicas denominadas *D*, *B* e *C*, respectivamente, e o tipo selvagem é denominado *A*. Nos códons 54 e 57, devido à troca de uma única guanina por uma adenina, ocorre uma substituição da glicina por ácido aspártico e da glicina por ácido glutâmico, respectivamente. As substituições de aminoácidos interrompem as seqüências Gly-Xaa-Yaa e desestabilizam a estrutura secundária da porção colágeno da MBL, gerando defeitos na polimerização da molécula, sendo responsáveis pela redução da concentração sérica da proteína e incapacidade de ativar o complemento (STEFFENSEN et al., 2000). No códon 52, a troca de uma citosina por uma timina leva a uma substituição da arginina por cisteína. Esta mutação não atua sobre a seqüência Gly-Xaa-Yaa, mas a presença de um resíduo de cisteína a mais rompe a

formação do oligômero pelo surgimento de pontes dissulfeto adicionais (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001).

Além das mutações na região estrutural, ocorrem mutações na região promotora do gene, mostrando que as concentrações plasmáticas da MBL também são moduladas a nível transcricional (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001). Foram identificados dois pontos de variação na região reguladora a 5' e um na região não-traduzida a 5' denominados *H/L* (posição -550), *Y/X* (posição -221) e *P/Q* (posição +4). Os polimorfismos *H/L* e *Y/X* resultam da substituição de um nucleotídeo guanina por uma citosina e o *P/Q* resulta da troca de uma citosina por uma timina (MADSEN et al., 1995).

As três mutações na região estrutural do gene estão em desequilíbrio de ligação com as mutações da região promotora e cada indivíduo apresenta uma combinação de dois dos seguintes haplótipos possíveis: *HYP A*, *LYQ A*, *LYP A*, *LXP A*, *LYP B*, *LYQ C* e *HYP D*. Os haplótipos mais comuns encontrados a partir destes alelos polimorfos são *LXP*, *LYP*, *LYQ* e *HYP*. Entre estes, o *HYP* está associado com concentração sérica mais elevada de MBL, enquanto o *LXP* está associado com valores mais baixos da proteína. A redução na concentração sérica de MBL nos pacientes homocigotos *LXA/LXA* é similar àquela determinada por uma variante estrutural *HYA/0*, representando um sistema genético com efeito aditivo dos haplótipos (MADSEN et al., 1995).

A frequência destes haplótipos varia de acordo com a população em estudo, com diferenças marcantes entre grupos étnicos diferentes (MADSEN et al., 1995). A frequência das três mutações estruturais do gene MBL foi estudada em várias populações diferentes. O alelo selvagem *A* é o mais comum, alcançando frequência igual ou superior a 50%, podendo chegar a 99,3% em aborígenes australianos (TURNER et al., 2000). O alelo *B* foi identificado com frequência 11 a 16% em populações da Eurásia (LIPSCOMBE et al. 1992; MADSEN et al., 1995; GARRED et al., 1992), entretanto pode ocorrer na frequência de 42 a 46% em sul-ameríndios e é quase ausente em africanos e populações da Oceania (MADSEN et al., 1998; LIPSCOMBE et al. 1996; TURNER, et al., 2000). Por outro lado, a variante *C* foi identificada com frequência de 24 a 29% em populações africanas do sul do deserto do Saara e é rara em europeus, orientais e ameríndios (LIPSCOMBE et al. 1992; MADSEN et al., 1995; GARRED et al., 1992). O alelo *D* foi identificado com

freqüência baixa, em torno de 6% a 7% nas populações européias investigadas, aparecendo também em outras populações tanto africanas como não-africanas com freqüência de 5% (TURNER, 1996).

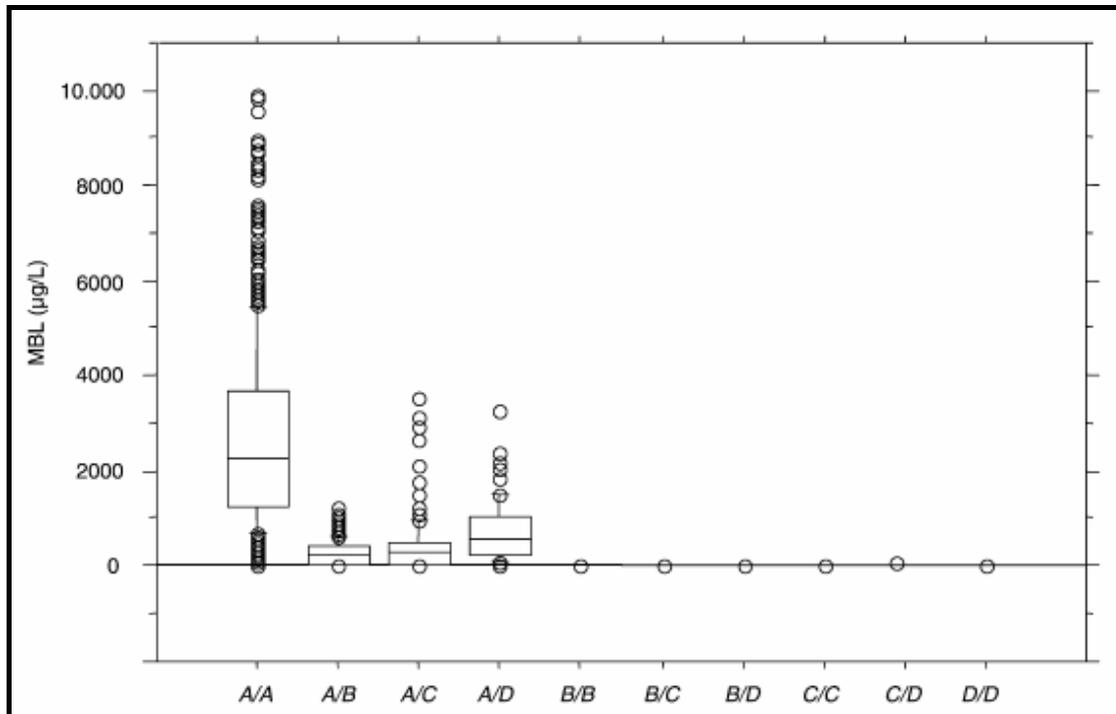
No Brasil, a freqüência alélica da MBL foi estudada na população do Paraná, num grupo de caucasóides, afro-brasileiros, mestiços e indígenas. Na população caucasóide as freqüências para as variantes *B*, *C* e *D* foram de 11%, 0,3% e 7% respectivamente; na população de afro-brasileiros de 3%, 20% e 2% e na população mestiça 16%, 7% e 4%. As populações indígenas das tribos Guarani e Kaingang apresentaram 43% e 29% para a mutação *B*. Os guaranis apresentaram 0,4 % para a variante *C* e nenhum dos dois grupos apresentou a variante *D* (BOLDT; PETZEL-ERLER, 2002).

Os valores basais de MBL na circulação são bem estáveis (NIELSEN et al., 1995), entretanto diferem bastante entre indivíduos, podendo variar de 50 ng/ml até acima de 3.000 ng/ml (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001).

As três mutações estruturais no gene MBL são os determinantes mais importantes nos valores protéicos e as variantes da região promotora do gene têm influência na expressão de MBL. Foi demonstrado que indivíduos homozigotos para essas mutações apresentam moléculas de baixo peso molecular, enquanto que indivíduos heterozigotos produzem, além destas, moléculas de alto peso molecular, similares ao tipo selvagem. Apenas os oligômeros de alto peso molecular são capazes de ativar o complemento (GARRED et al., 2003). Indivíduos heterozigotos têm somente 1/8 da probabilidade de selecionar três cadeias peptídicas normais durante a biossíntese. Isso é baseado no fato de que somente um em 2X2X2 (um em oito) produtos oligoméricos dos indivíduos heterozigotos poderia ser normal (TURNER, 1996).

Em um estudo com um grupo de 1183 doadores de sangue não houve detecção de proteína circulante (limite de detecção de 20 ng/ml) em homozigotos para variantes estruturais, enquanto que o estado heterozigoto teve uma redução nos valores protéicos, especialmente para os alelos *B* e *C* (Figura 12) (GARRED et al., 2003).

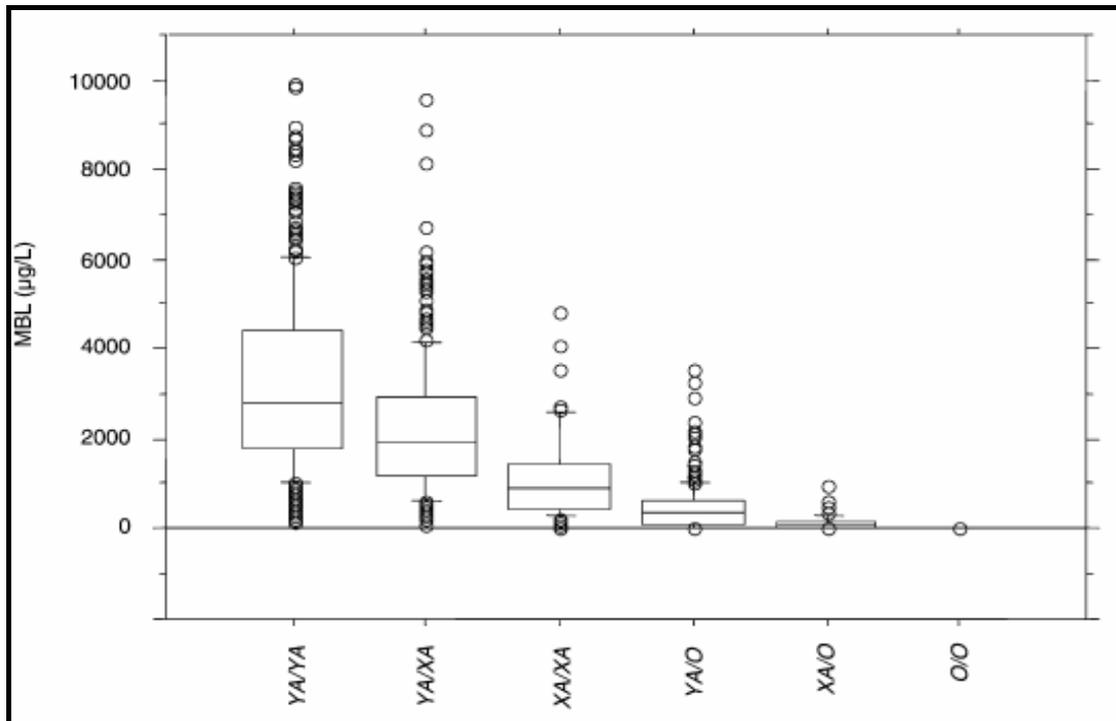
FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL COM RELAÇÃO ÀS VARIANTES ESTRUTURAIS



FONTE: GARRED, 2003.

O polimorfismo da região promotora também tem influência sobre os valores séricos de MBL (MADSEN et al., 1995; MADSEN et al., 1998). A fim de facilitar a interpretação das diferenças entre os genótipos, geralmente os dados são apresentados de maneira mais simples, agrupando as variantes estruturais *B*, *C* e *D*, para uma só classe denominada “*O*”, e mostrando apenas o alelo da região promotora na posição -221 (*Y/X*), que tem maior influência na modulação da concentração sérica de MBL, sendo que a variante *X* somente é encontrada formando haplótipo A (*XA*) (Figura 13) (GARRED et al., 2003).

FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL COM RELAÇÃO AO GENÓTIPO



FONTE: GARRED et al., 2003.

Vários estudos apresentaram evidências de que a deficiência de MBL aumenta a suscetibilidade geral dos indivíduos a doenças infecciosas (SUMMERFIELD et al., 1997; ALAN; EZEKOWITZ, 2001; ROY et al., 2002).

As mutações no gene MBL foram associadas com infecções por fungos, bactérias e vírus como o HIV e o HBV. As concentrações baixas da MBL levam a um defeito de opsonização e estão associadas com infecções de repetição na infância (TURNER, 1991). Por outro lado, concentrações altas podem, sob certas condições, ser prejudiciais porque podem facilitar infecções por certos microrganismos e/ou acentuar o dano tecidual resultante da ativação indesejada do complemento (GARRED et al., 1992; GARRED et al. 1994; SCHAFRANSKI et al, 2004). Um estudo recente observou valores séricos de MBL aumentados em portadores de doença reumática cardíaca sugerindo que a deficiência de MBL pode representar uma vantagem contra o desenvolvimento de estenose mitral reumática, e que concentrações altas podem contribuir para o desenvolvimento da doença (SCHAFRANSKI et al., 2004).

Outros estudos observaram uma suscetibilidade maior à infecção por patógenos específicos em indivíduos deficientes de MBL, incluindo o vírus HIV (GARRED et al. 1997; NIELSEN et al., 1995), *Plasmodium falciparum* (LUTY, KUN; KREMSNER, 1998; JÜLIGER et al., 2002), *Cryptosporidium parvum* (KELLY et al., 2000) e *Neisseria meningitidis* (HIBBERD et al., 1999). Entretanto, em caso de parasitas intracelulares como a *Mycobacteria* e a *Leishmania*, a deficiência de MBL parece atuar fornecendo proteção contra a doença. Isto é explicado pelo fato de que o parasita utiliza a opsonização do C3 e os receptores de C3 para invadir a célula hospedeira e uma redução na ativação do complemento reduz essa possibilidade. O primeiro estudo que traz suporte para esta idéia foi realizado com pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae* na Etiópia que apresentaram valores séricos altos de MBL em relação ao grupo controle (GARRED et al, 1994).

Além disso, vários estudos indicam que a MBL também pode modular a gravidade de diferentes doenças. Um dos primeiros estudos nesta área foi realizado por GARRED et al. (1997) colaboradores mostrando que pacientes infectados pelo HIV apresentavam maior frequência de mutações no gene, e que a sobrevivência depois do diagnóstico de AIDS era reduzida nos portadores de mutações.

Com relação às doenças auto-imunes, há evidências de que pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico (LES) têm uma frequência maior de mutações no gene MBL ou deficiência da proteína, conforme observado em grupos de origem inglesa, chinesa, espanhola e afro-americana. Nesses casos a deficiência da MBL está relacionada à diminuição da remoção de complexos imunes (DAVIES et al., 1995; LAU et al., 1996). SULLIVAN et al. (1996) colaboradores observaram uma frequência aumentada de mutações em duas regiões estruturais do gene MBL (códon 54 e 57) em pacientes com LES. Outro estudo observou um maior risco de progressão da doença e outras complicações de origem infecciosa em pacientes portadores de LES com variantes alélicas do gene MBL (GARRED et al., 1999 e 2001).

No caso de portadores de artrite reumatóide os estudos são controversos. KILPATRICK (1997) e STANWORTH et al. (1998) não encontraram associação entre mutações no gene ou valores séricos baixos de MBL e a doença. Entretanto, outros estudos encontraram evidências de associação entre deficiência de MBL e artrite reumatóide (GRAUDAL et al., 1998; GARRED et al., 2000). O início precoce

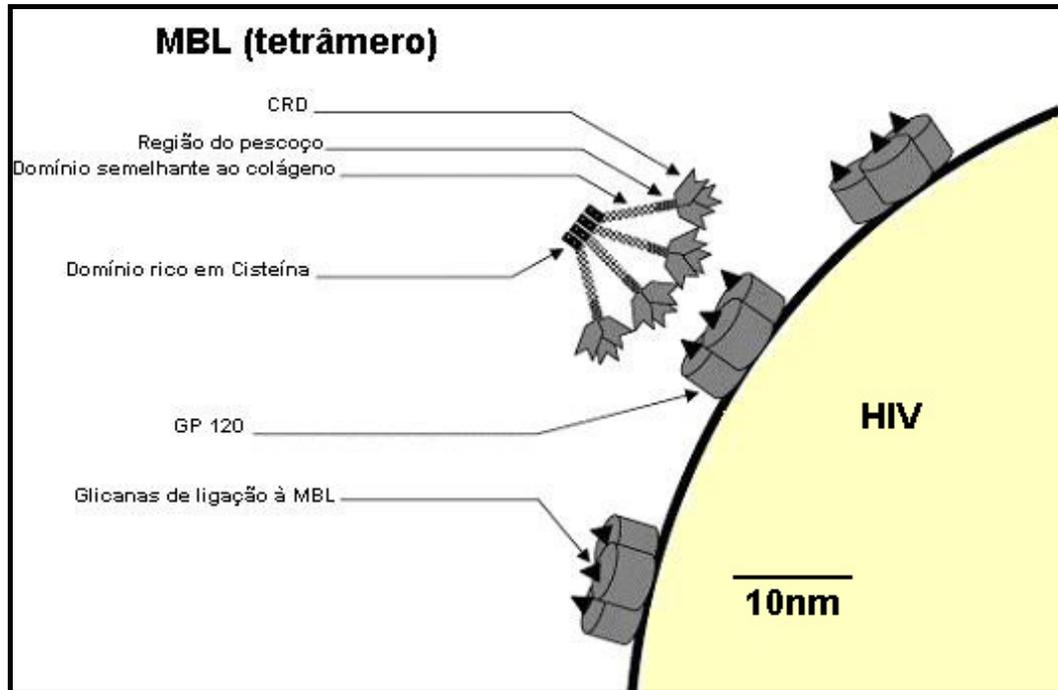
da doença teve associação com concentrações baixas da MBL (GRAUDAL et al., 1998) e variantes alélicas do gene MBL (GARRED et al., 2000). Por outro lado, os indivíduos com genótipo *A/A* podem ter aumento da reação inflamatória (GARRED et al., 2000).

Recentemente, iniciou-se um estudo com administração intravenosa de MBL purificada em 20 pacientes saudáveis deficientes da proteína (VALDIMARSSON, 2003). A terapia de reposição da MBL já está sendo realizada através de estudos de casos nos quais observou-se que a administração da proteína purificada em pacientes deficientes é um procedimento seguro, além de promover desde a estabilização (GARRED et al., 2002) até a melhora do quadro clínico dos pacientes (VALDIMARSSON et al., 1998).

3.4 A MBL E O VÍRUS HIV

O envelope protéico do HIV (gp120/gp41) é extensivamente glicosilado. A gp41 tem apenas quatro a cinco carboidratos de ligação, já aproximadamente metade da massa molecular da gp 120 é composta de carboidratos. Ao mesmo tempo em que a glicosilação do HIV através da gp 120 e gp 41 fornece uma barreira para o desenvolvimento da resposta mediada por anticorpos, esta fornece um importante sítio de ataque do sistema imune inato através da ligação da MBL. (SAIFUDDIN et al., 2000). Foi demonstrado que a MBL se liga ao HIV principalmente devido à glicosilação na gp120 (Figura 14).

FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INTERAÇÃO ENTRE A MBL E O HIV



FONTE: JI; GEWURZ; SPEAR, 2005.

3.4.1 Interação entre a MBL e o HIV

As primeiras descrições da interação entre a MBL e o HIV foram feitas por EZEKOWITZ et al. (1989). Nesse estudo verificou-se que a MBL purificada do soro se ligava a células T infectadas pelo HIV, porém não se ligava a células T não infectadas. Mais tarde, demonstrou-se que a gp 120 recombinante se ligava à MBL e comprovou-se o papel dos carboidratos da gp 120 na interação MBL-HIV (HAURUM et al, 1993).

A habilidade de ligação dos virions HIV com a MBL, foi estudada através de testes de captura utilizando-se MBL purificada, que mostraram ligação não só a cepas de HIV de linhagens celulares como também de isolados primários do vírus. A MBL levou à captura do HIV de forma mais eficiente que os anticorpos anti-gp 120 (SAIFUDDIN et al., 2000).

No momento em que as partículas virais brotam da membrana celular a superfície do vírion contém, além da gp120 e gp 41, proteínas da célula hospedeira incluindo as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de

classe I, de classe II e moléculas de adesão (ARTHUR et al., 1992 e FORTIN; CANTIN; TREMBLAY, 1998). Muitas destas proteínas derivadas da célula hospedeira são glicosiladas. Com o objetivo de verificar a contribuição da gp 120/gp41 e das proteínas derivadas da célula hospedeira na ligação com MBL foi desenvolvido um teste utilizando partículas virais com e sem expressão de gp 120/gp 41. A ligação a MBL foi aproximadamente cinco vezes maior quando foram utilizadas partículas de HIV com expressão das glicoproteínas, sugerindo que os carboidratos importantes para a ligação são os expressos nas gp 120 e gp 41 (SAIFFUDIN et al. 2000).

Existem evidências de que as N-glicanas da gp 120 inibem a resposta imune adaptativa ao HIV. Um estudo recente mostrou que pacientes infectados pelo HIV apresentam anticorpos capazes de neutralizar o vírus. Porém, devido a mutações nos sítios N-glicosilados, o HIV escapa dessa neutralização (WEI et al., 2002). Estudos experimentais confirmaram que os oligossacarídeos são um importante mecanismo de escape do vírus à neutralização por anticorpos (CHACKERIAN; RUDENSEY; OVERBAUGH, 1997 e CHENG-MAYER et al., 1999).

3.4.2 Ativação do complemento, opsonização e fagocitose do HIV e MBL

Apesar de ser uma proteína inicial da via das lectinas, poucos estudos foram feitos avaliando a capacidade do HIV ou de células infectadas pelo HIV de ativar o complemento através da MBL. Um dos primeiros estudos utilizou placas adsorvidas com gp 120 recombinante ou isolada de células T infectadas, onde se verificou o depósito dos componentes C3 e C4 do complemento (HAURUM et al., 1993). Entretanto, outro estudo observou que a gp 120 do HIV, quando expressa em células T, não se liga de forma eficiente à MBL ou a ligação à gp 120 não é capaz de ativar a via da lectina de forma eficiente (SAARLOOS; LINT; SPEAR, 1995).

Recentemente verificou-se uma habilidade opsonizante da MBL na interação do HIV com células monocíticas, sugerindo que *in vivo* a MBL pode afetar o *clearance* do HIV do sangue (YING et al., 2004).

A capacidade da MBL de neutralizar o HIV foi estudada pela primeira vez por EZEKOWITZ et al. (1989) que observaram que concentrações altas de MBL eram capazes de neutralizar o HIV. Entretanto, estudos mais recentes verificaram

neutralização de apenas 10-12% de isolado primário do HIV com altas concentrações de MBL (20 µg/ml), sugerindo inibição da neutralização visto que na maioria dos indivíduos a concentração sérica normal não ultrapassa 5 µg/ml (YING et al., 2004; HART; SAIFUDDIN; SPEAR, 2003).

Alguns estudos sugerem que o tratamento de pacientes com drogas que alteram a glicosilação da gp 120 pode resultar em um aumento na destruição e no *clearance* do vírus pela MBL uma vez que a glicosilação tem um papel importante na proteção do vírus contra o “ataque” de anticorpos (HART; SAIFUDDIN; SPEAR, 2003).

3.4.3 Concentração sérica e genótipos da MBL na infecção pelo HIV e AIDS

Há controvérsia nos estudos relacionando o papel da MBL na infecção pelo HIV, visto que alguns resultados são conflitantes e as metodologias utilizadas variam desde a avaliação de concentrações séricas da proteína até sua genotipagem, relacionadas com suscetibilidade ao vírus e/ou progressão da AIDS.

Os primeiros estudos nessa área foram realizados por GARRED et al. (1997) investigando variantes alélicas da região exon 1 do gene MBL e concentração sérica da proteína. Nesse estudo, portadores homocigotos das variantes estruturais do gene apresentaram risco maior de infecção pelo HIV além de sobrevida mais curta após diagnóstico de AIDS. Entretanto, MAAS et al. (1998) observaram uma progressão mais lenta para AIDS nos portadores de variantes alélicas, demonstrando um efeito protetor da MBL.

Outro estudo observou freqüências similares de mutações na região exon 1 do gene MBL num grupo de colombianos infectados pelo HIV e controles, sem associação entre os alelos B, C e D e a suscetibilidade ao vírus (MALIK et al., 2003).

BONIOTTO et al. (2000) estudaram o polimorfismo da região promotora do gene MBL em crianças infectadas pelo HIV através de transmissão vertical e observaram que o polimorfismo do gene tem influência sobre a transmissão vertical da doença e o curso da infecção perinatal. Em outro estudo com crianças brasileiras os mesmos autores analisaram o polimorfismo na região exon 1 do gene e demonstraram que a presença de mutação no gene estrutural confere risco maior de transmissão vertical pelo HIV-1 (BONIOTTO et al., 2003).

Segundo KELLY et al. (2000), pacientes com AIDS homozigotos para mutações estruturais no gene MBL apresentam um risco maior de desenvolver criptosporidiose.

McBRIDE et al. (1998) avaliaram concentrações séricas da MBL e mutações na região exon 1 do gene e não encontraram associação com a progressão da doença e o aparecimento de infecções oportunistas. Entretanto, PROHASZKA et al. (1997) observaram associação entre concentrações séricas em diferentes estágios da infecção pelo HIV e suscetibilidade à doença e progressão da AIDS.

Um estudo realizado em São Paulo com crianças (LIAN et al., 2004) e outro realizado com adultos infectados pelo HIV (NIELSEN et al., 1995) não encontrou associação entre a concentração sérica da MBL e os estágios clínicos da AIDS. SENALDI et al. (1995) observaram concentrações altas da proteína em pessoas infectadas pelo HIV sem diferença entre as classes do CDC enquanto HEGGELUND et al. (2003) observaram este aumento nos estágios mais avançados da doença.

Alguns autores observaram concentrações séricas reduzidas em pacientes HIV positivos com pneumonia, em relação a controles sem infecção bacteriana (HUNDT; HEIKEN; SCHMIDT, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

No período de novembro de 2003 a dezembro de 2004, após aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1), foram investigados 119 pacientes com AIDS, atendidos no Hospital Oswaldo Cruz de Curitiba.

A população estudada foi composta por dois grupos: o grupo de doentes e o grupo controle, formado por doadores de sangue do Hemobanco de Curitiba. Os pacientes e doadores foram incluídos na pesquisa após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

Pacientes que compareceram ao Hospital Oswaldo Cruz para realização da contagem de linfócitos T CD4⁺, tratamento no Hospital Dia ou internamento, foram convidados a participar do estudo. Os pacientes apresentavam diferentes estágios de evolução da doença, variando desde manifestações clínicas moderadas até graves. O critério de inclusão dos pacientes foi idade superior a 18 anos e diagnóstico de AIDS, e para os controles, negatividade no teste anti-HIV. O critério de exclusão foi a apresentação de co-infecção com o vírus da hepatite B e/ou hepatite C.

A coleta de dados foi feita no momento da entrevista com o paciente e através de pesquisa documental baseada nos dados dos prontuários médicos do Hospital Oswaldo Cruz e fichas de investigação dos pacientes junto à Coordenação Estadual de DST/AIDS (Anexo 3).

Foram estudados 119 pacientes emparelhados com 123 controles saudáveis de acordo com idade, sexo e grupo étnico. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (Anexo 4).

4.1.1 Diagnóstico de AIDS

O diagnóstico de AIDS foi realizado de acordo com o Critério CDC Adaptado ou Critério Rio de Janeiro/Caracas, adotados pelo Ministério da Saúde do Brasil para diagnóstico da doença em adultos (BRASIL-MS-CN DST/AIDS, 2004).

Considera-se caso de AIDS todo adulto que apresente evidência laboratorial de infecção pelo HIV confirmada através de dois testes de triagem reagentes ou um teste confirmatório para detecção de anticorpos anti-HIV. Além disto, o caso de AIDS deve apresentar um conjunto de sinais, sintomas e doenças que somem pelo menos dez pontos segundo o Critério Rio de Janeiro/Caracas (Tabela 2) ou pelo menos uma doença indicativa de AIDS e/ou contagem de linfócitos T CD4⁺ abaixo de 350 células/mm³ segundo o Critério CDC Adaptado.

TABELA 2 – ESCALA DE SINAIS, SINTOMAS OU DOENÇAS – CRITÉRIO RIO DE JANEIRO / CARACAS

<i>Sinais/Sintomas/Doenças</i>	<i>Pontos</i>
Sarcoma de Kaposi	10
Tuberculose disseminada / extrapulmonar / pulmonar não-cavitária	10
Candidíase oral ou leucoplasia pilosa	5
Tuberculose pulmonar cavitária não especificada	5
Herpes Zoster em indivíduo com idade menor ou igual a 60 anos	5
Disfunção do sistema nervoso central	5
Diarréia superior a um mês de duração	2
Febre igual ou superior a 38°C por período superior a um mês	2
Caquexia ou perda de peso superior a 10%	2
Astenia superior a um mês de duração	2
Dermatite persistente	2
Anemia e/ou linfopenia e/ou trombocitopenia	2
Tosse persistente ou qualquer pneumonia (exceto tuberculose)	2
Linfoadenopatia maior ou igual 1cm com mínimo dois sítios extra-inguinais superior a um mês de duração	2

FONTE: BRASIL-MS-CN DST/AIDS, 2004.

As doenças indicativas de AIDS em adultos são:

- Câncer cervical invasivo;
- Candidose de esôfago;
- Candidose de traquéia, brônquios e pulmões;
- Citomegalovirose em qualquer outro local que não sejam fígado, baço e linfonodos; como a retinite por citomegalovírus;
- Criptococose extrapulmonar;
- Criptosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
- Herpes simples mucocutâneo, por um período superior a um mês;
- Histoplasmose disseminada (localizada em quaisquer órgãos que não exclusivamente em pulmão ou linfonodos cervicais/hilares);
- Isosporidiose intestinal crônica;
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva (vírus JC, um poliomavírus);
- Linfoma não-Hodgkin de células B (fenótipo imunológico desconhecido) e outros linfomas dos seguintes tipos histológicos: linfoma maligno de células grandes ou pequenas não-clivadas (tipo Burkitt ou não-Burkitt), ou linfoma maligno imunoblástico sem outra especificação;
- Linfoma primário do cérebro;
- Pneumonia por *Pneumocystis carinii*;
- Qualquer micobacteriose disseminada em órgãos outros que não sejam o pulmão, pele ou linfonodos cervicais hilares (exceto tuberculose ou hanseníase);
- Reativação de doença de Chagas (meningoencefalite e/ou miocardite);
- Sepses recorrentes por bactérias do gênero *Salmonella* (não tifóide);
- Toxoplasmose cerebral.

(BRASIL-MS-CN DST/AIDS, 2004).

4.1.2 Classificação da infecção pelo HIV

Os pacientes foram agrupados em categorias clínicas de acordo com a classificação do CDC conforme tabela 3.

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV - CDC, 1992

Categorias clínicas			
	A	B	C
<i>Categorias laboratoriais/ Linfócitos CD4</i>	Assintomático, linfadenopatia persistente ou infecção aguda	Sintomático, não-A, não-C	Condições indicativas de AIDS
(1) $> 500/mm^3$	A1	B1	C1
(2) $200 \text{ a } 499/mm^3$	A2	B2	C2
(3) $< 200/mm^3$	A3	B3	C3

FONTE: RACHID; SCHECHTER, 2003.

A contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 200 células/mm³ é considerada definidora de AIDS, independentemente de manifestações clínicas. Portanto, pacientes incluídos nas categorias A3, B3, C1, C2 e C3 têm diagnóstico da doença.

Na categoria clínica B as condições devem ser atribuídas ao HIV ou ter seu curso modificado pela infecção pelo HIV, por exemplo, candidíase oral ou vaginal, dermatite seborréica, etc.

Na categoria clínica C estão incluídas as doenças indicadoras de AIDS em adultos da revisão da definição de casos do CDC de 1993, acrescidas de câncer cervical invasivo, pneumonia bacteriana recorrente com mais de dois episódios em um ano e tuberculose pulmonar (Anexo 5) (BARTLETT; GALLANT, 2004).

4.2 METODOLOGIA

Neste estudo investigou-se a presença de mutações na região do exon 1 e região promotora Y/X do gene MBL em pacientes com AIDS, utilizando diferentes técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR consiste em uma amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias desta seqüência, através de repetições cíclicas de processos que reproduzem o mecanismo que ocorre normalmente nas células durante a replicação do DNA.

4.2.1 Amostras de sangue

Foram coletados 5 ml de sangue total com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) para a contagem de linfócitos T CD4⁺ e/ou quantificação da carga viral do HIV-1. A extração do DNA foi realizada a partir desta mesma amostra sanguínea não sendo necessária mais uma coleta.

4.2.2 Contagem de linfócitos T CD4⁺

A contagem de linfócitos T CD4⁺ foi realizada no Setor de Imunologia do Laboratório Central do Estado (LACEN) através de citometria de fluxo (*FACS CountTM Reagents, Becton-Dickinson, San Jose, California, USA*).

4.2.3 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por JOHN et al. (1991) e modificada por LAHIRI e NURNBERGER JR (1991) (Anexo 6).

A partir do concentrado de leucócitos do sangue total (*buffy-coat*), foi realizada a lise das hemácias utilizando 10 ml de tampão TKM1 e 100 µl de Nonidet P-40 (Sigma), e em seguida foram realizadas mais duas lavagens com 10 ml de TKM1. O precipitado obtido a partir da lise das hemácias passou pelo processo de lise dos leucócitos com 800 µl de TKM2 e 50 µl de SDS a 10%. Todo o material foi incubado a 56°C até o dia seguinte.

Na segunda etapa da extração utilizou-se elevada concentração de sal para a precipitação das proteínas com adição de 300 μ l de NaCl 6M. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um tubo tipo eppendorf e realizou-se a precipitação do DNA com etanol 100% seguido de lavagem com etanol 70%.

O DNA obtido foi seco à 37°C e foi hidratado em tampão Tris-EDTA (TE). Sua concentração e pureza foram determinadas através da leitura da densidade óptica em biofotômetro Ultra Violeta (*1101 WPA UV*, Linton Cambridge, UK). A medida espectrofotométrica é a quantidade de radiação ultravioleta absorvida pelas bases. No espectrofotômetro a concentração de ácidos nucleicos foi detectada em um comprimento de onda de 260 nm e a concentração de proteínas em 280 nm. A razão entre as D.O. de 260/280 oferece o teor de pureza do DNA. Após a verificação da concentração de DNA as amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C e posteriormente foram submetidas à PCR.

4.2.4 Genotipagem da MBL

A genotipagem das amostras dos pacientes com AIDS foi realizada no Setor de Biologia Molecular do LACEN através de PCR geral e PCR por mutagênese sítio específica (PCR-SDM). Posteriormente foi realizada PCR baseada no polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), para os alelos A, B, C e D do gene, e PCR com seqüência específica de primers (PCR-SSP) para os alelos Y e X.

A tipagem no grupo controle foi realizada na Dinamarca com a colaboração da Dra Rudi Steffensen através de PCR em tempo real (*Real-time PCR*), utilizando o *LightCyclerTM*, um fluorímetro integrado a um termociclador (*Roche Diagnostics*, Mannheim, Germany). Neste ensaio as mutações foram detectadas por PCR e análise das curvas de temperatura de fusão ou *melting* (T_m), através da hibridização com sondas de transferência de energia (FRET). A análise da T_m depende do grau de homologia entre as duas fitas do DNA e fornece um perfil característico para cada genótipo de MBL, sendo que a T_m necessária para separar uma fita dupla pareada de forma perfeita é maior do que a necessária para separar fitas com mutações (STEFFENSEN; HOFFMANN; VARMING, 2003).

4.2.5 Amplificação da região exon 1 do gene

As amplificações foram realizadas no termociclador *Perkin Elmer 9600* (*PE 9600*, Cetus, Norwalk, USA). Todos os *primers* foram sintetizados pela *Invitrogen Life technologies*, São Paulo, Brasil. As PCRs foram realizadas com volume final de 50 µl contendo 2 µl do DNA genômico (concentração entre 250-500 µg/ml); 1 a 2 µl de cada *primer* específico (concentração 100 pmol); 1,5 a 1,75 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de *Taq polimerase* (5 unidades/µl) e tampão PCR concentrado 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; KCl 500 mM) (Anexo 7). Os primers utilizados seguiram o protocolo de MADSEN et al. (1995) (Tabela 4).

O programa de amplificação empregado para PCR geral da região exon1 e para PCR-SDM foi o mesmo, e consistiu de uma graduação com várias temperaturas de anelamento chamada genericamente de *touch-down* (Tabela 5).

Cada PCR foi acompanhada de controles negativos, que consistiram de soluções de reação completas sem o DNA, e positivos, que consistiram dos diferentes haplótipos pesquisados neste estudo (*YA*, *XA*, *YB*, *YC* e *YD*). Os controles positivos, obtidos por seqüenciamento do DNA, foram fornecidos pela Dra Angélica Boldt, da Universidade de Tübingen, na Alemanha.

TABELA 4 – SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR

PCR		PRIMER
<i>PCR GERAL</i>		
PCR EXON1	<i>Forward</i>	5'-AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'
<i>PCR-SDM</i>		
ALELO D	<i>Forward</i>	5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGAAGCG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'

TABELA 5 – PROGRAMA DE PCR *TOUCH-DOWN*

Passo 1	Desnaturação	94°C – 3 minutos
Passo 2	Desnaturação	94°C – 20 segundos
	Anelamento temperatura inicial	60°C – 20 segundos
	Auto incremento - 0,5°C	
	Anelamento temperatura final	50°C – 20 segundos
	Extensão	72°C – 30 segundos
		X 20 ciclos
Passo 3	Desnaturação	94°C – 20 segundos
	Anelamento	50°C – 20 segundos
	Extensão	72°C – 30 segundos
		X 15 ciclos
Passo 4	Extensão	72°C – 7 minutos
Passo 5	Resfriamento	4°C

4.2.6 Detecção e análise do produto amplificado por PCR

A detecção dos produtos da amplificação foi feita através de corrida eletroforética em gel de agarose tipo II a 2% (*Invitrogen Life technologies*), corado com brometo de etídeo numa concentração final de 0,5 µg/ml em tampão tris-borato EDTA (TBE). Para cada corrida eletroforética, alíquotas de 10 µl das reações de PCR foram misturadas com 2 µl de corante azul de bromofenol 0,2% e aplicadas a um gel de agarose, acompanhadas por um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (*DNA ladder 100 pb, Invitrogen Life technologies*). Aplicou-se voltagem de 150V ao gel durante 1 hora para que os fragmentos de DNA migrassem do pólo negativo para o positivo.

A visualização das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados foi realizada em um transiluminador ultravioleta (*Uniscience, Brasil*). A fotodocumentação foi realizada através de câmera digital (*Kodak Digital Science – Eletrophoresis Documentation Analysis System 120, Rochester, NY, USA*). Foram observados fragmentos de 349 pb, correspondentes ao produto amplificado da PCR do exon 1, e de 125 pb, correspondentes ao produto da PCR-SDM. O gel de

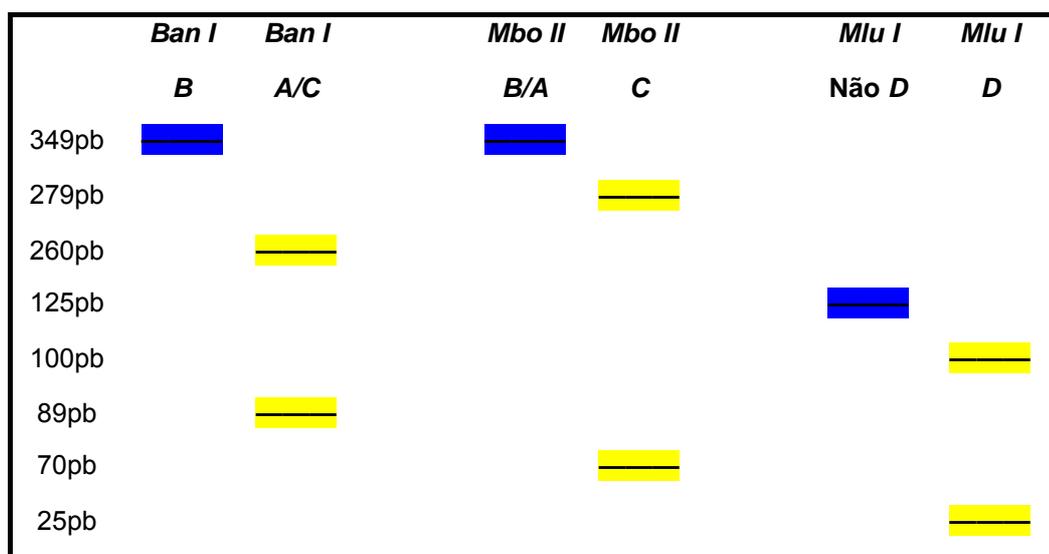
agarose teve a finalidade de confirmar a eficácia das reações de PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados para posterior digestão com as enzimas de restrição.

4.2.7 PCR-RFLP dos produtos da região do exon 1

Os fragmentos de PCR geral e SDM foram submetidos à digestão com enzimas de restrição que reconhecem seqüências específicas de bases no DNA e cortam a molécula no sítio de reconhecimento ou próximo dele (Anexo 7).

O produto de 349 pb da PCR do exon 1 foi digerido com a enzima *Ban I* (*Promega, Madison, USA*) e a *Mbo II* (*Promega, Madison, USA*), e detectado por eletroforese em gel de agarose a 3%, 100V, 2 horas. *Ban I* cliva o alelo A em dois fragmentos de 260 pb e 89 pb e deixa o alelo B sem digerir, enquanto *Mbo II* cliva especificamente o alelo C em dois fragmentos, de 279 pb e 70 pb. O produto da PCR-SDM de 125 pb foi digerido com a enzima *Mlu I* (*Invitrogen Life technologies*) e detectado por eletroforese em gel de agarose a 3%, 100V, 2 horas. *Mlu I* cliva o produto específico para o alelo D de 125 pb em dois fragmentos de 100 e 25 pb (Figura 15). Novamente foi realizada visualização das bandas coradas com brometo de etídeo e fluorescentes sob radiação UV em um transiluminador.

FIGURA 15 – ESQUEMA MOSTRANDO OS PADRÕES DE ELETROFORESE ESPERADOS PARA OS ALELOS A, B, C e D APÓS PCR-RFLP



4.2.8 Amplificação da região promotora do gene

A amplificação da região promotora foi realizada através de PCR-SSP (MADSEN et al., 1995). Esta PCR difere da PCR genérica porque utiliza pelo menos um iniciador com nucleotídeo 3'-terminal complementar a apenas uma das variantes do gene. A reação de polimerização não ocorre caso o *primer* não esteja perfeitamente pareado ao DNA molde porque a *Taq polimerase* não reconhece o iniciador da reação. Desta maneira, a presença ou ausência de produto amplificado indica a presença ou ausência da variante para a qual o iniciador era complementar. A PCR-SSP foi acompanhada da amplificação de um controle interno, o gene da β -globina.

Na região promotora do gene da MBL Y representa o alelo normal enquanto X representa o alelo mutante. Foram realizadas duas PCRs-SSP, uma para amplificar Y e a outra para X. Cada reação de amplificação foi feita com um primer comum as duas e outro diferente apenas por uma base na extremidade 3', além do par de primers para o controle interno (Tabela 6).

As reações de PCR-SSP foram feitas de acordo com o protocolo anteriormente descrito por MADSEN et al. (1995) utilizando programa específico no PE 9600 (Tabela 7) (Anexo 7).

Esta reação vai resultar na amplificação de dois produtos: o controle, que serve como indicativo da eficiência da reação de amplificação, e o produto correspondente à variante X/Y do indivíduo, se esta for complementar ao iniciador específico. Cada PCR foi acompanhada de controles negativos, que são soluções de reação completas, sem o DNA, e de controles positivos tipados anteriormente. O resultado foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose 2,5%, 150V, na forma de uma ou duas bandas coradas com brometo de etídio, fluorescentes sob radiação ultravioleta (Figura 16).

TABELA 6 - SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR – SSP PARA DETECÇÃO DOS ALELOS Y E X

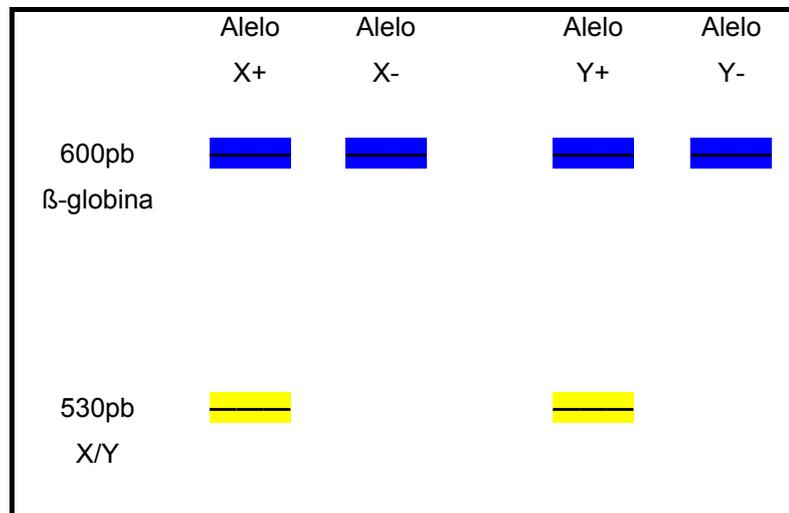
PCR		<i>PRIMER</i>
PCR-SSP		
ALELO X	<i>Forward</i>	5'-CATTGTTCTCACTGCCAC <u>C</u> -3'
ALELO Y	<i>Forward</i>	5'-CATTGTTCTCACTGCCAC <u>G</u> -3'
	<i>Reverse</i>	5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'
PCR controle		
β -globina	<i>Forward</i>	5'-TAGTCCCACTGTGGACTACTT-3'
β -globina	<i>Reverse</i>	5'-CCTGAGAGCTTGCTAGTGATT-3'

Nota: Os nucleotídeos variantes estão sublinhados.

TABELA 7 – PROGRAMA DE PCR-SSP

Passo 1	Desnaturação	94°C – 3 minutos
Passo 2	Desnaturação	94°C – 30 segundos
	Anelamento	65°C – 60 segundos
	Extensão	72°C – 60 segundos
		X 30 ciclos
Passo 3	Extensão	72°C – 7 minutos
Passo 4	Resfriamento	4°C

FIGURA 16 – ESQUEMA MOSTRANDO OS PADRÕES DE ELETROFORESE ESPERADOS PARA OS ALELOS Y E X APÓS PCR-SSP



4.2.9 Análise dos resultados

Após a tipagem dos alelos, formaram-se os diferentes genótipos e haplótipos de MBL, resultantes das combinações entre as variantes estruturais e promotoras em estudo (Tabela 8). Para evitar a análise de pequenos grupos de pacientes, foi adotada uma designação comum para as três mutações da região exon 1, sendo as variantes *B*, *C* e *D* do exon 1 agrupadas em uma única categoria, chamados de alelo “0” (zero), enquanto o alelo normal foi chamado “A” (GARRED et al., 2003). O grupo A/A representa os homocigotos selvagens, o grupo 0/0 representa os homocigotos para mutação e abrange os genótipos B/B, C/C, D/D, B/D, B/C e C/D e o grupo A/0 representa os heterocigotos e abrange os genótipos A/B, A/C e A/D.

Com o objetivo de facilitar a interpretação, foram definidos 6 haplótipos diferentes dentro dos três genótipos estruturais específicos (A/A, A/0 e 0/0) (GARRED et al., 2003).

As concentrações séricas de MBL podem ser avaliadas de forma predita em relação ao genótipo observado. Os haplótipos YA/YA e YA/XA estão associados com altas concentrações da proteína, enquanto que os haplótipos YA/0 e XA/XA estão associados com valores médios e XA/0 e 0/0 com concentrações baixas, respectivamente (GARRED et al., 2003).

TABELA 8 – GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS DE MBL

Genótipos MBL	Haplótipos	Haplótipos
A/A		
	YA/YA	YA/YA
	YA/XA	YA/XA
	XA/XA	XA/XA
A/O		
A/B	YA/YB XA/YB	YA/O
A/C	YA/YC XA/YC	XA/O
A/D	YA/YD XA/YD	
O/O		
B/B	YB/YB	O/O
C/C	YC/YC	
D/D	YD/YD	
B/C	YB/YC	
B/D	YB/YD	
C/D	YC/YD	

4.2.10 Análise estatística

Após a realização da genotipagem de MBL nos casos e controles, os resultados foram organizados em duas planilhas contendo todas as informações necessárias para a análise estatística: idade, sexo, grupo étnico, genótipo, haplótipo, alelos, concentração predita, data do diagnóstico da AIDS, data do óbito e doenças associadas (Anexo 8).

O cálculo da sobrevida após diagnóstico da doença foi realizado considerando-se a diferença entre a data do diagnóstico da AIDS e o dia 31/12/2004. Com relação ao tempo de sobrevida foram avaliados 114 pacientes uma vez que não foram obtidos os dados referentes a cinco deles.

Recorreu-se à análise estatística descritiva dos dados, utilizando-se o teste paramétrico “t de Student” e os testes não-paramétricos “Mann-Whitney” (através do

software “Primer of Biostatistics”) (GLANTZ, 1997), “Qui-Quadrado” e “Exato de Fisher” (através do programa Epi-Info) (CDC, 2004). O nível de significância adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Comparou-se os resultados obtidos através do cálculo da “razão de chances” ou *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DOS ALELOS A, B, C E D DA REGIÃO DO EXON 1

O produto obtido após amplificação da região do exon 1 do gene MBL através da PCR geral correspondeu a um fragmento de 349 pb, o qual foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose (Figura 17). O produto obtido através da PCR-SDM foi específico para o alelo *D* e correspondeu a um fragmento de 125 pb (Figura 18). Posteriormente os fragmentos de DNA amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Ban I*, *Mbo II* e *Mlu I* para identificação dos alelos *A*, *B*, *C* e *D*.

FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% APÓS PCR GERAL PARA REGIÃO DO EXON 1 DO GENE MBL

- 1 – Marcador de Peso Molecular de 100 pb.
- 2 a 10 – PCR positiva para a região do exon 1.
- 11 – Controle negativo.
- 12 – Controle positivo.

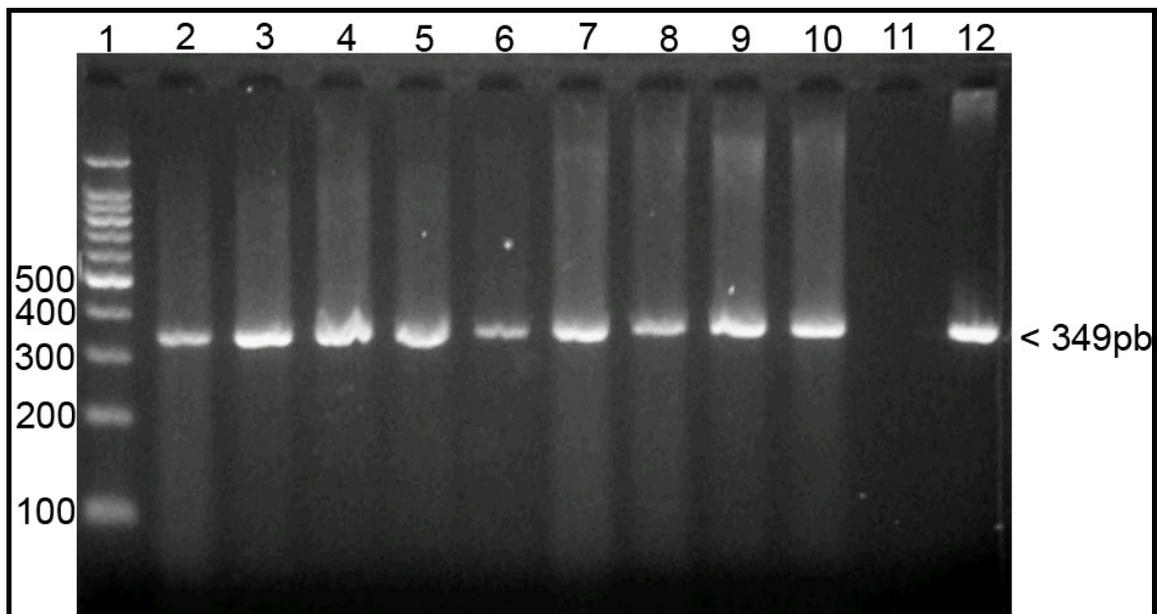
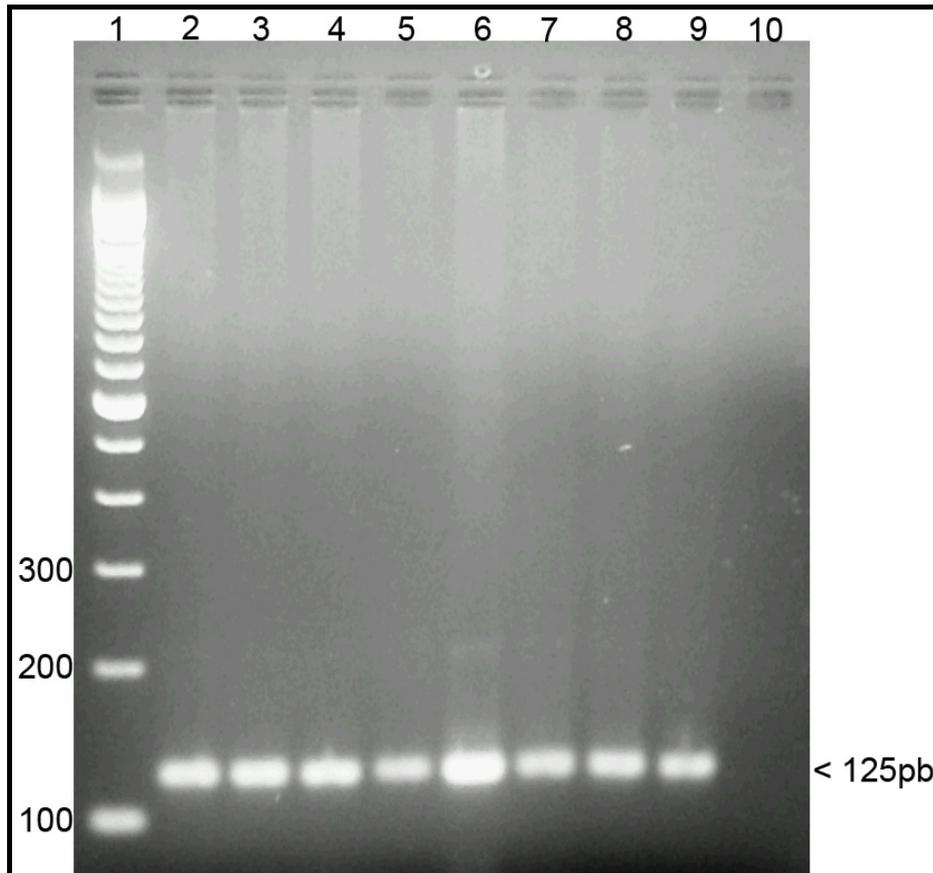


FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% APÓS PCR-SDM PARA O ALELO D DO GENE MBL

- 1 – Marcador de Peso Molecular de 100 pb.
- 2 a 8 – PCR-SDM positiva para o alelo D.
- 9 – Controle positivo.
- 10 – Controle negativo.

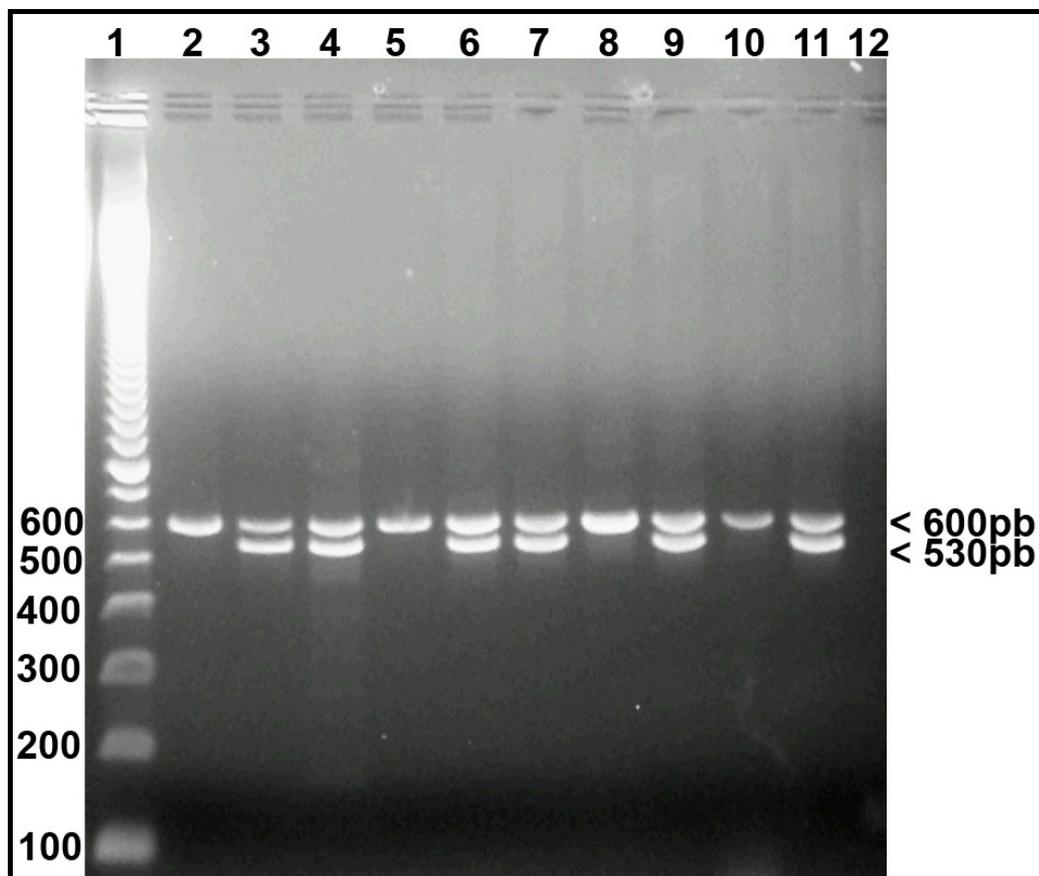


5.2 DETECÇÃO DOS ALELOS Y/X DA REGIÃO PROMOTORA

Foi realizada PCR-SSP para detectar o polimorfismo Y/X utilizando-se duas reações de amplificação para cada paciente, uma delas específica para Y e outra para X. Em todas as reações observou-se um fragmento de 600 pb correspondente à amplificação do controle interno (β -globina), e um fragmento de 530 pb correspondente a Y ou X, dependendo do *primer* utilizado. Nas amostras de heterozigotos Y/X observaram-se fragmentos de 530 pb nas duas reações de amplificação, com os dois *primers* específicos (Figura 19).

FIGURA 19 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% APÓS PCR-SSP PARA OS ALELOS Y E X

- 1 - Marcador de peso molecular de 100 pb.
- 2, 4, 6, 8 e 10 → PCR com primer específico para o alelo X.
- 3, 5, 7, 9 e 11 → PCR com primer específico para o alelo Y.
- 2 e 3 - Paciente homocigoto YY.
- 4 e 5 - Paciente homocigoto XX.
- 6 e 7 - Paciente heterocigoto XY.
- 8 e 9; 10 e 11 – Pacientes homocigotos YY.
- 12 - Controle negativo



5.3 FREQUÊNCIA DOS ALELOS A, B, C, D, Y E X E DOS HAPLÓTIPOS EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

A frequência dos alelos A, B, C e D da região exon 1, dos alelos Y e X da região promotora do gene MBL e dos haplótipos combinados está demonstrada na tabela 12.

A freqüência dos alelos *A*, *B*, *D*, *Y* e *X* não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes e controles ($p=n.s.$). Entretanto, a freqüência do alelo *A* foi menor no grupo de pacientes, sendo esta diferença próxima da significância ($p=0,053$). A freqüência do alelo *0* (*B+C+D*) foi maior no grupo de pacientes e esta diferença também se aproximou da significância ($p=0,053$). Já a freqüência do alelo *C* foi significativamente maior no grupo de pacientes ($p=0,008$).

A freqüência dos haplótipos *XA*, *YA*, *YB* e *YD* não apresentou diferença significativa entre os grupos em estudo (Tabela 9). Já a freqüência do haplótipo *YC* foi maior no grupo de pacientes com AIDS em relação aos controles e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,019$).

TABELA 9 – FREQUÊNCIA DOS ALELOS *A*, *B*, *C*, *D*, *Y* E *X* DO GENE MBL EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

<i>Alelos</i>	<i>Pacientes</i> (<i>n</i> =119)		<i>Controles</i> (<i>n</i> =123)		<i>Valor de</i> <i>p</i> ⁽¹⁾
	<i>N</i> ^o	<i>Freqüência</i>	<i>N</i> ^o	<i>Freqüência</i>	
Total exon 1	238		246		
<i>A</i>	175	0,73	200	0,81	0,053
<i>B</i>	38	0,16	33	0,14	0,506
<i>C</i>	13	0,06	03	0,01	⁽²⁾ 0,008
<i>D</i>	12	0,05	10	0,04	0,766
Alelo 0 (<i>B+C+D</i>)	63	0,27	46	0,19	0,053
Total promotor	238		246		
<i>Y</i>	199	0,84	199	0,81	0,507
<i>X</i>	39	0,16	47	0,19	0,507
Total haplótipos	238		246		
<i>XA</i>	39	0,16	47	0,19	0,507
<i>YA</i>	136	0,57	153	0,62	0,298
<i>YB</i>	38	0,16	33	0,14	0,506
<i>YC</i>	13	0,06	03	0,01	0,019
<i>YD</i>	12	0,05	10	0,04	0,766

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado; (2) Teste estatístico - Exato de Fisher.

5.4 GENÓTIPOS E EXPRESSÃO PREDITA DE MBL NOS PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

Em relação aos genótipos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos sob comparação, quando foram analisadas todas as variantes do exon 1 individualmente e a variante *Y/X* da região promotora (Tabela 10).

Quando os alelos variantes *B*, *C* e *D* foram agrupados em *O* formando os genótipos *A/A*, *A/O* e *O/O*, observou-se um aumento significativo do genótipo *O/O* no grupo de pacientes com AIDS (13/119, 10,9%) em relação ao grupo controle (3/123, 2,4%, $p=0,007$). A frequência dos genótipos *A/A* e *A/O* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com AIDS e controles (Tabela 11, Gráfico 1).

A probabilidade de ocorrência de AIDS em relação aos genótipos da MBL avaliada através da razão de chances (OR), demonstrou que a chance de um indivíduo homocigoto para a mutação *O/O* de adquirir a doença é 4,91 vezes maior do que um indivíduo heterocigoto ou homocigoto selvagem (OR=4,91, IC=1,26 - 2,32) (Tabela 11).

A distribuição dos genótipos combinados pelos haplótipos de expressão predita alta e média de MBL foi similar entre pacientes com AIDS e controles, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Observou-se um aumento dos genótipos *AX/O* e *O/O*, relacionados com expressão predita baixa de MBL nos pacientes (22/119, 18,5%) quando comparados com os controles (13/123, 10,5%, $p=0,117$). Estes resultados, no entanto, não foram estatisticamente significativos, porém indicam que a chance de um indivíduo com uma combinação de haplótipos relacionados à expressão predita baixa de MBL de adquirir a doença é 1,92 vezes maior do que a dos controles (OR=1,92, IC=0,87 - 4,28) (Tabela 12).

TABELA 10 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=119)		Controles (n=123)		Valor de $p^{(1)}$
	Nº	%	Nº	%	
Exon 1					
A/A	69	58,0	80	65,1	0,319
A/B	24	20,2	29	23,6	0,627
A/C	05	4,2	03	2,4	⁽²⁾ 0,343
A/D	08	6,7	08	6,5	0,849
B/B	02	1,7	01	0,8	⁽²⁾ 0,488
B/C	06	5,0	-	-	-
B/D	04	3,4	02	1,6	⁽²⁾ 0,326
C/C	01	0,8	-	-	-
Promotora -221					
X/X	03	2,5	04	3,2	⁽²⁾ 0,518
X/Y	33	27,7	39	31,7	0,592
YY	83	69,8	80	65,1	0,520

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado.

(2) Teste estatístico - Exato de Fisher.

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL AGRUPADOS PARA OS ALELOS VARIANTES DA REGIÃO EXON 1 EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=119)		Controles (n=123)		OR	Valor de $p^{(1)}$
	Nº	%	Nº	%		
Exon 1						
A/A	69	58,0	80	65,1	0,74 (0,43 - 1,29)	0,319
A/O	37	31,1	40	32,5	0,94 (0,53 - 1,67)	0,920
O/O	13	10,9	03	2,4	4,91 (1,26 - 2,32)	⁽²⁾ 0,007

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado.

(2) Teste estatístico - Exato de Fisher.

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL AGRUPADOS PARA EXON 1 EM PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

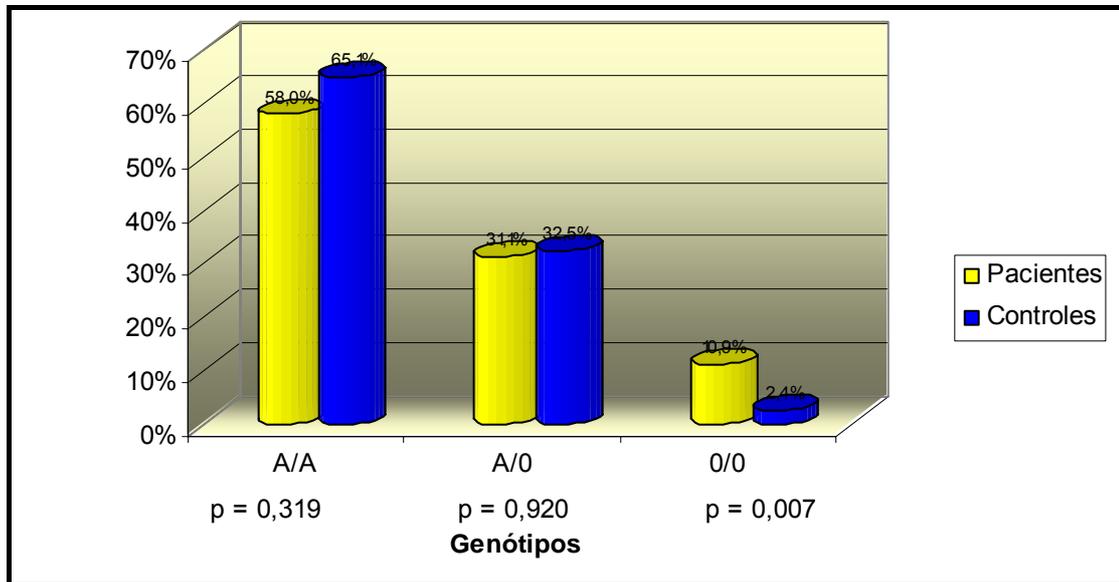


TABELA 12 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS COMBINADOS RELACIONADOS À EXPRESSÃO PREDITA DE MBL ENTRE PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

<i>Expressão predita de MBL</i>	<i>Pacientes (n=119)</i>		<i>Controles (n=123)</i>		<i>OR</i>	<i>Valor de p⁽¹⁾</i>
	<i>Nº</i>	<i>%</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>		
Alta						
AY/AY e AX/AY	66	55,5	74	60,2	0,82 (0,48 - 1,42)	0,542
Média						
AX/AX e AY/O	31	26,0	36	29,3	0,85 (0,47 - 1,55)	0,670
Baixa						
AX/O e O/O	22	18,5	13	10,5	1,92 (0,87 - 4,28)	0,117

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado.

5.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE MBL EM RELAÇÃO AOS DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AIDS

O polimorfismo do gene MBL foi relacionado com o tempo de doença após diagnóstico de AIDS, sobrevivida até o dia 31/12/2004, infecções oportunistas, categorias clínicas do CDC e concentração sérica predita de MBL.

5.5.1 Genótipo de MBL e tempo de doença após diagnóstico da AIDS

Entre os 114 pacientes com data informada de diagnóstico da AIDS, o tempo médio de doença foi de 53,4 meses (mediana de 46,6 meses), com tempo mínimo de 3 dias e máximo de 155,7 meses, desde o diagnóstico até o dia 31/12/2004.

O tempo de doença dos pacientes em relação aos genótipos A/A, A/O e O/O da MBL foi de 52,2, 35,5 e 43,2 meses respectivamente (mediana). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e o tempo de progressão da doença (Tabela 13).

TABELA 13 – RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DE MBL E O TEMPO DE DOENÇA APÓS DIAGNÓSTICO DA AIDS

	Nº	Média	TEMPO DE DOENÇA (em meses)				Valor de $p^{(1)}$
			Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Mediana	
Pacientes	114	53,4	38,7	3,0d	155,7	46,6	
Genótipo							
A/A	66	54,8	39,1	3,0 d	146,1	52,2	0,645
A/O	35	51,6	39,7	2,9	155,7	35,5	0,981
O/O	13	51,3	36,0	6,4	101,0	43,2	0,916

NOTA: (1) Teste estatístico - Mann-Whitney.

5.5.2 Tempo de sobrevida dos pacientes e óbito

O tempo médio de sobrevida dos pacientes que foram a óbito até 31/12/2004 foi de 38 meses com mediana de 14,3 meses (n=18), valor esse inferior ao observado nos pacientes que permaneceram vivos até essa data, com média de 56,3 meses e mediana de 49,2 meses. Esses resultados foram estatisticamente significantes ($p=0,012$) (Tabela 14).

TABELA 14 – SOBREVIDA E ÓBITO DOS PACIENTES DESDE O DIAGNÓSTICO DA AIDS

	Nº	%	SOBREVIDA (em meses)					Valor de p ⁽¹⁾
			Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Mediana	
Pacientes	114	100	53,4	38,7	3,0d	155,7	46,6	
Óbito								
Sim	18	15,8	38,0	46,5	3,0 d	155,7	14,3	0,012
Não	96	84,2	56,3	36,6	1,1	146,1	49,2	

NOTA: (1) Teste estatístico - Mann-Whitney.

5.5.3 Genótipo de MBL e óbito dos pacientes

Entre os 119 pacientes avaliados, 18 foram a óbito (18/119, 15,1%) até a data de 31/12/2004. A média da idade dos pacientes que foram a óbito foi de 40,9 anos, enquanto que a dos pacientes vivos até esta data foi de 38 anos ($p=0,908$) (Tabela 15).

Dos 18 pacientes que foram a óbito até 31/12/2004, onze tinham o genótipo A/A (11/18, 61,1%), cinco o genótipo A/O (5/18, 27,8%) e dois o genótipo O/O (2/18, 11,1%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos da MBL e a ocorrência do óbito nos pacientes com AIDS até a data analisada ($p=n.s.$) (Tabela 16).

TABELA 15 - IDADE DOS PACIENTES COM AIDS EM RELAÇÃO AO ÓBITO ATÉ 31/12/2004

IDADE								
	Nº	%	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Mediana	Valor de p⁽¹⁾
Pacientes	119	100	38,4	10,5	19,0	68,0	-	
Óbito								0,908
Sim	18	15,1	40,9	15,4	22,0	68,0	-	
Não	101	84,9	38,0	9,4	19,0	65,0	34,5	

NOTA: (1) Teste estatístico - Mann-Whitney.

TABELA 16 – RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DE MBL E O ÓBITO DOS PACIENTES COM AIDS

ÓBITO					
Genótipo	Sim (n=18)		Não (n=101)		Valor de p^(1,2)
	Nº	%	Nº	%	
A/A	11	61,1	58	57,4	0,974
A/0	05	27,8	32	31,7	0,957
0/0	02	11,1	11	10,9	⁽²⁾ 0,621

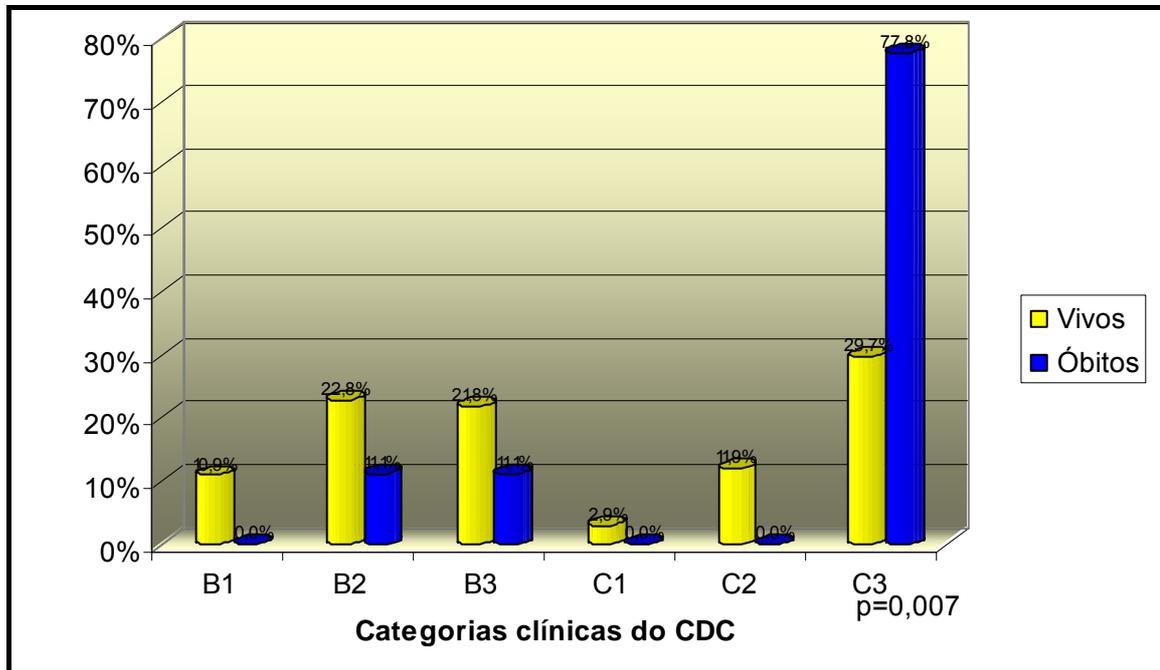
NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado.

(2) Teste estatístico - Exato de Fisher.

5.5.4 Distribuição dos pacientes em categorias clínicas do CDC em relação ao óbito

Entre os pacientes que foram a óbito, 14 (14/18, 77,8%) faziam parte da categoria clínica C3 do CDC, dois (2/18, 11,1%) faziam parte da categoria B2 e os outros dois (2/18, 11,1%) faziam parte da categoria B3. Não foram registrados óbitos nas demais categorias clínicas do CDC. O número de óbitos foi significativamente maior na categoria C3 em relação às outras categorias ($p=0,007$) (Gráfico 2).

GRÁFICO 2 – NÚMERO DE ÓBITOS DE PACIENTES COM AIDS ATÉ 31/12/2004 EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC



5.5.5 Relação entre o genótipo de MBL e as categorias clínicas do CDC

Verificou-se um aumento significativo na freqüência de pacientes com genótipo A/A e categoria C do CDC (41/69, 59,4%) em relação aos pacientes com genótipo A/A e categoria clínica B (28/69, 40,6%, $p=0,011$). Por outro lado, pacientes com genótipo “não A/A” (A/0 e 0/0) foram mais freqüentes na categoria clínica B (32/50, 65,3%) em relação ao mesmo genótipo na categoria C (18/50, 34,7%) (Tabela 17).

TABELA 17 – GENÓTIPOS DE MBL EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC

Categoria Clínica CDC	Genótipo A/A		Genótipos não A/A (A/O e O/O)		Total pacientes		Valor de p⁽¹⁾
	<i>Nº</i>	%	<i>Nº</i>	%	<i>Nº</i>	%	
B (B1+B2+B3)	28	40,6	32	64,0	60	50,4	0,019
C (C1+C2+C3)	41	59,4	18	36,0	59	49,6	
Total genótipos	69	100	50	100	119	100	

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado

5.5.6 Expressão predita de MBL em relação às categorias clínicas do CDC

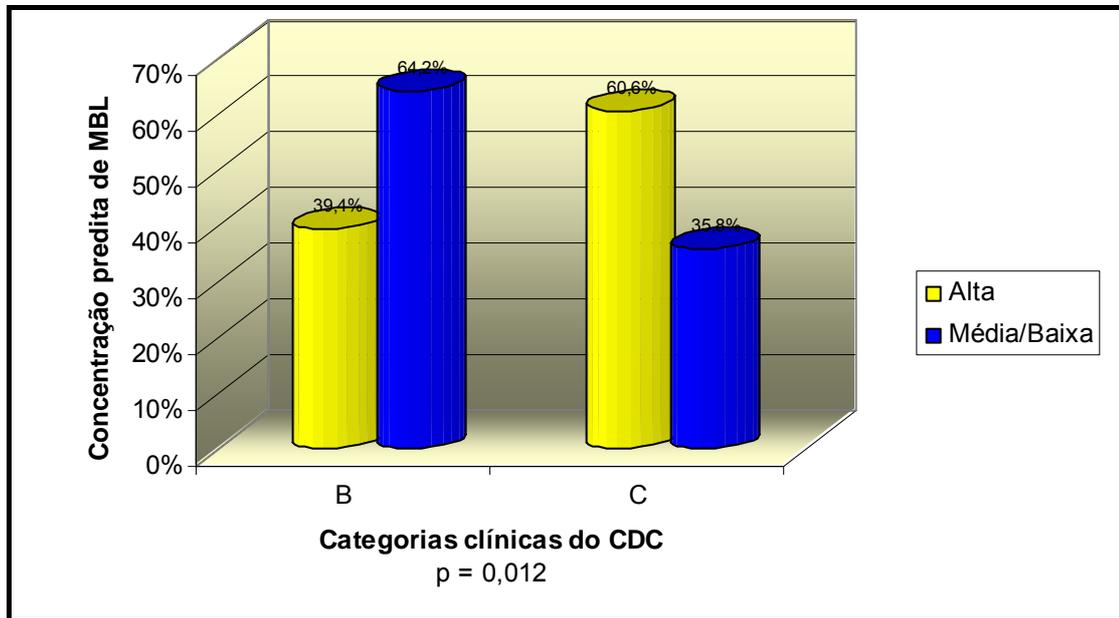
O número de pacientes com expressão predita alta de MBL foi superior naqueles pacientes pertencentes ao grupo C do CDC (40/66, 60,6%), em relação aos pacientes pertencentes ao grupo B (26/66, 39,4%, $p=0,012$). Por outro lado, a concentração predita média/baixa de MBL foi superior no grupo de pacientes da categoria B do CDC (34/53, 64,2%), em relação à frequência no grupo C (19/53, 35,8%) (Tabela 18, Gráfico 3).

TABELA 18 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA PREDITA DE MBL EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC

Categoria Clínica CDC	Concentração predita de MBL						Valor de p⁽¹⁾
	Alta (n=66)		Media/baixa (n=53)		Total (n=119)		
	<i>Nº</i>	%	<i>Nº</i>	%	<i>Nº</i>	%	
B (B1+B2+B3)	26	39,4	34	64,2	60	50,4	0,012
C (C1+C2+C3)	40	60,6	19	35,8	59	49,6	
Total	66	100	53	100	119	100	

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado.

GRÁFICO 3 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA PREDITA DE MBL EM RELAÇÃO ÀS CATEGORIAS CLÍNICAS DO CDC



5.5.7 Doenças indicativas de AIDS nos pacientes pertencentes à categoria C do CDC

Entre as 79 doenças indicativas de AIDS que ocorreram nos 59 pacientes pertencentes ao grupo C do CDC, a mais freqüente foi a infecção pelo *Pneumocystis carinii* (20/79, 25,3%). A maioria dos pacientes apresentou uma única doença definidora (43/59, 72,9%), enquanto que 20,3% (12/59) apresentaram duas infecções e 6,8% (4/59) apresentaram três (Tabela 19).

Observou-se um aumento significativo de doenças indicativas de AIDS nos pacientes que foram a óbito. Entre os pacientes que foram a óbito até a data de 31/12/2004, 77,8% apresentaram doenças indicativas de AIDS (14/18) enquanto que 44,6% dos pacientes que permaneceram vivos no período analisado desenvolveram essas infecções (45/101, p=0,009) (Tabela 20).

A probabilidade de ocorrência de doença definidora de AIDS em relação aos genótipos de MBL, avaliada através da razão de chances (OR), demonstrou a chance 2,60 vezes maior de um indivíduo com genótipo A/A adquirir doenças oportunistas em relação aos outros genótipos (OR= 2,60, IC=1,15-5,93) (Tabela 21).

TABELA 19 – DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS OBSERVADAS NOS PACIENTES DA CATEGORIA CLÍNICA C DO CDC

<i>Doenças indicativas de AIDS</i>	<i>Categoria C</i>			<i>Infecções</i>	
Tipo	C1	C2	C3	Nº	%
Candidíase de esôfago	-	01	09	10	12,6
Criptococose	01	01	08	10	12,6
Encefalopatia pelo HIV	-	02	05	07	8,9
Infecção por <i>Herpes simples</i>	01	02	02	05	6,3
Leucoencefalopatia	-	-	01	01	1,3
Pneumonia por <i>P. carinii</i>	02	02	16	20	25,3
Retinite por citomegalovírus	02	03	06	11	14,0
Sarcoma de Kaposi	-	02	04	06	7,6
Toxoplasmose de SNC	-	-	08	08	10,1
Tuberculose disseminada	-	-	01	01	1,3
Total	06	13	60	79	100

<i>Doenças indicativas de AIDS</i>	<i>Categoria C</i>			<i>Pacientes</i>	
Número	C1	C2	C3	Nº	%
Uma	01	11	31	43	72,9
Duas	01	01	10	12	20,3
Três	01	-	03	4	6,8
Total	3	12	44	59	100

TABELA 20 – DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS NOS PACIENTES DA CATEGORIA C DO CDC EM RELAÇÃO AO ÓBITO

Doenças indicativas de AIDS	Vivos		Óbitos		Total		Valor de p ⁽¹⁾
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Sim	45	44,6	14	77,8	59	49,6	0,009
Não	56	55,4	04	22,2	60	50,4	
Total	101	100	18	100	119	100	

NOTA: (1) Teste estatístico - Exato de Fisher.

TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE MBL EM RELAÇÃO ÀS DOENÇAS INDICATIVAS DE AIDS

Genótipo	Doença definidora de AIDS				OR	Valor de p
	Sim		Não			
	Nº	%	Nº	%		
A/A	41	69,5	28	46,7	2,60 (1,15-5,93)	0,019
A/O	13	22,0	24	40,0	0,42 (0,18-1,02)	0,055
O/O	5	8,5	8	13,3	0,60 (0,16-2,21)	0,578
Total	59	100	60	100		

NOTA: (1) Teste estatístico - Qui-quadrado.

6 DISCUSSÃO

Estudos prévios relacionando MBL e infecção pelo HIV foram baseados na análise do polimorfismo na região do exon 1 do gene ou em uma única quantificação sérica de MBL, uma vez que a concentração desta proteína é considerada relativamente constante no decorrer da doença.

O presente estudo é inédito ao associar a pesquisa de mutações na região promotora Y/X do gene MBL, além das mutações na região do exon 1, em pacientes com AIDS. O único estudo que analisou ambas regiões foi realizado com crianças brasileiras HIV positivas (BONIOTTO et al., 2000).

Atualmente, vários métodos baseados em PCR podem ser utilizados na rotina para pesquisa de mutações conhecidas no gene MBL, incluindo PCR baseada no polimorfismo conformacional de fita simples (PCR-SSCP), PCR com hibridização alelo específica (PCR-ASO), PCR-SSP, PCR-SDM, PCR-RFLP e PCR em tempo real (PCR *real time*) (MADSEN et al., 1995; LIPSCOMBE et al., 1992, 1996; MULLIGHAN et al., 2000; STEFFENSEN et al., 2000; BOLDT e PETZL-ERLER, 2002). As freqüências das variantes do gene obtidas por PCR-SSP são 100% comparáveis com os resultados obtidos por PCR-RFLP, PCR-SDM e PCR em tempo real (STEFFENSEN et al., 2000; STEFFENSEN; HOFMANN; VARMING, 2003).

6.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ALELOS E HAPLÓTIPOS DO GENE MBL

Ao analisarmos as freqüências alélicas de MBL nos grupos de pacientes com AIDS e controles saudáveis, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos alelos *A*, *B*, *D*, *Y* e *X* entre os grupos. Entretanto, a freqüência do alelo *C* foi significativamente maior no grupo de pacientes ($p=0,008$). Neste alelo, a troca de uma única base no códon 57 leva à substituição de um aminoácido e desestabilização da estrutura colagenosa da MBL, prejudicando a formação de polímeros. Portanto, sugere-se que a freqüência aumentada deste alelo no grupo de pacientes é um fator responsável pela redução da concentração sérica de MBL e, portanto, deficiência da proteína, com redução ou incapacidade de ativação da via da lectina do complemento.

Esses resultados sugerem que a deficiência de MBL, determinada pelo alelo C, está associada com o desenvolvimento da AIDS.

Conforme observado em trabalhos anteriores (GARRED et al., 1995), as variantes da região promotora e estrutural do gene MBL encontram-se em desequilíbrio de ligação, sendo que o alelo A é encontrado associado a X ou Y e os alelos B, C e D somente se associam a Y. Desta forma, neste estudo foram inferidos os haplótipos XA, YA, YB, YC e YD. A frequência dos haplótipos formados pela combinação dos alelos foi semelhante entre os grupos de pacientes e controles, exceto em relação ao haplótipo YC, cuja frequência foi maior no grupo de pacientes. ($p=0,019$). Este fato já era esperado uma vez que o alelo C apresentou uma frequência significativamente maior em relação aos controles e somente é observado associado ao alelo Y.

6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS E A CONCENTRAÇÃO PREDITA DE MBL NOS PACIENTES COM AIDS E CONTROLES

De acordo com trabalhos anteriores, todos os alelos variantes do exon 1 têm um efeito importante na determinação das concentrações séricas de MBL e podem ser agrupados em uma única categoria chamada 0 (GARRED et al., 1997). Assim, os alelos D, B e C foram denominados 0, formando os genótipos A/A, A/0 e 0/0.

Ao analisar-se os genótipos de MBL verificou-se um aumento significativo do genótipo 0/0, homocigoto para mutação na região estrutural, no grupo de pacientes com AIDS em relação ao grupo controle (10,9% vs 2,4%, $p=0,007$). Observou-se que indivíduos com genótipo 0/0 apresentam um risco 4,91 vezes maior de adquirir a infecção pelo HIV em relação aos indivíduos com genótipo A/A e A/0 (OR=4,91, IC=1,26-2,32) Além disso, a observação de uma frequência baixa de homocigotos entre os controles saudáveis fornece suporte à idéia de que a deficiência da MBL aumenta o risco de infecção pelo HIV.

Desta forma, sugere-se que os alelos variantes, responsáveis pela deficiência da proteína, quando associados em homocigose, têm uma influência importante no estabelecimento da doença devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa, onde a MBL tem importante papel como ativação do complemento, opsonização e fagocitose. O papel da MBL na resposta imune inata tem sido

descrito como um ante-anticorpo já que sua ação é definida nos primeiros minutos ou horas do contato com o antígeno, antes do estabelecimento de uma resposta imune adaptativa efetiva.

Estudo prévio realizado na Dinamarca com um grupo de homossexuais masculinos infectados pelo HIV encontrou uma associação semelhante para o genótipo 0/0, observando uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes e o grupo de controles saudáveis (8% vs 0,8%, $p=0,005$) (GARRED et al., 1997). O estudo de GARRED foi o pioneiro investigando o polimorfismo do gene MBL em pacientes dinamarqueses HIV positivos, tendo pesquisado apenas as mutações na região exon 1 do gene. Entretanto, MALIK et al. (2003) não observaram associação entre as variantes alélicas e a suscetibilidade ao vírus em pacientes colombianos HIV positivos heterossexuais. Os motivos para estes achados conflitantes ainda não estão bem esclarecidos, mas podem ser devido às diferenças étnicas entre as populações estudadas.

Não se sabe se as variantes alélicas da MBL estão associadas diretamente à suscetibilidade ao HIV ou se os indivíduos homocigotos para os alelos variantes estão mais predispostos a outras infecções que podem aumentar a suscetibilidade à infecção pelo HIV. Alguns estudos avaliaram o papel das mutações no gene que leva à síntese do receptor de quimiocina CCR5 e confere proteção contra a infecção. Uma suscetibilidade a doenças venéreas, por exemplo, pode tornar a mucosa genital mais vulnerável a co-infecções. Vários fatores, inclusive genéticos, são importantes nesse contexto, visto que a MBL por si não leva a doença.

De qualquer forma existem evidências de que a MBL tem um papel importante na infecção pelo HIV. Os oligossacarídeos presentes na gp 120 do HIV ligam-se à MBL e esta ligação leva a ativação da via da lectina do complemento e pode induzir à neutralização viral (EZEKOWITZ et al., 1989; HAURUM et al., 1993). Deste modo, as concentrações baixas da MBL e a conseqüente redução da ativação do complemento podem prejudicar a neutralização viral e a fagocitose, contribuindo para o aumento da carga viral.

Foi demonstrado que, embora a MBL se ligue a diferentes cepas do HIV, esta ligação “per se” não resultou na neutralização do vírus (YING et al., 2004; HART; SAIFFUDIN; SPEAR, 2003). A razão disto ainda não está bem esclarecida e serão necessários novos estudos a respeito da neutralização viral e ativação do

complemento após ligação da MBL ao HIV. É possível que a MBL tenha um papel importante no *clearance* do HIV da circulação.

Ao analisar-se as concentrações preditas de MBL determinadas por haplótipos combinados YA/YA, XA/YA, YA/YA, YA/0, XA/0 e 0/0 avaliou-se também a influência das mutações na região promotora X/Y do gene sobre a concentração sérica da proteína. Os alelos da região exon 1 do gene têm a maior influência sobre a determinação da concentração sérica de MBL, entre os alelos da região promotora, o papel mais expressivo cabe a Y/X (GARRED et al., 2003). Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os genótipos combinados de expressão predita alta, média e baixa; observou-se uma proporção maior dos genótipos de concentração predita baixa, XA/0 e 0/0, nos pacientes com AIDS (18,5% vs 10,5%, OR=1,92, IC=0,87-4,28). O alelo variante X, formando o haplótipo XA e associado a um alelo variante 0 resulta no genótipo combinado XA/0 e tem a mesma influência na concentração de MBL que dois alelos 0, formando o genótipo 0/0. Este resultado sugere o papel importante da mutação X na região promotora, quando associado a um alelo estrutural variante.

Uma avaliação precisa da influência do genótipo na concentração sérica da proteína poderá ser confirmada em estudos futuros através de testes de ELISA para detecção de MBL no plasma dos pacientes deste estudo.

6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE MBL E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AIDS

6.3.1 Genótipo de MBL e o tempo de doença após diagnóstico da AIDS

Não foi observada associação com os genótipos de MBL analisando-se o tempo de doença desde o diagnóstico da AIDS até o dia 31/12/2004, ou até a data do óbito, em 114 pacientes.

Este resultado, no entanto, pode ser devido a um viés pois nem sempre a data do diagnóstico da AIDS corresponde ao início da doença. No caso de pacientes que fazem acompanhamento médico regular desde o momento em que são informados sobre sua soro-positividade ao HIV, a data do início da doença é bem definida, entretanto, há casos em que os pacientes tomam conhecimento de que são

portadores do HIV quando a doença já está em uma forma clínica avançada. Neste caso, o início da doença poderia ser anterior a data do diagnóstico, prejudicando a avaliação do tempo decorrido a partir do diagnóstico. Além disto, o tempo de doença é uma variável que depende de inúmeros fatores, entre eles a aceitação da doença, a adesão ao tratamento, a disponibilidade da medicação e o serviço de saúde.

O desvio padrão observado neste estudo foi alto, com um registro de tempo de doença de apenas 3 dias após o diagnóstico e outro de até 155,7 meses. Observou-se que a mediana do tempo de doença foi significativamente menor nos pacientes que foram a óbito (14,3 meses, $p=0,012$), entretanto, este resultado não está relacionado com o genótipo da MBL.

Neste estudo não investigou-se o tempo de progressão desde a data da soroconversão até o início da AIDS porque, na maioria dos casos, este dado era desconhecido, impossibilitando essa avaliação. Além disto, alguns pacientes realizaram a sorologia para o HIV quando já estavam doentes, a fim de confirmar o diagnóstico.

Entretanto, MAAS et al. (1998) pesquisaram um grupo de homossexuais masculinos na Holanda com data de soroconversão bem documentada, resultante do acompanhamento trimestral de pacientes soro-negativos e soro-positivos. Estes autores observaram um tempo maior desde a soroconversão até o início da doença para os pacientes com alelos variantes (*O*), sugerindo um efeito protetor das variantes estruturais do gene MBL na progressão para a AIDS. GARRED et al. (1997), por outro lado, não encontraram nenhuma associação entre o tempo de evolução para AIDS e os genótipos de MBL, mas este resultado pode ser devido a um viés uma vez que a data da soroconversão dos pacientes do estudo não era conhecida.

6.3.2 Genótipo de MBL e óbito

Quando analisou-se o genótipo de MBL em relação ao óbito não observou-se associação entre as variáveis genótipo de MBL e óbito. No entanto, é importante considerar que os pacientes foram observados por um período curto de tempo, desde o início do estudo, em outubro de 2003, até o dia 31/12/2004. A fim de determinar se existe influência do genótipo de MBL na sobrevivência dos pacientes com

AIDS, esses serão avaliados anualmente por um período de cinco anos e os resultados serão então divulgados.

GARRED et al. (1997) registraram 53 óbitos em um grupo de 61 pacientes com AIDS após um período de acompanhamento de 10 anos. Em seu estudo, observou-se uma chance duas vezes maior de óbito em pacientes portadores de alelos variantes, tanto homocigotos como heterocigotos em relação aos pacientes com genótipo A/A (OR=2,0, IC=1,3-4,5). É importante considerar que o estudo de GARRED foi realizado de 1985 a 1995, antes do início da terapia altamente potente (HAART) que aumentou a sobrevivência dos pacientes com AIDS.

6.3.3 Associação entre os genótipos de MBL e as categorias clínicas do CDC

Neste estudo não foram observados pacientes pertencentes à categoria clínica A do CDC, provavelmente porque a seleção desses foi realizada somente no Hospital Oswaldo Cruz. Além de pacientes HIV positivos internados, o hospital realiza o tratamento de infecções oportunistas e outras doenças relacionadas à AIDS no Hospital-Dia. Os pacientes investigados pertenciam às categorias B e C do CDC e foram classificadas de acordo com o perfil de CD4⁺ do momento da coleta. Portanto, alguns pacientes estavam imunologicamente estáveis e não apresentavam infecções oportunistas, apesar de já terem diagnóstico de AIDS.

Verificou-se uma frequência significativamente maior de óbitos nos pacientes incluídos na classe C3 do CDC, justificada pelo fato de que nesta categoria estão agrupados os pacientes com doença mais grave, com infecções oportunistas e contagem de linfócitos CD4⁺ inferior a 200 células/mm³.

Observou-se uma frequência significativamente maior de pacientes com genótipo A/A pertencentes ao grupo C, enquanto pacientes com genótipo A/0 e 0/0 foram mais frequentes no grupo B. Este resultado está de acordo com o trabalho de HEGGELUND et al. (2003) que observaram um aumento na concentração sérica de MBL, em paralelo com a progressão da doença, em pacientes adultos infectados pelo HIV. Este aumento foi acompanhado de uma maior ativação da via da lectina do complemento nos pacientes do grupo C do CDC.

Outro estudo realizado com pacientes pediátricos brasileiros portadores do vírus HIV observou valores aumentados de MBL sérica nos estágios mais

avançados da doença, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa. Valores baixos de MBL foram encontrados em crianças sintomáticas e assintomáticas dificultando a conclusão de que concentração baixa de MBL poderia proteger contra progressão da doença (LIAN et al., 2004).

Concentrações séricas altas, determinadas por haplótipos combinados de alta expressão predita (YA/YA e XA/YA) e pelo genótipo A/A, sugerem a ocorrência de um estímulo na ativação do complemento mediado pela MBL durante a infecção crônica pelo HIV e progressão da doença. A elevação tanto da MBL sérica como de sua função poderia ser considerada como parte da resposta aguda à doença crônica, uma vez que a MBL é uma proteína de fase aguda.

Estudos prévios demonstraram associação entre concentrações séricas altas de MBL e doenças crônicas, sugerindo um efeito pró-inflamatório da proteína na exacerbação de doenças como a artrite reumatóide e a doença reumática cardíaca (GARRED et al., 2000; SCHAFRANSKI et al., 2004). Há controvérsias em relação ao papel da MBL na progressão da AIDS. A MBL pode se ligar à gp 120 do envelope dos vírions e ativar a via das lectinas do complemento resultando em opsonização do vírus ou a ativação da via das lectinas pode ser desencadeada por gp 120 livres aderidas à superfície de linfócitos CD4+, facilitando sua destruição e progressão para AIDS.

Apesar da resposta da MBL variar muito e poder ser resultado de diferenças genéticas ou constitucionais, esta parece estar ligada ao curso da doença. É possível que, em pacientes com carga viral elevada, altas concentrações de MBL atuem recrutando mediadores inflamatórios e promovendo imunodeficiência de células CD4⁺ e altos níveis de replicação viral. Nestes casos, as propriedades antivirais e de proteção da MBL poderiam ser prejudicadas pelos efeitos negativos da ativação exacerbada do complemento via MBL. Portanto, é possível que um aumento excessivo nos valores séricos de MBL se torne desfavorável no estágio tardio de infecção pelo HIV, como já foi observado para outros microorganismos intracelulares como *Mycobacterium leprae*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania braziliensis* (GARRED et al., 1994; SANTOS et al., 2001; AMBROSIO, 2005).

O polimorfismo de MBL e a ativação da via das lectinas do complemento podem estar envolvidos na fisiopatologia da infecção pelo HIV. As diferentes concentrações séricas de MBL estão diretamente ligadas a variações genéticas na

região exon 1 e promotora do gene. Entretanto, a capacidade de ativar a via das lectinas parece variar entre os indivíduos e também ser devido a outros fatores genéticos desconhecidos. Além disto, deve-se considerar outros fatores como a carga viral e a terapia em uso.

6.3.4 Doenças indicativas de AIDS

Neste estudo, a doença indicativa de AIDS observada com maior frequência foi a pneumonia por *Pneumocystis carinii* em 33,9% dos 59 pacientes. Nos países desenvolvidos, antes do uso rotineiro de profilaxia para pneumocistose, a pneumonia por *Pneumocystis carinii* era a infecção indicativa de AIDS em 65% dos casos e ocorria em mais de 80% dos pacientes em algum momento da doença. Atualmente, nos Estados Unidos, este valor caiu para 38%. No Brasil, a frequência relatada de pneumocistose é menor, em parte pela dificuldade da confirmação do diagnóstico ou até por subnotificação.

Entre os 18 pacientes que foram a óbito, 77,8% (14/18) apresentaram infecções oportunistas associadas à contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 200 células/mm³, enquanto outros 22% (4/18) não apresentaram infecções oportunistas. Entre os pacientes sem diagnóstico de doenças indicativas de AIDS que foram a óbito, dois tinham contagem de linfócitos inferior a 200 células/mm³ e outros dois tinham contagem inferior a 500 células/mm³ na data da coleta. Entretanto, no período de evolução da doença até o óbito estes dois pacientes também apresentaram queda dos linfócitos até uma contagem inferior a 50 células/mm³. Além disto, alguns pacientes podem evoluir com síndrome consuntiva progressiva e grave chegando ao óbito sem desenvolver infecções ou neoplasias definidoras de AIDS (RACHID; SCHECHTER, 2003).

Estes dados corroboram com a literatura observando que a principal causa de óbito nos pacientes infectados pelo HIV são as infecções oportunistas e que a contagem de linfócitos inferior a 200 células/mm³ confere grande risco de progressão para morte a curto ou médio prazo.

A observação de um aumento significativo do genótipo A/A de MBL nos pacientes com doenças indicativas de AIDS (41/59, 69,5%, p=0,019) sugere um efeito prejudicial do genótipo selvagem nos pacientes com a doença instalada, na

categoria de maior gravidade na classificação clínica do CDC. Pacientes homocigotos A/A apresentaram um risco 2,60 vezes maior de adquirir infecções oportunistas (OR= 2,60, IC=1,15-5,93). Este dado corrobora com os resultados obtidos por HEGGELUND et al. (2003) detectando concentrações séricas aumentadas nos pacientes da categoria C do CDC. Durante a fase sintomática da doença, uma ativação acentuada da via da lectina, associada ao genótipo A/A, pode favorecer a entrada de organismos intracelulares nas células e o surgimento de infecções oportunistas.

Por outro lado, a proporção maior de pacientes com genótipo A/O e O/O (32/60, 53,3%) no grupo B do CDC pode sugerir que a deficiência da MBL e de menor ativação da via da lectina confere uma proteção contra o aparecimento de doenças indicativas de AIDS, que levam a uma classificação na categoria C. Neste caso a presença de mutações no gene não estaria colaborando para entrada de microorganismos oportunistas, devido à deficiência de MBL.

Finalmente, sugere-se que a deficiência de MBL, determinada através do genótipo O/O, confere maior suscetibilidade à infecção pelo HIV e desenvolvimento de AIDS, enquanto que genótipos homocigotos selvagens A/A, associados com concentrações altas da proteína, podem exercer importante papel pró-inflamatório nos estágios avançados da doença.

7 CONCLUSÕES

- A frequência significativamente aumentada do alelo *C* e do haplótipo *YC* nos pacientes com AIDS pode ser responsável pela redução na concentração sérica e deficiência de MBL e pode estar associada com o desenvolvimento da doença;
- Os pacientes com genótipo homozigoto para mutação *0/0* apresentaram associação positiva com a infecção pelo HIV ($p=0,007$) e um fator de risco 4,91 vezes maior de adquirir a doença;
- Entre os pacientes com doenças indicativas de AIDS observou-se uma frequência aumentada do genótipo homozigoto selvagem *A/A* conferindo um risco 2,60 vezes maior para infecções oportunistas;
- Os genótipos homozigotos selvagens *A/A* apresentaram associação positiva com a categoria mais grave do CDC ($p=0,019$), sugerindo um efeito pró-inflamatório de MBL no estágio tardio da infecção pelo HIV;
- Apesar de não ter sido significativo, a presença dos haplótipos combinados de expressão predita baixa de MBL (*AX/0* e *0/0*) em portadores da infecção pelo HIV, conferiu um risco 1,92 vezes maior de adquirir a doença;
- A frequência dos genótipos de expressão predita alta de MBL (*YA/YA* e *XA/YA*) foi significativamente maior na categoria *C* do CDC enquanto que os genótipos de expressão predita média e baixa foram mais frequentes na categoria clínica *B* ($p=0,012$);
- Não houve relação entre os genótipos de MBL e o óbito dos pacientes ou o tempo de doença desde o diagnóstico da AIDS no período em estudo;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular & Molecular**. Tradução: Raimundo Gesteira. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. Tradução de: Cellular and Molecular Immunology.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Collingwood: Saunders, 2003.
- ALAN, R.; EZEKOWITZ, B. Mannose-binding lectin in prediction of susceptibility to infection. **Lancet**, Oxford, v. 358, n. 9282, p. 598-599, 2001.
- ALKAHATIB, G. et al. CC CKR5: a rantes, MIP-1 α , MIP-1 β , receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. **Science**, Washington, v. 272, n. 5270, p. 1955-1958, 1996.
- AMBROSIO, A. R. ***Leishmania (viannia) braziliensis***: ativação do sistema complemento e interação com a lectina ligante de manose (MBL). Curitiba, 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade federal do Paraná.
- ARTHUR, L. O. et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. **Science**, Washington, v. 258, n. 5090, p. 1935-1938, 1992.
- BABOVIC-VUKSANOVIC, D.; SNOW, K.; TEN, R. M. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency. Variant alleles in the Midwestern population of the United States. **Ann Allergy Asthma Immunol**, St. Paul, v. 82, n. 2, p.134-138, 1999.
- BARRINGTON, R. et al. The role of complement in inflammation and adaptative immunity. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 180, p. 5-15, 2001.
- BARTLETT, J. G.; GALLANT, J. E. **2004 Edition of Medical Management of HIV Infection Book**. Baltimore: The Johns Hopkins University, 2004.
- BOLDT, A. B; PETZL-ERLER, M. L. A new strategy for mannose-binding gene haplotyping. **Hum Mutat**, New York, v. 19, n. 3, p. 296-306, 2002.
- BONIOTTO, M. et al. Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. **Genes Immun**, Basingstoke, v.1, n. 5, p. 346-348, 2000.
- BONIOTTO, M. et al. MBL2 polymorphisms are involved in HIV 1 infection in brazilian perinatally infected children. **AIDS**, Philadelphia, v. 17, n. 5, p. 779-780, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Crítérios de definição de AIDS em adultos e crianças**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Epidemiology Program Office. **Epi Info™ for Windows** – version 3.2. Atlanta, 2004.

CHACKERIAN, B.; RUDENSEY, L. M.; OVERBAUGH, J. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. **J Virol**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7719–7727, 1997.

CHENG-MAYER, C. et al. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. **J Virol**, Washington, v. 73, n. 7, p. 5294–5300, 1999.

DAVIES, E. J. et al. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 38, n. 1, p. 110-114, 1995.

DENG, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, London, v. 381, n. 6584, p. 661-666, 1996.

DRICKAMER, K.; DORDAL, M. S.; REYNOLDS, L. Mannose-binding protein isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structure and homology with pulmonary surfactant apoprotein. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 261, n. 15, p. 6878-6887, 1986.

EZEKOWITZ, R. A.; DAY, L. E.; HERMAN, G. A. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. **J Exp Med**, New York, v. 167, n. 3, p. 1034-1046, 1988.

EZEKOWITZ, R. A. et al. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. **J Exp Med**, New York, v. 169, n. 1, p. 185-196, 1989.

EZEKOWITZ, R. A. Role of mannose-binding lectin in innate immunity. **J Infect Dis**, Chicago, v. 187, n. 2, p. S335-S339, 2003.

FAUCI, A. S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease; implications for therapy. **Science**, Washington, v. 262, n. 5136, p. 1011-1018, 1993.

FAUCI, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-1 induced disease. **Nature**, London, v. 384, n. 6609, p. 529-534, 1996.

FENG, Y. et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven – transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, Washington, v. 272, n. 5263, p. 872-877, 1996.

FORTIN, J. F.; CANTIN, R.; TREMBLAY, M. J. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. **J Virol**, Washington, v. 72, n. 3, p. 2105-2112, 1998.

FRANK, M. M., FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunol Today**, Cambridge, v. 12, n. 9, p. 322-326, 1991.

FUJITA, T. Evolution of the lectin complement pathway and its role in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, n. 5, p. 346-353, 2002.

FURTADO, M. R. et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. **N Engl J Med**, Boston, v. 340, n. 21, p. 1614-1622, 1999.

GALLO, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. **Science**, Washington, v. 224, n. 4648, p. 500-503, 1984.

GALLO, R. C.; MONTAGNIER, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. **N Engl J Med**, Boston, v. 349, n. 24, p. 2283-2285, 2003.

GARRED, P. et al. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. **Clin Exp Immunol**, London, v. 90, n. 3, p. 517-521, 1992.

GARRED, P. et al. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? **Eur J Immunogenet**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 125-131, 1994.

GARRED, P. et al. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. **Lancet**, Oxford, v. 346, n. 8980, p. 941-943, 1995.

GARRED, P. et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, Oxford, v. 349, n. 9047, p. 236-240, 1997.

GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 42, n. 10, p. 2145-2152, 1999.

GARRED, P. et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **J Rheumatol**, Toronto, v. 27, n. 1, p. 26-34, 2000.

GARRED, P. et al. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Genes Immun**, Basingstoke, v. 2, n. 8, p. 442-450, 2001.

GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in a MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. **Pediatr Pulmonol**, New York, v. 33, n. 3, p. 201-207, 2002.

GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin deficiency -- revisited. **Mol Immunol**, Oxford, v. 40, n. 2-4, p. 73-84, 2003.

GAYLE, H. D.; HILL, G. L. Global impact of human immunodeficiency virus and AIDS. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 14, n. 2, p. 327-335, 2001.

GLANTZ, S. A. **Primer of Biostatistics** – Version 4.0. 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 1997.

GRAUDAL, N. A. et al. Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis A longitudinal study. **J Rheumatol**, Toronto, v. 25, n. 4, p. 629-635, 1998.

HAROUSE, J. M. et al. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. **Science**, Washington, v. 253, n. 5017, p. 320-323, 1991.

HART, M. L.; SAIFUDDIN, M.; SPEAR, G.T. Glycosylation inhibitors and neuraminidase enhance human immunodeficiency virus type 1 binding and neutralization by mannose-binding lectin. **J Gen Virol**, London, v. 84, n. 2, p. 353-360, 2003.

HAURUM, S. T. et al. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**, Philadelphia, v. 7, n. 10, p.1307-1313, 1993.

HEGGELUND, L. et al. Mannose-binding lectin in HIV infection: relation to disease progression and highly active antiretroviral therapy. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v. 32, n. 4, p. 354-361, 2003.

HIBBERD, M. L. et al. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. **Lancet**, Oxford, v. 353, n. 9158, p. 1049-1053, 1999.

HUNDT, M.; HEIKEN, H.; SCHMIDT, R. E. Association of low mannose-binding lectin serum concentrations and bacterial pneumonia in HIV infection. **AIDS**, Philadelphia, v. 14, p. 1853-1854, 2000.

IKEDA, K.; et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 262, n. 16, p. 7451-7454, 1987.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world of complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 180, p. 86-89, 2001.

JACK, D. L.; TURNER, M. W. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochem Soc Trans**, London, v. 31, n. 4, p. 753-757, 2003.

JANEWAY JR, C. A.; TRAVERS, P.; SERLOMCHIR, M. **Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

JI, X.; GEWURZ, H.; SPEAR, G. T. Mannose-binding lectin (MBL) and HIV-Review. **Mol Immunol**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 145-152, 2005.

JOHN, S. W. et al. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Res**, London, v. 19, n. 2, p. 408, 1991.

JÜLIGER, S. et al. Restricted polymorphisms of the mannose-binding lectin gene in a population of Papua New Guinea. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 505, n. 1-2, p. 87-91, 2002.

KAWASAKI, T.; ETOH, R.; YAMASHINA, I. Isolation and characterization of mannan-binding protein from rabbit liver. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 81, n. 3, p. 1018-1024, 1978.

KELLY, P. et al. Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 119, n. 5, p. 1236-1242, 2000.

KILPATRICK, D. C. Mannan binding protein in sera positive for rheumatoid factor. **Br J Rheumatol**, London, v. 36, n. 2, p. 207-209, 1997.

KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfus Med**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 335-352, 2002.

KUHLMAN, M.; JOINER, K.; EZEKOWITZ, R. A. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. **J Exp Med**, New York, v. 169, n. 5, p. 1733-1745, 1989.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR., J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, London, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAU, Y. L. et al. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 39, n. 4, p. 706-708, 1996.

LEE, R. T. et al. Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 299, n. 1, p. 129-136, 1991.

LEVY, J. A. et al., Isolation of lymphocytophatic retrovirus from San Francisco patients with AIDS. **Science**, Washington, v. 225, n. 4664, p. 840-842, 1984.

LEVY, J. A. et al. Infection of human immunodeficiency virus -- CD4 is not enough. **N Engl J Med**, Boston, v. 335, n. 20, p. 1528-1530, 1996.

LIAN, Y. C. et al. Immunological analysis in paediatric HIV patients at different stages of the disease. **Scand J Immunol**, Oslo, v. 60, n. 6, p. 615-624, 2004.

LIPSCOMBE, R. J. et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 1, n. 9, p. 709-715, 1992.

LIPSCOMBE, R. J. et al., Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several populations groups. **Eur J Hum Genet**, Houndmills, v. 4, n. 1, p. 13-19, 1996.

LU, J. Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system. **Bioessays**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 509-518, 1997.

LUTY, A. J.; KUN, J. F; KREMSNER, P. G. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. **J Infect Dis**, Chicago, v. 178, n. 4, p. 1221-1224, 1998.

MAAS, J. et al. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progresión to AIDS. Amsterdam Cohort Study. **AIDS**, Philadelphia, v. 12, n. 17, p. 2275-2280, 1998.

MADSEN, H. O. et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **J Immunol**, Baltimore, v. 155, n. 6, p. 3013-3020, 1995.

MADSEN, H. O. et al. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **J Immunol**, Baltimore, v. 161, n. 6, p. 3169-3175, 1998.

MALIK, S. et al. Absence of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. **Immunogenetics**, Berlin, v. 55, n. 1, p. 49-52, 2003.

MATSUSHITA, M.; EZEKOWITZ, R. A. B.; FUJITA, T. The Gly-54-->Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serin proteases. **Biochem J**, London, v. 311, n. 3, p. 1021-1023, 1995.

McBRIDE, M. O. et al. Mannose-binding protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. **Int J STD AIDS**, London, v. 9, n. 11, p. 683-688, 1998.

MONTAGNIER, L. et al. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. **Science**, Washington, v. 225, n. 4657, p. 63-66, 1984.

MULLIGHAN, C. G. et al. Lack of association between mannose-binding lectin gene polymorphism and primary Sjogren's syndrome. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 43, n. 12, p. 2851-2852, 2000.

NIELSEN, S. L. et al. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. **Clin Exp Immunol**, London, v. 100, n. 2, p. 219-222, 1995.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A. S. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**, Boston, v. 328, n. 5, p. 327-335, 1993.

PASTINEN, T. et al. Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population. **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 14, n. 8, p. 695-698, 1998.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Mol Immunol**, Oxford, v. 38, n. 2-3, p. 133-149, 2001.

PROHASKA, Z. et al. Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of the disease. **Immunol Lett**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 171-175, 1997.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS**. 7. ed. Revinter: Rio de Janeiro, 2003.

ROGER M. Influence of host genes on HIV-1 disease progression. **FASEB J**, Bethesda, v. 12, n. 9, p. 625-632, 1998.

ROY, S. et al. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. **Lancet**, Oxford, v. 359, n. 9317, p. 1569-1573, 2002.

SAARLOOS, M. N.; LINT, T. F.; SPEAR, G. T. Efficacy of HIV-specific and 'antibody-independent' mechanisms for complement activation by HIV-infected cells. **Clin Exp Immunol**, London, v. 99, n. 2, p. 189-195, 1995.

SAIFUDDIN, M. et al. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. **J Gen Virol**, London, v. 81, n. 4, p. 949-955, 2000.

SANTOS, I. K. F. M. et al., Mannan-Binding Lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p.5212-5215, 2001.

SASTRY, K. et al. The human-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome. **J Exp Med**, New York, v. 170, n. 4, p. 1175-1189, 1989.

SCHAFRANSKI, M. D. et al. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clin Exp Immunol**, London, v. 138, n. 3, p. 521-525, 2004.

SCHÜPBACH, J.; GALLO, R. Human retroviruses. In: SPECTER, S.; HODINKA, R.L.; YOUNG, S.A. **Clinical Virology Manual**, Washington, ASM, 2000, p. 513-560.

SCHWARTZ, S. A.; NAIR, M. P. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, v. 6, n. 3, p. 295-305, 1999.

SENALDI, E. T. et al. Circulation levels of mannose binding protein in human immunodeficiency virus infection. **J Infect**, London, v. 31, n. 2, p. 145-148, 1995.

STANWORTH, S. J. et al. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, London, v. 37, n. 2, p.186-188, 1998.

STEFFENSEN, R. et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v. 241, n. 1-2, p. 33-42, 2000.

STEFFENSEN, R.; HOFFMANN, K.; VARMING, K. Rapid genotyping gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridisation probes. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v. 278, n. 1-2, p. 191-199, 2003.

SULLIVAN, K. E. et al. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 39, n. 12, p. 2046-2051, 1996.

SUMMERFIELD, J. A.; TAYLOR, M. E. Mannose-binding proteins in human serum: identification of mannose-specific immunoglobulins and a calcium-dependent lectin, of broader carbohydrate specificity, secreted by hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 883, n. 2, p. 197-206, 1986.

SUMMERFIELD, J. A. et al. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ**, London, v. 314, n. 7089, p. 1229-1232, 1997.

TAYLOR, M. E. et al. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **Biochem J**, London, v. 262, n. 3, p. 763-771, 1989.

TURNER, M. W. Deficiency of mannan-binding protein -- a new complement deficiency syndrome. **Clin Exp Immunol**, London, v. 86, n. 1, p. 53-56, 1991.

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 532-540, 1996.

TURNER, M. W., et al. Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1481-1486, 2000.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol Immunol**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 423-429, 2003.

UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS); WHO (World Health Organization). **AIDS epidemic update: 2004**. Disponível em: <http://www.unaids.org/wad2004/EPIupdate2004_html_en/epi04_00_en.htm> Acesso em: 22 abr. 2005.

UTIYAMA, S. R. R.; REASON, I. T. M.; KOTZE, L. M. S. Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas. **Rev Bras Anal Clin**. Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p. 183-188, 2004.

VALDIMARSSON, H. et al. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannose-binding (MBL) to MBL-deficient humans. **Scand J Immunol**, Oslo, v. 48, n. 2, p. 116-123, 1998.

VALDIMARSSON, H. Infusion of plasma-derived mannan-binding lectin (MBL) into MBL-deficient humans. **Biochem Soc Trans**, London, v. 31, n. 4, p. 768-769, 2003.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, Boston, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001a.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **N Engl J Med**, Boston, v. 344, n. 15, p. 1140-1144, 2001b.

WEI, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, London, v. 422, n. 6929, p. 307-312, 2002.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, London, v. 360, n. 6400, p. 127-134, 1992.

WEIS, W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 163, p. 19-34, 1998.

WONG, N. K. et al. Activities of MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. **Mol Immunol**, Oxford, v. 36, n. 13-14, p. 853-861, 1999.

YING, H. et al. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization, **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 20, n. 3, p. 327-335, 2004.

ANEXO 1



Curitiba, 24 de novembro de 2003.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Cláudia Helena Zen
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GÊNICO DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (mbf) NA SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HIV", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 28 de outubro de 2003. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Protocolo CEP/HC 106.EXT.060/2003-10

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 24 de maio de 2004.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Renato Tambara Filho", written over a horizontal line.

Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a)** Por você ser portador do vírus da AIDS está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Influência do polimorfismo gênico da Lectina Ligante de Manose (MBL) na suscetibilidade à infecção pelo HIV”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b)** O objetivo desta pesquisa é conhecer a associação entre uma proteína que participa da resposta imunológica às infecções, chamada Lectina Ligante de Manose, e a evolução da AIDS.
- c)** Caso você participe da pesquisa, será utilizada apenas uma parte do sangue que você irá coletar para realizar a carga viral.
- d)** Como em qualquer exame você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados com a coleta de sangue.
- e)** Os riscos que envolvem sua participação no estudo são relacionados apenas com a coleta de sangue e podem ser dor no local da punção ou hematoma.
- f)** Contudo os benefícios esperados são: contribuir para o melhor conhecimento da resposta imunológica ao HIV.
- g)** A bioquímica Cláudia Helena Zen, telefone 264-4111 ramal 216, responsável por este estudo, estará sempre a sua disposição para qualquer esclarecimento.
- h)** Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- i)** A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.
- j)** As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- l)** Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são da responsabilidade do paciente.
- m)** Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- n)** Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data ____/____/____

Assinatura do paciente

ANEXO 3**FICHA DE INVESTIGAÇÃO DOS PACIENTES - HOC**

1. Registro MBL:
2. Nome:
3. Idade:
4. Sexo:
5. Grupo étnico:
6. Prontuário:
7. Ficha de Investigação CE/DST/AIDS:
8. Data do 1º teste HIV+:
9. Data do 1º CD4 disponível:
10. Contagem do 1º CD4 disponível:
11. Data do diagnóstico de SIDA:
12. Data coleta:
13. CD4 da coleta:
14. Relações sexuais:
15. Uso de droga injetável:
16. Transfusão de sangue:
17. Classificação CDC (A, B e C):
18. Doença indicativa do grupo C:
19. Em tratamento (HAART):
20. Óbito:
21. Data óbito:
22. Outros:

ANEXO 4

ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES

ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA IDADE EM RELAÇÃO AOS GRUPOS EM ESTUDO

Idade (anos)	Número	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Valor de $p^{(1)}$
Controles	123	36,4	9,6	21,0	63,0	0,117
Pacientes	119	38,4	10,5	19,0	68,0	
Total	242	37,4	10,1	19,0	68,0	

NOTA: (1) Teste t de Student.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA EM RELAÇÃO AO GRUPO ÉTNICO E SEXO

Dados	Pacientes (n=119)		Controles (n=123)		Total (n=242)		Valor De $p^{(1)}$
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Sexo							0,566
Masculino	90	75,6	88	71,5	178	73,6	
Feminino	29	24,4	35	28,5	64	26,4	
Grupo étnico							0,440
Branco	103	86,6	101	82,1	204	84,3	
Pardo/Mulato	13	10,9	15	12,2	28	11,6	
Negro	03	2,5	07	5,7	10	4,1	

NOTA: (1) Teste Qui-quadrado.

ANEXO 5

DOENÇAS INDICADORAS DE AIDS – CDC – 1997

- Câncer cervical invasivo;
- Candidíase de esôfago, traquéia, brônquios ou pulmões;
- Citomegalovirose exceto em fígado, baço e linfonodos; como a retinite por citomegalovírus;
- Coccidioidomicose extrapulmonar;
- Criptococose extrapulmonar;
- Criptosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
- Demência associada ao HIV; incapacidade cognitiva e/ou outras disfunções que interfiram com a atividade profissional ou cotidiana;
- Herpes simples com úlcera mucocutânea, por um período superior a um mês ou bronquite, pneumonite, esofagite;
- Histoplasmosse extrapulmonar;
- Isosporidiose intestinal crônica;
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva (vírus JC, um poliomavírus);
- Linfoma: de burkit, imunoblástico, primário do SNC;
- *Mycobacterium avium* disseminado;
- *Mycobacterium tuberculosis* pulmonar e extrapulmonar;
- Pneumonia bacteriana recorrente;
- Pneumonia por *Pneumocystis carinii*;
- Sarcoma de Kaposi em paciente abaixo de 60 anos;
- Septicemia recorrente por *Salmonella* (não tifóide);
- Síndrome consumptiva associada ao HIV: perda ponderal involuntária superior a 10% do peso e diarreia crônica ou fraqueza crônica e febre de origem obscura documentada superior a 30 dias;
- Toxoplasmose de órgão interno.

ANEXO 6

EXTRAÇÃO DE DNA – PROTOCOLO JOHN/LAHIRI/NURNBERGER

1. Coletar de 5 a 10ml de sangue com EDTA.
2. Centrifugar por 10 minutos.
3. Pipetar a camada intermediária “Buffy-coat” e passar para um tubo falcon de 15ml.
4. Completar até 14ml com TKM1.
5. Acrescentar 100 µl de igePAL (Nonidet)
6. Agitar no vortex para misturar bem o detergente.
7. Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm.
8. Desprezar o sobrenadante deixando somente o pellet.
9. Completar até 14ml com TKM1, suspender o pellet e agitar no vortex.
10. Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm.
11. Desprezar o sobrenadante deixando somente o pellet.
12. Completar até 14ml com TKM1, ressuspender o pellet e agitar no vortex.
13. Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm.
14. Acrescentar 800 µl de TKM2.
15. Ressuspender o pellet com pipeta Pasteur.
16. Passar para um eppendorf de 1.5ml.
17. Adicionar 50 µl de SDS 10% a 55°C e agitar no vortex.
18. Incubar em banho-maria a 55°C por 24 horas (overnight).
19. Retirar do banho e adicionar 300 µl de NaCl saturado (6M) e agitar no vortex.
20. Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm.
21. Transferir o sobrenadante para 2 tubos eppendorf, no sobrenadante está o DNA e no precipitado, as proteínas.
22. Adicionar 2 volumes de etanol 100% a -20°C.
23. Tampar e inverter várias vezes.
24. Centrifugar 1 min e retirar o sobrenadante com transferpet.
25. Lavar o DNA em etanol 70% a 4°C.
26. Retirar o etanol 70% e deixar secar em temperatura ambiente.

27. Hidratar o DNA com 100 µl de TE.

28. Incubar em banho-maria de 1 a 2 dias até o DNA entrar em solução com o TE

29. Colocar na geladeira por 1 semana.

30. Passar para o freezer.

SOLUÇÃO DE TKM1

REAGENTE	CONC.ESTOQUE	Volume
tris-HCl pH 7.6	1M	5ml
KCl	1M	5ml
MgCl ₂	1M	5ml
EDTA	(0,1M)	10ml
ddH ₂ O	q.s.p.	500ml

SOLUÇÃO DE TKM2

REAGENTES	CONC.ESTOQUE	Volume
tris-HCl pH 7.6	1M	0,5ml
KCl	1M	0,5ml
MgCl ₂	1M	0,5ml
EDTA	(0,1M)	1,0ml
NaCl	1M	20ml
ddH ₂ O	q.s.p.	500ml

ANEXO 7 - PROTOCOLOS PARA REALIZAÇÃO DE PCR

Protocolo PCR exon 1 MBL (MADSEN)

Data: _____

Salvo em: _____

Tubo	Reg.		Res.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21		Água	
22		Controle	

Master MIX (n=22+1):

Tampão PCR 5µl x 23 = 115 µl
MgCl₂ 1,5µl x 23 = 34,5 µl
dNTPs 4 µl x 23 = 92 µl
Primer 1 1µl x 23 = 23 µl
Primer 2 1µl x 23 = 23 µl
Taq pol 0,5 µl x 23 = 11,5 µl
Água miliQ 35 µl x 23 = 805 µl

PCR:

- Aliquotar 48 µl/tubinho
- Acrescentar 2 µl DNA
- PE 9600 - programa 137
- Protocolo MBL-TD (*Touch down*)
- Eletroforese em gel de agarose a 2%, 150V, 1h

Protocolo PCR-SDM alelo D (MADSEN)

Data: _____

Salvo em: _____

Tubo	Reg.		Res.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21	Água		
22	Controle		

Master MIX (n=22+1):

Tampão PCR 5 μ l x 23 = 115 μ l
 MgCl₂ 1,75 μ l x 23 = 40,2 μ l
 dNTPs 4 μ l x 23 = 92 μ l
 Primer 3 2 μ l x 23 = 46 μ l
 Primer 4 2 μ l x 23 = 46 μ l
 Taq pol 0,5 μ l x 23 = 11,5 μ l
 Água miliQ 32,75 μ l x 23 = 753,3 μ l

PCR:

- Aliquotar 48 μ l/tubinho
- Acrescentar 2 μ l DNA
- PE 9600 - programa 137
- Protocolo MBL-TD (*Touch down*)
- Eletroforese em gel de agarose a 2%, 150V, 1h

Protocolo RFLP – digestão com *BanI* (Promega)

Data: _____

Salvo em: _____

Lote da enzima: _____

Validade: _____

Tubo	Reg.		Res.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22	* B	Controle	

Master Mix (n=22+1)

- Água deionizada 16 µl x 23 = 368 µl
- Tampão 10x RE 5 µl x 23 = 115 µl
- BSA 0,5 µl x 23 = 11,5 µl
- Enzima *BanI* 0,5 µl x 23 = 11,5 µl

Digestão enzimática (RFLP):

- Distribuir 22 µl em tubos de 200 µl estéreis
- Acrescentar 3 µl de DNA em cada tubo
- Homogeneizar com a ponteira e fazer um spin
- Incubar por 2h e meia a 50° C
- Eletroforese em gel de agarose a 3%, 100V, 2h

Protocolo RFLP – digestão com *MbolI* (Promega)

Data: _____

Salvo em: _____

Lote da enzima: _____

Validade: _____

Tubo	Reg.		Res.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22	* C	Controle	

Master Mix (n=22 + 1tubo):

- Água deionizada 16 µl x 23 = 368 µl
- Tampão 10x RE 5 µl x 23 = 115 µl
- BSA 0,5 µl x 23 = 11,5 µl
- Enzima *MbolI* 0,5 µl x 23 = 11,5 µl

Digestão enzimática (RFLP):

- Distribuir 22 µl em tubos de 200 µl estéreis
- Acrescentar 3 µl de DNA em cada tubo
- Homogeneizar com a ponteira e fazer um spin
- Incubar por 2h e meia a 37° C
- Eletroforese em gel de agarose a 3%, 100V, 2h

Protocolo RFLP – digestão com *MluI* (Invitrogen)

Data: _____

Salvo em: _____

Lote da enzima: _____

Validade: _____

Tubo	Reg.		Res.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22	*D	Controle	

Master Mix (n=22 +1 tubo):

- Água deionizada 16,5 µl x 23 = 379,5 µl
- Tampão 10x RE 5 µl x 23 = 115 µl
- Enzima *MluI* 0,5 µl x 23 = 11,5 µl

Digestão enzimática (RFLP):

- Distribuir 22 µl em tubos de 200 µl estéreis
- Acrescentar 3 µl de DNA em cada tubo
- Homogeneizar com a ponteira e fazer um spin
- Incubar por 2h e meia a 50° C
- Eletroforese em gel de agarose a 3%, 100V, 2h

Protocolo PCR-SSP para região promotora XY (MADSEN)

Data: _____

Salvo em: _____

Tubo	Reg.		X	Y	β X	β Y	Res
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							

Master Mix (n=11+1):Tampão PCR 5 μ l x 12 = 60 μ lMgCl₂ 1,5 μ l x 12 = 18 μ ldNTPs 4 μ l x 12 = 48 μ lBeta globina 1 1 μ l x 12 = 12 μ lBeta globina 2 1 μ l x 12 = 12 μ lPrimer X ou Y 1 μ l x 12 = 12 μ lPrimer X/Y 1 μ l x 12 = 12 μ lTaq pol 0,5 μ l x 12 = 6 μ lÁgua miliQ 33 μ l x 11 = 396 μ l**PCR:**

- Distribuir 48 μ l/tubinho em duas séries de tubos (X e Y)
- Acrescentar 2 μ l DNA
- Protocolo SSP-XY
- Programa 131 PE 9600
- Eletroforese em gel de agarose a 2%, 150V, 1h

ANEXO 8 – PLANILHA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA

GRUPO CONTROLES

continua

Nº	Idade	Sexo	Grupo Étnico	Genótipo Exon	Grupo1	Alelo		Genótipo X/Y	Alelo		Haplótipo			Grupo2	Conc. Preditada
						Exon1	Exon2		X/Y1	X/Y2	1	2	3		
1	28	M	N	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
2	43	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
3	41	F	B	BD	OO	B	D	YY	Y	Y	BY	DY	BY/DY	O/O	BAIXA
4	41	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
5	43	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
6	60	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
7	43	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
8	26	M	N	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
9	32	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
10	35	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
11	27	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
12	26	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
13	34	M	B	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
14	43	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
15	39	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
16	31	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
17	36	F	M	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
18	32	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
19	34	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
20	58	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
21	27	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
22	29	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
23	36	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
24	40	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
25	37	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
26	35	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
27	25	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
28	31	M	M	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
29	30	F	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
30	21	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
31	41	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
32	42	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
33	44	M	B	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
34	26	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
35	38	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
36	52	F	B	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX	MÉDIA
37	30	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
38	27	M	B	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
39	33	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
40	57	M	B	BD	OO	B	D	YY	Y	Y	BY	DY	BY/DY	O/O	BAIXA
41	25	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
42	41	F	B	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
43	54	F	B	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
44	46	F	B	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
45	47	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
46	53	F	N	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
47	56	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
48	27	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
49	41	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
50	36	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA

Continuação

Nº	Idade	Sexo	Grupo Étnico	Genótipo Exon	Grupo1	Alelo		Genótipo X/Y	Alelo		Haplótipo			Grupo2	Concentraçã o Predita
						Exon1	Exon2		X/Y1	X/Y2	1	2	3		
51	60	F	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
52	43	F	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
53	53	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
54	26	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
55	39	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
56	32	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
57	32	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
58	53	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
59	32	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
60	30	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
61	28	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
62	41	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
63	41	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
64	35	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
65	47	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
66	28	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
67	45	M	B	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
68	49	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
69	41	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
70	36	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
71	51	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
72	43	F	B	BB	OO	B	B	YY	Y	Y	BY	BY	BY/BY	O/O	BAIXA
73	25	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
74	45	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
75	38	F	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
76	29	M	N	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
77	24	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
78	25	M	N	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
79	25	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
80	40	M	N	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
81	43	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
82	34	M	M	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
83	30	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
84	29	M	M	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
85	27	M	B	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
86	40	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
87	34	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
88	28	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
89	28	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
90	27	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
91	22	M	B	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
92	21	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
93	36	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
94	41	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
95	34	F	B	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
96	63	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
97	45	M	N	AC	AO	A	C	YY	Y	Y	AY	CY	AY/CY	AY/O	MÉDIA
98	38	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
99	29	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
100	52	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA

Nº	Idade	Sexo	Grupo Étnico	Genótipo Exon	Grupo1	Alelo		Genótipo X/Y	Alelo		Haplótipo			Grupo2	Concentraçã o Predita
						Exon1	Exon2		X/Y1	X/Y2	1	2	3		
101	37	F	M	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX	MÉDIA
102	27	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
103	29	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
104	22	F	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
105	37	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
106	23	M	M	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
107	44	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
108	46	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
109	31	M	B	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX	MÉDIA
110	27	M	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
111	39	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
112	47	F	B	AC	AO	A	C	XY	X	Y	AX	CY	AX/CY	AX/O	BAIXA
113	28	M	M	AC	AO	A	C	XY	X	Y	AX	CY	AX/CY	AX/O	BAIXA
114	27	M	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
115	43	F	B	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
116	23	F	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
117	33	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
118	35	M	B	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX	MÉDIA
119	38	M	M	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
120	29	F	B	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
121	29	M	B	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
122	30	M	M	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
123	36	F	B	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA

GRUPO PACIENTES																								
Nº	Idade	Sexo	Grupo	Data	Sobrev.	CDC	Doenças			Vivo	Óbito	Genótipo	Grupo1	Alelo		Genótipo	Alelo		Haplótipo			Grupo2	Conc.	
			étnico	AIDS	31/12/2004		Tipo				Tempo	exon		Exon1	Exon2	X/Y	X/Y1	X/Y2	1	2	3	Predita		
1	59	M	M	28/05/2003	2,0	C3	1	Leucoencefalopatia	-	-	N	28/07/2003	2,0	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	ALTA
2	45	M	B	23/08/2001	27,9	C3	1	P. carinii	-	-	N	07/12/2003	27,9	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O
3	27	M	M	03/12/2002	25,3	B2	-	-	-	-	S	-	-	BC	OO	B	C	YY	Y	Y	BY	CY	BY/CY	O/O
4	22	M	B	01/01/2001	48,7	C3	1	Toxo SNC	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
5	48	F	B	30/06/2003	18,3	B2	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O
6	33	F	B	14/02/2000	48,1	B2	-	-	-	-	N	26/01/2004	48,1	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
7	41	M	B	28/03/1994	131,0	B2	-	-	-	-	S	-	-	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O
8	27	F	B	08/07/2003	18,1	C3	2	Retinite CMV	Candidiase Esofago	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
9	22	M	M	26/05/2003	6,4	B3	-	-	-	-	N	05/12/2003	6,4	BC	OO	B	C	YY	Y	Y	BY	CY	BY/CY	O/O
10	41	M	B	19/04/2001	45,1	C3	1	Encefalopatia	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
11	50	M	B	01/01/1998	85,2	C2	1	Retinite CMV	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
12	39	M	B	01/01/2000	60,9	C3	1	S.Kaposi	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
13	45	M	B	15/09/2001	40,1	B3	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
14	31	M	B	-	-	B3	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
15	53	M	B	01/01/1996	109,6	B2	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
16	25	M	B	24/02/2003	1,4	C3	2	Cripto	P. carinii	-	N	08/04/2003	1,4	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
17	41	M	B	01/01/2003	13,3	C3	3	P. carinii	S. Kaposi	TB DISS.	N	03/02/2004	13,3	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
18	29	M	B	01/12/2002	25,4	C3	1	Retinite CMV	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
19	65	F	B	21/07/2003	0,8	C3	1	P. carinii	-	-	N	14/08/2003	0,8	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
20	44	M	N	04/02/2003	23,2	C3	1	P. carinii	-	-	S	-	-	AC	AO	A	C	YY	Y	Y	AY	CY	AY/CY	AY/O
21	41	F	B	07/03/2003	22,2	B3	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
22	38	M	M	27/06/1997	91,5	B3	-	-	-	-	S	-	-	CC	OO	C	C	YY	Y	Y	CY	CY	CY/CY	O/O
23	41	M	B	01/01/2001	48,7	B1	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
24	53	M	B	15/03/1997	94,9	B3	-	-	-	-	S	-	-	BD	OO	B	D	YY	Y	Y	BY	DY	BY/DY	O/O
25	35	F	B	11/05/1999	68,7	B1	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O
26	32	M	B	07/12/2001	37,3	B1	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX
27	34	F	B	15/06/2001	43,2	B2	-	-	-	-	S	-	-	BB	OO	B	B	YY	Y	Y	BY	BY	BY/BY	O/O
28	51	M	M	12/03/1997	95,0	B3	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
29	52	M	B	15/09/1996	101,0	C3	2	P. carinii	Encefalopatia	-	S	-	-	BB	OO	B	B	YY	Y	Y	BY	BY	BY/BY	O/O
30	51	M	B	06/10/1997	88,1	B2	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
31	57	M	B	01/01/1999	73,0	B1	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
32	26	M	B	27/05/2002	15,4	C3	2	P. carinii	Encefalopatia	-	N	01/09/2003	15,4	BD	OO	B	D	YY	Y	Y	BY	DY	BY/DY	O/O
33	41	M	B	01/07/1996	103,5	C1	1	Retinite CMV	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
34	31	M	B	05/02/1997	96,2	C2	2	Retinite CMV	Candidiase Esofago	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
35	28	M	B	19/08/2003	0,1	C3	1	P. carinii	-	-	N	22/08/2003	0,1	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AY	AY	AX/AY	AX/AY
36	36	M	B	04/12/1996	81,7	C3	1	Cripto	-	-	N	22/08/2003	81,7	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O
37	43	M	B	01/10/1997	88,3	C3	3	Cripto	P. carinii	Retinite CMV	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
38	27	F	B	09/09/2003	16,0	C3	2	Toxo SNC	Candidiase Esofago	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
39	41	M	B	03/01/1997	97,3	C3	3	P. carinii	Candidiase Esofago	Toxo SNC	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
40	35	F	N	06/11/2003	14,0	B2	-	-	-	-	S	-	-	AC	AO	A	C	YY	Y	Y	AY	CY	AY/CY	AY/O
41	45	M	B	01/12/1999	61,9	C2	1	S.Kaposi	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
42	27	F	M	16/05/2001	44,2	B3	-	-	-	-	S	-	-	AC	AO	A	C	YY	Y	Y	AY	CY	AY/CY	AY/O
43	26	M	B	19/08/2002	28,8	C3	2	P. carinii	Encefalopatia	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
44	68	F	B	03/02/1995	108,8	B2	-	-	-	-	N	12/01/2004	108,8	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
45	33	M	B	02/10/2003	15,2	C3	1	Candidiase Esofago	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX
46	36	M	B	01/09/2002	28,4	C3	1	Retinite CMV	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
47	60	F	B	10/07/2003	18,0	C3	2	P. carinii	HERPES	-	S	-	-	BC	OO	B	C	YY	Y	Y	BY	CY	BY/CY	O/O
48	39	M	B	01/03/2004	10,2	B2	-	-	-	-	S	-	-	BC	OO	B	C	YY	Y	Y	BY	CY	BY/CY	O/O
49	37	M	B	18/09/1999	64,4	C2	1	Cripto	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
50	65	M	B	01/02/1998	84,2	C2	1	Retinite CMV	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
51	32	M	B	11/11/1999	62,6	B3	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O
52	63	F	B	09/03/2004	0,9	C3	1	P. carinii	-	-	N	05/04/2004	0,9	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY
53	35	F	B	10/10/1995	112,3	C3	1	Cripto	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
54	42	M	B	04/12/1996	98,3	B2	-	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O
55	27	M	B	15/04/1997	93,9	C2	1	P. carinii	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
56	35	M	B	05/02/2002	35,3	C3	1	P. carinii	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY
57	37	F	M	01/01/1999	73,0	B2	-	-	-	-	S	-	-	BC	OO	B	C	YY	Y	Y	BY	CY	BY/CY	O/O
58	34	M	B	11/05/1999	68,7	B3	-	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY

59	25	M	M	25/04/2004	8,3	B3	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
60	41	M	B	08/10/2003	15,0	C3	1	Toxo SNC	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
61	60	M	B	05/12/1991	155,7	C3	1	Candidiase Esofago	-	N	18/09/2004	155,7	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
62	51	M	B	15/06/1998	79,7	C1	3	P. carinii	HERPES	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
63	39	F	B	08/10/2003	15,0	C3	1	Retinite CMV	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
64	38	M	B	03/06/2000	55,7	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
65	42	M	B	30/07/2004	0,4	B3	-	-	-	N	12/08/2004	0,4	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
66	25	M	B	14/04/1999	69,6	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
67	45	M	B	01/01/1998	85,2	B2	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
68	50	M	B	01/02/2002	35,5	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
69	21	M	B	01/08/2003	17,3	B2	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
70	46	M	B	01/10/1999	63,9	B1	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
71	47	M	B	08/01/2002	36,3	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
72	28	F	M	15/03/2003	21,9	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
73	28	M	M	15/06/1997	88,1	C3	1	S.Kaposi	-	N	10/09/2004	88,1	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
74	44	M	B	15/06/2002	31,0	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
75	40	M	B	30/10/1997	87,3	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
76	33	M	B	01/10/1999	54,1	C3	1	P. carinii	-	N	11/03/2004	54,1	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
77	35	F	B	12/06/1995	116,3	C3	2	P. carinii	Candidiase Esofago	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
78	27	F	B	11/08/2002	29,1	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
79	31	M	B	01/12/2000	49,7	C2	1	P. carinii	-	S	-	-	BD	OO	B	D	YY	Y	Y	BY	DY	BY/DY	O/O	BAIXA
80	19	M	B	02/04/2003	21,3	C3	1	Cripto	-	S	-	-	AC	AO	A	C	YY	Y	Y	AY	CY	AY/CY	AY/O	MÉDIA
81	36	M	B	-	-	C2	1	Herpes	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
82	36	M	M	13/11/2003	13,8	C3	1	Cripto	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
83	39	F	B	01/01/1993	146,1	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
84	42	M	B	01/02/2000	59,8	C2	1	S.Kaposi	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
85	36	M	B	01/08/1993	139,0	C1	2	Retinite CMV	P. carinii	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
86	33	F	B	15/10/2004	2,3	C3	1	Toxo SNC	-	N	24/12/2004	2,3	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
87	30	F	B	30/09/1998	75,9	C3	1	Candidiase Esofago	-	N	24/12/2004	75,9	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
88	65	M	N	05/10/2004	2,9	C3	1	Candidiase Esofago	-	S	-	-	AC	AO	A	C	YY	Y	Y	AY	CY	AY/CY	AY/O	MÉDIA
89	48	M	B	20/05/2003	19,7	C3	1	Candidiase Esofago	-	S	-	-	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
90	42	M	B	01/02/2002	35,5	B3	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
91	36	M	B	06/07/2002	30,3	C3	1	Toxo SNC	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
92	36	M	B	01/01/1999	73,0	B1	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
93	33	M	B	14/01/2003	23,9	C3	2	Cripto	Encefalopatia	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
94	32	M	B	25/03/1999	70,3	C2	1	Herpes	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
95	25	M	B	20/08/1998	77,5	B3	-	-	-	S	-	-	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
96	42	M	B	01/01/2002	36,5	B1	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
97	30	F	B	12/07/1999	66,6	B2	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
98	28	M	B	21/07/2004	5,4	B3	-	-	-	S	-	-	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
99	27	M	B	29/11/2004	1,1	C2	1	Encefalopatia	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
100	32	M	B	01/10/2004	3,0	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
101	39	M	B	06/12/2002	25,2	B1	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA
102	30	F	M	15/09/2002	27,9	C3	1	Toxo SNC	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
103	54	F	B	01/01/1996	109,6	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
104	30	M	B	19/09/2003	15,6	C3	1	Herpes	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
105	46	M	B	25/05/1998	80,4	C3	1	Retinite CMV	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
106	36	F	B	01/01/1997	97,4	B1	-	-	-	S	-	-	BD	OO	B	D	YY	Y	Y	BY	DY	BY/DY	O/O	BAIXA
107	30	M	B	-	-	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
108	40	F	B	01/06/1995	116,7	B2	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
109	45	M	B	21/10/1996	99,8	C2	1	Encefalopatia	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
110	42	F	B	19/11/2002	25,8	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XX	X	X	AX	AX	AX/AX	AX/AX	MÉDIA
111	45	M	B	01/01/1994	133,9	C3	2	Cripto	S.Kaposi	S	-	-	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
112	45	M	B	01/01/1996	109,6	B3	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	YY	Y	Y	AY	AY	AY/AY	AY/AY	ALTA
113	35	M	B	23/10/2002	26,7	B3	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
114	20	M	B	-	-	B3	-	-	-	S	-	-	AD	AO	A	D	XY	X	Y	AX	DY	AX/DY	AX/O	BAIXA
115	28	M	M	01/08/2001	41,6	C3	1	Toxo SNC	-	S	-	-	BC	OO	B	C	YY	Y	Y	BY	CY	BY/CY	O/O	BAIXA
116	36	F	B	01/01/2000	60,9	B1	-	-	-	S	-	-	AA	AA	A	A	XY	X	Y	AX	AY	AX/AY	AX/AY	ALTA
117	40	M	B	-	-	B2	-	-	-	S	-	-	AD	AO	A	D	YY	Y	Y	AY	DY	AY/DY	AY/O	MÉDIA
118	32	M	B	30/04/2000	56,9	B1	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	XY	X	Y	AX	BY	AX/BY	AX/O	BAIXA
119	38	M	B	01/11/2002	26,4	B2	-	-	-	S	-	-	AB	AO	A	B	YY	Y	Y	AY	BY	AY/BY	AY/O	MÉDIA