

MARCELO DERBLI SCHAFRANSKI

POLIMORFISMOS DOS GENES *MBL2* E *MASP2* NA FEBRE REUMÁTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-graduação em Medicina Interna, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

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

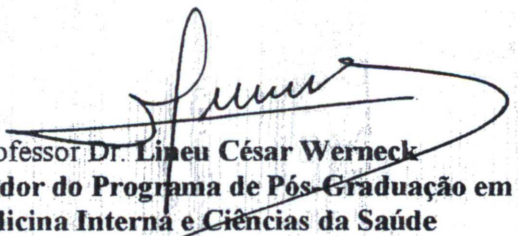
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lílían Pereira-Ferrari

**CURITIBA
2008**

DECLARAÇÃO

Declaro, para fins curriculares, que **Marcelo Derbli Schafranski** apresentou e defendeu, com aprovação pela banca examinadora, a *Tese* intitulada: **"POLIMORFISMOS DOS GENES MBL2 E MASP2 NA FEBRE REUMÁTICA"** do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde - Doutorado**, em 30 de maio de 2.008. Nesta ocasião, foi recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de *Doutor em Medicina Interna*, com a publicação da *Tese* em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 30 de maio de 2.008.



Professor Dr. **Lineu César Werneck**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde

POLIMORFISMOS DOS GENES *MBL2* E *MASP2* NA FEBRE REUMÁTICA

Ao meu avô, Jorge Abdala Derbli, *in memoriam*,
pelo exemplo de vida e dedicação à família

AGRADECIMENTOS

- À Prof^ª Iara José Messias-Reason, orientadora desta tese, pessoa por quem cultivo grande respeito e admiração, pela amizade e pela paciência. O seu amplo conhecimento e espírito crítico foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;
- À Prof^ª LÍlian Pereira-Ferrari, co-orientadora desta tese, pela colaboração essencial no desenvolvimento da parte laboratorial da tese e pela orientação fundamental da parte de Métodos;
- À Daniela Scherner, pela colaboração na realização da parte laboratorial da tese;
- À Prof^ª Rudi Steffensen, pelo auxílio na realização das genotipagens utilizando-se a PCR em tempo real;
- Aos Profs. Drs. Arnaldo Stier e Renato Torres, por nos receber em seus ambulatórios, onde pudemos selecionar os pacientes para a pesquisa;
- Ao Dr. Alessandro Nogueira, pelo auxílio na formatação de figuras e por importantes sugestões diversas;
- À Simone Ribeiro Furian, pela organização nos agendamentos telefônicos das entrevistas e coletas de sangue dos paciente;
- Aos Meus pais, Márcia e Jonas, pelo apoio irrestrito em todos os momentos, e por valorizarem o bem precioso que é a Educação;
- Aos Meus irmãos, Sílvia e Murilo, pessoas que tornam o viver mais agradável;
- À Minha esposa, Anna Paula, pela paciência, amor e companheirismo em todos os momentos;
- Ao Dr. José Gastão Rocha de Carvalho, pelo apoio e confiança
- Ao Hospital de Clínicas da UFPR, instituição sólida e à qual devemos grande parte de nosso conhecimento como Médico;
- À Deus, fonte inesgotável de esperança e conforto em todos os momentos

“Uma jornada de duzentos quilômetros começa
com um simples passo”

Provérbio chinês

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
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 SISTEMA COMPLEMENTO.....	6
3.1.1 Associação do complemento com doenças.....	11
3.2 LECTINA LIGANTE DE MANANA (<i>MANNAN-BINDING LECTIN</i> – MBL)	13
3.2.1 Generalidades.....	13
3.2.2 Estrutura molecular.....	14
3.2.3 Genética da MBL.....	16
3.2.4 Funções da proteína MBL.....	22
3.2.4.1 Ativação de complemento.....	22
3.2.4.2 Opsonização e ativação da fagocitose.....	22
3.2.4.3 Modulação da resposta inflamatória.....	23
3.2.5 Interações da MBL com células do hospedeiro.....	27
3.2.6 Deficiência de MBL.....	27
3.2.7 MBL e infecções.....	28
3.2.8 MBL e outras doenças.....	29
3.3 SERINA PROTEASE-2 ASSOCIADA À MBL (MASP-2).....	31

3.3.1	Genética e estrutura.....	32
3.3.2	Interação MASPs/MBL.....	34
3.3.3	Mutações e Associações com Doenças.....	34
3.4	FEBRE REUMÁTICA (FR).....	39
3.4.1	Generalidades.....	39
3.4.2	Epidemiologia.....	39
3.4.3	Características clínicas.....	41
3.4.3.1	Cardiopatia reumática crônica.....	43
3.4.4	Patogênese.....	44
3.4.4.1	Estreptococo do grupo A (EGA).....	44
3.4.4.2	Genética e Imunologia da FR e da CRC.....	47
3.4.4.3	Sistema complemento e febre reumática.....	52
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	55
4.1	Pacientes.....	55
4.2	Controles.....	57
4.3	Amostras de sangue.....	58
4.4	Obtenção dos dados relativos à concentração sérica de MBL.....	58
4.5	Extração de DNA genômico.....	58
4.6	Genotipagem dos polimorfismos <i>MBL2</i>	58
4.6.1	PCR em tempo real.....	59
4.6.2	PCR-SSP.....	61
4.7	Genotipagem do polimorfismo <i>MASP2</i>	64
4.8	Análise estatística.....	65
5	RESULTADOS.....	67
5.1	Genótipos <i>MBL2</i> e concentrações séricas de MBL nos pacientes portadores de CRC e controles.....	67
5.2	Genotipagem dos polimorfismos <i>MBL2</i>	69
5.2.1	Detecção dos alelos <i>A, B, C e D</i> da região éxon 1.....	70
5.2.2	Detecção dos alelos <i>X/Y</i> da região promotora.....	71

5.3	Frequências dos alelos <i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i> e <i>X/Y</i> em pacientes e controles.....	72
5.3.1	Pacientes totais <i>vs</i> controles.....	73
5.3.2	Pacientes com história de cardite reumática (total) <i>vs</i> controles.....	74
5.3.3	Pacientes com CRC <i>vs</i> controles.....	74
5.3.4	Pacientes com história de cardite reumática aguda sem seqüelas (CRA) <i>vs</i> controles.....	78
5.3.5	Pacientes com história de FR sem cardite <i>vs</i> controles.....	78
5.3.6	Relação dos genótipos <i>MBL2</i> e as características clínicas dos pacientes com FR sem CRC.....	81
5.4	Genotipagem do polimorfismo D120G de <i>MASP2</i>	82
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÕES	96
8	REFERÊNCIAS	97

ANEXO 1	TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	115
ANEXO 2	TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E EXCLARECIDO.....	117
ANEXO 3	PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	119
ANEXO 4	PLANILHA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	121
ANEXO 5	MANUSCRITO REFERENTE À TESE PUBLICADO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL.....	136
ANEXO 6	MANUSCRITO REFERENTE À TESE PUBLICADO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL.....	145
ANEXO 7	MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL.....	150

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	9
FIGURA 2 - ESTRUTURA DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA	10
FIGURA 3 - IMAGEM CRISTALOGRAFICA DA REGIÃO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS (CRD) E DA REGIÃO DO PESCOÇO DA SUB-UNIDADE DA MBL	15
FIGURA 4 - OLIGOMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA MBL	15
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELO COMPLEXO MBL-MASP-2	16
FIGURA 6 - CARACTERÍSTICAS DO GENE <i>MBL2</i>	18
FIGURA 7 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL DE ACORDO COM O GENÓTIPO ESTRUTURAL E DA REGIÃO PROMOTORA X/Y	22
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DAS FUNÇÕES DA PROTEÍNA MBL	24
FIGURA 9 - COMPONENTES DA VIA DAS LECTINAS	31
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS E ÉXONS DO GENE <i>MASP2/MAP19</i>	33
FIGURA 11 - ATIVAÇÃO DA MASP-2	35
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DOS POLIMORFISMOS CONHECIDOS DO GENE <i>MASP2</i>	38
FIGURA 13 - LESÃO DA ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA	43
FIGURA 14 - ESTRUTURA DO EGA	46
FIGURA 15 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA M DO EGA	47

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DO NÓDULO DE <i>ASCHOFF</i>	49
FIGURA 17 - MECANISMOS PATOGÊNICOS ENVOLVIDOS NA CRC	54
FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO METODOLOGIA TAQMAN®	60
FIGURA 19 - PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA OS POLIMORFISMOS DO ÉXON 1 DO GENE MBL2 COM A REAÇÃO DE PCR-SSP	63
FIGURA 20 - PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA OS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE MBL2 COM A REAÇÃO DE PCR-SSP	64
FIGURA 21 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA O POLIMORFISMO D120G DO GENE MASP2 APÓS RESTRIÇÃO COM A ENZIMA HpaII	65
FIGURA 22 - RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL E OS GENÓTIPOS MBL2	69
FIGURA 23 - GENOTIPAGEM DE <i>MBL2</i> UTILIZANDO <i>PRIMERS</i> COM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS – ÉXON 1	70
FIGURA 24 - GENOTIPAGEM DE <i>MBL2</i> UTILIZANDO <i>PRIMERS</i> COM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS – POLIMORFISMO X/Y	71
FIGURA 25 - FREQUÊNCIA DOS INDIVÍDUOS QUANTO AO STATUS DA CARDITE	72

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO	7
QUADRO 2	- MODULAÇÃO DA MBL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	26
QUADRO 3	- CRITÉRIOS DE JONES MODIFICADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE FR AGUDA	42
QUADRO 4	- COMPONENTES DO EGA QUE APRESENTAM REAÇÃO CRUZADA COM TECIDOS HUMANOS	48
QUADRO 5	- PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES PCR-SSP PARA O ÉXON 1	62
QUADRO 6	- PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES PCR-SSP PARA A REGIÃO PROMOTORA X/Y	62
QUADRO 7	- PROGRAMAS DE PCR-SSP UTILIZADOS NA GENOTIPAGEM DO ÉXON 1 E DA REGIÃO PROMOTORA <i>MBL2</i>	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS <i>MBL2</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES	 19
TABELA 2	- FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DO <i>MBL2</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES, E FREQUÊNCIA DE HOMOZIGOTOS PARA AS MUTAÇÕES	 20
TABELA 3	- FREQUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS COMBINADOS E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE <i>MBL2</i>	 21
TABELA 4	- FREQUÊNCIA DOS ALELOS <i>MASP2</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES	 37
TABELA 5	- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM HISTÓRIA DE FR E CONTROLES	 56
TABELA 6	- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES CARIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA (CRC) E CARDIOPATIA REUMÁTICA AGUDA (CRA)	 56
TABELA 7	- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES E CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE <i>MASP2</i>	 57
TABELA 8	- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS	 68
TABELA 9	- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MBL2</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO	 73
TABELA 10	- POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E DA REGIÃO PROMOTORA X/Y DE <i>MBL2</i> , EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE CARDITE REUMÁTICA AGUDA E CRÔNICA E CONTROLES	 75

TABELA 11 - POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA X/Y EM PACIENTES COM CRC E CONTROLES	76
TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES PORTADORES DE CRC EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS <i>MBL2</i>	77
TABELA 13 - POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA X/Y, EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE CRA E CONTROLES	79
TABELA 14 - POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA X/Y DO GENE <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM FR SEM CARDITE E CONTROLES	80
TABELA 15 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS E ÀS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES COM FR SEM CRC	81
TABELA 16 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HISTÓRIA DE FR	82
TABELA 17 - POLIMORFISMO DO GENE <i>MASP2</i> EM SUBGRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOPP	- <i>Advanced Oxidation Protein Products</i>
AR	- Artrite reumatóide
ASO	- Antiestreptolisina O
Ca ⁺⁺	- Cálcio
CR	- Receptor de complemento
CRA	- Cardite reumática aguda
CRC	- Cardiopatia reumática crônica
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidratos
CRP	- Proteína C-reativa
DM	- Diabetes <i>mellitus</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético
EGA	- Estreptococo do grupo A
FR	- Febre reumática
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigens</i>
IC	- Intervalo de confiança
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
LES	- Lúpus Eritematoso Sistêmico
MASP	- <i>MBL-associated serine protease</i>
MBL	- <i>Mannan-binding lectin</i>
NK	- <i>Natural killer</i>
OR	- <i>Odds ratio</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	- <i>Restriction fragment length polymorphism PCR</i> – polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição

PCR-SSP	- <i>Sequence-specific primer PCR</i> – PCR com <i>primer de sequência específica</i>
RANTES	- Quimiocina <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
SP	- Proteína surfactante
SUS	- Sistema Único de Saúde
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	- <i>Melting temperature</i> (temperatura de fusão)
TNF	- Fator de necrose tumoral
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultravioleta
VHS	- Velocidade de hemossedimentação

RESUMO

A febre reumática (FR) aguda e a sua sequela mais grave, a cardiopatia reumática crônica (CRC) são doenças mediadas por uma resposta imune anormal à infecção de orofaringe pelo *Streptococcus pyogenes*. A lectina ligante de manana (MBL), colectina dependente de cálcio capaz de ativar o complemento através da via das lectinas, é capaz de ligar-se à N-acetil-glucosamina, molécula presente na parede celular do *S. pyogenes* e nas válvulas cardíacas humanas. A ativação de complemento pela MBL ocorre através de serina-proteases associadas à MBL (MBL-associated serine proteases - MASPs), principalmente a MASP-2, cujo polimorfismo D120G, presente no éxon 3 do gene *MASP2*, foi recentemente associado a infecções recorrentes e manifestações auto-imunes. Mutações tanto no éxon 1 quanto na região promotora do gene *MBL2* foram associadas a doenças infecciosas e auto-imunes. Em estudos anteriores, observamos uma associação entre altas concentrações de MBL e a CRC. No presente estudo investigou-se a relação do polimorfismo dos genes *MBL2* e *MASP2* com as principais manifestações clínicas da FR (cardite reumática aguda, cardiopatia reumática crônica e artrite). Um total de 149 pacientes, sendo 43 (28,9%) homens e 106 (71,1%) mulheres, com média de idade de $39,28 \pm 14,53$ anos com história de FR e 147 controles saudáveis, sendo 53 (26%) homens e 94 (64%) mulheres, com média de idade de $38,9 \pm 13,56$ anos foram avaliados para a presença de polimorfismos no éxon 1 (A, B, C, D) e na região promotora X/Y do gene *MBL2* através de PCR-SSP e PCR em tempo real. A mutação D120G do gene *MASP2* foi determinada através de análise de restrição (PCR-RFLP). Os genótipos relacionados a maior produção de MBL (YA/YA e YA/XA) foram mais frequentes no grupo total de pacientes com cardite (aguda + crônica), nos pacientes com CRC e nos pacientes com CRA quando comparados com os controles saudáveis (OR 2,44, IC 95% 1,48-4,00, $p=0,0006$; OR 2,42, IC 95% 1,41-4,16, $p=0,001$ e OR 2,48, IC 95% 1,09-5,67, $p=0,035$, respectivamente). Através de análise de regressão logística demonstrou-se que concentrações de $MBL > 2800$ ng/ml aumentam o risco de desenvolvimento de CRC (OR 2,91, IC 95% 1,41-6,03, $p=0,003$). Ainda, entre os pacientes com história de FR sem sequela cardíaca ($n=42$), a frequência dos genótipos associados à maior produção de MBL foi mais alta no grupo de pacientes que apresentaram cardite aguda quando comparada aos que não apresentaram esta manifestação clínica (OR: 7,22 IC 95% 1.18-43,99, $p=0,031$). A artrite foi mais frequentemente observada nos pacientes portadores de genótipos XA/XA, XA/O e O/O, relacionados à baixa produção de MBL (OR: 0,22, IC 95% 0,05-0,89, $p=0,048$). A mutação D120G do gene *MASP2* foi encontrada em 4/106 (3,77%) pacientes com CRC e em 5/129 (3,88%) controles, todos de maneira heterozigota ($p=ns$). Nenhum paciente sem a sequela cardíaca apresentou a mutação D120G. Genótipos relacionados com alta produção de MBL parecem estar envolvidos na patogênese da cardite reumática aguda e na sua evolução para a forma crônica da doença. Já a mutação D120G do gene *MASP2* parece não apresentar papel relevante na patogênese destas manifestações da FR.

Palavras-chave: lectina ligante de manana, febre reumática, cardiopatia reumática crônica, cardite reumática, complemento, *MASP2*, serina proteases associadas à MBL, *MBL2*.

ABSTRACT

Rheumatic fever (RF) and its most severe sequela, chronic rheumatic heart disease (CRHD), are mediated by an abnormal immunological host response following a *Streptococcus pyogenes* oropharyngeal infection. Mannan-binding lectin (MBL), a collectin that activates complement, binds to N-acetylglucosamine, a molecule present on the streptococcus cell wall and on human heart valves. MBL activates complement through its associated serine-proteases MASPs), mainly MASP-2, which D120G polymorphism, present in the third exon of the *MASP2* gene, has been recently associated with recurrent infections and autoimmune manifestations. Mutations in the exon 1 and promoter region of *MBL2* gene have been associated to several infectious and autoimmune disorders. Previously, we reported an association between high MBL serum concentrations and CRHD. Here we investigate the association between *MBL2* polymorphisms and the presence of the major RF clinical manifestations (acute rheumatic carditis, chronic rheumatic heart disease and arthritis). Polymorphisms in exon 1 (A, B, C and D) and in the X/Y promoter region of the *MBL2* gene were determined by PCR-SSP and real-time PCR in 149 patients (43/28,9% males, 106/71,1% females, mean age $39,28 \pm 14,53$ years) with a history of RF and 147 controls (53/26% males, 94/64% females, mean age $38,9 \pm 13,56$ years). The presence of the D120G *MASP2* mutation was analyzed by PCR-RFLP. Genotypes associated with a higher production of MBL (YA/YA and YA/XA) were more frequent in the patients with carditis (acute + chronic), in the subgroups of patients with CRHD and in the subgroups of patients with history of carditis without valve sequela when compared to controls (OR 2,44, CI 95% 1,48-4,00, $p=0,0006$; OR 2,42, CI 95% 1,41-4,16, $p=0,001$ and OR 2,48, CI 95% 1,09-5,67, $p=0,035$, respectively). Logistic regression analysis showed that MBL levels >2800 ng/ml increased the risk of CRHD (OR 2,91, CI 95% 1,41-6,03, $p=0,003$). Also, among patients without CRHD ($n=42/149$, 28.2%), the frequency of the high-producing MBL genotypes was higher in the group that developed acute carditis when compared to the patients without this clinical manifestation (OR: 7,22 CI 95% 1,18-43,98, $p=0,031$). Arthritis was more frequently observed among carriers of the low-producing MBL genotypes (XA/XA, XA/O and O/O) (OR: 0,22, CI 95% 0,05-0,89, $p=0,048$). The *MASP2* D120G mutation was detected in 4/106 (3,77%) patients with CRHD and in 5/129 (3,88%) healthy controls, all in heterozygous state ($p=ns$). None of the patients without cardiac sequela presented the D120G mutation. *MBL2* genotypes associated with the high production of MBL seem to be involved in the pathogenesis of rheumatic carditis and its progression to CRHD. *MASP2* D120G mutation seems to play no role in the pathogenesis of both RF and its clinical progression to CRHD.

Key-words: mannan-binding lectin, rheumatic fever, rheumatic heart disease, rheumatic carditis, complement, MBL-associated serine proteases, *MASP2* gene, *MBL2* gene

1. INTRODUÇÃO:

A febre reumática (FR) aguda, seqüela tardia da infecção de orofaringe pelo estreptococo β -hemolítico do grupo A (EGA) de Lancefield, e a cardiopatia reumática crônica (CRC) são doenças cuja patogênese ainda não se encontra completamente esclarecida (CARRAPETIS, McDONALD e WILSON, 2005). A principal hipótese para o desenvolvimento da FR está baseada em reações auto-imunes decorrentes de mimetismo molecular entre estruturas do EGA e proteínas cardíacas, articulares e do sistema nervoso central (DAJANI, 1997). A seqüela mais grave da FR aguda é a CRC, que ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis, seja por surtos repetidos de cardite reumática aguda (CRA) ou pelo fluxo turbulento de sangue, que leva ao dano do aparelho valvar, com espessamento, fibrose e calcificação (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998). Concentrações séricas elevadas de imunocomplexos e de produtos de ativação do complemento (C3d) foram observadas em pacientes com FR e com CRC (REDDY et al., 1990), assim como depósitos de complemento e imunocomplexos foram demonstrados no tecido cardíaco em amostras de necrópsia de portadores de CRC (KAPLAN e DALENBACH, 1961), indicando que o sistema complemento pode estar envolvido na patogênese dessas doenças. A lectina ligante de manana (*mannan-binding lectin*), uma colectina cálcio-dependente, é uma molécula de reconhecimento de padrões (*pattern recognition protein* – PRP) com capacidade de se ligar a carboidratos (N-acetil-glucosamina, D-manose, L-fucose e N-acetil-manosamina) presentes nas superfícies de vírus, bactérias, fungos e protozoários (TAKAHASHI et al., 2006). A N-acetil-glucosamina é um dos principais componentes da parede celular do estreptococo (MALKIEL et al., 2000) e das válvulas cardíacas humanas (ARMOSTRONG e BISCHOFF, 2004). Após a interação com moléculas alvo, a MBL ativa o complemento através das suas serina proteases associadas (*MBL-associated serine proteases* – MASPs), induzindo lise celular e fagocitose. O gene *MBL2* está localizado no braço longo do cromossomo 10, sendo o mesmo composto por quatro éxons (KILPATRICK, 2002). Mutações de ponto no éxon 1 alteram significativamente as concentrações séricas de MBL (KILPATRICK, 2002), sendo o

alelo normal designado de *A*. Os alelos mutantes (*D*, *B*, *C*), resultantes de mutações nos códons 52, 54 e 57, respectivamente, recebem a denominação de *O*. Polimorfismos na região promotora (*X/Y*, *H/L*, *P/Q*, nas posições -221, -550 e +4, respectivamente) também afetam as concentrações de MBL, sendo *Y* (principalmente) e *H* associados a concentrações altas de proteína circulante (BOUWMAN, ROPE e ROOS, 2006). Recentemente, uma mutação de ponto no códon 120 (D120G, D105G na proteína madura) do éxon 3 do gene *MASP2* foi descrita em um indivíduo com história de manifestações clínicas infecciosas e auto-imunes (STENGAARD-PEDERSEN et al. 2003). Tal mutação consiste na substituição do nucleotídeo adenina por guanina (c.359A>G), resultando em uma troca do aminoácido ácido aspártico por glicina na proteína, com consequente incapacidade de ativação de complemento através da MBL. Em estudo anterior, demonstramos que pacientes portadores de CRC apresentam concentrações séricas de MBL significativamente mais elevadas que indivíduos saudáveis (SCHAFRANSKI et al., 2004). O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento dos polimorfismos do éxon 1 e da região promotora *X/Y* do gene *MBL2* e o polimorfismo D120G do gene *MASP2* no desenvolvimento de manifestações clínicas associadas à FR.

2. OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o polimorfismo gênico da região éxon 1 (*A, B, C, D*) e da região promotora *X/Y* do gene *MBL2* e o polimorfismo D120G do gene *MASP2* em pacientes com história de FR aguda e em controles saudáveis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência dos alelos e genótipos de *MBL2* e de *MASP2* entre pacientes com FR aguda e controles saudáveis;
- Comparar a frequência dos alelos e genótipos de *MBL2* e de *MASP2* entre pacientes com cardite reumática como um todo (aguda + crônica) e controles;
- Comparar a frequência dos alelos e genótipos de *MBL2* e de *MASP2* entre pacientes com cardiopatia reumática crônica (CRC) e controles;
- Comparar a frequência dos alelos e genótipos de *MBL2* e de *MASP2* entre pacientes com história de cardite reumática aguda sem seqüela valvar (CRA) e controles;
- Avaliar se as concentrações de MBL observadas nos pacientes portadores dos genótipos relacionados a alta produção de MBL representam risco para o desenvolvimento de cardite reumática crônica;
- Avaliar possível associação entre o polimorfismo *MBL2* e o desenvolvimento de artrite entre os pacientes portadores de FR aguda.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

3.1 Sistema Complemento:

O sistema complemento faz parte do sistema imune inato e é responsável por um dos principais mecanismos efetores da imunidade mediada por anticorpos. São três as suas principais atividades fisiológicas: defesa contra infecções bacterianas piogênicas, ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo e a remoção de complexos imunes e dos produtos da lesão inflamatória (quadro 1). Trata-se de um sistema composto por cerca de 30 proteínas, que circulam no plasma ou se encontram expressas em superfícies celulares (WALPORT, 2001).

O complemento é ativado através de três vias principais: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas, sendo que todas elas levam à formação do complexo citolítico de ataque à membrana (C5b-9). Após a ativação do complemento, os peptídeos ativos C3a e C5a desencadeiam efeitos pró-inflamatórios, como a quimiotaxia de leucócitos, degranulação de mastócitos e basófilos, contração de musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular. A resposta inflamatória é ainda amplificada pela geração de radicais tóxicos de oxigênio e pela indução da síntese e liberação de metabólitos do ácido araquidônico e citocinas (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Conseqüentemente, uma ativação excessiva do sistema complemento representa um considerável risco de lesão para o hospedeiro, por destruição tecidual inflamatória gerada direta ou indiretamente com a sua ativação (FLEMING e TSOKOS, 2006).

A via clássica compõe-se de reações sequenciais envolvendo C1, C4, C2 e C3 e. Ela se inicia com a ligação de C1 aos domínios Fc das imunoglobulinas IgM e IgG (sub-classes IgG1, IgG2 e IgG3 – IgG4 não se liga a C1). C1 é um complexo multimolecular composto por três frações: C1q, C1r e C1s, porções estas ligadas por pontes dependentes de cálcio. C1q possui sítio de ligação para IgG e IgM, e quando esta ligação ocorre, se inicia o processo de ativação desta via. C1q não possui atividade enzimática. Tal atividade cabe a C1r e C1s. Após a ativação de C1q, este se

liga a C1r e adquire a capacidade de clivar C1s. A ativação de C1s leva à clivagem de C2 e C4, com a posterior formação de C4b2a, enzima proteolítica também chamada de C3 convertase “clássica”, responsável pela clivagem de C3, um elemento de todas as vias (ABBAS e LICHTMAN, 2005)

QUADRO 1 – FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO.

As três principais atividades fisiológicas do sistema complemento	
Atividade	Proteína do Complemento Responsável
Defesa contra infecção	
Opsonização	Fragmentos de C3 e C4 (C3b, C4b), MBL
Quimiotaxia e ativação de leucócitos	Anafilotoxinas (C5a, C3a e C4a), receptores de anafilotoxinas em leucócitos
Lise de bactérias e células	Complexo de ataque à membrana (C5b-C9)
Interface entre sistema imune inato e adquirido	
Amplificação da resposta por anticorpos	C3b e C4b ligados a imunocomplexos e antígenos; receptores de C3 nas células B e células apresentadoras de antígeno
Aumento da memória imunológica	C3b e C4b ligados a imunocomplexos e à antígenos; receptores de C3 nas células dendríticas e foliculares
Remoção de debris celulares	
Remoção de células apoptóticas	C1q, fragmentos de C3 e C4, MBL
Remoção de imunocomplexos	C1q, fragmentos de C3 e C4, MBL

O complemento exerce, além da atividade de defesa contra infecções, um papel importante como interface entre o sistema imune inato e adaptativo e na remoção de debris celulares (adaptado de WALPORT, 2001).

A via alternativa compõe-se de quatro elementos. O fator D é homólogo ao C1s da via clássica, o C3 equivale ao C4 e o fator B ao C2. Um pequeno grau de atividade da via alternativa ocorre continuamente no plasma, através da hidrólise espontânea de C3, que resulta na formação de C3 ativo (C3H₂O). Esta molécula pode se ligar ao fator B, gerando a C3 convertase e C3b. O fragmento C3b se liga ao fator B, originando um complexo C3bB. O fator D cliva o fator B ligado ao C3b, formando

C3bBb (a C3 convertase da via alternativa). Deposição C3b nas células autólogas é rapidamente impedida pela ação de proteínas regulatórias, como o fator I e seus cofatores (fator H, proteína cofator de membrana– MCP, proteína de ligação ao C4 – C4BP, receptor de complemento tipo 1 - CR1) e o fator de aceleração do decaimento (DAF). Uma proteína chamada properdina estabiliza o complexo C3bBb, o qual equivale ao C4b2a em sua capacidade de iniciar a seqüência terminal de ativação (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

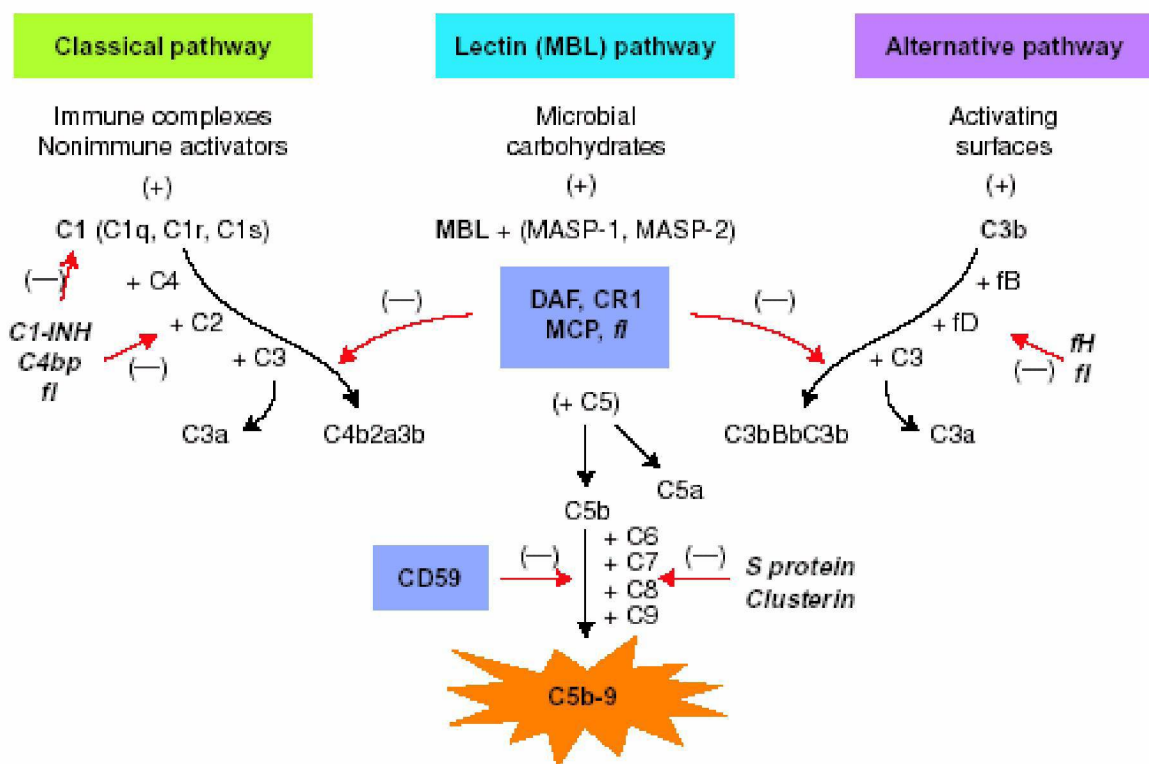
A via das lectinas é ativada após ligação de moléculas de MBL ou de ficolinas a resíduos de carboidratos presentes na superfície de microrganismos. A MBL ativa o complemento após a interação com duas proteases denominadas MASPs (*MBL-associated serine proteases*, serina-proteases associadas à MBL - MASP-1 e MASP-2). A MASP-2 cliva e ativa C4 e C2 e a MASP-1 cliva apenas C2 (TAKAHASHI et al., 2006).

Após a clivagem de C3, os fragmentos C3b ligam-se ao C4b2a e ao C3bBb das enzimas convertases das vias clássica e alternativa, respectivamente, para onde as 3 vias convergem, formando a enzima C5 convertase (figura 1). O C5, por sua vez, é clivado em C5a (uma anafilotoxina) e C5b, que inicia a formação do complexo de ataque à membrana (C5b-9). Tal complexo se insere na membrana celular, causando influxo de íons e água ao interior celular, levando à lise osmótica da célula (ABBAS e LICHTMAN, 2005) (figura 2).

Importantes funções imunológicas dos fragmentos solúveis do complemento bem como aqueles que permanecem ligados à membrana celular tornam-se possíveis através da interação com receptores em diferentes tipos celulares. Existem dois receptores para os domínios colagenosos de C1q, presentes em monócitos, neutrófilos e células endoteliais, os quais estão implicados no reconhecimento de partículas associadas a C1q e cuja ligação resulta numa opsonização mais intensa (NEPOMUCENO E TENNER, 1998). O CR1 (CD35), receptor para C3b, C4b e iC3b, é expressado em monócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e eritrócitos, e atua principalmente na fagocitose (MEDOF e NUSSENZWEIG, 1984). A clivagem de iC3b origina C3dg, que posteriormente é clivado em C3d de membrana e C3g na fase

fluida, processo mediado por tripsina, elastases e plasmina. O CR2 (CD21) está presente principalmente em linfócitos B, em alguns linfócitos T e células dendríticas e endoteliais. O CR2 apresenta afinidade para iC3b, C3d e C3dg (CLEMENZA e ISENMAN, 2000). O CR3 está presente em monócitos, neutrófilos, células mielóides e *natural killers* (NK) e o CR4 está presente em monócitos, neutrófilos e células mielóides. Ambos ligam-se a iC3b, contribuindo para a fagocitose de partículas opsonizadas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

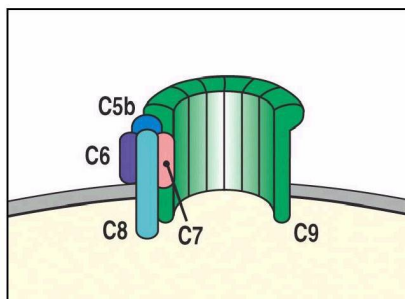
FIGURA 1 - AS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO



Complexo lítico de ataque à membrana

Observa-se que as três vias convergem para a clivagem de C3, formação das C5 convertases (C4b2a3b e C3bBbC3b), com posterior clivagem de C5 e a formação do complexo lítico de ataque à membrana, C5b-9 (adaptado de FRANCIS, 2003).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA



O complexo lítico de ataque à membrana é constituído pelo fragmento C5b e pelos componentes finais da via de ativação do complemento C6-9 (adpatado de ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Os fragmentos C3a, C4a e C5a são anafilotoxinas, exercendo quimiotaxia e ativação de leucócitos através da interação com receptores de anafilotoxinas presentes na superfície destas células (C3aR e C5aR – CD88). Os receptores de anafilotoxinas estão presentes em monócitos, macrófagos, mastócitos e basófilos (WALPORT, 2001). Os fragmentos C3b, C3d ligam-se aos receptores CR2 presentes nos linfócitos B, potencializando a resposta imune mediada por anticorpos (MORGAN et al., 2000).

Em condições fisiológicas, a ativação do complemento é controlada pela ação coordenada de proteínas solúveis e associadas à membrana. Os componentes reguladores solúveis, como o inibidor de C1, a proteína de ligação com C4b (C4bp), os fatores H e I, a clusterina e a vitronectina restringem a ação do complemento nos flúidos corporais em diferentes pontos da cascata. Além disso, cada célula autóloga é protegida do ataque do complemento por proteínas reguladoras de superfície, tais como o receptor do complemento 1 (CD35), a proteína cofator de membrana (CD46), o fatores de aceleração do decaimento (*decay-accelerating factor* - DAF, CD55) e o CD59 (KIRSCHFINK e MOLLNES, 2003).

3.1.1 Associação do complemento com doenças

Os mecanismos regulatórios do complemento encontram-se em fino equilíbrio, de maneira que a ativação do mesmo concentra-se na superfície de microrganismos invasores e a deposição de complemento em células e tecidos autólogos é limitada. Quando há quebra nestes mecanismos, o complemento pode causar danos ao organismo (FLEMING e TSOKOS, 2006).

Evidências clínicas e experimentais enfatizam o papel proeminente do complemento em quadros de imunodeficiência e na patogênese de numerosas doenças inflamatórias, incluindo aquelas causadas por auto-imunidade, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (PICKERING e WALPORT, 2000) e a artrite reumatóide (AR) (NYDEGGER et al, 1977).

São doenças associadas à ativação do complemento: síndrome da resposta inflamatória sistêmica, síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, síndrome pós-reperfusão, angioedema, síndrome do enxerto-*versus*-hospedeiro, vasculite, nefrite, incompatibilidade biomaterial (após diálise ou circulação extra-corpórea), doenças auto-imunes (LES, AR, miastenia gravis), trauma grave, queimaduras e sepsis (KIRSCHFINK e MOLLNES, 2003).

As deficiências de complemento podem estar associadas a infecções recorrentes e ao desenvolvimento de doenças auto-imunes. A deficiência de C2 é a mais comumente encontrada em humanos. O LES se desenvolve em mais de 50% dos pacientes deficientes de C2 e C4 e em cerca de 90% dos portadores da deficiência de C1q, possivelmente por falha na eliminação de complexos auto-imunes (NUSINOW, ZURAW e CURD, 1985). A deficiência de C3 está relacionada a infecções piogênicas graves, e infecções recorrentes por neisseria, particularmente sistêmicas e com sorotipos raros, estão associadas com a deficiência de componentes que compõe o complexo de ataque à membrana (C5b-9) (FIJEN et al., 1994).

Dentre as doenças reumáticas, também há relato da deficiência de C2 em um quadro de dermatomiosite em uma paciente feminina com diagnóstico confirmado por biópsia muscular (LEDDY et al., 1975), de deficiência de C3 na vasculite

urticariforme hipocomplementêmica (MCLEAN et al., 1980), de deficiência de C5 em um caso de síndrome de Sjögren com manifestações sistêmicas (SCHOONBROOD et al., 1995) e em um caso de poliartrite com diagnóstico de febre reumática (MIMORI et al., 1992).

Alguns microrganismos utilizam o sistema complemento para aumentar o seu poder infectante, como é o caso da bactéria *Mycobacterium leprae*, que se utiliza dos receptores de complemento CR1 e CR3 para invadir os monócitos (SCHLESINGER e HOROWITZ, 1990). Um mecanismo semelhante é utilizado pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que utiliza os receptores CR1, CR2 e CR3 para penetrar em macrófagos, linfócitos T CD4+ e células dendríticas (SPETH, STOIBER e DIERICH, 2003).

Em um estudo experimental utilizando coelhos, SCHMIEDT et al. (1998) analisaram morfometricamente a aorta em um grupo de animais deficientes de C6 e a compararam com o grupo de animais com concentrações normais do componente, após 12 semanas de dieta rica em colesterol. A maior formação de placas de ateroma nos animais normais pôde ser observada até a olho nu. Tal experimento demonstra que a deficiência de complemento pode ser benéfica, neste caso pela ausência de formação do complexo de ataque à membrana, o qual especula-se ter um papel importante no início do processo de aterosclerose, provavelmente pela lesão de células musculares lisas e subsequente liberação da proteína quimiotóxica de monócitos do tipo 1, células que sabidamente atuam na patogênese da doença

LEHNER et al. (1992) também levantaram a hipótese do benefício da deficiência de um componente do complemento. Observaram que o plasma de um paciente deficiente de C6, portador de meningite meningocócica, possuía concentrações baixas de endotoxina e do complexo de ataque à membrana. Após a adição de plasma fresco, *in vitro*, em resposta à *Escherichia coli* J45, houve restauração da liberação de endotoxina. Concluiu-se menor mortalidade em pacientes deficientes de C6 pode ocorrer, devido à uma menor liberação de endotoxina bacteriana, com conseqüente menor lesão tecidual.

A MBL é a proteína chave na ativação do complemento pela via das lectinas. Deficiências genéticas de MBL estão associadas com um risco aumentado de infecção, especialmente no período entre os 6 meses e os 2 anos de idade, no qual a criança perde a proteção oferecida pelos anticorpos maternos (KILPATRICK, 2002). A quantificação das concentrações séricas de MBL deveria ser acrescentada no painel de exames a serem solicitados quando existe uma suspeita de imunodeficiência, embora os seus resultados devam ser interpretados com cuidado, uma vez que as concentrações podem não refletir exatamente a atividade da via, uma vez que outras proteínas também participam da ativação de complemento por esta via, entre elas as MASP.

3.2. Lectina ligante de manana (*Mannan-Binding Lectin* – MBL)

3.2.1 Generalidades:

A MBL é membro da família das lectinas dependentes de cálcio, chamadas de colectinas (lectinas colagenosas). São oito as colectinas conhecidas atualmente: além da MBL, a proteína surfactante A (*surfactant protein A*, SP-A), a proteína surfactante B (*surfactant protein B*, SP-B), a colectina hepática 1 (CL-L1), a colectina placentária (CL-P1), a conglutinina, a colectina de 43 kDa (CL-43) e a colectina de 46 kDa (CL-46). Como parte do sistema imune inato, as colectinas têm papel crucial na primeira linha de defesa contra microrganismos. Com exceção de CL-P1 e CL-L1, que se apresentam no citosol e na membrana celular, respectivamente, as demais colectinas são solúveis e secretórias (van de WETERING, van GOLD e BATENBURG, 2004). A MBL tem estrutura homóloga ao C1q. É uma das proteínas de reconhecimento de padrões de patógenos (PRPs) do sistema imune inato, pertencendo assim à mesma classe dos receptores macrofágicos de manose, dos receptores do tipo *scavenger* e dos receptores *toll-like*, (TAKAHASHI, MICHELOW e EZEKOWITZ, 2006), colaborando na distinção do que é próprio e não-próprio através do reconhecimento de padrões moleculares específicos (*pathogens-associated molecular patterns* - PAMPs), neste caso os terminais do grupo manose e de outros açúcares, presentes na superfície de bactérias, fungos e parasitas (TURNER, 1996). A

MBL é capaz de ativar a cascata do complemento de maneira independente de anticorpos através da interação com serina-proteases, constituindo a chamada via das lectinas, e funciona também diretamente como opsonina, através da interação com receptores específicos localizados na superfície de macrófagos (BOUWMAN, ROPEP e ROOS, 2006).

O nome anteriormente utilizado, *mannan-binding protein* foi substituído por *mannan-binding lectin*, uma vez que a abreviatura (MBP) já era a estabelecida para a proteína ligante de mielina (*myelin-binding protein* - MBP) (TURNER, 1996). Atualmente os termos utilizados são *mannose-binding lectin* (lectina ligante de manose) ou *mannan-binding lectin* (lectinal ligante de manana), sendo manana (*mannan*) um polímero de manose.

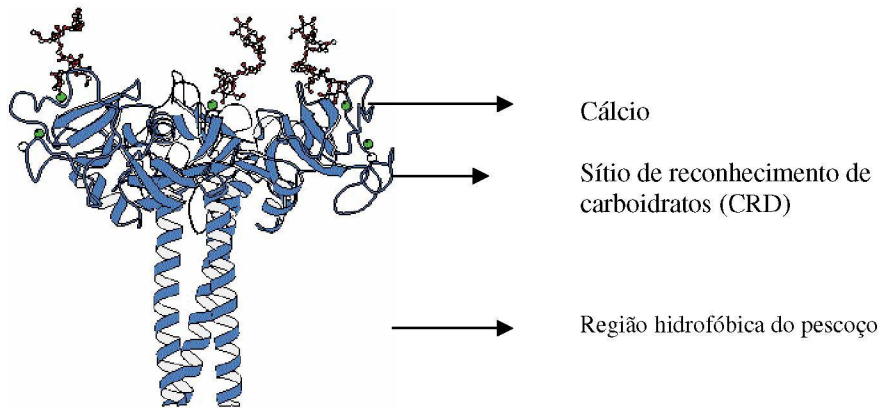
3.2.2 Estrutura molecular

A MBL é produzida principalmente no fígado. Em roedores, em coelhos e em macacos *rhesus* foram identificadas duas formas de MBL (MBL-A e MBL-C), enquanto que em humanos e em chimpanzés apenas uma forma se faz presente (EZEKOWITZ, DAY e HERMAN, 1988). Após redução na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), a MBL se apresenta como uma banda única na eletroforese, e é caracterizada por três sub-unidades de cadeias polipeptídicas de 32 kDa (TAKAHASHI, MICHELOW e EZEKOWITZ, 2006).

A unidade básica das colectinas é um trímero (figuras 3 e 4). Nas unidades monoméricas, quatro domínios estruturais podem ser distinguidos: um domínio N-terminal rico em cisteína, um domínio de colágeno, um domínio helicoidal que forma o pescoço e um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (van de WETERING, van GOLD e BATENBURG, 2004).

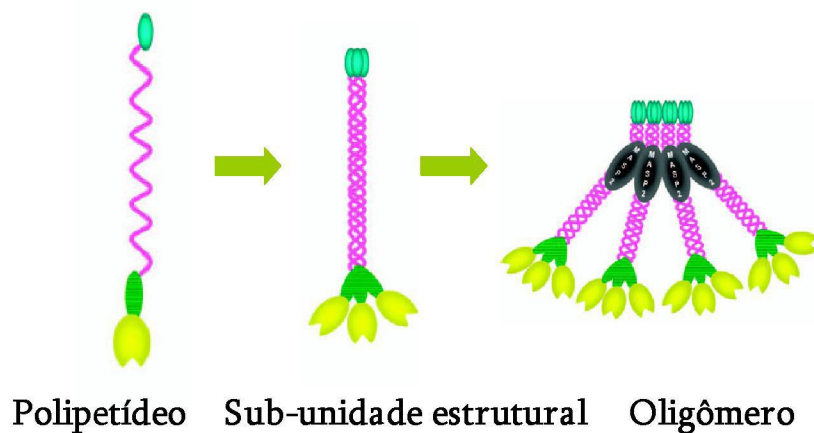
O arranjo final dos trímeros de MBL em seres humanos é formado basicamente por oligômeros que variam de 2 a 6 unidades, de peso molecular de até 500 kDa, que formam estruturas quaternárias semelhantes a de um buquê de tulipas e a de C1q. Acredita-se que as formas predominantes em humanos são dímeros, trímeros e tetrâmeros (KILPATRICK, 2002).

FIGURA 3 - IMAGEM CRISTALOGRAFICA DA REGIÃO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS (CRD) E DA REGIÃO DO PESCOÇO DA SUB-UNIDADE DA MBL



A unidade básica da MBL, que é composta por 3 cadeias polipeptídicas de 32 kDa, isoladamente não tem a capacidade de ativação do complemento (adaptado de WEIS e DRICKAMER, 1992)

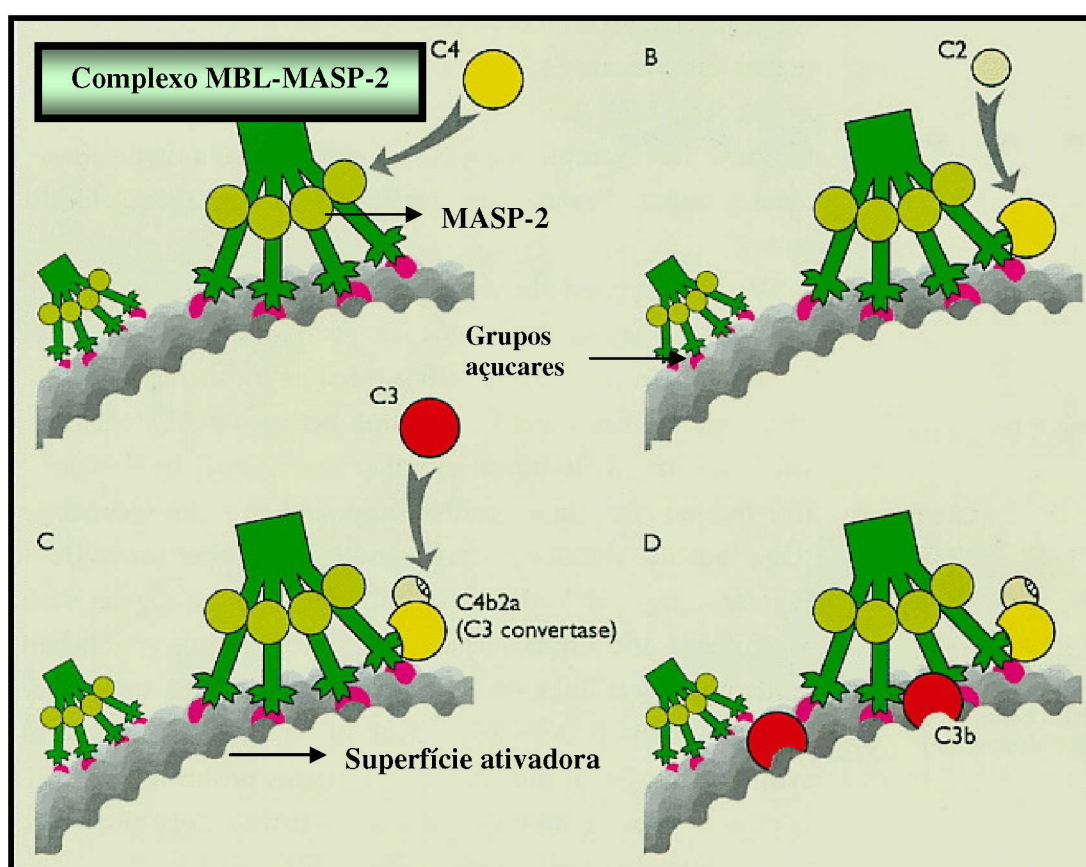
FIGURA 4 – OLIGOMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA MBL



O domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) é seguido por um domínio em α -hélice que compõe o pescoço, um domínio semelhante ao colágeno e um domínio N-terminal rico em cisteína. Três domínios da região do pescoço, formam uma estrutura tripla helicoidal e os três domínios de colágeno formam uma tripla hélice, levando à formação de uma sub-unidade trimérica. As sub-unidades triméricas se agrupam subsequentemente através dos resíduos de cisteína no domínio N-terminal e formam oligômeros maiores (adaptado de DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

A MBL ativa o complemento através da interação com uma protease denominada MASP-2 (*MBL-associated serine protease-2*, serina-protease associada à MBL-2), quando ocorre então a clivagem dos componentes C2 e C4 e a formação da C3 convertase C4bC2a (TAKAHASHI, MICHELOW e EZEKOWITZ, 2006) (figura 5).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELO COMPLEXO MBL-MASP-2



O processo ocorre na superfície da célula-alvo. Em (A) observamos o encontro do complexo MBL-MASP-2 com grupos açúcares da superfície de patógenos e a clivagem de C4. Em (B) há a clivagem de C2, com formação de C4b2a (C3 convertase) e a clivagem de C3 (C). Em (D) observamos a deposição de C3b na superfície do patógeno (adaptado de DOMINIC, 2001).

3.2.3 Genética da MBL

A proteína MBL é codificada por um gene que se localiza no braço longo do cromossomo 10 na região q11.2-q21 (figura 6), e denomina-se *MBL2* (*MBL1P1* é

um pseudogene). O gene é composto por 4 éxons, além do éxon 0, entre as regiões promotoras 0 e 1, o qual não é transcrito. As bases moleculares para a deficiência de MBL são mutações de ponto localizadas no primeiro dos quatro éxons do gene, resultando em falha da oligomerização das unidades triplas básicas. Como consequência, ocorre uma menor interação com os resíduos de sacarídeos na superfície dos microrganismos e menor capacidade de fixação de complemento (KILPATRICK, 2002). Mutações na região promotora do gene também influenciam a concentração sérica da proteína (MADSEN et al., 1995).

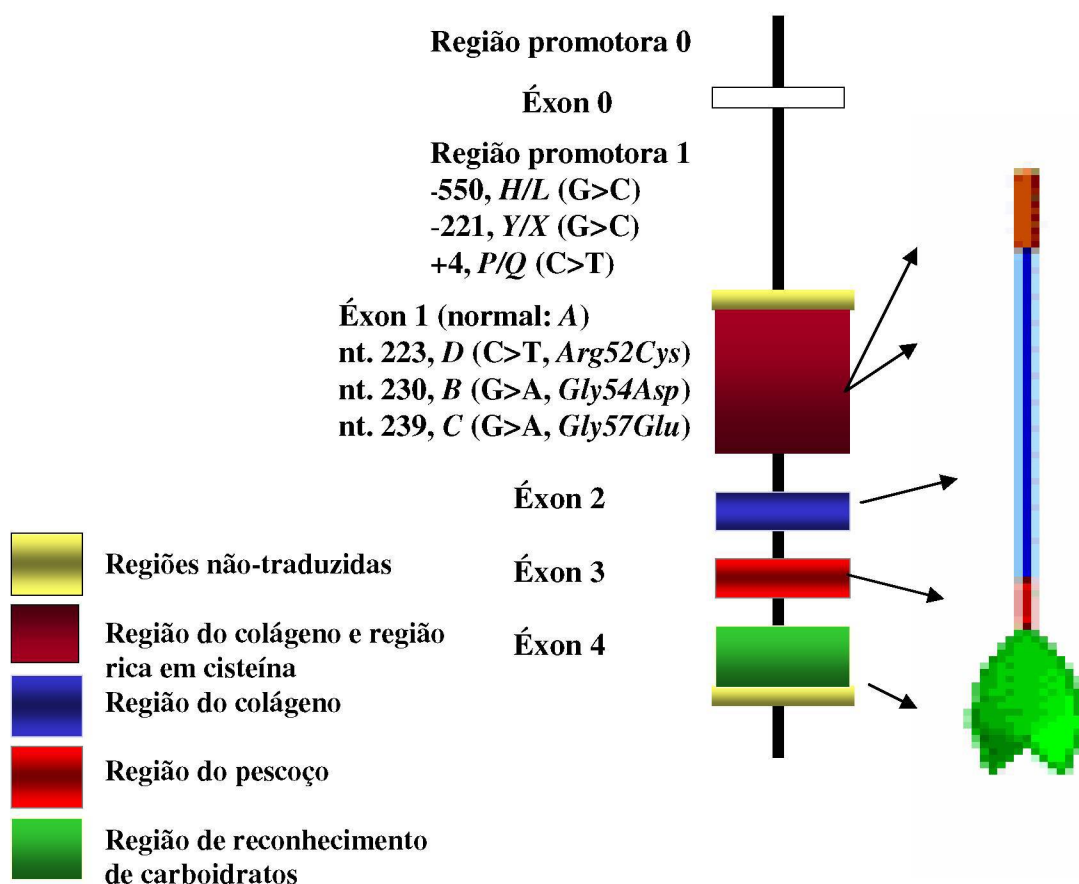
O éxon 1 corresponde à região estrutural do gene e codifica para o domínio N-terminal e parte do domínio de colágeno da cadeia. O éxon 2 codifica para o restante da cadeia de colágeno. O domínio do colágeno é onde ocorre a interação com a MASP2 e posterior ativação do complemento. O éxon 3 codifica para uma região intermediária, sítio de reunião das triplas hélices de colágeno. O éxon 4 apresenta as seqüências que codificam o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e de uma região não-traduzida (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

As mutações estruturais no gene *MBL2* são os determinantes mais importantes dos valores séricos da proteína, enquanto que as variantes da região promotora influenciam na expressão do gene. As três mutações mais frequentes estão no éxon 1 (nos códons 52, 54 e 57, designados *D*, *B* e *C*, respectivamente) do gene *MBL2*. O alelo selvagem do éxon 1 recebe a denominação de *A* e os alelos variantes recebem em conjunto a designação de *O*. As três regiões polimórficas na região promotora que influenciam na concentração sérica da proteína localizam-se nas posições -550, -221 e +4, e os alelos correspondentes recebem as denominações de H/L, X/Y e P/Q, respectivamente (KILPATRICK, 2002). Indivíduos homozigotos para as mutações do éxon 1 produzem quantidade de MBL indetectável por ELISA e sem capacidade de ativar complemento. Pacientes heterozigotos produzem unidades básicas de MBL em sua maioria monoméricas, enquanto que indivíduos homozigotos para o alelo selvagem *A* produzem dímeros, trímeros, tetrâmeros e oligômeros maiores, com maior capacidade de ativação de complemento (BOUWMAN, ROPEP e ROOS, 2006). A habilidade de ligação da proteína à microrganismos depende da

formação de oligômeros maiores, uma vez que a afinidade de ligação de um único CRD com os açúcares é baixa, e a oligomerização permite diversas ligações de alta avidéz simultâneas (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

A mutação mais frequente na população européia encontra-se no códon 54 do éxon 1, a qual resulta da substituição do aminoácido glicina por ácido aspártico. Outras duas mutações de ponto ocorrem nos códons 52 e 57, com a substituição de arginina por cisteína e de glicina por ácido glutâmico, respectivamente. A frequência de cada mutação do éxon 1 varia de acordo com a população estudada (tabela 1).

FIGURA 6 - CARACTERÍSTICAS DO GENE *MBL2*.



Estão representadas as mutações estruturais do éxon 1, dando origem aos alelos mutantes *B*, *C* ou *D* e as da região promotora. Também aparecem na figura os éxons responsáveis pela codificação de cada parte da molécula (adaptado de DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

As mutações observadas na região promotora do gene *MBL2* ocorrem nas posições -550, onde o dimorfismo conta com os alelos *H* e *L*, na posição -221, com os alelos *Y* e *X*, e +4, com os alelos *P* e *Q*. Os dimorfismos *H/L* e *X/Y* permitem a

modulação em nível transcricional, com produção de MBL $H > L$ e $Y > X$. Ainda, os haplótipos que contém o alelo usual *A* associado a um alelo *X*, produzem concentrações semelhantes aos alelos estruturais variantes *B*, *C* e *D*. Devido ao desequilíbrio de ligação entre as variantes de codificação e de regulação, o número de haplótipos nas populações humanas é limitado, restringido-se a poucos haplótipos (*HYPA*, *LYQA*, *LYPA*, *LXPA*, *HYPD*, *LYQC* e *LYPB*) (THIEL, FREDERIKSEN e JENSENIUS, 2005).

Também já foram descritas mutações em outras regiões do gene *MBL2*, localizadas no éxon 4, que também podem contribuir para as concentrações circulantes da proteína (BERNIG et al., 2005)

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS *MBL2* EM DIFERENTES POPULAÇÕES

População	Alelo selvagem <i>A</i>	Alelo <i>D</i> <i>223 C>T</i>	Alelo <i>B</i> <i>230 G>A</i>	Alelo <i>C</i> <i>239 G>A</i>
Europeus	0,79	0,06	0,14	0,01
Africanos	0,75	0,02	0,01	0,22
Chineses	0,88	0,01	0,11	0
Japoneses	0,75	0	0,25	0
Esquimós	0,87	0	0,13	0
Aborígenes australianos	1,00	0	0	0
Indígenas argentinos	0,54	0	0,44	0,02
Euro-brasileiros	0,82	0,063	0,11	0,003
Índios Kaingang (Brasil)	0,70	0	0,29	0,004
Índios Guarani (Brasil)	0,56	0	0,44	0

A mutação mais freqüente é a do códon 54 (*B*), com exceção da população africana, onde a mutação no códon 57 (alelo *C*) é mais freqüente (adaptado de KILPATRICK, 2002 e BOLDT, 2006).

A tabela 2 mostra a frequência dos haplótipos *MBL2* em diferentes populações e a frequência de homozigotos para as mutações. Dos portadores das mutações para a região codificadora, o haplótipo *LYQC* é encontrado principalmente nas populações africanas abaixo do Sahara, o haplótipo *HYPD* em caucasianos e o *LYPB* em asiáticos e nativos americanos. As mutações no gene *MBL2*, incluindo as da região promotora, são comuns, com frequências excedendo até 30% da população em certas áreas.

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS *MBL2* EM DIFERENTES POPULAÇÕES, E FREQUÊNCIA DE HOMOZIGOTOS PARA AS MUTAÇÕES

População	<i>n</i>	Haplótipos <i>MBL2</i>							Genótipo
		<i>HYP A</i>	<i>LYQ A</i>	<i>LYP A</i>	<i>LXP A</i>	<i>LYP B</i>	<i>LYQ C</i>	<i>HYP D</i>	HOMOZIGOTO O/O
Moçambicanos	154	0,06	0,27	0,30	0,13	0	0,24	0	0,06
Chiriguanos*	43	0,54	0,01	0,02	0,01	0,42	0	0	0,14
Mapuches*	25	0,38	0	0,08	0,04	0,46	0,04	0	0,16
Caucasianos	61	0,31	0,19	0,04	0,26	0,11	0,03	0,06	0,03
Quenianos	250	0,08	0,25	0,13	0,24	0,02	0,24	0,04	0,13
Esquimós	72	0,81	0	0,04	0,03	0,12	0	0	0,03
Brasileiros	105	0,26	0,16	0,11	0,14	0,21	0,05	0,03	0,09

A coluna homozigotos inclui a soma das combinações *B/B*, *C/C*, *D/D*. *B/C*, *B/D* e *C/D*. Em negrito estão os haplótipos dominantes. (adaptado de MADSEN et al. 1998 e MESSIAS-REASON et al., 2006) * tribos indígenas argentinas

A concentração sérica de MBL é geneticamente determinada e depende dos dois haplótipos *MBL2* herdados dos pais. Pelo fato da MBL ser considerada um reagente de fase aguda fraco, um aumento na concentração sérica da proteína de até três vezes em resposta à infecções pode ocorrer, uma vez que a secreção de MBL pode ser estimulada pela presença de citocinas pró-inflamatórias (GABAY e KUSHNER, 1999).

O genótipo MBL é um bom preditor da concentração sérica de MBL. Cerca de 90% dos indivíduos homozigotos para o alelo *A* possuem concentrações superiores a 0.6 µg/ml, sendo *HYP A* relacionado às concentrações altas de MBL sérica. Cerca de 85% dos indivíduos heterozigotos (*A/O*) possuem concentrações inferiores a 0.6 µg/ml. Homozigotos para as mutações estruturais geralmente têm concentrações muito baixas de MBL, assim como os indivíduos homozigotos para o haplótipo *LXPA*. Entretanto, dentro do mesmo genótipo uma variação da concentração da proteína pode ser encontrada entre diferentes indivíduos (figura 7).

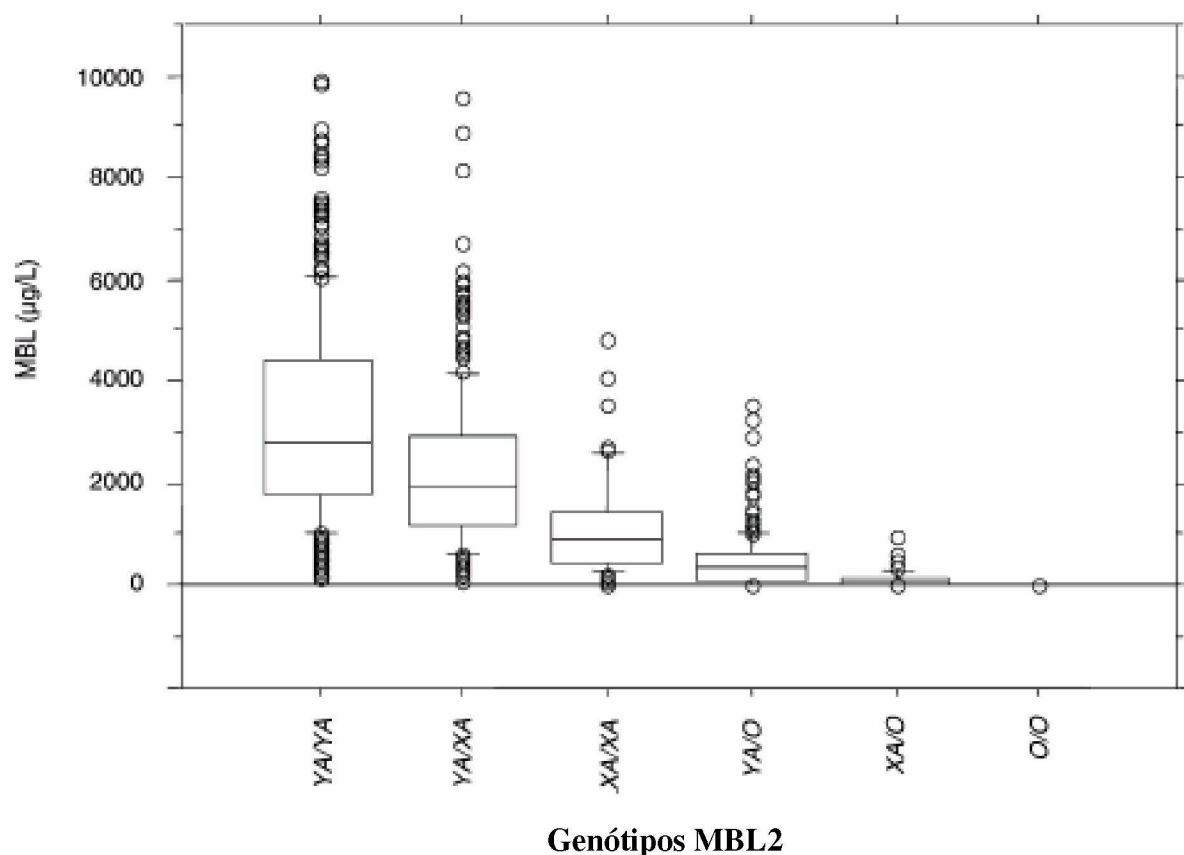
A tabela 3 mostra a frequência dos genótipos de *MBL2* e sua relação com a concentração sérica da MBL na população européia.

TABELA 3 - FREQUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS COMBINADOS E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE *MBL2*

Genótipo <i>MBL2</i>	Frequência (%)	Concentração média de MBL (ng/ml)	Genótipo <i>MBL2</i>	Frequência (%)	Concentração média de MBL (ng/ml)
<i>HYP A/HYP A</i>	17,64	2500	<i>HYP A/HYP D</i>	4,4	700
<i>HYP A/LXPA</i>	11,76	1400	<i>LXPA/HYP D</i>	2,9	20
<i>HYP A/LYQA</i>	11,76	2400	<i>LYQA/HYP D</i>	2,9	800
<i>LXPA/LXPA</i>	10,29	200	<i>LYPB/LYPB</i>	2,9	20
<i>LYQA/LXPA</i>	8,8	1000	<i>HYP A/LYPA</i>	2,9	1900
<i>LYQA/LYQA</i>	8,8	1900	<i>HYP A/LYPB</i>	1,4	300
<i>HYP A/LYPB</i>	7,3	400	<i>LYPA/HYP D</i>	1,4	600
<i>LYQA/LYPB</i>	4,4	300			

As concentrações séricas de MBL são determinadas pela combinação de sete haplótipos diferentes. As concentrações séricas maiores se encontram relacionadas ao haplótipo *HYP A* em homozigose. Os dados apresentados se referem à população européia (adaptado de KILPATRICK, 2002).

FIGURA 7 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL DE ACORDO COM O GENÓTIPO ESTRUTURAL E DA REGIÃO PROMOTORA X/Y



Os espaços cheios representam a distância interquartis, e as barras representam a variação do 10º ao 90º percentil. Os resultados são referentes a pacientes dinamarqueses (adaptado de GARRED et al., 2003).

3.2.4 Funções da proteína MBL

3.2.4.1 Ativação de complemento:

A ligação da MBL a microrganismos pode resultar na sua destruição pela ativação da cascata do complemento e formação do complexo lítico de membrana (C5b-9) (TURNER, 1996).

3.2.4.2 Opsonização e ativação da fagocitose:

Ao ligar-se a resíduos de açúcares, a MBL recobre a superfície de microrganismos-alvo, opsonizando-os para a fagocitose. Para que isso ocorra, é

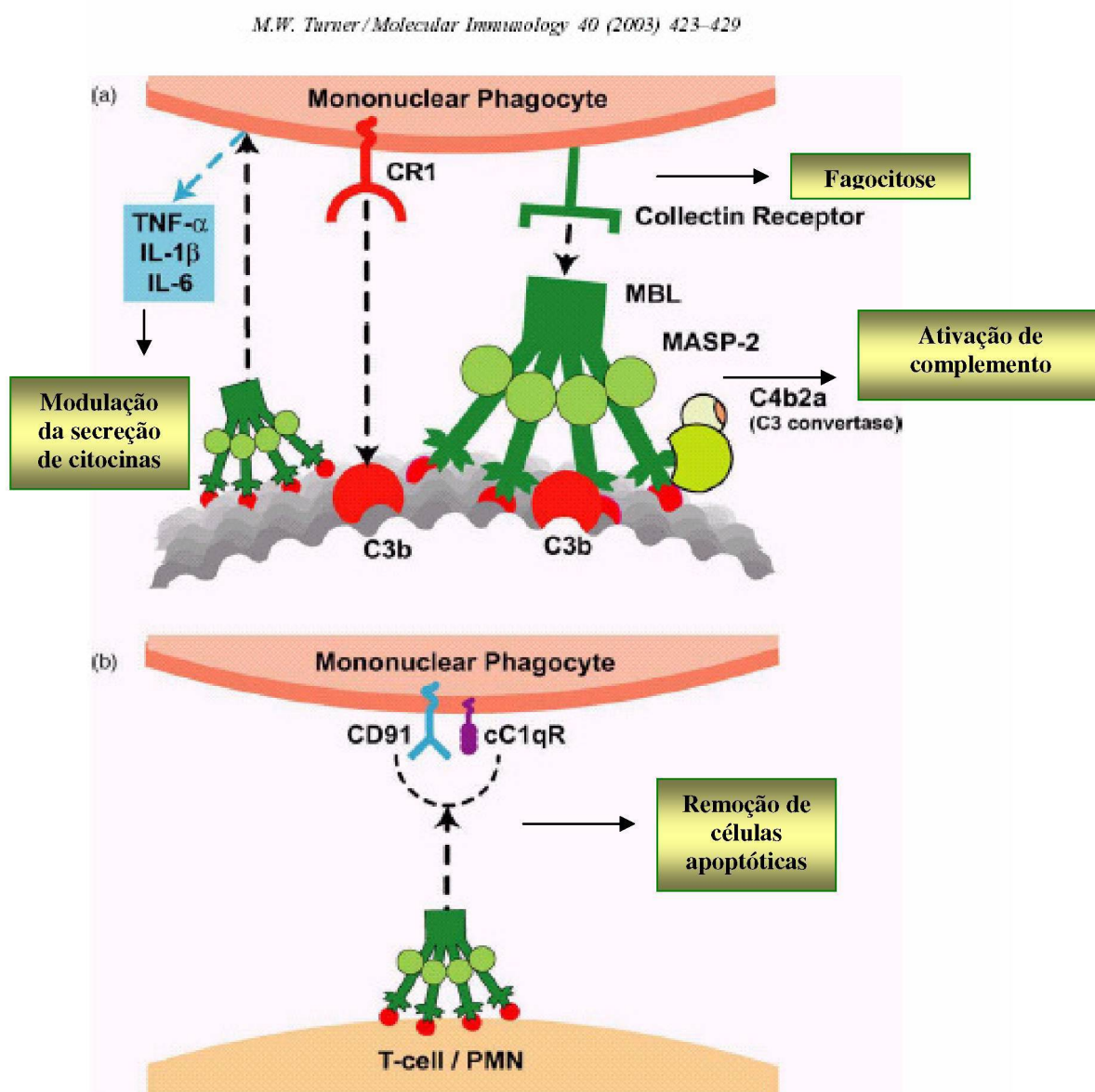
necessária uma interação do domínio colagenoso com receptores presentes nas células fagocíticas, o que pode resultar na captação e morte do microrganismo (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006). Um outro mecanismo pelo qual a opsonização pode ocorrer é pela ativação do complemento com deposição de C3b nas superfícies ativadoras (figura 8).

3.2.4.3 Modulação da resposta inflamatória:

AITTONIEMI et al. (1997), estudando pacientes com suspeita de infecção ou com infecção documentada, encontraram também relação negativa entre concentrações séricas de MBL e de interleucina-1 (IL-1).

Outras evidências demonstraram que a concentração de MBL influencia a secreção de TNF- α , interleucina-6 e IL-1 β . A produção *in vitro* de TNF- α por monócitos humanos incubados com *Candida albicans* aumentou após pré-incubação das leveduras com MBL (GHEZZI et al., 1998). A adição de concentrações altas de MBL a monócitos humanos incubados com a bactéria *Nesisseria meningitidis* diminuiu a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, enquanto que concentrações menores aumentaram a secreção de IL-6 e IL-1 β . Tal experimento demonstra o efeito dose-dependente da MBL sobre a secreção de IL-6 (JACK et. al, 2001). Já monócitos fagocitando formas promastigotas de *Leishmania chagasi* opsonizadas com MBL, secretam concentrações maiores de IL-6 e TNF- α que células que fagocitam parasitas não-opsonizados (SANTOS et al.,2001). Ainda, em trabalho realizado por HEGGELUND et al. (2005), se observou um aumento na secreção de TNF- α por polimorfonucleares humanos de pacientes infectados pelo HIV e de controles saudáveis quando estimulados com MBL e co-estimulados com HIV-gp120 e manose.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DAS FUNÇÕES DA PROTEÍNA MBL



Em (a) está representada a ativação de complemento através da interação com os receptores de colectinas presentes nas superfícies dos fagócitos. Em (b) está representada a função de auxílio na remoção de células apoptóticas (adaptado de TURNER, 2003).

Um aumento de produção de IL-10 e IL-1 β por monócitos humanos estimulados com componentes não-lipopolissacárides da *Neisseria meningitidis* na presença de MBL foi observado em experimento realizado por SPRONG et al. (2004).

As concentrações de TNF- α , IL-6 e interferon- γ não foram afetadas nesses experimentos.

NADESALINGAM et al. (2005), em estudo *in vitro*, observaram um aumento na secreção de IL-8, IL-10 e RANTES (uma quimiocina da família da IL-8) e diminuição da secreção de TNF- α por monócitos humanos incubados com peptidoglicano (o principal constituinte da parede celular de bactérias Gram-positivas) e MBL.

Estudando monócitos humanos incubados com MBL em condições fagocíticas (adição de lipopolissacarídeo bacteriano), FRASER et al. (2006) observaram uma redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β) e um aumento na secreção de IL-10, IL-6, IL-1Ra (antagonista do receptor de IL-1). Não se observou influência na secreção de TNF- α .

O quadro 2 ilustra as ações modulatórias da MBL sobre a produção de citocinas, fagocitose e remoção de células apoptóticas.

A MBL apresenta a capacidade de se ligar ao receptor de Clq (calreticulina) nos fagócitos, mecanismo pelo qual auxilia na remoção de células apoptóticas (OGDEN et al., 2001), figura 8.

Em um estudo realizado por GHIRAN et al. (2000), se demonstrou que o receptor do complemento tipo 1 (CR1/CD35), tanto em sua forma celular quanto secretória, funciona como receptor para MBL. Ainda, a MBL pode se ligar diretamente ao receptor de lipopolissacarídeo (LPS) CD14 modulando a liberação de citocinas mediadas por LPS.

PALANIYAR, NADESALINGAM e REID (2004) demonstraram que tanto a MBL, quanto as colectinas SP-A e SP-D são capazes de se ligar ao DNA fita simples e dupla de diversas origens (bacteriano, genômico e de síntese de oligonucleotídeos), e que a ligação ocorre através do CRD ou do domínio de colágeno.

Por outro lado, ARAI, TABONA E SUMMERFIELD (1993) observaram *in vitro* que a transcrição do gene *MBL2* parece ser regulada pela influência de interleucinas (IL), sofrendo um aumento pela ação de IL-6 e inibição pela IL-1. Essa não foi afetada pelo interferon- γ , TNF- α e fator de crescimento e transformação beta

(TGF- β). Tais dados demonstram que há assim como a MBL influência na secreção de citocinas e o oposto também é verdadeiro.

QUADRO 2 - MODULAÇÃO DA MBL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Referências	Objetivo do Estudo	Observações Importantes
SOELL et. al (1995)	Avaliação da secreção de TNF- α por monócitos humanos estimulados por polímeros de glicose e ramnose do estreptococo	Inibição da secreção de TNF- α mediada pela MBL
AITTONIEMI et. al (1997)	Pacientes pediátricos com suspeita ou portadores de infecção	Correlação inversa das concentrações séricas de IL-1 e MBL
GHEZZI et. al (1998)	Monócitos humanos incubados com formas leveduriformes de <i>Cândida albicans</i>	Aumento da secreção de TNF- α e vitronectina pelos monócitos na presença da MBL
SANTOS et. al (2001)	Monócitos humanos infectados com formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	Aumento da secreção de TNF- α e IL-6 pelas células que fagocitaram parasitas opsonizados com MBL
JACK et. al (2001)	Monócitos humanos incubados com <i>Neisseria meningitidis</i> do grupo B e MBL	Em altas concentrações de MBL, inibição da produção de IL-6, IL-1- β e TNF- α pelos monócitos. Em concentrações baixas, aumento da secreção de IL-1- β e IL-6
SPRONG et. al (2004)	Monócitos humanos incubados com componentes não-lipopolissacárides de <i>Neisseria meningitidis</i>	Aumento da produção de IL-1 β , IL-10 pelos monócitos. Nenhum efeito sobre a produção de IL-6, interferon- γ e TNF- α
HEGGELUND et. al (2005)	Monócitos de indivíduos saudáveis e HIV positivos incubados com MBL e proteína gp-120 do vírus HIV	Aumento da secreção de TNF- α em ambos os grupos
NADESALINGAM et. al (2005)	Monócitos humanos incubados com peptidioglicano e MBL	Aumento da secreção de IL-8, IL-10 e RANTES. Diminuição da secreção de TNF- α
FRASER (2006) et. al	Monócitos humanos incubados com LPS e MBL	Diminuição na secreção de IL-1 α e IL-1 β e um aumento na secreção de IL-10, IL-6, IL-1Ra pelos monócitos. Não houve influencia na secreção de TNF- α .

Pode-se observar a natureza pluripotente da MBL, com efeitos diferentes sobre a secreção de citocinas de acordo com cada situação, seja clínica ou experimental.

3.2.5 Interações da MBL com células do hospedeiro

3.2.6 Deficiência de MBL

Em 1976, SOOTHILL e HARVEY relataram casos de crianças com infecções de repetição e deficiência de desenvolvimento, cujo soro era incapaz de opsonizar leveduras *in vitro*. Tal deficiência foi também observada em 5% da população geral. Em 1989 (SUPER et al.) relacionaram pela primeira vez esta imunodeficiência à concentrações séricas diminuídas de MBL. A capacidade da MBL de ativar a cascata do complemento foi descrita primeiramente por IKEDA et al. em 1987. Após as descrições das mutações nos códons 54 (SUMIYA et al., 1991), 57 (LIPSCOMBE et al., 1992) e 52 (MADSEN et al., 1994) do éxon 1, responsáveis pelas alterações estruturais da molécula da MBL e das variantes da região promotora do gene (MADSEN et al., 1995), responsáveis pela expressão do gene *MBL2*, o papel destas passou ser estudado em diferentes doenças infecciosas e auto-imunes. Atualmente, a deficiência de MBL é considerada como a imunodeficiência mais comumente observada (TURNER, 1996). Na infância, tal imunodeficiência está associada a infecções graves (SUMMERFIELD et al. 1997) e a um risco relativo maior (cerca de duas vezes) de infecções do trato respiratório superior em crianças menores de dois anos de idade (KOCH et al., 2001). Associação da deficiência de MBL com infecções graves na fase adulta também foi relatada por outros autores em um pequeno grupo de pacientes (SUMMERFIELD et al., 1995). Por outro lado, em outro estudo, DAHL et al. (2004) avaliaram os genótipos *MBL2* em 9245 pacientes dinamarqueses e sua associação com risco de infecção, doenças comuns (asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência coronariana, abortamento), incluindo necessidade de hospitalização e óbito, não encontrando diferença estatística entre os homozigotos para o alelo selvagem (*A/A*), os heterozigotos (*A/O*) e os homozigotos para as mutações (*O/O*). Considerando-se como variável o êxito letal, o estudo teve um seguimento de 8 anos.

3.2.7 MBL e infecções

A influência da MBL na suscetibilidade e no curso clínico de doenças infecciosas tem sido o objetivo de numerosos estudos.

A capacidade de ligação da MBL com inúmeros patógenos entre eles bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* e outras), vírus (influenza, HIV, *Herpes simplex 2*), fungos (*Cândida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) e protozoários (*Plasmodium falciparum*, *Trypanozoma cruzi*) já foi demonstrada em estudos anteriores (DOMMET, KLEIN e TURNER, 2006).

O papel do gene *MBL2* na infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) ainda é controverso. THOMAS et al. (1996) encontraram uma frequência maior da mutação do códon 52 (alelo *D*) em pacientes europeus portadores de hepatite B aguda e hepatite B crônica (11% e 27%, respectivamente, *versus* 4% em controles saudáveis de origem caucasiana). A frequência de mutações dos códons 54 e 57 foi semelhante em todos os grupos. Por outro lado, CHEONG et al. (2005), estudando pacientes chineses portadores assintomáticos do vírus B, portadores de hepatite B crônica inativa, portadores do HBV com doença ativa e cirróticos, não encontraram relação entre mutações do códon 54 (mutação única encontrada em orientais) com a progressão da doença.

SASAKI et al. (2000), estudando 52 pacientes portadores de hepatite C e 50 controles saudáveis, encontraram um aumento não-significante da frequência da mutação do códon 54 (32.9% *vs* 21%), sendo que todos os pacientes portadores do alelo mutante eram portadores de hepatite crônica ativa ou cirrose hepática. PEDROSO (2004), estudando pacientes portadores de hepatite C crônica, encontraram uma frequência maior do genótipo *YA/YO* (responsável por concentrações séricas intermediárias de MBL) em pacientes com fibrose hepática moderada/grave, quando comparados a controles saudáveis. Tais resultados sugerem que a MBL pode exercer influência na progressão da doença.

Os efeitos da MBL na transmissão e progressão da infecção pelo HIV ainda são objetos de controvérsia, havendo estudos que mostram associação positiva (GARRED et al., 1997), nenhum efeito (McBRIDE et al., 1998) ou efeito protetor em relação à infecção mas deletério quanto à progressão (ZEN, 2005).

Em relação a ocorrência de infecções no LES, GARRED et al. (1999a) observaram uma maior taxa de infecções, especialmente pneumonia, em pacientes caucasianos portadores dos alelos variantes em homozigose quando comparados aos portadores do alelo normal. Os mesmos autores, estudando 149 pacientes caucasianos portadores de fibrose cística, observaram que os portadores dos alelos variantes apresentavam função pulmonar reduzida, maior taxa de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* e menor expectativa de vida em relação aos pacientes homozigotos para o alelo normal (GARRED et al., 1999b).

Uma vez que infecções, como a causada por *Chlamydia pneumoniae* passaram a ser estudadas como possíveis causadoras dos eventos iniciais que levam à doença arterial coronariana (DAC), uma importância passou a ser dada ao papel da MBL no desenvolvimento da aterosclerose. MADSEN et al. (1998) observaram uma frequência elevada de homozigose dos alelos variantes do *MBL2* em pacientes portadores de aterosclerose grave, quando comparados a controles.

Também, já foi observada associação dos genótipos relacionados à concentrações séricas menores de MBL com infecções pós-quimioterapia e a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (DOMMET, KLEIN e TURNER, 2006).

Em relação à infecção por microrganismos intracelulares que utilizam os receptores de C3 (CR1) para invadirem as células do hospedeiro, há evidências que concentrações séricas baixas de MBL possam exercer um efeito protetor contra essas infecções. São compatíveis com esta hipótese os achados na leishmaniose visceral (SANTOS et al., 2001), na meningite tuberculosa (HOAL-VAN HELDEN et al., 1999) e na forma lepromatosa da hanseníase (DORNELLES, PEREIRA-FERRARI, MESSIAS-REASON, 2006; MESSIAS-REASON et al., 2007).

3.2.8 MBL e outras doenças

Estudos recentes têm abordado a relação do polimorfismo gênico *MBL2* e/ou as concentrações séricas da proteína com a patogênese de doenças inflamatórias. A MBL não reconhece em condições de homeostase os tecidos do próprio organismo, porém, em algumas situações, principalmente relacionadas a estresse oxidativo, como

o que se observa na injúria pós-reperfusão (COLLARD et. al, 2000) e no infarto agudo do miocárdio (JORDAN et. al., 2003) ou à alteração de superfícies celulares causadas por glicosilação, fenômeno observado no diabetes *mellitus* (HANSEN et. al, 2003), tal interação pode ocorrer, levando a ativação do sistema complemento.

IP et al. (2000), estudando 211 pacientes de origem chinesa portadores de artrite reumatóide (AR), encontraram associação do alelo *B* e de concentrações séricas baixas da proteína com o desenvolvimento da doença. Ainda, as mutações e as concentrações baixas foram associadas à doença erosiva e à manifestações extra-articulares graves. Já GRAUDAL et al. (2000) associaram concentrações séricas baixas de MBL a um pior prognóstico na AR, incluindo índices radiográficos menos favoráveis, possivelmente devido à ação moduladora que essa proteína exerce sobre a secreção de TNF- α , molécula central na patogênese da AR. Por outro lado, SAEVARSDOTTIR et al. (2001), não observaram frequência aumentada de deficiência de MBL em 65 pacientes islandeses portadores de AR acompanhados prospectivamente e 63 mulheres analisadas retrospectivamente. Porém, as concentrações baixas da proteína foram associadas a uma pior progressão radiológica.

Outros autores também observaram associação dos genótipos relacionados a menor produção de MBL com o desenvolvimento de LES, provavelmente devido à remoção deficiente de imunocomplexos (DAVIES et al., 1995). Demonstrou-se também que complicações trombóticas no LES estão associadas a genótipos mutantes homozigóticos desta proteína (OHLENSCHLAEGGER et al., 2004). Recentemente, uma meta-análise incluindo 15 estudos abordando o polimorfismo da MBL no LES (LEE et al., 2005), levou os autores a concluir que as mutações do códon 54 (alelo *B*), da região promotora -550 (alelo *L*) e da região promotora -221 (alelo *X*) representam fatores de risco para o desenvolvimento do LES.

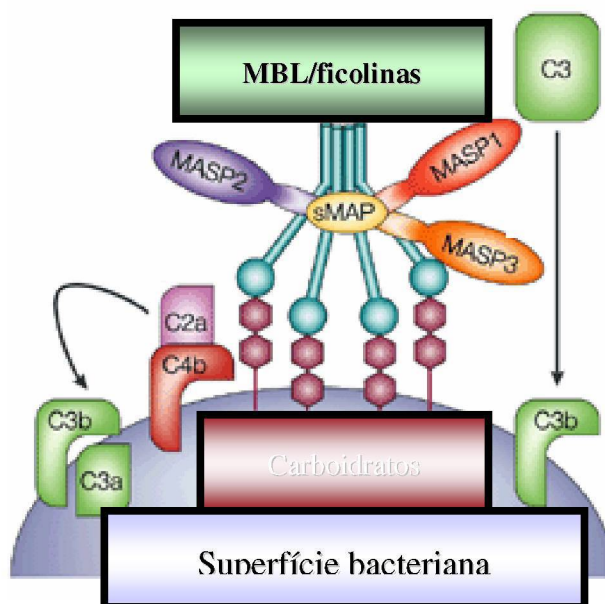
Concentrações séricas baixas de MBL também foram associadas à dermatomiosite do adulto, provavelmente relacionadas ao papel da MBL na remoção de queratinócitos apoptóticos (WERTH et al., 2002) e à doença de Behçet, sendo que

nesses pacientes observou-se uma associação da gravidade da doença com concentrações muito baixas de MBL (<100 ng/ml).

3.3 Serina proteases associadas à MBL (MASPs)

Compõe também a via das lectinas, além da MBL, as serina-proteases associadas à MBL (*mannan-binding lectin –associated serine proteases – MASPs*) e as ficolinas. Em 1992, MATSUSHITA e FUJITA descreveram uma nova enzima com a capacidade de levar à formação da C3 convertase C4b2a, a qual denominaram de *MBL-associated serine protease 1* (MASP-1, serina protease associada a MBL). Em 1997, THIEL et al. demonstraram que tal atividade era principalmente mediada por outra enzima, então denominada *MBL-associated serine protease 2* (MASP-2). Mais tarde, foram identificadas a MASP-3 (STOVER et. al, 2001) e uma proteína não-enzimática denominada Map-19 ou sMAP - um fragmento da MASP-2 com quatro aminoácidos adicionais (STOVER et. al, 1999) (figura 9).

FIGURA 9 – COMPONENTES DA VIA DAS LECTINAS



A ativação de complemento pela via das lectinas ocorre quando o complexo MBL-MASP-2 entra em contato com uma superfície ativadora, geralmente composta por carboidratos (adaptado de FUJITA, 2002).

As ficolinas (H-ficolina, L-ficolina e M-ficolina, sendo as duas primeiras proteínas humorais e a última presente na superfície de monócitos) também ativam o complemento via MASP-2 (MATSUSHITA e FUJITA, 2002) (figura 9). Estas diferem da MBL pelo fato de não apresentarem um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), mas sim um domínio semelhante ao fibrinogênio. As ficolinas não são lectinas no sentido estrito do termo, isto é, proteínas que se ligam exclusivamente a carboidratos, pois possuem afinidade indiscriminada por grupos acetil (SORENSEN, THIEL e JENSENIUS, 2005).

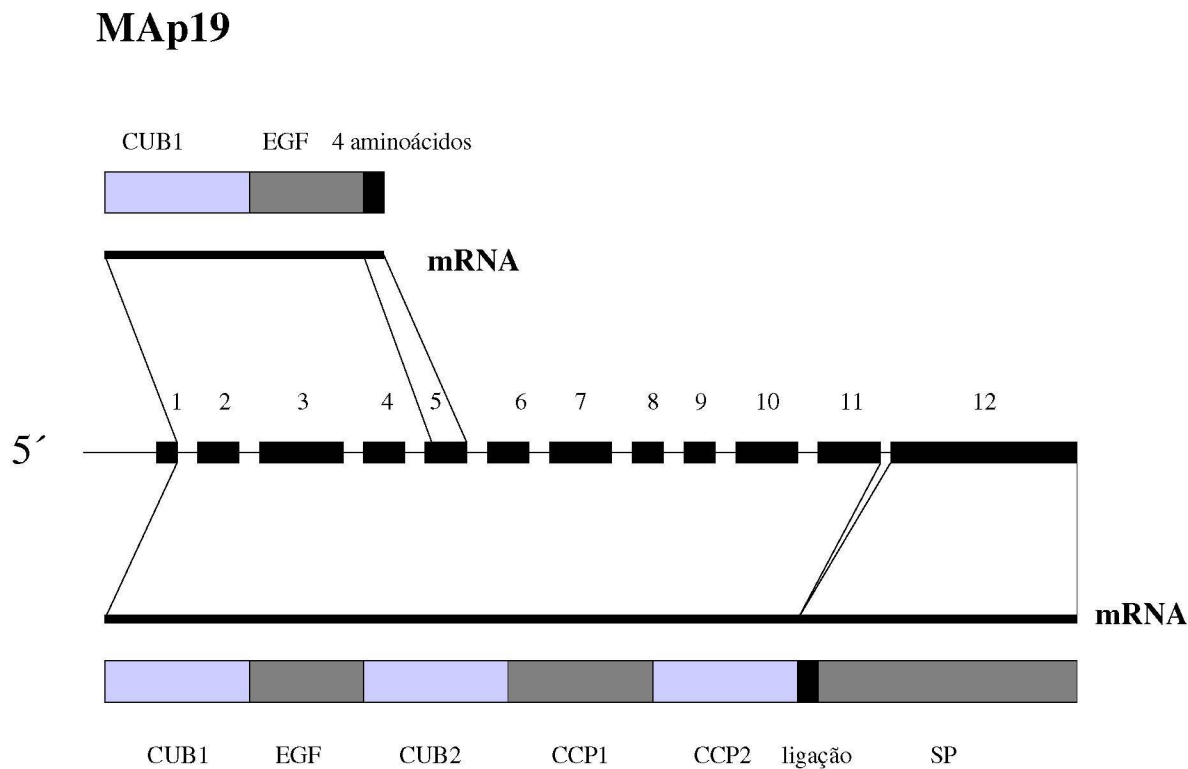
A ativação do complemento via MBL e ficolinas é dependente da sua associação com as MASPs, portanto hipoteticamente a deficiência destas teria consequências mais amplas que a deficiência da própria MBL.

3.3.1 Genética e Estrutura

O gene *MASP2* está localizado no cromossomo 1p36.23-31, contém 12 éxons e 6 diferentes domínios: CUB1 (domínio encontrado nos componentes do complemento C1r/C1s, Uegf e proteína óssea morfogênica 1), domínio EGF (semelhante ao fator de crescimento epidérmico), CUB2, domínios CCP (proteína de controle do complemento) 1 e 2 e domínio serina-protease (SP) (STOVER et al., 2001) (figura 10).

A proteína MASP-2 é codificada por 11 éxons. Um único éxon (éxon 12) codifica para a região de ligação e para a região serina protease, enquanto os demais domínios são codificados por 10 éxons. O éxon 5 do gene *MASP2/Map19* permite a geração de um RNAm variante que codifica dois domínios comuns (CUB1 e EGF) e quatro aminoácidos adicionais C-terminais característicos da Map19. O fígado é o único sítio onde MASP-2 e Map19 foram detectadas (SORENSEN, THIEL e JENSENIUS, 2005).

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS E ÉXONS DO GENE *MASP2/MAP19*



A proteína sMap é codificada pelos éxon 2, 3, 4 e 5, sendo que este último codifica para 4 aminoácidos. O éxon 1 representa uma região não-traduzida. (adaptado de SORENSEN, THIEL e JENSENIUS, 2005).

O gene *MASPI* é composto por 17 éxons e se localiza no cromossomo 3q27-28. Através de *splicing* alternativo, o mesmo codifica para as proteínas MASP-1 e MASP-3. A região não-catalítica N-terminal de ambas as proteínas é idêntica e está na dependência dos 10 primeiros éxons. A região de ligação e a região C-terminal serina protease da MASP-1 é codificada por 6 éxons e da MASP-3 por um único éxon apenas. O sítio primário de produção de MASP 1 e de MASP-3 é o fígado (SCHWEABLE, 2002).

3.3.2 Interação MASPs/MBL

Esta associação se apresenta em padrões diferentes de acordo com a MASP presente neste complexo. Oligômeros menores de MBL contém MASP-1 e MASP-19, enquanto que oligômeros maiores apresentam a MASP-2. Atualmente, apenas a MASP-2 tem uma função claramente definida na ativação do complemento. Esta inicialmente cliva C4 e posteriormente C2, originando a C3 convertase, C4b2a (WALLIS, 2007). A MASP-1 cliva C4, mas não C2, sendo portanto incapaz de ativar o complemento isoladamente, mas pode aumentar a ativação via complexos MASP-2/MBL (CHEN e WALLIS, 2004). A MASP-3 também é amplamente relacionada a oligômeros maiores e exerce uma inibição competitiva da ligação da MASP-2 com a MBL, tendo uma função aparentemente regulatória (DAHL et. al, 2001).

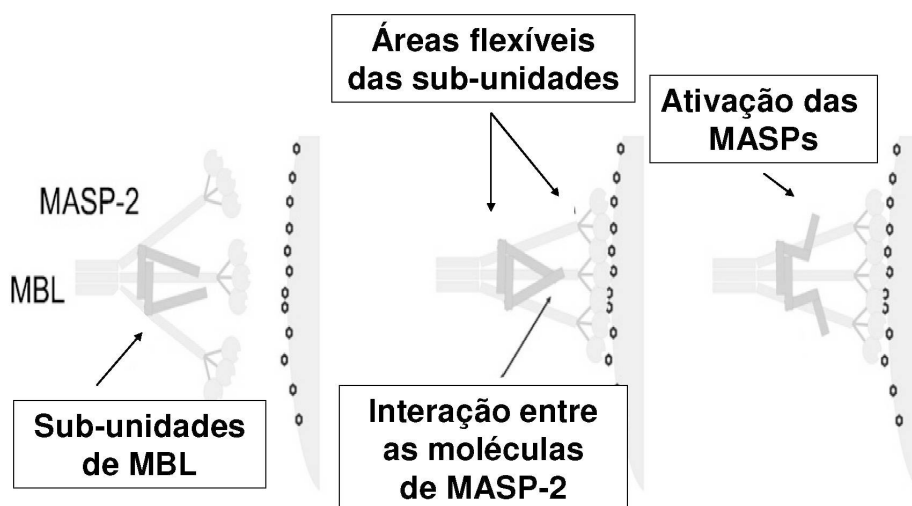
A ligação MASP-2/ MBL ocorre entre os domínios de colágeno da MBL e os domínios N-terminais CUB1-EGF-CUB2 da MASP-2, ligação esta dependente de cálcio. Em estudo recente, TEILLET et al. (2007) demonstraram que a mesma ocorre através do aminoácido lisina posicionado na região 55 da cadeia colagenosa. A ativação da MASP-2 através da MBL, se dá pelo aumento da autocatálise quando a MBL se liga a uma superfície ativadora (WALLIS, 2007). O mecanismo de ação mais provável para a ativação da MASP-2 é o rearranjo das sub-unidades de MBL no momento da ligação com uma superfície ativadora. As mudanças conformacionais no oligômero MBL possibilitam o alinhamento das regiões flexíveis da MASP2, permitindo que o sítio catalítico de uma delas entre em contato com a região de ligação da outra (CCP2-SP), com clivagem subsequente e seguimento da ativação da cascata (WALLIS, 2007) (figura 11).

3.3.3 Mutações no gene *MASP2* e associação com doenças

Deficiência hereditária de MASP-2 foi relatada pela primeira vez em 2003 em um paciente masculino com pneumonias pneumocócicas de repetição e

manifestações auto-imunes (sintomas articulares, mialgias, presença de anticorpo antinuclear). Neste paciente foi encontrada uma mutação de ponto (adenina por guanina) no códon 120 (D120G, c.359A>G, códon 105 na proteína madura) do éxon 3, em homozigose. O mesmo apresentava atividade desprezível da via das lectinas, e familiares heterozigotos para a mutação demonstravam atividade abaixo do 5º percentil (STENGAARD-PEDERSEN et. al, 2003). A mutação em questão altera a estrutura do domínio CUB1 na proteína madura, o qual é crítico para a ligação com a MBL (figura 12).

FIGURA 11 - ATIVAÇÃO DA MASP-2



O contato do complexo MASP-2/MBL com uma superfície de carboidratos leva a mudanças conformacionais nas sub-unidades de MBL através da região flexível, permitindo assim a ativação da MASP-2 (adaptado de WALLIS, 2005)

A partir de então o polimorfismo do gene *MASP2* passou a ser estudado em associação com doenças inflamatórias e infecciosas.

Em 293 crianças polonesas com infecções recorrentes do trato respiratório superior, CEDZYNSKI et al. (2004) observaram uma criança portadora da

mutação D120G em homozigose e uma criança heterozigota para a mutação. Ambas apresentavam a atividade da via das lectinas reduzida (deposição de C4b) analisada através de ELISA .

STOVER et. al. (2005), estudando a mesma mutação em 314 trios de pacientes britânicos portadores de psoríase e seus pais, 894 indivíduos no total) e em 129 trios controle, não observaram diferenças na frequência do alelo mutante entre pacientes e indivíduos saudáveis (0,0379 vs 0,0379, respectivamente).

Já YTTING et al. (2005) mediram as concentrações séricas de MASP-2 em 605 pacientes pré-operatórios de câncer colorretal e em 105 controles, observando valores significativamente maiores de MASP-2 no grupo de pacientes. Ainda, houve correlação das concentrações de MASP-2 com as taxas de recorrência do câncer e de mortalidade. O número de infecções pós-operatórias não foi relacionada às concentrações da proteína.

A mutação D120G foi analisada em 109 pacientes portadores de fibrose cística (OLESEN et al., 2006). Os autores não observaram relação da apresentação da mesma em heterozigose com a ativação do complemento através da MBL nem com a função pulmonar dos indivíduos. Neste mesmo estudo os autores identificaram uma paciente portadora de doença pulmonar grave, homozigota para a mutação. Desta maneira, concluíram que a disfunção total de MASP-2 pode ser um importante fator modulador da doença pulmonar na fibrose cística.

LOZANO et. al (2005), estudando o polimorfismo genético da *MASP2* em um grupo de 65 africanos e 104 espanhóis, encontraram 3 novas variantes do gene no éxon 3, domínio CUB1, nas posições 84 (Arg/Gln), 103 (Arg/Cys) e 111 (Pro-Leu). As variantes 84, 103 e 111 foram encontradas somente em africanos (3,6%, 1,8% e 3,6%, respectivamente). A variante D120G foi observada de maneira semelhante em ambos os grupos (3 espanhóis, 1,4% e 2 africanos, 2%), frequência menor do que a observada em dinamarqueses (5,5%) (STENGAARD-PEDERSEN et. al, 2003).

Recentemente, THIEL et al. (2007) analisaram a frequência da mutação que resulta na duplicação de quatro aminoácidos (p.156_159dupCHNH), assim como das mutações de ponto p.R99C, p.R118C, p.D120G, p.P126L e p.V377A em africanos

de Zâmbia, chineses de Hong Kong, caucasianos dinamarqueses, índios brasileiros e Inuits da Groelândia ocidental e oriental (tabela 1).

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS PORTADORES DE ALELOS VARIANTES *MASP2* EM DIFERENTES POPULAÇÕES

		Africanos (n=194)	Chineses (n=573)	Caucasianos (n=350)	Inuits ocidentais (n=41)	Inuits orientais (n=96)	Ameríndios brasileiros (n=324)
p.R99Q	<i>AG</i>	30 (15,5%)	NR	1 (0,1%)	0	0	2 (0,6%)
	<i>AA</i>	1 (0,5%)		0	0	0	0
p.R118C	<i>CT</i>	0	NR	0	0	0	0
	<i>TT</i>	0		0	0	0	0
p.D120G	<i>AG</i>	0	0	27 (7,7%)	3 (7,3%)	0	0
	<i>GG</i>	0	0	0	0	0	0
p.P126L	<i>CT</i>	50 (25,7%)	0	0	0	0	4 (1,2%)
	<i>TT</i>	6 (3%)	0	0	0	0	0
p.156_159dup		0	3 (0,26%)	0	0	0	0
p.V377A	<i>TC</i>	49 (25,2%)	NR	7 (1,3%)	0	14 (14,5%)	25 (7,7%)
	<i>CC</i>	8 (4,1%)		0	0	0	1 (0,3%)

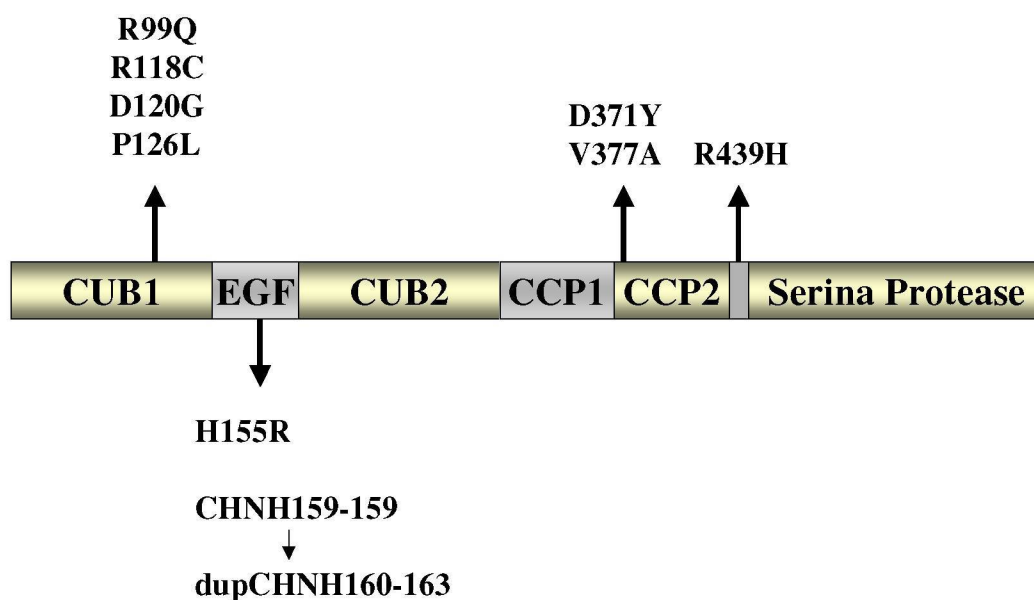
Três mutações foram observadas na população de índios brasileiros (adaptado de THIEL et. al, 2007). NR: não-realizado.

As concentrações séricas de MASP-2 encontravam-se reduzidas nos indivíduos portadores das mutações p.156_159dupCHNH, p.D120G, p.V377A e p.P126L e aumentadas nos portadores da variante p.R99C, mas a atividade da via das

lectinas era não-funcional apenas nos indivíduos homozigotos para a mutação p.P126L (figura 12). Excetuando-se a variante p.D120G, ainda não são relatadas associações destas mutações com doenças, as quais se tornam objetos interessantes para estudos futuros.

Deficiências de MASP-1 e MASP-3 ainda não foram relatadas (SORENSEN, THIEL e JENSENIUS, 2005).

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DOS POLIMORFISMOS CONHECIDOS DO GENE *MASP2*.



Os polimorfismos p.156_159dupCHNH e p.V377A estão associados à baixas concentrações séricas de MASP-2, mas com atividade normal de ativação de complemento. O polimorfismo p.D120G em homo ou heterozigose e o polimorfismo p.P126L em homozigose comprometem a função da via das lectinas (adaptado de THIEL et al., 2007)

3.4. Febre reumática

3.4.1 Generalidades

A febre reumática (FR) pode ser caracterizada como uma doença inflamatória de caráter auto-imune que se desencadeia após a infecção de orofaringe pelo estreptococo do grupo A de Lancefield (EGA). Sua característica clássica anátomo-patológica é o dano às fibrilas do colágeno e à matriz do tecido conjuntivo. O processo inflamatório envolve múltiplos órgãos: primariamente o coração, as articulações, a pele e o sistema nervoso central. As manifestações clínicas da FR seguem uma infecção de orofaringe pelo EGA, com um período de latência de aproximadamente 3 semanas. A maior importância da FR encontra-se no fato que a mesma é capaz de causar fibrose das válvulas cardíacas, com sérios prejuízos hemodinâmicos ao paciente (DAJANI, 1997).

A FR é a causa mais comum de doença valvular adquirida em crianças e adultos jovens em todo o mundo. Embora sua incidência tenha diminuído nas últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos, a FR ainda permanece como um sério problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (GIBOFISKY e ZABRISKIE, 2001). As razões para as flutuações na incidência da doença ainda não estão totalmente compreendidas e, embora a FR esteja sendo estudada extensivamente, a sua patogênese ainda não está completamente esclarecida (GUILHERME et. al., 2005).

3.4.2 Epidemiologia

A incidência da FR começou a diminuir após a introdução dos antibióticos na prática clínica, caindo de 250 para 100 pacientes por 100.000 habitantes na Dinamarca, entre os anos de 1862 a 1962 (DAJANI, 1997). A introdução dos antibióticos em 1950, rapidamente acelerou seu declínio, até que nos anos 80, nesse mesmo país, a incidência variava de 0,23 a 1,88 pacientes por 100.000 habitantes, principalmente entre crianças e adolescentes (GORDIS, 1985). Em muitos países em desenvolvimento, a incidência da FR ainda se aproxima ou excede 100

casos para 100.000 habitantes. Na América do Sul, a incidência da doença varia de 1 a 17 pacientes por 1000 habitantes (DAJANI, 1997). No Brasil, acredita-se que a incidência da doença esteja próxima de 1 para 1000 (BERTOLETTI, 2004). ALVES MEIRA et al. (1995), em estudo realizado de março a dezembro de 1992, relataram 4 casos de FR entre 550 estudantes do ensino médio de escolas locais em Belo Horizonte (MG), estimando a prevalência da FR nessa cidade em 3,6/1000 habitantes. De acordo com dados obtidos junto ao DATASUS, entre os meses de fevereiro de 2006 e 2007, foram realizadas 716 internações decorrentes de cardiopatia reumática crônica no país, a um custo de R\$ 6.641.94 por internação, totalizando um gasto de R\$ 4.687.652.00, enquanto que a antibioticoprofilaxia da FR giram em torno de R\$ 190.00 por ano (dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA).

O declínio na incidência da FR e da cardiopatia reumática nos países desenvolvidos tem sido atribuído a vários fatores. Além da introdução da antibioticoterapia, melhores padrões sócio-econômicos, condições de moradia mais adequadas, domicílios e escolas menos populosos e um maior acesso ao atendimento médico corroboraram para o declínio da doença (DAJANI, 1997). O surgimento e desaparecimento de cepas reumatogênicas do estreptococo em certas regiões geográficas também parece ter influência no desaparecimento da FR em algumas partes do mundo (COLMAN et al., 1993).

As características epidemiológicas da faringite pelo estreptococo e da FR, devido à relação íntima entre as duas doenças, são bastante semelhantes. A chance da FR aguda se desenvolver após um ataque de orofaringite pelo EGA é de cerca de 0,3 a 3% (WILLIAMS, 2001). Os ataques iniciais de FR geralmente ocorrem entre 6 e 15 anos, sendo raros antes dos 5 anos de idade (DAJANI, 1997). O risco para o desenvolvimento de FR é maior nas populações mais suscetíveis ao desenvolvimento de faringite estreptocócica, como aquelas que habitam em ambientes mais populosos, tais como estabelecimentos militares e aquelas em contato com crianças em idade escolar. TORRES et al. (2000) observaram a presença do EGA na orofaringe de 76.9% de 1768 crianças de 16 abrigos na cidade de Curitiba/PR, sendo que a maioria delas apresentava sintomas de infecção de vias aéreas superiores no momento da coleta.

3.4.3 Características clínicas

A apresentação clínica da FR aguda é bem variável, sendo que a falta de alguma característica patognomônica resultou no desenvolvimento dos critérios de Jones modificados (JAMA, 1992) que são usados para o estabelecimento do diagnóstico (quadro 3). Para diagnóstico de FR são necessários dois critérios maiores ou 1 maior e dois menores, além da evidência prévia de infecção estreptocócica.

Os critérios maiores incluem a artrite, a cardite, a coréia, os nódulos subcutâneos e o eritema marginado.

Classicamente a artrite da FR aguda afeta várias juntas sucessivamente, por um período curto de tempo. Os membros inferiores são acometidas mais precocemente, seguida dos membros superiores. O termo migratório é comumente utilizado, mas não significa que a inflamação desaparece em uma junta e depois aparece em outra. Geralmente ocorre alguma superposição, acometendo até 75% dos pacientes com FR aguda (CARAPETIS, 2005).

A coréia de *Sydenham* é caracterizada por movimentos involuntários, especialmente em face e membros, fraqueza, distúrbios da marcha, da fala e dos movimentos voluntários e labilidade emocional. Muitas vezes aparece isoladamente como manifestação tardia da FR aguda (CARAPETIS, 2005).

Os nódulos subcutâneos da FR são indolores e duros, com diâmetro variando entre 1 e 2 cm, e são localizados em superfícies ósseas ou proeminências, e sobre tendões. O eritema marginado é uma erupção evanescente, não-pruriginosa, rósea ou avermelhada, afetando o tronco e as partes proximais dos membros, poupando a face. As lesões são centrífugas, e o centro apresenta melhora gradativa enquanto a lesão se estende. O bordo externo da lesão é bem definido, enquanto que o centro é difuso. Pelo fato de apresentar forma de anel, recebe também a denominação de eritema anular (WILLIAM e ALTO, 1992).

Entre 30-45% dos pacientes exibem cardite como manifestação clínica, que pode envolver pericárdio, miocárdio e endocárdio. A válvula mais acometida é a mitral, na forma de inicialmente insuficiência e posteriormente estenose, seguida da

válvula aórtica (CARAPETIS, 2005). Na revisão clássica de BLAND e JONES (1951) foram identificados 65% de pacientes com cardite entre 1000 pacientes com FR.

Durante o episódio agudo de FR, há pouco ou nenhum prejuízo hemodinâmico. A principal complicação da FR é a lesão valvar após o surto de cardite. O processo agudo se resolve e deixa cicatrizes nos folhetos valvares. Eventualmente, ocorre fusão das comissuras e espessamento do aparato sub-valvular. Episódios repetidos de valvulite reumática e cardite aceleram tal processo.

QUADRO 3 – CRITÉRIOS DE JONES MODIFICADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE FR AGUDA

Crítérios Maiores	Crítérios Menores
Cardite Poliartrite Coréia Eritema marginado Nódulos subcutâneos	Febre Artralgia FR aguda prévia ou cardiopatia reumática Reagentes de fase aguda elevados Proteína C-reativa (PCR) Velocidade de hemossedimentação (VHS) Prolongamento do intervalo P-R no eletrocardiograma
Achados Laboratoriais	
Evidência de infecção estreptocócica prévia Aumento de antistreptolisina O ou outro anticorpo estreptocócico Cultura de orofaringe positiva para o EGA Escarlatina recente	

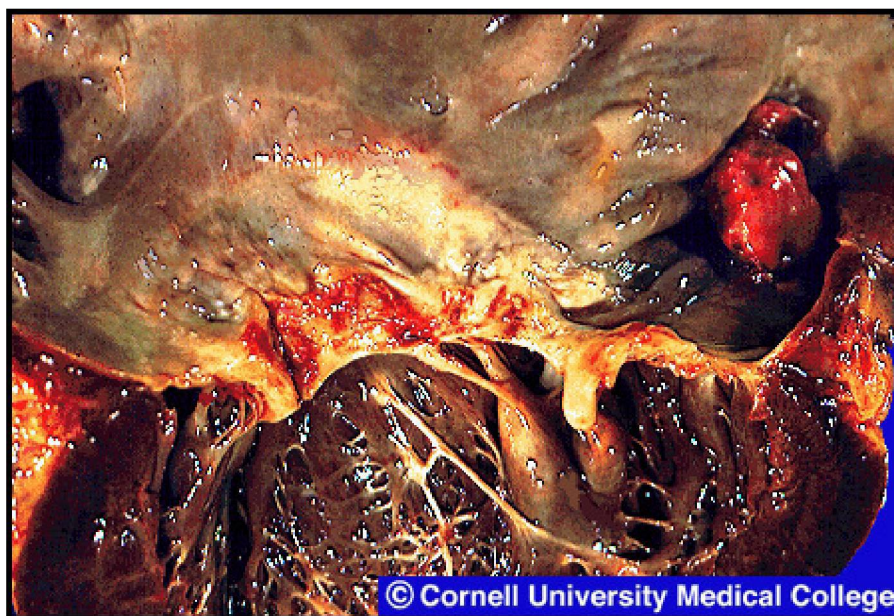
Para que se estabeleça o diagnóstico são necessários dois critérios maiores ou um maior e dois menores, associados à evidência laboratorial de infecção prévia pelo estreptococo (JAMA, 1992)

As recorrências da FR ocorrem mais comumente dentro de 2 anos após o surto inicial, sendo que o risco de recorrência diminui com a idade. Até 50% dos pacientes que apresentam a FR podem evoluir para cardiopatia reumática crônica, especialmente se eram portadores de cardite no surto inicial (GRIFFITHS, WELTON e GERSONY, 1990). O exame ecocardiográfico apresenta maior sensibilidade para a detecção da presença da CRC. MARIJON et al. (2007), estudando 3677 crianças com história de FR em Cambodja e 2170 em Moçambique, observaram uma prevalência de CRC de 2,2/1000 e 2,3/1000 respectivamente, quando as crianças foram examinadas clinicamente. Com o uso de ecocardiografia, a prevalência aumentou para 21,5/1000 e 30,4/1000, respectivamente. A válvula mais afetada foi a mitral (87,3% dos casos em Cambodja e 98,4%, em Moçambique).

3.4.3.1. Cardiopatia reumática crônica

A cardiopatia reumática crônica (CRC) é a sequela mais grave da FR aguda e se manifesta clinicamente de 10 a 20 anos após o ataque inicial de FR, sendo a principal causa de valvulopatia adquirida no mundo todo (figura 13). A principal válvula acometida é a mitral, sendo que o acometimento da válvula aórtica é menos frequente. A lesão cardíaca clássica da CRC é a estenose mitral, que pode se apresentar juntamente com insuficiência da válvula, secundária à calcificação valvular (BRAUNWALD, 1997). Quando os sintomas de aumento de átrio esquerdo aparecem, correção cirúrgica se faz necessária. A incidência da CRC em pacientes com história de FR aguda varia de 30% a 50% (BLAND e JONES, 1951). A estenose mitral em adultos é quase sempre resultante de inflamação pós-reumática e doença degenerativa, que leva à fusão das comissuras mitrais e ao espessamento das cordoálias tendíneas (BRAUNWALD, 1997). Em casos raros a estenose mitral pode ser secundária a lesões congênicas, síndrome carcinóide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide (AR) e mucopolissacaridoses.

FIGURA 13 - LESÃO DA ESTENOSE MITRAL REUMÁTICA



Há fusão das comissuras, com espessamento das cordoálias tendíneas e posteriormente disfunção valvar (WEILL MEDICAL COLLEGE OF CORNELL UNIVERSITY, com permissão).

3.4.4 Patogênese

A evidência do envolvimento do EGA como agente causador do ataque inicial e dos ataques recorrentes de FR é forte, porém indireta, sendo baseada em observações clínicas, epidemiológicas e imunológicas (DAJANI, 1997). É bem conhecido que epidemias de FR seguem intimamente ataques epidêmicos de orofaringites ou escarlatina. O tratamento adequado da faringite estreptocócica reduz drasticamente a incidência de FR subsequente. Além disso, antibioticoprofilaxia adequada em pacientes com FR definida, reduz os ataques recorrentes da mesma. Os níveis séricos de anticorpos contra antígenos do EGA (antiestreptolisina O, hialuronidase e estreptoquinase) estão aumentados em pacientes com FR aguda, mesmo quando estes não se recordam do episódio de orofaringite (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998).

O EGA pode ser classificado em dois grupos, de acordo com as diferenças na região C da proteína M: um está claramente associado à infecção orofaríngea, e o outro (com raras exceções), pertence às cepas relacionadas ao impetigo. O tecido linfóide faríngeo se constitui num importante sítio para a iniciação da resposta humoral anormal do hospedeiro à antígenos de reação cruzada do EGA com órgãos-alvo próprios.

3.4.4.1 Estreptococo do grupo A (EGA)

O estreptococo é primeiramente classificado de acordo com o tipo de hemólise que é capaz de produzir em laboratório. Os estreptococos do grupo alfa causam hemólise total; os do grupo beta, hemólise parcial e os do grupo gama são incapazes de causar hemólise. A classificação dos estreptococos do grupo beta é feita pela tipagem do carboidrato de que é composta sua camada média e central, e estende-se de A a V. Apenas o estreptococo do grupo A é capaz de produzir a FR. Apesar de outros grupos sorológicos de estreptococos beta-hemolíticos (por exemplo: B, C, G, e

F) estarem associados a infecções de vias aéreas altas, nenhum deles causa FR. Apenas os grupos A e G são capazes de produzir a proteína M em sua camada externa, sendo esta proteína o principal antígeno bacteriano relacionado a patogênese da FR, já que confere resistência à fagocitose, aumentando a virulência do patógeno. As diferenças antigênicas da proteína M, por sua vez, são responsáveis pela classificação dos EGA (MARTINS, VEASY E HILL, 2006) (figuras 14 e 15).

Muitos antígenos do EGA, tanto de superfície quanto de componentes da estrutura celular, podem reagir de maneira cruzada com antígenos de mamíferos (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998). A cápsula do EGA composta de N-acetil-glucosamina e ácido hialurônico, é estruturalmente idêntica ao ácido hialurônico de mamíferos. Investigações pioneiras de Rebecca Lancefield no início do século XX e de outros pesquisadores estabeleceram a proteína M como o principal fator de virulência do EGA, caracterizando cerca de 80 tipos sorológicos distintos, de acordo com suas diferenças antigênicas, sendo os tipos 1, 3, 5, 6, 14, 18, 19, 24, 27 e 29 considerados os mais reumatogênicos (STOLLERMAN, 1990).

A proteína M possui uma estrutura helicoidal com uma região variável no seu terminal N, responsável pela sua especificidade (Figura 15). Esta é seguida de uma região de repetição B e de um domínio C e finalmente de uma região de ancoramento, que é comum a muitos microorganismos. A proteína M apresenta estrutura homóloga e reatividade cruzada com o citoesqueleto das proteínas cardíacas tropomiosina e miosina, e também com outras estruturas, como a queratina, o DNA, a laminina e a vimentina (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998). A imunização em ratos com proteína M recombinante do EGA pode gerar uma reação auto-imune contra válvulas cardíacas com características anátomo-patológicas semelhantes às encontradas na cardiopatia reumática (QUINN et al., 2001). Além disso, BAIRD et al. (1991) demonstraram que certos epítomos da proteína M do estreptococo são semelhantes a antígenos da cartilagem articular e da sinóvia.

O carboidrato grupo-específico do EGA é constituído de uma cadeia de polissacarídeos consistindo de ramnose, envoltas por N-acetil-glucosamina. ADDERSON et al. (1998) demonstraram no soro de pacientes portadores de FR aguda

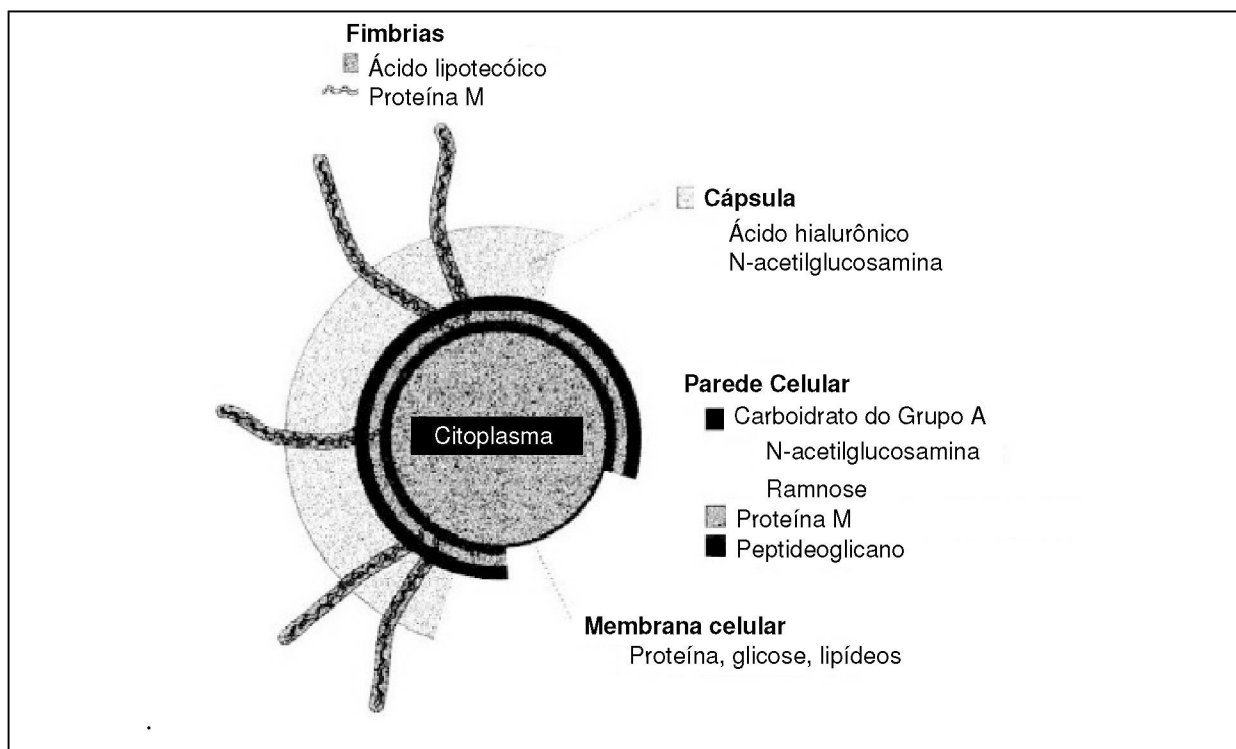
títulos elevados de anticorpos reativos principalmente contra o epítipo N-acetil-glucosamina do EGA.

Já a porção mucopeptídica do EGA, que é a principal estrutura de sua sustentação, é composta de ácido murâmico e N-acetil-glucosamina, e quando injetada em camundongos, induz o aparecimento de artrite (CROMARTIE et al., 1977).

Por outro lado, ainda não foi estabelecido o papel do ácido lipoteicóico na patogênese da FR, molécula presente na superfície das bactérias Gram-positivas e reconhecida pelo sistema imune inato, capaz de induzir a produção de citocinas, (DAJANI, 1997).

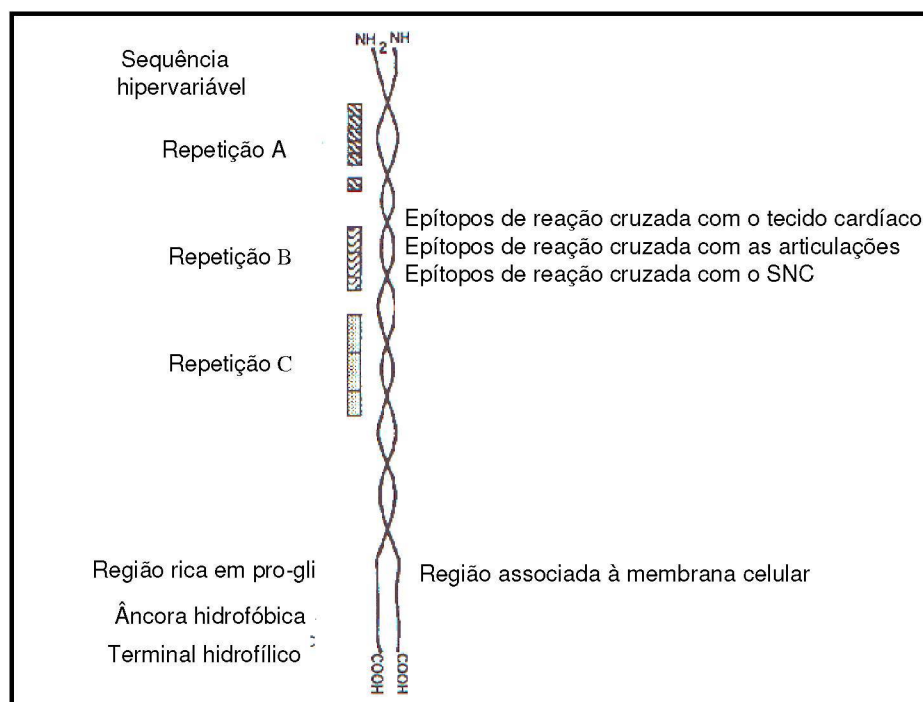
Ainda deve-se considerar a reação cruzada desencadeada pela membrana do EGA contra estruturas cardíacas. Imunização de camundongos com a mesma induz a formação de anticorpos contra o tecido cardíaco de maneira semelhante ao observado na FR aguda (FROUDE et al., 1989).

FIGURA 14 - ESTRUTURA DO EGA.



A proteína M se constitui no principal fator de virulência da bactéria (adaptado de MARTINS, VEASY E HILL, 2006).

FIGURA 15 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA M DO EGA



Os epítomos presentes na área de repetição B apresentam reação cruzada com epítomos do hospedeiro (adaptado de FISCHETTI, 1991)

3.4.4.2 Genética e Imunologia da FR e da CRC

A FR aguda tem uma tendência familiar e diferentes estudos mostram uma concordância definitiva entre gêmeos monozigotos (18.7%, em comparação com 2,5% em gêmeos dizigóticos). Associações entre a FR aguda e antígenos do complexo principal de histocompatibilidade humana (HLA) têm sido cada vez mais descritas, sendo que a maioria delas estão relacionadas ao locus DR. Na população brasileira, observou-se associação com HLA-DR7 e HLA-DR53, com riscos relativos para o desenvolvimento da doença de 3.8 e 4.2, respectivamente (GUILHERME et al., 1991).

Uma das associações mais importantes, inicialmente descrita por PATARROYO et al. (1979), está relacionada a antígenos de células B, presentes em 70% dos pacientes com FR. Na tentativa de confirmar estes resultados, GIBOFISKY et al. (1985) demonstraram um marcador de células B presentes em aproximadamente

95% dos pacientes com FR. Posteriormente, KAHNNA et al (1989) desenvolveram um anticorpo monoclonal contra o antígeno de células B, denominado D8/17, o qual foi identificado em 100% dos pacientes com FR aguda e em 14% dos controles.

Mutações no gene do TNF- α , citocina com funções pró-inflamatórias importantes, situado na região HLA de classe III, também já foram objetos de estudo na FR. Tanto em pacientes de origem brasileira (RAMASAWMY et al., 2007) quanto de origem turca (SALLAKCI et. al., 2005), o polimorfismo -308G>A, que está relacionado a uma maior produção de TNF- α , foi associada tanto ao desenvolvimento de FR como de CRC.

Outros genes candidatos já foram investigados na patogênese da FR, com achados positivos, com o é o caso do polimorfismo do gene FcgammaRIIA (BERDELI et al., 2004) e da enzima conversora da angiotensina I (CHOU et al., 2004).

O conceito de reatividade cruzada entre antígenos do EGA e antígenos relevantes do hospedeiro levantou a hipótese de que a imunidade humoral tinha o papel mais importante na patogênese da FR, e que em resposta a uma infecção de orofaringe pelo EGA, o hospedeiro produziria certos anticorpos contra estruturas do EGA, que reconheceriam antígenos semelhantes de certos tecidos humanos, levando ao dano do coração, articulações e do sistema nervoso central (quadro 4).

QUADRO 4 - COMPONENTES DO EGA QUE APRESENTAM REAÇÃO CRUZADA COM TECIDOS HUMANOS

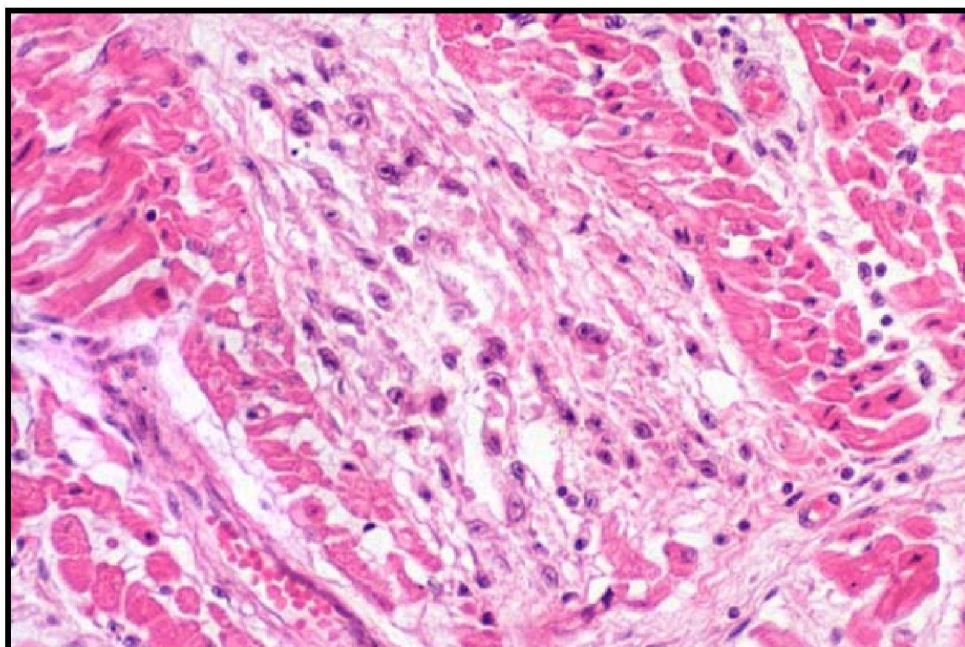
Antígeno Estreptocócico	Tecido humano de reação cruzada
Membranas do plasma	Membrana celular miocárdica
Glicoproteína e polissacarídeo	Válvulas cardíacas
Membrana celular	Estruturas citoplasmáticas dos neurônios do núcleo caudado e subtalâmicos
	Miosina cardíaca
Proteína M	Miosina cardíaca e membranas sarcolemas

A proteína M se constitui no principal antígeno de reação cruzada (adaptado de WILLIAMS, 2001).

Anticorpos anti-EGA de reação cruzada com o coração, articulações e sistema nervoso central foram demonstrados no soro de pacientes com FR aguda (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998). Na verdade, os mecanismos imunopatológicos envolvidos na FR são resultantes não só de uma excessiva resposta humoral, como também celular. E, embora ocorra exacerbação da resposta imune humoral na FR aguda, existem evidências de uma participação ativa da imunidade celular na lesão tecidual (GUILHERME et al., 2001).

Uma pista inicial veio do fato de que os infiltrados celulares encontrados nas válvulas cardíacas são predominantemente de linfócitos T e que os nódulos de *Aschoff* (Figura 16), lesão característica da FR cardíaca, consistem basicamente de monócitos, macrófagos e neutrófilos (RAIZADA et al., 1983) e mais tardiamente por linfócitos T e B (FRASER et al., 1997) (figura 16).

FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO DO NÓDULO DE ASCHOFF



O nódulo de Aschoff, formado principalmente por macrófagos, constitui-se na lesão característica da cardite reumática aguda e crônica (GENERAL PATHOLOGY IMAGES FOR INFLAMMATION AND REPAIR)

EL-DEMELLAWY et al. (1997), em um estudo *in vitro*, demonstraram que linfócitos T de pacientes portadores de CRC reconhecem uma proteína miocárdica de 50 a 54 kDa, e que a exposição dessas a antígenos estreptocócicos aumenta a habilidade de reconhecimento dos antígenos da proteína miocárdica.

Em um estudo prospectivo, MORRIS et al. (1993a) demonstraram que os pacientes portadores de FR aguda e CRC ativa apresentam um número significativamente elevado de células T CD4+, células B CD22+ e relação CD4+/CD8+, do que pacientes portadores de CRC quiescente e de faringite estreptocócica.

GUILHERME et al. (1995) estudaram 107 clones de células T obtidas de fragmentos cirúrgicos de tecidos cardíacos de 4 pacientes portadores de CRC. No estudo, os autores testaram *in vitro* a capacidade destas células de reconhecer peptídeos sintéticos derivados da proteína M do EGA e proteínas cardíacas, e concluíram que os clones dos quatro pacientes eram capazes de reconhecer tanto a proteína estreptocócica como o tecido cardíaco.

Por outro lado, YOSHINAGA et al. (1995) mostraram que linhagens de linfócitos T derivadas de tecido valvar e linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de FR são capazes de reconhecer antígenos da parede celular e da membrana do estreptococo. No entanto, estes linfócitos não reagem cruzadamente com a proteína M ou proteínas do citoesqueleto da bactéria.

Um outro estudo realizado também por GUILHERME et al. (2001), baseado no achado que linfócitos T infiltrantes no tecido cardíaco de pacientes com CRC são capazes de reconhecer simultaneamente segmentos da proteína M e proteínas do coração, demonstrou quais regiões da proteína M5 são reconhecidas pelos clones dos linfócitos T. Os resíduos de aminoácidos 81-96, incluídos na região 81-103 da proteína M5 foram preferencialmente reconhecidos por linfócitos T do sangue periférico dos pacientes com CRC grave (46%), enquanto que apenas 8,6% de indivíduos controles foram capazes de reconhecer esta região. Destes pacientes, 70% eram HLA-DR7 e 61% HLA-DR53, sugerindo que tais moléculas HLA estejam

preferencialmente envolvidas no reconhecimento da proteína M5 nos pacientes com CRC grave.

Tais dados sugerem que, durante a infecção pelo EGA, linfócitos T previamente sensibilizados na periferia contra antígenos bacterianos (proteína M), migram para o tecido cardíaco e, por mecanismo de mimetismo molecular, reconhecem de forma cruzada proteínas cardíacas, desencadeando uma resposta inflamatória que acaba por lesar o tecido. O macrófago atua como uma célula apresentadora dos determinantes antigênicos de reação cruzada do EGA ao linfócito T, induzindo a ativação de clones de células T auto-reativas (DOS REIS e BARCINSKI, 1980). As células B, que seriam esperadas nos tecidos lesados, são raras. A diminuição de linfócitos T CD8⁺ foi observado no surto inicial da FR aguda. Possivelmente o mecanismo normal de supressão da imunidade celular esteja danificado na FR, levando a uma ativação descontrolada da mesma nos tecidos afetados (KOTB et al., 1989). Além disso, o *turnover* normal das células cardíacas poderia resultar numa sensibilização das células T do hospedeiro à sua própria miosina cardíaca exposta, a qual é geralmente intracelular (CARRAPETIS, 2005).

Alguns estudos demonstraram concentrações elevadas de interleucina-1 e 2 (IL-1 e IL-2) (MORRIS et al., 1993), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (NARIN et al., 1995), interleucina-7 e 8 (IL-7 e IL-8) (KUTUKCULER e NARIN, 1995), assim como dos receptores solúveis do TNF- α (S-TNF- α R) e da IL-2 (sIL-2R) (SAMSONOV et al., 1995), tanto na FR aguda quanto na CRC. Ainda, concentrações elevadas de IL-2 (MILLER et al., 1989; ZEDAN et al., 1992) e TNF- α (MILLER et al., 1989) foram observadas em pacientes portadores de CRC. GUILHERME et al. (2004), analisaram o perfil de citocinas das células mononucleares periféricas e do infiltrado cardíaco de pacientes com CRC, encontrando predominância de células positivas para TNF- α , interferon- γ e IL-10, e escassas células positivas para IL-4 nas válvulas, sugerindo que as células T-auxiliares Th1 são responsáveis pela lesão cardíaca nestes pacientes. A secreção de TNF- α por macrófagos parece representar um papel importante na agregação e ativação de linfócitos T e B, que chegam aos nódulos de *Aschoff* posteriormente aos macrófagos (FRASER et al., 1997).

Uma hipótese plausível para o desenvolvimento da FR seria a apresentação de antígenos do EGA por células apresentadoras de antígeno através das moléculas HLA para linfócitos T CD4⁺. Uma apresentação ou reconhecimento anormais resultaria em ativação e proliferação descontrolada das células CD4⁺, provavelmente mediadas por IL-2. Isso levaria a uma liberação de linfocinas, com ativação de células *natural killer* (NK) e células T citotóxicas, com posterior ativação de macrófagos e neutrófilos. Tais fatos erradicariam o EGA, porém com dano a estruturas do próprio hospedeiro. Os antígenos-próprios, então liberados de seus refúgios intracelulares (quadro 4), induziriam uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos. Os anticorpos juntamente com complemento, por sua vez, poderiam levar a mais dano tecidual (CARAPETIS, CURRIE e GOOD, 1996).

Em relação ao dano inicial, ainda não está claro se este é celular ou humoral, mas as lesões posteriores parecem ser causadas pela infiltração de células T e de macrófagos (CARRAPETIS, 2005).

3.4.4.3 Sistema complemento e febre reumática

O envolvimento do sistema complemento na FR já foi objeto de alguns estudos. Exames de necrópsia realizados em tecido cardíaco de pacientes vitimados pela FR revelaram depósitos maciços de imunoglobulinas e complemento (KAPLAN e DALENBACH, 1961).

SAPRU et al. (1977) compararam as concentrações séricas de C3 e CH50 em 35 pacientes portadores de CRC com as de 17 controles saudáveis. Os autores observaram concentrações médias significativamente menores no grupo de pacientes, sugerindo que alguma lesão mediada por complemento pode ter ocorrido em algum momento do curso da doença.

Foi demonstrado que anticorpos presentes no soro de pacientes com FR contra uma proteína de 56 kDa do EGA, a qual apresenta mimetismo molecular com uma proteína de 52 kDa da superfície de células eucarióticas, reagem com fibroblastos

humanos intactos *in vitro*, e são capazes de lisar as células em presença de complemento (PREHM et al., 1995).

Em estudo *in vitro*, demonstrou-se que anticorpos específicos contra a contra a proteína M do EGA, quando em contato com a cartilagem articular, ativam mais complemento que soro de controles normais (BAIRD et al., 1991). Existem evidências de que, tanto pacientes portadores de FR aguda, quanto pacientes portadores de CRC, possuem valores séricos aumentados de imunocomplexos e de produtos de ativação do complemento (C3d) quando comparados com população controle (REDDY et al., 1990).

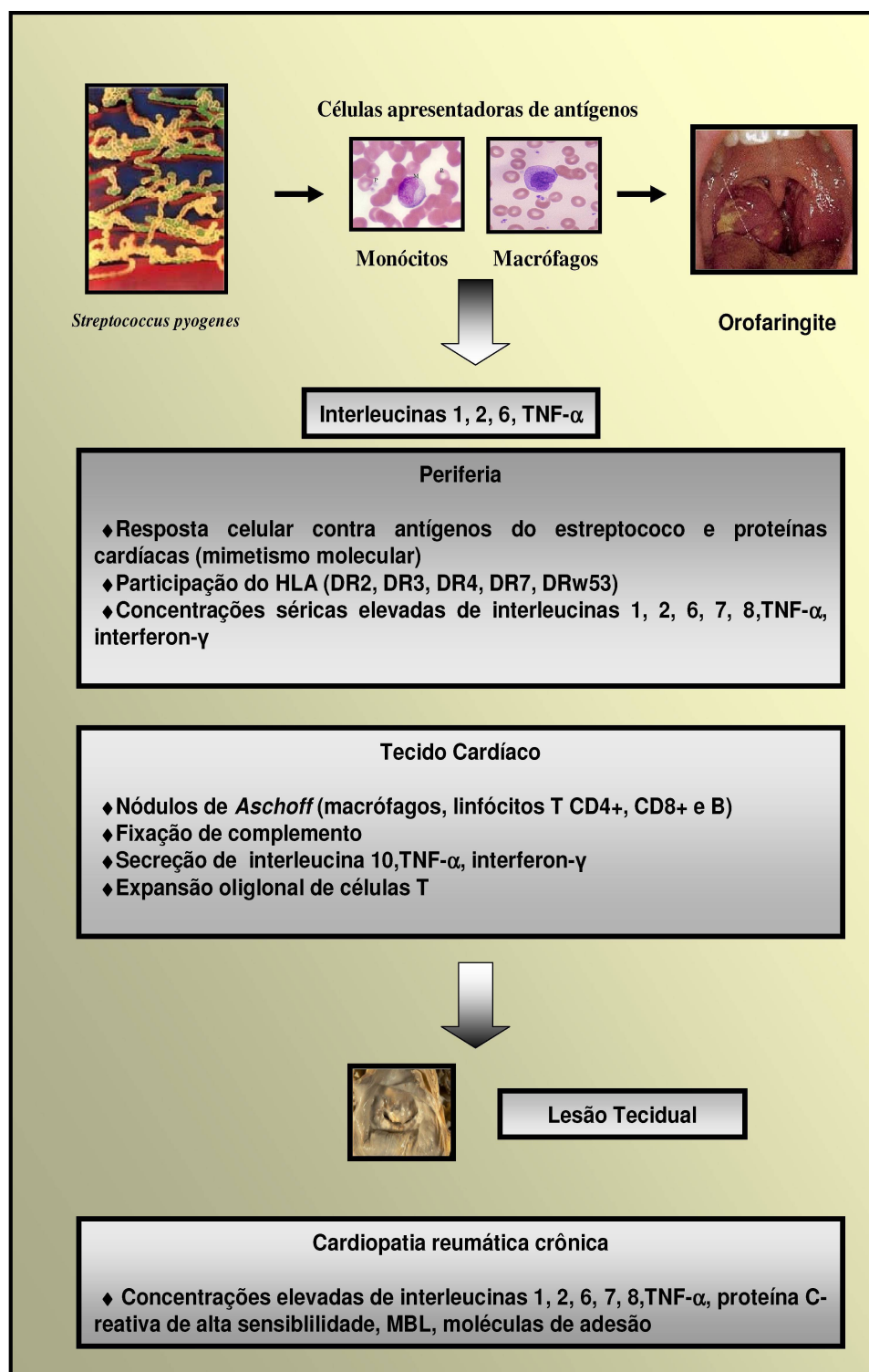
Também há relatos de diminuição dos componentes do complemento nas articulações de pacientes com FR aguda, sugerindo ativação desse sistema por imunocomplexos nesse local (SVARTMAN et al., 1975). A deposição de imunocomplexos, seguida por ativação do complemento em tecidos de pacientes com FR aguda, pode ser o evento inicial para a vasculite vista nesses pacientes, com posterior participação dos anticorpos auto-reativos (GIBOFSKI e ZABRISKIE, 2001).

Um papel imunogenético do complemento na doença foi demonstrado por de MESSIAS et al. (1995). Os autores demonstraram que pacientes portadores de CRC apresentaram uma frequência aumentada do alelo raro do componente C4, C4A*6 quando comparados a controles saudáveis.

Em estudo prévio, demonstramos que pacientes portadores de CRC apresentam concentrações séricas de MBL significativamente mais elevadas que indivíduos saudáveis (SCHAFRANSKI et al., 2004).

A figura 17 representa esquematicamente os fatores envolvidos na patogênese da CRC.

FIGURA 17 – MECANISMOS PATOGENICOS ENVOLVIDOS NA CRC



A apresentação de antígenos estreptocócicos anormal pelo HLA levaria à ativação de linfócitos T CD4+ e citotóxicos através de citocinas, com lesão às próprias células do hospedeiro e liberação de antígenos próprios, com consequente ativação da imunidade humoral, fixação de complemento e mais dano subsequente.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram incluídos no estudo um total de 149 pacientes com história de FR, sendo 43 (28,9%) homens e 106 (71,1%) mulheres, com mediana de idade de $39 \pm 14,53$ DP anos). As características demográficas dos mesmos estão representadas na tabela 5. Foram incluídos no estudo pacientes com história de FR de acordo com os critérios de Jones modificados (1992) e que não apresentavam outras doenças inflamatórias, neoplasias, endocardite infecciosa ou outras infecções, no momento da coleta. Nenhum indivíduo foi excluído do estudo por má qualidade das amostras. Dentre os pacientes investigados, 107 (71,81%) eram portadores de CRC, cujo diagnóstico foi obtido através de história clínica e ecocardiograma transtorácico mostrando o comprometimento reumático da válvula mitral. Os outros 42 pacientes (28,18%, mediana de idade 23 ± 6 DP anos) não evoluíram para CRC, sendo que 35 (23,48%) apresentaram história de cardite reumática aguda (CRA) e 7 (4,69%) não apresentaram este sintoma como manifestação da FR. Os pacientes incluídos no grupo CRA apresentavam ecocardiograma transtorácico normal na época da coleta de sangue. Os pacientes portadores de CRC encontravam-se em acompanhamento no ambulatório de Cardiologia do Hospital de Clínicas da UFPR, e os pacientes sem CRC freqüentavam a Unidade da Criança, setor de Cardiologia Pediátrica, em Curitiba/PR.

Dos 107 pacientes portadores de CRC, 30 (28%) não tinham sido submetidos a nenhum tratamento invasivo da doença reumática e 77 (72%) foram submetidos a alguma intervenção (tabela 6). As características clínicas dos pacientes portadores e não-portadores de CRC podem ser observadas na tabela 2.

De acordo com a classificação étnica, 114 (76,51%) indivíduos eram euro-brasileiros, 34 (22,8%) afro-descendentes e 1 (0,67%) indivíduo era de origem indígena. Dos 42 pacientes sem CRC, 19 (45,2%) tinham história de artrite, 4 (9,5%), de nódulos sub-cutâneos, 3 (7,1%), de coréia e 1 (2,3%) de eritema marginado.

TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM HISTÓRIA DE FR E CONTROLES.

	Pacientes (n=149)	Controles (n=147)	p
Idade	39 ± 14,53*	38 ± 13,56*	0,81
Variação	8 a 76	19-78	
Sexo			
M	43 (28,9%)	53 (36%)	
F	106 (71,1%)	94 (64%)	0,18
Origem étnica			
Euro-brasileiros	114 (76,51%)	125 (85,03%)	
Afro-descendentes	34 (22,8%)	21 (14%)	
Índigenas	1 (0,67%)	1 (0,68%)	0,11

Ambos os grupos apresentaram características demográficas semelhantes quanto à idade, sexo e grupo étnico (testes exato de *Fisher*, do qui-quadrado e de *Mann-Whitney*, *mediana ± DP)

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES CARIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA (CRC) E CARDIOPATIA REUMÁTICA AGUDA (CRA)

Pacientes sem CRC	(n=42)	Pacientes com CRC	(n=107)
<i>Características clínicas</i>		<i>Não-submetidos a procedimentos invasivos (n=30)</i>	
Idade	22,57 ± 6 (8-33)*	Grau de estenose mitral	
Idade do primeiro surto de FR	8,37 ± 3,35 (3-16)*	Normal	0
Idade do último surto de FR	9,11 ± 3,92 (3-18)*	Leve	16 (53,3%)
Total de surtos de FR	1,59 ± 1,66 (1-10)*	Moderada	11 (36,6%)
Profilaxia correta	39 (92,85%)	Grave	3 (10%)
<i>Manifestações clínicas</i>		<i>Submetidos a procedimentos invasivos (n=77)</i>	
Cardite	35 (83%)	Idade quando do procedimento (anos)	38 ± 12*
Artrite	19 (45,2%)	Comissurotomia	27 (35,0%)
Nódulos subcutâneos	4 (9,5%)	Valvuloplastia por balão	15 (19,4%)
Coréia	3 (7,1%)	Troca por válvula biológica	26 (33,7%)
Eritema marginado	1 (2,3%)	Troca por válvula metálica	9 (11,6%)

Dentre os pacientes com história de FR que não desenvolveram CRC, as manifestações clínicas mais frequentes foram a cardite e a artrite. A maioria (72%) dos pacientes portadores de CRC evoluíram para algum procedimento invasivo para correção da valvulopatia (* média ± desvio-padrão)

4.2 Controles

Foram incluídos no estudo 147 indivíduos saudáveis sendo 53 (36%) homens e 94 (64%) mulheres, com mediana de idade $\pm$ DP de $38 \pm 13,56$ anos, doadores de sangue do Hemobanco do HC-UFPR. Destes, 125 (85%) eram euro-brasileiros, 21 (14%), afro-descendentes 1 (0.68%) de origem indígena (tabela 2).

As características dos indivíduos utilizados na análise do polimorfismo de *MASP2* podem ser observadas na tabela 7.

Para a realização de todas as análises, os indivíduos controles foram pareados quanto à idade, sexo e origem étnica dos pacientes. Todos os pacientes e os controles assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do HC/UFPR (CEP/HC 491.073/2002-06).

TABELA 7. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES E CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE *MASP2*.

	Pacientes (n=148)	Controles (n=129)	<i>p</i>
Idade (anos)	$38,5 \pm 14,4$ (8-76)*	$38 \pm 12,2$ (19-78)*	0,66
Sexo			
M	43 (29%)	52 (40%)	0,06
F	105 (71%)	77 (60%)	
Origem étnica			
Euro-brasileiros	112 (76%)	99 (77%)	0,42
Afro-descendentes	36 (24%)	24 (23%)	

Os grupos de indivíduos utilizados para as análises relativas ao polimorfismo D120G do gene *MASP2* foi diferente dos utilizados para o gene *MBL2*. O mesmo consiste de 148 pacientes e 129 controles, também pareados quanto à idade, sexo e origem étnica (testes do qui-quadrado e de *Mann-Whitney*, *mediana $\pm$ desvio-padrão).

4.3 Amostras de sangue

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue venoso sem anticoagulante e 5 ml de sangue venoso com anticoagulante (EDTA – ácido etileno diamino tetracético - Vacuette EDTAK3®) de cada paciente e controle. As amostras foram centrifugadas a 2000 r.p.m. por 15 minutos. Aquelas coletadas sem o anticoagulante tiveram o soro separado e aliquoteado em microtubos com capacidade de 0,5 ml cada. Do sangue coletado com anticoagulante foi separada a camada de concentrado de leucócitos (*buffy-coat*) para extração de DNA. As alíquotas foram armazenadas a – 70°C, até o momento das análises laboratoriais.

4.4 Obtenção dos dados relativos à concentração sérica de MBL

Em estudo anterior (SCHAFRANSKI et al., 2004), quantificação da concentração sérica da proteína MBL foi realizada em 104 pacientes portadores de CRC e em 60 controles, através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se reagentes comerciais (*Staten Serum Institute*, Dinamarca). Os *kits* em questão tem a capacidade de detecção de oligômeros maiores de MBL, portanto através destas medidas pode-se inferir a atividade da via das lectinas. O valor de *cutoff* para o ensaio foi de 50 ng/ml. Esses dados foram utilizados na comparação com os genótipos *MBL2*.

4.5 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por LAHIRI e NURNBERGER (1991). Amostras com leitura de $A_{260/280}$ entre 1,7 e 2,0 foram consideradas ideais.

4.6 Genotipagem dos polimorfismos *MBL2*

A genotipagem das amostras dos 107 pacientes com CRC e dos 147 controles foram realizadas na Dinamarca, com a colaboração da Professora Dr^a Rudi

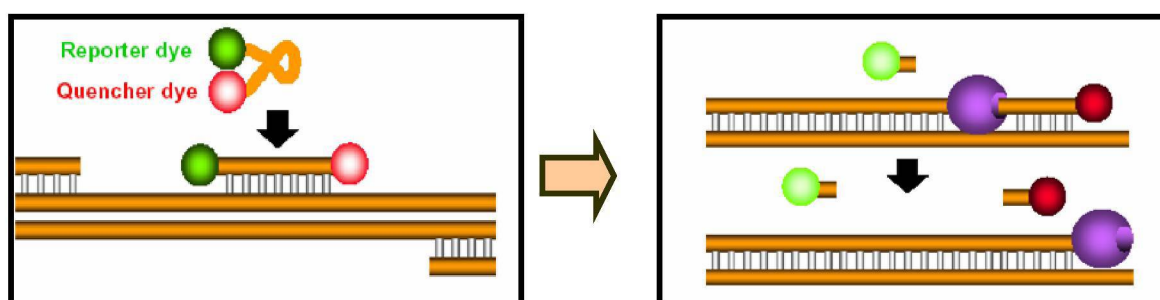
Steffensen. Para tanto, foram utilizadas duas técnicas: PCR em tempo real com sondas de hibridização fluorescentes, para a detecção dos alelos do éxon 1; e PCR em tempo real com sondas de hibridização com extensão menor (*minor groove binder-DNA probes*) para o polimorfismo X/Y. A genotipagem dos 42 pacientes com história de FR e sem seqüela cardíaca foi realizada através de PCR-SSP (*specific sequence primer*) no laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR, método que apresenta concordância de 100% com a PCR em tempo real (STEFFENSEN, HOFFMANN e VARMING, 2003).

4.6.1 PCR em tempo real

Na técnica que foi utilizada para a genotipagem do éxon 1, a análise foi baseada em uma PCR seguida da análise da temperatura de fusão (T_m , ou melting temperature) de cada fita dupla de DNA. A reação de PCR incluía iniciadores que contemplavam a região do gene do *MBL2* onde as três mutações do éxon 1 se encontram (à montante, 5'-CATCAACGGCTTCCCAGGC-3', e à jusante, 5'-TGGGCTGGCAAGACAACACTATTAG-3'), e duas sondas: uma específica para o alelo C, marcado com um fluoróforo que emitia luz vermelha, e outra marcada com fluoresceína, complementar a todos os alelos do éxon 1, cujo acoplamento se dava a duas bases de distância daquela marcada com o fluoróforo e que, em proximidade com a mesma, emitia fluorescência (FRET: *fluorescence resonance energy transfer*). O programa de PCR consistiu em 1 ciclo de 95° C por 30 s e 45 ciclos de 95° C por 0 s, 60° C por 10 s e 72° C por 9 s. Após a amplificação, a análise de fusão foi realizada e consistiu em 1 ciclo de 95° C por 0 s, e 50° C por 180 s, com uma temperatura de transição de 20° C/s, e então uma elevação a 85° C por 0 s a 0,2° C/s. A T_m necessária para separar uma fita dupla pareada de forma perfeita é maior do que a necessária para separar fitas com seqüências com mutações. Cada seqüência portadora de mutação fornece uma T_m específica, e aquelas portadoras de mutações em heterozigose apresentam duas temperaturas de fusão, com picos de fluorescência menores que os fornecidos pelas seqüências com mutações em homozigose (STEFFENSEN, HOFFMANN e VARMING, 2003). As análises foram realizadas com o uso do equipamento LightCycler® (*Roche Diagnostics*, Mannheim, Germany).

Para a genotipagem região promotora *X/Y*, foi aplicada uma técnica com sondas fluorescentes com extensão menor e específicas para cada alelo. As reações de PCR continham 50 ng de DNA, 900 nM de *iniciadores*, 200 nM de sondas (VIC e FAM®) e TaqMan Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), em um volume final de 25 µl, e foram realizadas em termociclador (*ABI Prism 7000*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). O perfil da PCR foi de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 92°C e 1 minuto de acoplamento e extensão a 60°C. Sondas ligadas aos fluoróforos VIC e FAM® foram desenvolvidas para a detecção específica dos alelos *X* e *Y*, respectivamente. Estas sondas apresentam em uma extremidade o fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que absorve a energia do fluoróforo em forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Após a ação exonuclease 5' da Taq DNA polimerase, a sonda é degradada, ocorrendo a separação do *quencher* e do fluoróforo (figura 18), o que resulta em um aumento da intensidade da fluorescência, que é exponencial durante o processo de amplificação. Esse aumento da fluorescência acontece apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (HEID et al., 1996). A leitura da fluorescência gerada durante as reações de amplificação foi feita no *ABI Prism 7000*, e a determinação dos genótipos foi obtida com o Sistema de Detecção de Sequências (*SDS*, *Applied Biosystems*) (HOEYVELD et al., 2004).

FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA TAQMAN®



A clivagem da sonda pela TaqMan® resulta na separação dos fluoróforos, com posterior emissão de fluorescência. Em verde está representado o fluoróforo (*repórter dye*), em vermelho o *quencher* e em roxo a Taq polimerase. (FONTE: *Applied Biosystems*).

4.6.2 PCR-SSP

A genotipagem dos polimorfismos *MBL2* nos 42 pacientes portadores de FR aguda foi realizada através de PCR-SSP (*specific sequence primer*) no laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR, de acordo com o método descrito por STEFFENSEN et al. (2000). Para a determinação do polimorfismo do éxon 1, utilizou-se iniciadores (Dialab Diagnósticos, Brasil) com seqüências complementares às aquelas presentes nas mutações (*B*, *C*, *D*). Para cada indivíduo, também foram realizadas reações com iniciadores complementares à seqüência usual do sítio polimórfico em estudo. Como controle interno, foi utilizado o hormônio do crescimento humano (HGH) (quadro 5).

Para a genotipagem da região promotora do *MBL2*, foram realizadas duas PCRs-SSP, uma para amplificar *X* e outra para amplificar *Y*. O alelo *Y* é considerado o usual e o *X* representa o alelo mutante. Cada reação de PCR foi realizada com um iniciador relativo à seqüência normal comum para ambas as reações e com um outro diferente apenas por uma base na extremidade 3', além do par de iniciadores para o controle interno (β -globina) (quadro 6).

As reações foram realizadas com um volume final de 20 μ l, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTPs e 20 pmol de cada iniciador específico, em uma solução tampão contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl 0.01% gelatina e 1 U de Taq polimerase Gold (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). As concentrações finais de $MgCl_2$ foram diferentes em cada mistura (1.1, 1.7 e 1.7 mM para o éxon 1, *Y* e *X*, respectivamente). As reações de PCR foram realizadas no Gene Amp PCR System 9600 (*Eppendorf North America Inc.*, USA), de acordo com o programa indicado no quadro 7. Os genótipos foram determinados pela presença ou ausência de banda após eletroforese em gel de agarose a 2% (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), corados com brometo de etídeo e visualizados através de luz ultravioleta (*Uniscience*, Brasil).

QUADRO 5 - INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES PCR-SSP PARA O ÉXON 1

Éxon 1	Alelo	Seqüência 5' - 3'	Amplicom (pb)
Códon 52 D	<i>Cys</i>	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACA-3'	268
Códon 52 não-D	<i>Arg</i>	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACG-3'	268
Códon 54 B	<i>Asp</i>	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-CCCCCTTTTCTCCCTTGGTGT-3'	278
Códon 54 não-B	<i>Gly</i>	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-CCCCCTTTTCTCCCTTGGTGC-3'	278
Códon 57 C	<i>Glu</i>	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-ACGTACCTGGTTCCCCCTTTTCTT-3'	290
Códon 57 não-C	<i>Gly</i>	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-ACGTACCTGGTTCCCCCTTTTCTC-3'	290
Controle (HGH)	<i>HGH</i>	5'-TGCCTTCCCAACCATCCCTTA-3' 5'-CCACTCACGGATTCTGTGTGTTC-3'	431

Como controle interno foi utilizado um fragmento do hormônio do crescimento humano. O grifo representa o nucleotídeo complementar ao mutado. Número de acesso ao *Gene Bank* para os iniciadores do éxon 1: AF080508

QUADRO 6 - INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES PCR-SSP PARA A REGIÃO PROMOTORA X/Y

Região promotora	Seqüência	Amplicom (pb)
Y	5'-CATTTGTTCTCACTGCCACG-3' 5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'	530
X	5'-CATTTGTTCTCACTGCCACG-3' 5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'	530
β-globina	5'-TAGTCCCCTGTGGACTACTT-3' 5'-CCTGAGAGCTTGCTAGTGATT-3'	600

Como controle interno foi utilizado o gene da β-globina. Número de acesso ao *Gene Bank* para os iniciadores da região promotora: AF080508

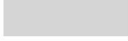
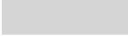
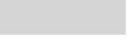
QUADRO 7 - PROGRAMA DE PCR

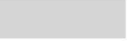
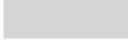
		Éxon 1	X/Y
Passo 1	Desnaturação	95°C - 10 minutos	95°C - 10 minutos
Passo 2	Desnaturação	94°C - 20 segundos	94°C - 30 segundos
	Anelamento	62°C - 20 segundos	59°C - 30 segundos
	Extensão	72°C - 30 segundos	72°C - 45 segundos
		x 30 ciclos	x 30 ciclos
Passo 3	Extensão	72°C - 5 minutos	72°C - 5 minutos
Passo 4	Armazenamento	4°C	4°C

Acima está representado o programa de PCR utilizado na reação PCR-SSP para a genotipagem do éxon 1 e da região promotora do gene *MBL2*.

Os padrões de eletroforese esperados estão esquematizados nas figuras 19 e 20.

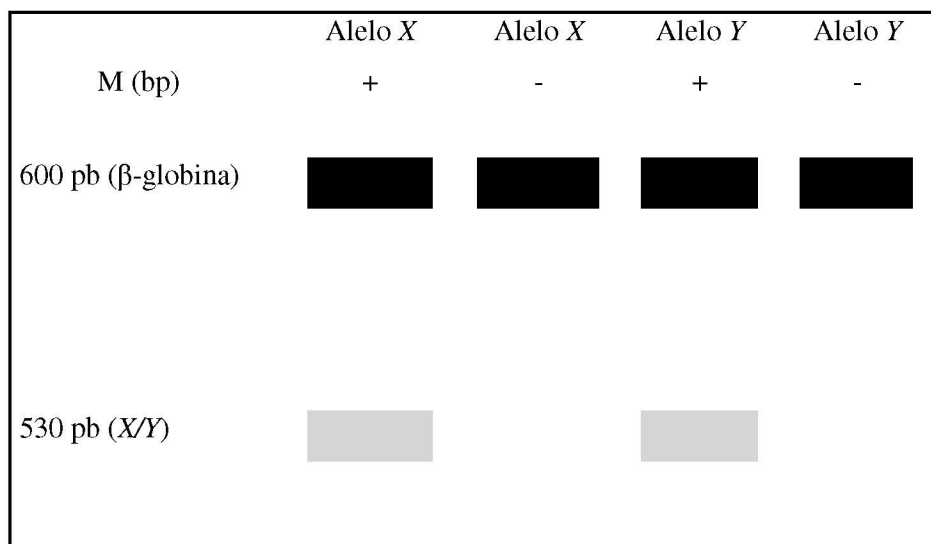
FIGURA 19 – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA OS POLIMORFISMOS DO ÉXON 1 DO GENE *MBL2* COM A REAÇÃO DE PCR-SSP

M (bp)	<i>52 D</i>		<i>52 não -D</i>		<i>54 B</i>	
	+	-	+	-	+	-
431 pb						
290 pb						
278 pb						
268 pb						

	<i>54 não-B</i>		<i>57 C</i>		<i>57 não-C</i>	
	+	-	+	-	+	-
431 pb						
290 pb						
278 pb						
268 pb						

M se refere ao tamanho do fragmento em pb. Um segmento do gene do hormônio do crescimento (GH) humano foi utilizado como controle interno (431 pb).

FIGURA 20 - PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA OS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL2* COM A REAÇÃO DE PCR-SSP



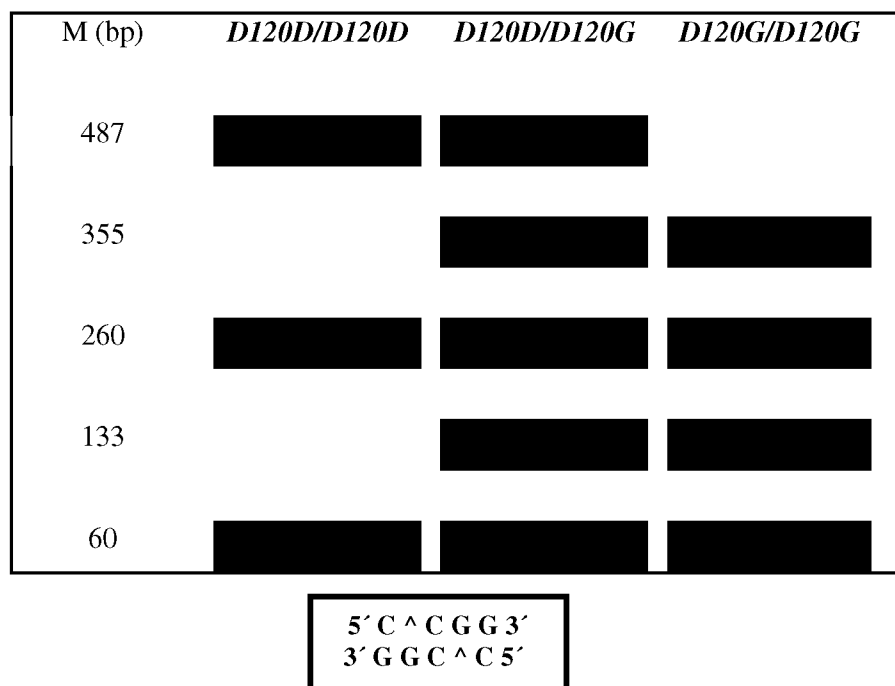
M se refere à massa molecular do amplicom . O gene da β-globina foi utilizado como controle interno (600 pb).

4.7 Genotipagem do polimorfismo *MASP2*

O polimorfismo do gene *MASP2* foi determinado em 148 pacientes e 129 controles, cujas características estão representadas na tabela 5.

O DNA genômico foi extraído de sangue periférico conforme descrito previamente. Um fragmento de 807 bp do gene *MASP-2* foi amplificado utilizando-se os seguintes iniciadores 5'-CAGGTCACTGGACAAACAGATCA-3' (à montante, localizado na região promotora) e 5'-CTGCCTGGCCTAAGACAGAG-3' (à jusante, localizado no íntron 3' do éxon 3). Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram digeridos pela enzima *HpaII* (Promega, Southampton, UK) *overnight* a 37°C e os fragmentos de restrição analisados em gel de agarose a 2%. O produto de PCR contém dois sítios não-variáveis para a *HpaII*, que servem como controles internos e geram três fragmentos de 487 bp, 260 bp e 60 bp. A mutação *D120G* gera um terceiro sítio para a *HpaII*, que cliva o fragmento de 487 bp em fragmentos de 355 bp e 133 bp (figura 21).

FIGURA 21 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA O POLIMORFISMO D120G DO GENE *MASP2* APÓS RESTRIÇÃO COM A ENZIMA *HpaII*



A presença da mutação resulta na clivagem do amplicom de 487 pb em dois fragmentos com massa molecular de 355 pb e 133 pb. Portanto, quando a mutação se apresenta em homozigose, o fragmento de 487 não aparece. O retângulo representa o sítio de clivagem da enzima de restrição.

4.8 Análise estatística

As frequências alélicas e genótípicas foram determinadas por contagem simples e avaliadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Testes de independência entre pacientes e controles foram realizados utilizando-se os testes do qui-quadrado com correção de *Yates* e o teste de *Fisher* bicaudal. Quando apropriado, o *odds ratio* é apresentado, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação às concentrações de MBL é apresentada em mediana, percentis e amplitude. As comparações entre médias foram feitas através dos testes de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*. Para comparações múltiplas das médias das concentrações de MBL,

foi utilizada a correção de *Bonferroni*. Modelos de regressão logística modo *backwards* foram aplicados para se observar a correlação entre múltiplas variáveis. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos. Os programas utilizados foram *Statistica* versão 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OH, USA) e *MedCalc Software* (Belgium). Na comparação entre pacientes e controles, o poder da amostra foi de 91,4%.

5. RESULTADOS

5.1 Genótipos *MBL2* e concentrações séricas de MBL nos pacientes portadores de CRC e controles:

Avaliando-se as concentrações de MBL nos indivíduos portadores do genótipo *A/A*, se observou uma concentração significativamente ($p < 0.012$) maior da proteína no grupo de pacientes ($n=69$) quando comparados aos controles ($n=30$) ($4121,88 \pm 353,88$ ng/ml vs $2547 \pm 220,33$ ng/ml, respectivamente). Nesta análise, três pacientes e nenhum indivíduo controle apresentavam o genótipo estendido *XA/XA*, o qual está relacionado a valores baixos de MBL. Este fato foi observado também neste estudo, onde os valores de MBL nos pacientes com genótipo *A/A* excluindo os genótipos *XA/XA* ($n=66$) foram $4265,60$ ng/ml $\pm 359,60$ e nos pacientes com genótipo *XA/XA* ($n=3$), $960 \pm 498,9$ ng/ml ($p < 0,013$). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de MBL entre pacientes e controles heterozigotos *A/O* (743 ± 137 ng/ml vs 696 ± 126 ng/ml, $p=ns$), nem homozigotos *O/O* ($106,66 \pm 106,66$ ng/ml vs 70 ± 70 ng/ml, $p=ns$). Dessa forma, observou-se somente uma diferença na concentração sérica de MBL nos indivíduos com genótipos relacionados ao aumento na expressão da proteína.

Comparando-se as concentrações de MBL nos pacientes portadores do genótipo estendido *YA/YA* ($n=41$) com as concentrações dos demais genótipos ($n=63$), confirmou-se a relação desse genótipo com valores altos de MBL ($4897,56 \pm 499,87$ ng/ml vs $1695,09 \pm 237,49$ ng/ml, $p < 0,0001$, respectivamente). Essa mesma relação foi observada no grupo controle, $n=22$ e 38 , respectivamente ($2593,63 \pm 286,81$ ng/ml vs $930,28 \pm 184,37$ ng/ml, $p < 0,0001$) (tabela 8).

Utilizando-se a curva ROC (*receiver operating characteristic*) aplicada aos pacientes portadores de CRC e controles obteve-se um valor crítico de MBL sérica de 2800 ng/ml como fator de risco para o desenvolvimento de CRC (sensibilidade de 45.1%, especificidade de 80%, $p < 0,0019$). Dos 47 pacientes portadores de concentração sérica de MBL > 2800 ng/ml, 46 (98%) possuíam os genótipos *YA/YA* e

YA/XA, e dos 57 portadores de MBL<2800 ng/ml, 36 (63%) possuíam genótipos não-YA/YA e YA/XA (OR: 85.1, IC 95% 10,90 – 664,03, $p<0,000006$). Dentre os 104 pacientes com CRC analisados, 47 (45,2%) possuíam MBL > 2800 ng/ml, e dos 60 controles avaliados, 12 (20%) possuíam estas concentrações ($p=0,001$)

Observou-se diferença estatisticamente significativa na distribuição da concentração sérica de MBL entre os diferentes genótipos *MBL2*, tanto nos pacientes com CRC como nos controles ($p<0,000005$ e $p<0,000002$, respectivamente), para p significativo de 0,0003 e 0,0002 respectivamente (*Kruskal-Wallis* com correção de *Bonferroni*).

A relação dos genótipos completos com as concentrações séricas de MBL podem ser observadas na figura 22.

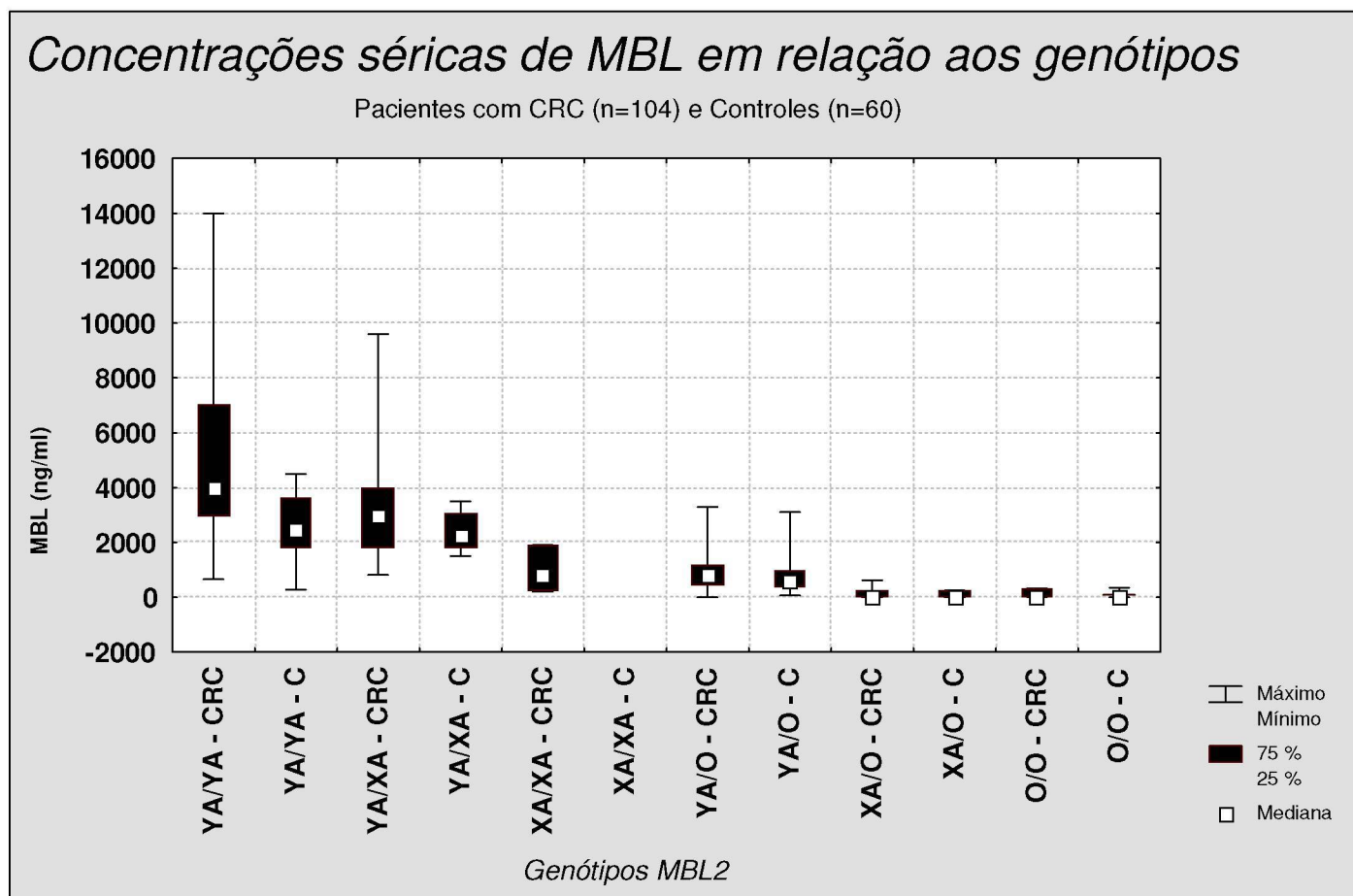
TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS

Genótipo <i>MBL2</i>	Pacientes – CRC (n=104)	Concentração sérica de MBL (ng/ml)*	Controles (n=60)	Concentração sérica de MBL (ng/ml)*	<i>p</i>
YA/YA	41	4897,56 ± 499,87	22	2593,63 ± 286,81	0,002
YA/XA	25	3229,2 ± 411,76	8	2418,75 ± 268,91	0,28
XA/XA	3	960 ± 498,93	0	na	na
YA/O	23	973,95 ± 158,15	22	775,45 ± 134,03	0,34
XA/O	9	51,11 ± 28,88	3	83,33 ± 83,33	0,64
O/O	3	106,66 ± 106,66	5	70 ± 70	0,77

Observou-se diferença significativa apenas entre as concentrações de MBL relacionadas aos genótipos YA/YA (teste de *Mann-Whitney*).

* média±EP, na: não-aplicável

FIGURA 22 – RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL E OS GENÓTIPOS *MBL2*



Pacientes (CRC): YA/YA (41), YA/XA (25), XA/XA (3), YA/O (23), XA/O (9), O/O (3); controles (C): YA/YA (22), YA/XA (8), XA/XA (0), YA/O (22), XA/O (3), O/O (5). A designação O inclui qualquer genótipo com os alelos variantes B, C e D. Houve significância estatística entre pacientes e controles apenas para o genótipo YA/YA ($p=0,002$, teste de *Mann-Whitney*).

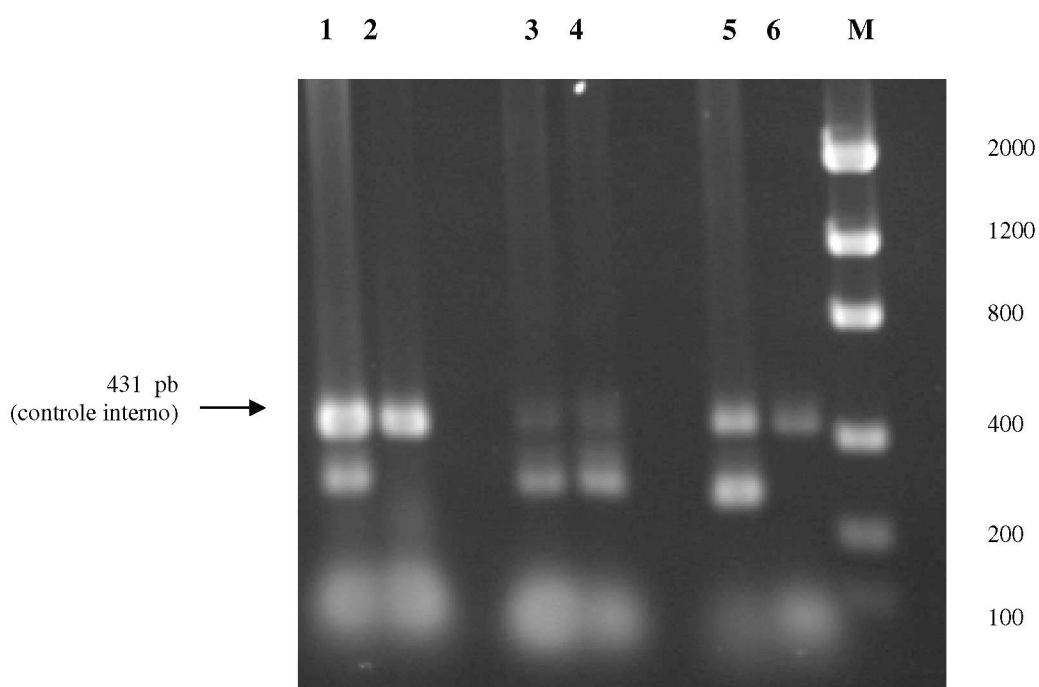
5.2 Genotipagem dos polimorfismos *MBL2*:

A análise foi baseada na genotipagem do éxon 1 e da região promotora X/Y em 149 pacientes com história de FR e em 147 indivíduos saudáveis.

5.2.1 Detecção dos alelos A, B, C e D da região éxon 1

A detecção dos alelos do éxon 1 em gel de agarose a 2% após amplificação do gene *MBL2* por PCR-SSP pode ser visualizada na figura 23. Para a genotipagem de cada indivíduo foram necessárias 6 reações. Como controle interno observa-se o fragmento de 431 pb, relativo a um amplificado do hormônio do crescimento (GH) humano.

FIGURA 23. GENOTIPAGEM DE *MBL2* UTILIZANDO INICIADORES COM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS – ÉXON 1



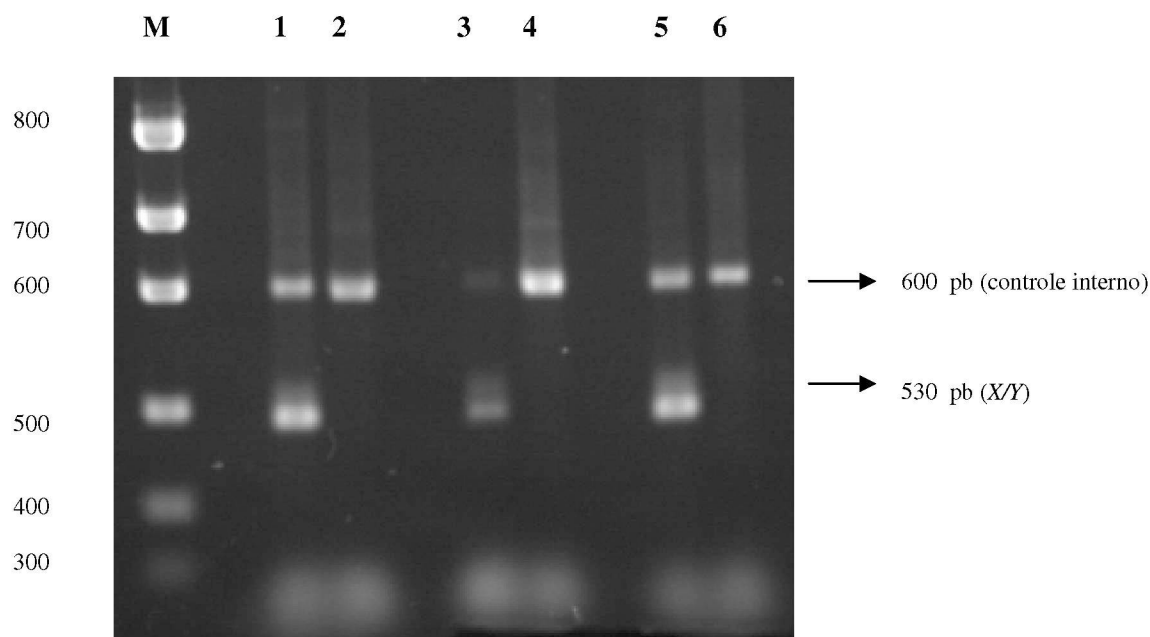
1. PCR com *primer* específico para os alelos *não-C* positiva
2. PCR com *primer* específico para o alelo *C* negativa
3. PCR com *primer* específico para os alelos *não-B* positiva
4. PCR com *primer* específico para o alelo *B* positiva
5. PCR com *primer* específico para os alelos *não-D* positiva
6. PCR com *primer* específico para o alelo *D* negativa
- M. *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen Life Technologies)

O número referente à especificidade da PCR está indicada no topo de cada coluna. Indicado pela seta está o controle interno de 431 pb. M indica o marcador de massa molecular. O paciente é heterozigoto AB.

5.2.2 Detecção dos alelos X/Y da região promotora:

Foi realizada através de duas reações de amplificação PCR-SSP para cada paciente, uma delas específica para o alelo X e outra para o alelo Y. Como controle interno foi utilizado o gene da β -globina (600 pb). O amplicom resultante apresenta 530 pb. Nos indivíduos heterozigotos, houve amplificação nas duas reações, com os dois *iniciadores* específicos (figura 24).

FIGURA 24 - GENOTIPAGEM DE *MBL2* UTILIZANDO *INICIADORES* COM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS – POLIMORFISMO X/Y



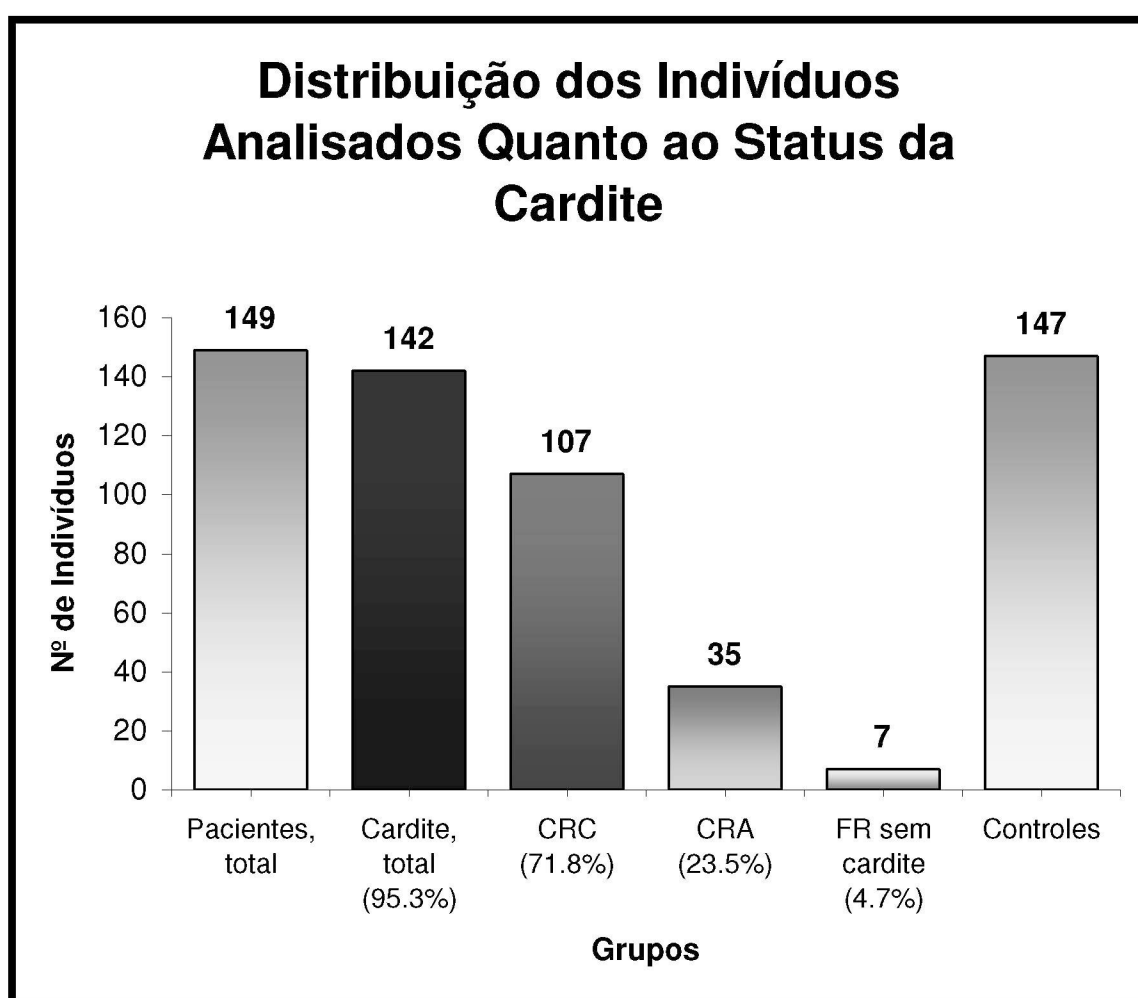
1, 3 e 5: PCR com *primer* específico para o alelo Y
 2, 4 e 6: PCR *primer* específico para o alelo X
 1 + 2, 3 + 4 e 5 + 6: pacientes homozigotos YY
 M: Marcador de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies*)

O número referente à especificidade da PCR está indicada no topo de cada coluna. Indicado pela seta está o controle interno de 600 pb. M indica o marcador de massa molecular de 100 pb.

5.3 Frequências dos alelos *A*, *B*, *C*, *D* e *X/Y* em pacientes e controles:

Foram analisados 149 pacientes no total, divididos posteriormente em quatro grupos distintos. Na figura 25 está caracterizada a frequência dos grupos e sub-grupos estudados.

FIGURA 25 - FREQUÊNCIA DOS INDIVÍDUOS QUANTO AO *STATUS* DA CARDITE



Foram analisados 149 pacientes no total, divididos posteriormente em quatro grupos distintos (cardite total, isto é, aguda mais crônica; CRC; cardite aguda sem CRC, designada aqui por CRA, e FR sem cardite) e 147 controles.

5.3.1 Pacientes totais vs controles:

A distribuição dos alelos A, B, C e D do éxon 1 e X/Y da região promotora pode ser observada na tabela 9.

TABELA 9. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL2* NOS GRUPOS EM ESTUDO

	<u>Pacientes Frequência</u>		<u>Controles Frequência</u>		<i>p</i>
	(n=149)		(n=147)		
Alelos <i>MBL2</i>					
A	242	0,812	220	0,748	0,07
O	56	0,188	74	0,252	
B	39	0,131	51	0,173	
C	5	0,017	12	0,041	
D	12	0,040	11	0,037	
X	56	0,188	45	0,153	1
Y	242	0,812	249	0,847	
Genótipos <i>MBL2</i>					
A/A	99	0,664	83	0,565	0,18
A/O	44	0,295	54	0,367	
O/O	6	0,040	10	0,068	
X/X	3	0,020	3	0,020	
X/Y	50	0,336	40	0,272	
Y/Y	96	0,644	104	0,707	0,47
A/A	99	0,664	83	0,565	0,10
A/O + O/O	50	0,336	64	0,435	
Genótipos estendidos <i>MBL2</i>					
YA/YA + YA/XA	108	0,725	79	0,537	0,001
XA/XA + XA/O + O/O	41	0,275	68	0,463	

Observou-se diferença estatisticamente significativa apenas em relação aos genótipos estendidos. Os genótipos YA/YA + YA/XA foram mais frequentes no grupo de pacientes com história de FR como um todo (OR IC 95%: 2.26; 1.39-3.67, $p=0,001$) (testes exato de Fisher e do qui-quadrado).

A frequência dos genótipos relacionados a uma maior produção de MBL (YA/YA e YA/XA) foi significativamente maior no grupo de pacientes quando comparada aos controles saudáveis (108/149, 72,5% vs 79/147, 53,7%, OR 2,26, IC 95% 1,39-3,67, $p=0,001$).

Com relação aos alelos A, B, C, e D do éxon 1 e X/Y da região promotora, assim como aos respectivos genótipos, não se observou diferença significativa entre os grupos. Também não foram observadas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas em relação à origem étnica, tanto no grupo de pacientes, quanto no grupo controle.

5.3.2 Pacientes com história de cardite reumática (total) vs controles

A frequência dos genótipos relacionados à maior produção de MBL (YA/YA e YA/XA) foi significativamente maior no grupo de pacientes quando comparada aos indivíduos controle (105/142 (73,9%) vs 79/147 (53,7%), OR 2,44, IC 95% 1,48-4,00, $p=0,0006$). Considerando-se apenas o éxon 1, o genótipo A/A também foi mais frequente no grupo de pacientes do que na população controle (97/142, 68,3% vs 83/147, 56,5%, OR 1,66, IC 95% 1,02-2,68, $p=0,05$). Dessa forma, os alelos variantes (O) foram mais frequentes entre os controles do que nos pacientes com cardite (74/294, 25,2% vs 50/284, 17,6%, OR 0,63, IC 95% 0,42-0,95, $p=0,03$) (tabela 10).

5.3.3 Pacientes com CRC vs controles:

A frequência dos genótipos relacionados a uma maior produção de MBL (YA/YA e YA/XA) foi significativamente maior no grupo de pacientes do que nos controles (79/107, 73,8% vs 79/147, 53,7%, OR 2,42, IC 95% 1,41-4,16, $p=0,001$) (tabela 11).

Em relação aos alelos A, B, C, e D do éxon 1 e X/Y da região promotora, não se observou diferença significativa entre os grupos, assim como em relação aos respectivos genótipos.

TABELA 10. POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E DA REGIÃO PROMOTORA X/Y DE *MBL2*, EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE CARDITE REUMÁTICA AGUDA E CRÔNICA E CONTROLES

	Pacientes com cardite (total)		Controles		
	n	Frequência	n	Frequência	p
	(n=142)		(n=147)		
Alelos <i>MBL2</i>					
A	234	0,824	220	0,748	
O	50	0,176	74	0,252	0,03
B	34	0,120	51	0,173	0,08
C	5	0,018	12	0,041	0,13
D	11	0,039	11	0,037	1
X	54	0,190	45	0,153	
Y	230	0,810	249	0,847	0,28
Genótipos <i>MBL2</i>					
A/A	97	0,683	83	0,565	
A/O	40	0,282	54	0,367	
O/O	5	0,035	10	0,068	0,09
X/X	3	0,021	3	0,020	
X/Y	48	0,338	40	0,272	
Y/Y	91	0,641	104	0,707	0,45
A/A	97	0,683	83	0,565	
A/O + O/O	45	0,317	64	0,435	0,05
Genótipos estendidos <i>MBL2</i>					
YA/YA + YA/XA	105	0,739	79	0,537	
XA/XA + XA/O + O/O	37	0,261	68	0,463	0,0006

Diferença estatisticamente significativa foi observada em relação aos alelos variantes, que foram mais frequentes no grupo controle (OR IC 95% 0,63; 0,42-0,95, $p=0,03$) e em relação aos genótipos A/A e YA/YA + YA/XA, que foram mais frequentes no grupo de pacientes com história de cardite como um todo (OR IC 95% 1,66; 1,02-2,68, $p=0,05$ e OR IC 95% 2,44; 1,48-4,00, $p=0,0006$, respectivamente) (testes exato de Fisher e do qui-quadrado).

Através de regressão logística investigou-se os seguintes fatores de risco para o desenvolvimento de CRC: *idade, sexo, origem étnica, presença dos genótipos YA/YA e YA/XA e MBL >2800 ng/ml*, comparando-se os pacientes portadores da

sequela cardíaca com os controles. Obteve-se OR: 2,91 (IC 95% 1,41-6,03, $p=0,003$) para presença de MBL >2800 ng/ml como fator de risco para o desenvolvimento de CRC. Os demais parâmetros não apresentaram significância estatística.

TABELA 11 - POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA X/Y EM PACIENTES COM CRC E CONTROLES

	Pacientes com CRC		Controles		p
	n	Frequência	n	Frequência	
	(n=107)		(n=147)		
Alelos <i>MBL2</i>					
A	175	0,818	220	0,748	
O	39	0,182	74	0,252	0,08
B	29	0,136	51	0,173	0,79
C	5	0,023	12	0,041	0,60
D	5	0,023	11	0,037	1
X	42	0,196	45	0,153	
Y	172	0,804	249	0,847	0,24
Genótipos <i>MBL2</i>					
A/A	71	0,664	83	0,565	
A/O	33	0,308	54	0,367	
O/O	3	0,028	10	0,068	0,17
X/X	3	0,040	3	0,020	
X/Y	25	0,233	40	0,272	
Y/Y	79	0,738	104	0,707	0,73
A/A	53	0,495	83	0,565	
A/O + O/O	54	0,505	64	0,435	0,33
Genótipos estendidos <i>MBL2</i>					
YA/YA + YA/XA	79	0,738	79	0,537	
XA/XA + XA/O + O/O	28	0,262	68	0,463	0,001

Observou-se diferença estatisticamente significativa apenas em relação aos genótipos estendidos *MBL2*. Os genótipos YA/YA + YA/XA foram mais frequentes no grupo de pacientes com CRC quando comparado aos controles saudáveis (OR IC 95%: 2,42; 1,41-4,16, $p=0,001$) (testes exato de Fisher e do qui-quadrado).

Analisando-se separadamente as características clínicas dos sub-grupos de pacientes portadores de CRC em relação à história prévia de procedimento invasivo para correção da valvulopatia, não se observou associação das mesmas com os genótipos estendidos *MBL2* (tabela 12).

TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES PORTADORES DE CRC EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS *MBL2*.

Pacientes com CRC (n=107)	Genótipos YA/YA e YA/XA (n=65)	Demais genótipos (n=42)	p	OR (IC 95%)
Não-submetidos a procedimentos invasivos (n=30)				
Grau de estenose mitral				
Normal	0	0	1	
Leve	16 (53,3%)	3 (30%)	0,12	
Moderada	11 (36,6%)	7 (70%)	0,014	0,10 (0,01-0,61)
Grave	3 (10%)	0	0,53	
Submetidos a procedimentos invasivos (n=77)				
Idade na época do procedimento (anos)				
	38 ± 12*	37,39 ± 10,67 (18-65)*	38,66 ± 13,97 (12-75)	ns
Comissurotomia	27 (35%)	17 (37,7%)	10 (31,2%)	0,63
Valvuloplastia por balão	15 (19,4%)	9 (20%)	6 (18,7%)	1
Troca por válvula biológica	26 (33,7%)	13 (28,8%)	13 (40,6%)	0,33
Troca por válvula metálica	9 (11,6%)	6 (13,3%)	3 (9,3%)	0,72

Não se observou nenhuma diferença significativa de relevância entre os pacientes portadores de genótipos relacionados a uma maior produção de MBL e os demais em relação ao tipo de procedimento invasivo para correção da valvulopatia. Dentre os pacientes não submetidos a procedimentos, a estenose mitral moderada foi mais frequente entre os portadores dos genótipos relacionados à baixa concentração sérica de MBL (OR IC 95% 0,1; 0,01-0,61, p=0,014) (teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney, * média ± DP)

Dentro do grupo de pacientes não-submetidos a procedimentos invasivos (n=30), a estenose mitral moderada foi mais frequente nos pacientes portadores dos genótipos relacionados à menor produção de MBL (7/10, 70% vs 4/20, 20%, OR 0,10 (IC 95% 0,01-0,61, p=0,015). Dentro do grupo de pacientes submetidos a alguma intervenção (n=77), não houve diferença estatística relacionada à idade da realização do procedimento, nem com o tipo do mesmo.

5.3.4 Pacientes com história de cardite reumática aguda sem seqüelas (CRA) vs controles:

Entre os 142 pacientes com história de cardite reumática investigados, 35 não apresentavam seqüelas valvares até o momento desta avaliação. A frequência dos genótipos relacionados a maior produção de MBL (YA/YA e YA/XA) foi significativamente maior no grupo de pacientes quando comparados aos controles saudáveis (26/42, 74.3% vs 79/147, 53.7%, OR 2.48, IC 95% 1.09-5.67, p=0.035). Considerando-se apenas o éxon 1, o genótipo A/A também foi mais freqüente nos pacientes do que nos controles (26/42, 74,2% vs 83/147, 56,4%, OR 2,22, IC 95% 0,97-5,08, p=0,05). O alelo mutante B foi mais freqüente entre os controles quando comparados aos pacientes com CRA (51/294, 17,3% vs 5/84, 7.1%, OR 0,36, IC 95% 0,14-0,95, p=0,04) (tabela 13).

5.3.5 Pacientes com história de FR sem cardite vs controles:

Do total de 149 pacientes estudados, somente 7 (4,69%) apresentaram FR sem história de cardite reumática. Analisando-se este grupo, não se observou diferenças significativas entre pacientes e controles na distribuição de frequências de alelos e genótipos *MBL2* (tabela 14).

TABELA 13. POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA X/Y, EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE CRA E CONTROLES

	Pacientes com CRA		Controles		<i>p</i>
	n	Frequência	n	Frequência	
	(n=35)		(n=147)		
Alelos <i>MBL2</i>					
A	59	0,843	220	0,748	
O	11	0,157	74	0,252	0,11
B	5	0,071	51	0,173	0,04
C	0	0,000	12	0,041	0,13
D	6	0,086	11	0,037	0,10
X	12	0,171	45	0,153	
Y	58	0,829	249	0,847	0,71
Genótipos <i>MBL2</i>					
A/A	26	0,743	83	0,565	
A/O	7	0,200	54	0,367	
O/O	2	0,057	10	0,068	0,14
X/X	0	0,000	3	0,028	
X/Y	12	0,571	40	0,374	
Y/Y	9	0,429	64	0,598	0,23
A/A	26	0,742	83	0,564	
A/O + O/O	9	0,257	64	0,435	0,05
Genótipos estendidos <i>MBL2</i>					
YA/YA + YA/XA	26	0,743	79	0,537	
XA/XA + XA/O + O/O	9	0,257	68	0,463	0,035

Observou-se diferença estatisticamente significativa em relação alelo variante *B*, que foi mais freqüentes no grupo controle (OR IC 95% 0,36; 0,14-0,95, $p=0,04$) e em relação aos genótipos *A/A* e *YA/YA + YA/XA*, que foram mais freqüentes no grupo de pacientes com história de cardite reumática aguda sem sequelas (OR IC 95% 2,22; 0,97-5,08, $p=0,05$ e OR IC 95% 2,48; 1,09-5,67, $p=0,035$, respectivamente) (testes exato de *Fisher* e do qui-quadrado).

TABELA 14. POLIMORFISMO DO ÉXON 1 E REGIÃO PROMOTORA X/Y DO GENE *MBL2* EM PACIENTES COM FR SEM CARDITE E CONTROLES

	FR sem cardite reumática		Controles		
	n	Frequência	n	Frequência	p
	(n=7)		(n=147)		
Alelos <i>MBL2</i>					
A	8	0,571	220	0,748	
O	6	0,429	74	0,252	0,20
B	5	0,357	51	0,173	0,14
C	0	0,000	12	0,041	1
D	1	0,071	11	0,037	0,09
X	2	0,143	45	0,153	
Y	12	0,857	249	0,847	1
Genótipos <i>MBL2</i>					
A/A	2	0,286	83	0,565	
A/O	4	0,571	54	0,367	
O/O	1	0,143	10	0,068	0,22
X/X	0	0,000	3	0,028	
X/Y	2	0,286	40	0,374	
Y/Y	5	0,714	64	0,598	0,75
A/A	2	0,286	83	0,564	
A/O + O/O	5	0,714	64	0,435	0,24
Genótipos estendidos <i>MBL2</i>					
YA/YA + YA/XA	2	0,286	79	0,537	
XA/XA + XA/O + O/O	5	0,714	68	0,463	0,25

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre o grupo de pacientes com FR sem história de cardite e os indivíduos saudáveis (teste exato de Fisher).

5.3.5 Relação entre os genótipos *MBL2* e características clínicas dos pacientes com FR sem CRC

Analisando-se a frequência dos genótipos *MBL2* relacionados a alta produção de MBL (*YA/YA* e *YA/XA*) e demais genótipos com relação às características clínicas dentro grupo de pacientes com história de FR que não desenvolveram CRC (n=42), observou-se diferença significativa em relação à frequência da artrite, que foi menos frequente no grupo portador destes genótipos quando comparado ao grupo com genótipos relacionados à baixa produção de MBL (10/28, 35,7% vs 10/14, 71,4%, OR 0,22, IC 95% 0,05-0,89, p=0,048) (tabela 15).

TABELA 15 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS *MBL2* EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS E ÀS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES COM FR SEM CRC

Pacientes sem CRC	(n=42)	Genótipos <i>MBL2</i>		<i>p</i>	OR (IC 95%)
		<i>YA/YA</i> e <i>YA/XA</i> (n=28)	Demais genótipos (n=14)		
<i>Características clínicas</i>					
Idade no primeiro surto de FR (anos)	8,57 ± 3,35 (3-16)*	8,57 ± 3,57 (3-16)*	8,57 ± 3,00 (5-14)*	1	
Idade no último surto de FR (anos)	9,11 ± 3,92 (3-21)*	9,28 ± 4,37 (3-21)*	8,78 ± 2,93 (5-14)*	0,70	
Nº total de surtos	1,59 ± 0,25 (1-10)#	1,57 ± 0,38 (1-5)#	1,60 ± 0,33 (1-10)#	0,94	
Profilaxia correta	39 (92,85%)	26 (92,8%)	13 (92,8%)	1	
<i>Manifestações clínicas</i>					
Cardite	35 (83%)	26 (92,8%)	9 (64,2%)	0,031	7,22 (1,18-43,99)
Artrite	20 (47,6%)	10 (35,7%)	10 (71,4%)	0,048	0,22 (0,05-0,89)
Nódulos subcutâneos	4 (9,5%)	2 (7,1%)	2 (14,2%)	1	
Coréia	3 (7,1%)	3 (10,7%)	0	0,53	
Eritema marginado	1 (2,3%)	1 (3,5%)	0	1	

A cardite foi observada com maior frequência entre os portadores dos genótipos relacionados à altas concentrações de MBL, ao contrário do que se observou com a artrite, que foi mais frequente entre os indivíduos portadores de genótipos relacionados a concentrações séricas menores da proteína (*média ± DP, # média ± EP, ns: não-significativo)

5.4 Genotipagem do polimorfismo D120G de *MASP2*:

A análise foi baseada na presença do polimorfismo D120G em 277 indivíduos (148 pacientes e 129 controles), cujas características demográficas podem ser observadas na tabela 7.

Do total de 148 pacientes avaliados, 42 (28,37%) tinham história de FR sem CRC, e 106 (71,62%) eram portadores de CRC, os quais foram ou não submetidos a procedimentos invasivos (tabela 16).

TABELA 16 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HISTÓRIA DE FR

Pacientes sem CRC	(n=42)	Pacientes com CRC	(n=106)
Características clínicas		Não-submetidos a procedimentos invasivos (n=30)	
Idade do primeiro surto de FR	8,57 ± 0,5	Grau de estenose mitral	
Idade do último surto de FR	8,88 ± 0,6	Normal	0
Total de surtos	1,59 ± 0,2	Leve	16 (53,3%)
		Moderada	11 (36,6%)
Manifestações clínicas		Grave	3 (10%)
Cardite	35 (83%)	Submetidos a procedimentos invasivos (n=76)	
Artrite	19 (45,2%)	Comissurotomia	26 (34,2%)
Nódulos subcutâneos	4 (9,5%)	Valvuloplastia por balão	15 (19,7%)
Coréia	3 (7,1%)	Troca por válvula biológica	26 (34,2%)
Eritema marginado	1 (2,3%)	Troca por válvula metálica	9 (11,8%)

Dos 148 pacientes analisados, 42 tinham história de CRA sem CRC e 106 eram portadores de CRC. Destes, a maioria (71,7%) haviam sido submetidos a algum procedimento invasivo para tratamento da valvulopatia.

A mutação D120G foi observada em quatro pacientes (4/106, 3,77%) com CRC e em 5 controles (5/129, 3,88%, $p=1$). Todos os indivíduos eram heterozigotos para o alelo variante. Nenhum dos pacientes sem a sequela cardíaca da FR apresentou a mutação. De acordo com a origem étnica, 3 pacientes e 3 controles portadores da mutação eram euro-brasileiros, e 1 paciente e 2 controles eram afro-descendentes ($p=ns$). Dois dos pacientes portadores da mutação foram submetidos a

troca de válvula mitral por válvula biológica, e os outros dois não sofreram nenhuma intervenção invasiva.

A média de idade dos pacientes e dos controles portadores do alelo variante foi de $43,5 \pm 3,78$ DP anos (38-46) e $47,2 \pm 19,4$ (31-78), respectivamente ($p = ns$). Nenhuma diferença foi observada na frequência do alelo variante entre os diferentes grupos de pacientes investigados (0% na FR, 1,88% na CRC e 1,93% nos controles, $p=0,44$) (tabela 17).

TABELA 17 - POLIMORFISMO DO GENE *MASP2* EM SUB-GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES

MASP2	Pacientes com FR			Controles	p
	Total	FR s/CRC	c/ CRC		
	(n=148)	(n=42)	(n=106)	(n=129)	
Alelos					
D	292 (98,64%)	84 (100%)	208 (98,11%)	253 (98,06%)	ns ^{1, 2, 3, 4}
G	4 (1,35%)	0	4 (1,88%)	5 (1,93%)	
Genótipos					
DD	144 (97,29%)	42 (100%)	102 (96,22%)	124 (96,12%)	ns ^{1, 2, 3, 4}
DG	4 (2,70%)	0	4 (3,77%)	5 (3,87%)	
GG	0	0	0	0	

1. Total vs controles 2. s/ CRC vs controles 3. c/ CRC vs controles 4. s/CRC vs c/ CRC
ns: não-significativo

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo D120G do gene *MASP2* entre o grupo de pacientes com FR sem CRC, com CRC e os indivíduos saudáveis.

6. DISCUSSÃO:

A febre reumática e a sua seqüela mais grave, a cardiopatia reumática crônica, são doenças em cuja patogênese há o envolvimento tanto de fatores inatos quanto adaptativos da resposta imunológica. Evidências epidemiológicas e imunogenéticas sugerem que existem indivíduos com um maior risco de desenvolver tanto a FR quanto a CRC (GIBOFSKY, KERWAR e ZABRISKIE, 1998).

A proteína MBL é uma importante molécula do sistema imune inato, que além de exercer funções na opsonização de patógenos e ativação do sistema complemento, é capaz de modular a resposta inflamatória, exercendo influência na secreção de citocinas (WETERING, GOLD e BATENBURG, 2004). A associação da MBL com doenças infecciosas, inflamatórias e auto-imunes já foi objeto de um grande número de estudos, e a mesma parece representar papéis diferentes na patogênese das diversas doenças analisadas, uma vez que a sua deficiência pode se apresentar como fator protetor em determinadas situações e como fator patogênico em outras (DOMMET, KLEIN e TURNER, 2006).

A associação da MBL com a CRC foi abordada previamente em dois estudos. Em estudo anterior, observou-se que pacientes portadores de CRC apresentavam concentrações séricas de MBL significativamente mais elevadas que indivíduos saudáveis (SCHAFRANSKI et al., 2004). JIN, JI, e HU (2001), analisando o polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* em um pequeno número de indivíduos chineses (36 pacientes portadores de CRC e 39 controles saudáveis), não encontraram associação dos genótipos mutantes com a doença, embora a frequência do alelo mutante *B* foi maior naqueles pacientes com início mais precoce dos sintomas relacionados à doença cardíaca. A relação do polimorfismo do gene *MBL2* com as demais manifestações clínicas da FR, assim como o polimorfismo D120G do gene *MASP2* nesta doença, ainda não haviam sido abordados previamente. No presente estudo, analisamos as variantes genéticas do gene *MBL2* em relação ao desenvolvimento das manifestações da FR de uma maneira mais ampla, isto é, incluindo pacientes com história de cardite reumática aguda sem seqüelas valvares

(CRA) e pacientes portadores das demais manifestações da doença (artrite, coréia, eritema marginado e nódulos subcutâneos).

Neste estudo, realizou-se uma análise das concentrações séricas de MBL dos pacientes portadores de CRC e dos controles previamente estudados através de curva ROC (*receiver operating characteristic*), obtendo-se um valor crítico de MBL sérica de 2800 ng/ml como fator de risco para o desenvolvimento de CRC. Após análise multivariada incluindo também a idade, sexo, origem étnica e a presença dos genótipos estendidos *YA/YA* e *YA/XA*, a presença de concentrações séricas de MBL superiores a 2800 ng/ml resultaram em um OR de 2.91 para o desenvolvimento de CRC. Tal achado corrobora a hipótese da presença de um efeito pró-inflamatório da MBL na patogênese desta doença.

A MBL é considerada uma proteína de fase aguda, embora sua concentração tenha um aumento modesto nos processos inflamatórios. Em pós-operatório, situação em que há resposta inflamatória sistêmica, a concentração de MBL circulante aumenta em até 3 vezes, elevação semelhante à encontrada em indivíduos com malária. Esses valores são modestos quando comparados ao aumento da concentração de outros marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa (CRP), que podem chegar a 40 vezes do valor normal (THIEL et al., 1992).

A presença de atividade inflamatória persistente na CRC já foi evidenciada por diferentes autores. Em uma análise de apêndices atriais em 50 pacientes portadores de CRC, coletados durante valvulotomia mitral fechada, demonstrou-se a presença de nódulos de *Aschoff* em 56% das amostras, sendo que não havia evidência clínica e laboratorial de atividade reumática em nenhum dos pacientes (CHOPRA et al. 1988). A presença de nódulos de *Aschoff* com infiltrados mononucleares abundantes indicam a presença de cardite sub-clínica nesses pacientes.

Em outro estudo, YETKIN et al. (2001) demonstraram elevadas concentrações séricas de moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) em pacientes portadores de CRC. O papel fundamental das moléculas de adesão em condições inflamatórias e imunológicas tem sido reportado nos últimos anos. Essas têm uma função importante na migração das células para os sítios de inflamação e na

transmigração de linfócitos, e são expressas no endotélio vascular servindo como ligantes para as células inflamatórias circulantes.

GOLBASI et al. (2002), comparando as concentrações séricas de CRP em 81 mulheres portadoras de CRC, 31 mulheres portadoras de válvulas prostéticas e 102 controles saudáveis, encontraram valores significativamente maiores desta proteína nas pacientes portadoras de CRC. A CRP é um reagente de fase aguda, e o fato dessa proteína se encontrar elevada no grupo de portadoras de CRC pode refletir que a atividade inflamatória é persistente nesse grupo de pacientes. A proteína C-reativa atua no fígado estimulando a secreção de interleucina-6, que como veremos mais adiante, aumenta a expressão do gene *MBL2*.

Os achados obtidos no estudo anterior baseado na concentração sérica da proteína e confirmados pelas análises aqui realizadas (figura 22), apontam a MBL como um marcador de inflamação ativa na CRC, a qual pode estar envolvida no desenvolvimento das lesões observadas nesta doença devido à sua condição pró-inflamatória.

Em condições de homeostase, a MBL não se liga a tecidos próprios, porém em situações de hipóxia celular e estresse oxidativo pode haver glicolisação de superfícies celulares, levando à deposição de MBL e ativação do complemento (COLLARD et al., 2000).

A enzima NADPH oxidase está envolvida diretamente na produção de radicais livres. KUMAR et al. (1991) estudaram a atividade desta enzima após estimulação da atividade oxidativa de monócitos e neutrófilos de pacientes portadores de FR aguda, CRC e faringite estreptocócica. O seguimento foi feito no 15º dia e nos 3º e 6º meses. Houve elevação da atividade enzimática no grupo com FR e CRC, mas não no grupo da faringite estreptocócica. E durante o período de seguimento, houve um declínio progressivo na atividade enzimática no grupo com FR, o que não ocorreu na CRC, onde a atividade permaneceu estável por todo o período, indicando um processo contínuo de estresse oxidativo na CRC.

Já CHIU et al. (2006), estudando as concentrações séricas de produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e proteína C-reativa por método de alta

sensibilidade (*hs*-CRP) - marcadores sensíveis de estresse oxidativo e de inflamação sistêmica, respectivamente - em 90 pacientes portadores de CRC e em 46 indivíduos saudáveis, encontraram valores significativamente mais elevados desses marcadores no grupo dos pacientes. Esses dados indicam a presença de estresse oxidativo e de inflamação crônica nos pacientes com CRC.

Possivelmente, o papel patogênico da MBL na FR e na CRC se deve ao reconhecimento de estruturas próprias alteradas por estresse oxidativo e consequente lesão tecidual mediada pela ativação do complemento. A inter-relação da MBL com as citocinas pode também fazer parte deste processo, o que será abordado mais adiante.

Neste estudo, a análise do polimorfismo do éxon 1 e da região promotora *X/Y* do gene *MBL2* demonstrou a associação dos genótipos associados à alta produção de MBL com as manifestações cardíacas da FR, tanto a CRC quanto a CRA. Ao analisar-se os genótipos (mutações *B*, *C* e *D* do éxon 1 e polimorfismo *X/Y* da região promotora) e os genótipos estendidos (éxon 1 + região promotora *X/Y*) do gene *MBL2* separadamente, observou-se aumento significativo da frequência do genótipo *A/A*, relacionado a altas concentrações de MBL, no grupo total de pacientes com cardite (OR: 1.66, tabela 7) e no grupo com história de CRA (OR: 2.22, tabela 10), quando comparados aos indivíduos sadios. Os genótipos estendidos *YA/YA* + *YA/XA* foram mais frequentes no grupo total de pacientes (OR: 2.26, tabela 6), no grupo total de pacientes com cardite (OR: 2.44, tabela 7), nos pacientes com CRC (OR: 2.42, tabela 8) e nos pacientes com CRA (OR: 2.48, tabela 10), quando comparados à população controle. Além disso, 97.8% dos pacientes portadores dos genótipos *YA/YA* e *YA/XA* possuíam concentrações séricas de MBL > 2800 ng/ml, enquanto que apenas 36.6% dos controles portadores destes genótipos apresentavam concentrações de MBL séricas acima deste valor ($p=0.02$).

Portanto, os genótipos associados às concentrações elevadas de MBL se apresentaram como fatores de risco para o desenvolvimento de cardite reumática como um todo, de CRA e de CRC, corroborando o papel pró-inflamatório e imunogenético da MBL na patogênese dessas manifestações clínicas da FR.

Uma função imunopatológica da MBL, provavelmente mediando excessiva ativação de complemento com conseqüente lesão tecidual relacionada, foi sugerido em estudos anteriores abordando doenças mediadas imunologicamente.

Estudando o polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* em 189 pacientes dinamarqueses portadores de AR, GARRED et. al (2000) observaram que a média de idade de início da doença era menor nos pacientes portadores dos genótipos variantes. Porém, a presença do genótipo A/A foi associada a doença de início tardio e mais agressiva. TROELSEN et al. (2007), estudando 229 pacientes dinamarqueses portadores de AR, observaram um risco aumentado de doença cardíaca isquêmica, infarto agudo do miocárdio e morte por doenças cardíacas, no grupo de portadores de genótipos relacionados a concentrações elevadas de MBL (YA/YA e YA/XA) associados a níveis séricos aumentados de agalactosil-IgG (IgG0). Os autores concluíram que complexos de MBL e IgG0 depositados nas paredes dos vasos sanguíneos poderiam participar no processo inflamatório pró-aterogênico que resulta na doença cardíaca isquêmica.

Analisando 65 pacientes japoneses portadores de cirrose biliar primária (CBP), MATSUSHITA et al. (2001) encontraram uma maior freqüência dos haplótipos hiperprodutores de MBL (*HYP A/HYP A*) no grupo de doentes, quando comparados a 218 controles saudáveis (0.53 vs 0.44, $p < 0.031$), sugerindo que uma produção aumentada de MBL pode exercer uma função na imunopatogênese da CBP, possivelmente pela interação dessa molécula com células epiteliais dos canalículos biliares alteradas em sua conformação pela presença de bactérias luminas intestinais, promovendo a ativação do complemento.

WANG et al. (2001), investigaram 104 pacientes japoneses portadores de síndrome de Sjögren, doença caracterizada por inflamação crônica das glândulas exócrinas, primária e 143 controles saudáveis. Uma freqüência significativamente elevada do alelo normal A e do genótipo A/A em homozigose foi observada no grupo de pacientes. Os autores apresentaram a hipótese de que a ativação do complemento via MBL pode facilitar a lesão tecidual em portadores desta síndrome.

O polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* foi avaliado por RECTOR et al. (2001) em pacientes belgas portadores de doença inflamatória intestinal (doença de Crohn e retocolite ulcerativa). Os autores encontraram uma frequência diminuída dos genótipos variantes (*A/O* e *O/O*) nos pacientes portadores de retocolite ulcerativa quando comparados com portadores de doença de Crohn e com controles saudáveis. Desta maneira, os autores hipotetizaram que pode haver a participação da MBL no processo que leva ao dano mucoso mais extenso mediado por complemento observado na retocolite.

Há estudos associando a MBL à patogênese de glomerulonefrites humanas, como a nefropatia por IgA (ENDO et al., 1998), a síndrome de Henoch-Schonlein (ENDO et al., 2000), e também às nefrites lúpica, membranosa, membrano-proliferativa do tipo I, e associada a anticorpos anti-membrana basal (LHOTTA, WURZNER e KONIG, 1999). Ainda, concentrações séricas elevadas de MBL foram relacionadas a complicações vasculares do diabetes *mellitus* do tipo 1 (HANSEN et al., 2003), ao desenvolvimento de microalbuminúria nesta doença (HOSVIND et al., 2005) e à reestenose de carótidas precoce pós-endarterectomia (RUGONFALVI-KISS et al., 2005), possivelmente devido a ligação da MBL com estruturas próprias do organismo alteradas seja por glicosilação, ou por estresse oxidativo, levando à ativação de complemento com posterior lesão tecidual.

A exemplo de estudos anteriores em populações caucasianas e euro-brasileiras (MADESN et al., 1998, KILPATRICK, 2002 e BOLDT et al., 2006), a mutação mais frequentemente observada em nossa população foi o alelo B (17,3%, tabela 6). Mas, ao contrário dos povos de origem caucasiana, onde o alelo D é o segundo mais frequente, a segunda mutação mais observada nos indivíduos saudáveis aqui analisados foi o alelo C (4,1%), possivelmente pela maior miscigenação étnica da população brasileira com povos de origem africana, continente onde esta variante é a predominante dentre as mutações do éxon 1 do gene *MBL2*.

A menor frequência dos alelos mutantes (*O*) nos pacientes com história de cardite reumática como um todo (OR: 0.63, tabela 7) e do alelo mutante *B* nos

pacientes com história de CRA (OR: 0.36, tabela 10) sugerem que os alelos mutantes de *MBL2* podem exercer um papel protetor no desenvolvimento de doença cardíaca reumática. Por outro lado, entre os pacientes com CRA, encontrou-se uma frequência maior dos genótipos relacionados a uma menor produção de MBL nos pacientes com história de artrite (OR: 0.22, tabela 12). Recentemente, SAEVARSDOTTIR et al. (2007) observaram que a MBL exerce também uma função na eliminação de imunocomplexos. Uma remoção deficiente destes no espaço articular poderia estar predispondo tais pacientes a essa manifestação clínica, uma vez que a deposição de imunocomplexos na articulação esta implicada na patogênese da artrite nos pacientes com FR (SVARTMAN, 1975).

A deficiência de MBL como fator protetor foi objeto de alguns estudos prévios, sugerindo um papel vantajoso da deficiência de MBL em situações de resposta inflamatória exacerbada ou de infecções por microrganismos intracelulares.

Em estudo experimental, JORDAN, MONTALTO E STAHL (2001) estudaram dois grupos de ratos submetidos a oclusão coronariana, com o objetivo de observar o papel da MBL na injúria pós-reperusão. Anteriormente ao procedimento de oclusão, um grupo de ratos foi tratado com anticorpos monoclonais anti-MBL. Neste grupo, os autores observaram uma área de infarto menor, assim como menor deposição de C3 e menor infiltração neutrofílica. A liberação de mediadores inflamatórios (ICAM-1, VCAM-1 e interleucina-6) também foi menor no grupo de ratos que receberam o anticorpo.

Também em estudo experimental, TAKAHASHI et al. (2002) observaram o padrão de secreção de citocinas em camundongos submetidos a sépsis peritoneal induzida. Os autores observaram que os animais incapazes de expressar o gene *MBL-A* mostravam um padrão menor de secreção de citocinas do que os ratos normais, notadamente de TNF- α e IL-6, fato que foi mais evidente em fases tardias da sépsis (após 36 h). Os animais deficientes de *MBL-A* apresentaram maior sobrevida do que aqueles com expressão normal do gene, possivelmente por menor lesão decorrente do processo inflamatório.

Num estudo de 114 pacientes espanhóis portadores de LES, FONT et al. (2006) observaram uma frequência maior de lesões valvulares cardíacas nos pacientes portadores dos genótipos relacionados à menor produção de MBL (*XA/XA*, *XA/O*, *O/O*), quando comparados aos portadores dos genótipos *YA/YA* e *YA/XA*. Entretanto, deve-se notar que 43% dos portadores dos genótipos associados à menor produção da proteína eram portadores de anticorpos anticardiolipina IgG, os quais estão relacionados à lesões valvares em pacientes lúpicos (LESZCZYNSKI et al., 2003). Portanto, a presença das lesões valvares poderia estar relacionada à presença destes anticorpos, e não ao polimorfismo do gene *MBL2*.

Uma vez que a MBL apresenta a função de opsonina, alguns autores propõe como hipótese que a deficiência da mesma poderia exercer efeito protetor contra infecções por microrganismos intracelulares, que se utilizam dos receptores de complemento para invadir as células do hospedeiro. GARRED et al. (1993) avaliaram as concentrações séricas de MBL em 36 pacientes etíopes portadores de hanseníase lepromatosa ou lepromatosa borderline e em 26 indivíduos saudáveis. Os autores encontraram concentrações significativamente mais elevadas da proteína no grupo de pacientes. Ainda, 58% dos controles vs 17% dos pacientes ($p=0,0019$) possuíam concentrações séricas de MBL compatíveis com a presença de alelos variantes. Esses achados sugeriram na época que a infecção pelo *Mycobacterium leprae* pode ter atuado como uma força de seleção positiva dos alelos variantes de *MBL2* causando concentrações reduzidas de MBL. Recentemente, DORNELLES, PEREIRA-FERRARI E MESSIAS-REASON (2006), estudando pacientes com formas lepromatosa, tuberculóide, dimorfa e indeterminada de hanseníase, observaram frequência maior de pacientes com a forma lepromatosa portadores de concentrações altas de MBL, quando comparados aos controles, sugerindo que a deficiência da proteína pode exercer um papel protetor contra esta forma grave da doença. Esses resultados foram confirmados em estudo posterior, que demonstrou que genótipos associados à alta concentração de MBL conferem suscetibilidade à hanseníase lepromatosa e à progressão para as formas lepromatosa e borderline da doença (MESSIAS REASON et al., 2007).

HOAL-VAN-HELDEN et al. analisaram as concentrações séricas de MBL e o polimorfismo do éxon 1 (alelo *B*) em 91 pacientes sul-africanos portadores de tuberculose pulmonar, em 64 pacientes portadores de meningite tuberculosa e em 79 controles saudáveis. A frequência do alelo *B* foi significativamente maior nos controles quando comparada aos grupos de pacientes. As concentrações séricas de MBL nos controles foram também significativamente menores do que nos pacientes portadores de meningite tuberculosa. Os autores concluíram que a presença do alelo mutante *B* pode exercer um efeito protetor importante contra o desenvolvimento deste tipo de meningite.

A MBL exerce dentro do sistema imune inato uma função de reconhecimento de padrões de patógenos, função também exercida pelos receptores *toll-like*, os quais já foram objeto de estudo na FR e na CRC. BERDELI et al. (2005) estudaram a relação do polimorfismo do receptor *toll-like* 2 (TL-2) em pacientes turcos com FR aguda. Os autores encontraram uma frequência elevada do alelo Arg753Gln no grupo de pacientes quando comparados aos indivíduos saudáveis, conferindo aos pacientes portadores deste polimorfismo um OR de 97.1 (IC 95% 32.5 – 290) para o desenvolvimento de FR. Esse achado difere do encontrado em pacientes de mesma origem étnica com CRC (DUZGUN et al., 2007), nos quais o polimorfismo em questão não exerceu influência no desenvolvimento da doença.

Observa-se também uma interrelação entre MBL e citocinas. Evidências *in vitro* demonstram que a IL-6 pode aumentar a expressão do mRNA da MBL. ARAI et al. (1993) observaram um aumento da expressão do mRNA da MBL em células hepáticas da linhagem HuH-7 pela ação desta citocina. FRASER et al. (2006), também em experimento realizado *in vitro*, observaram que monócitos humanos expostos a estímulo fagocítico na presença de MBL, exibem secreção aumentada de IL-10, IL-6 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra). SANTOS et. al (2001) observaram que a secreção de IL-6 e TNF- α por polimorfonucleares humanos incubados com formas promastigotas de *Leishmania chagasi* aumentava de maneira dose-dependente, quando incubadas na presença de MBL.

YEGIN, COSKUM E ERTUG (1997) avaliaram o perfil de citocinas de 27 crianças turcas no primeiro surto de FR (15 sem o envolvimento cardíaco e 12 com cardite reumática aguda). Na avaliação do grupo como um todo, foram observadas concentrações significativamente mais elevadas de TNF- α , IL-8 e IL-6 na admissão, quando comparados com os valores obtidos 7 dias após o tratamento, quando apenas 2 pacientes ainda permaneceram com as concentrações de TNF- α elevadas (um em cada sub-grupo). As concentrações de TNF- α mostraram correlação significativa com as de IL-6.

Comparando o perfil de mediadores inflamatórios de 92 pacientes turcos portadores de CRC com 50 controles saudáveis DAVUTOGLU et al. (2005) encontraram concentrações séricas significativamente elevadas de IL-6, receptor de IL-2 (IL-2R), IL-8, TNF- α , fibrinogênio e CRP de alta sensibilidade no grupo de pacientes ($p < 0.001$). Ainda, as concentrações de IL-6, TNF- α , fibrinogênio e da CRP se correlacionaram positivamente com a gravidade da lesão valvar.

Portanto, o papel da MBL na patogênese na FR e CRC pode também estar relacionado à modulação da resposta inflamatória via secreção de citocinas, como o TNF- α , citocina pró-inflamatória com expressão aumentada no tecido cardíaco de pacientes portadores de CRC e que parece ter a sua secreção influenciada pela MBL. Ainda, concentrações elevadas de IL-6, que são vistas tanto na FR aguda quanto na CRC, podem levar a uma maior expressão do gene *MBL2*.

Outro mecanismo possível de lesão mediada pela MBL é, como descrito anteriormente, através da ligação com estruturas próprias do organismo. As válvulas cardíacas são ricas em N-acetil-glucosamina (ARMSTRONG E BISCHOFF, 2004), molécula que se liga a MBL. Além disso, NAYAR, NAYAR E CHERIAN (2006), estudando válvulas de pacientes portadores de CRC, encontraram degeneração mixomatosa em um número significativo delas. O tecido mixomatoso é rico em ácido hialurônico, um polissacarídeo de alto peso molecular composto por sequências repetidas de ácido glicurônico e N-acetil-glucosamina. Desta maneira, pode-se

imaginar que a ativação do complemento e as lesões decorrentes desta na CRA e na CRC possam estar ocorrendo em parte através da ligação da MBL com esta molécula.

É importante observar que na amostra de pacientes portadores de FR utilizadas nesta análise, a maioria (95,3%) apresentava cardite como manifestação clínica. A hipótese da MBL atuar como fator patogênico na FR *per se* ou especificamente nas manifestações cardíacas deve ser abordada em futuros estudos, com um número maior de pacientes portadores das demais manifestações clínicas da doença (coréia, eritema marginado e nódulos sub-cutâneos), uma vez que a frequência reduzida destas manifestações observadas na presente análise traduzem um poder muito baixo para qualquer associação, seja ela positiva ou negativa.

A ativação de complemento pela MBL depende principalmente de uma de suas serina-protease associadas, a MASP-2, cujo polimorfismo *D120G*, relacionado à deficiência da proteína, já foi associado a fenômenos de auto-imunidade (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003) e à predisposição à infecções (SCHLAPBACH et. al., 2007). Na análise referente à variante *D120G*, nenhuma diferença na frequência desta mutação foi observada entre pacientes portadores de CRC, com história de FR sem seqüelas cardíacas e controles, embora somente os pacientes com CRC apresentaram a mutação e esta na forma heterozigota. Assim, concluiu-se que, se uma deficiência na via das lectinas desempenha um fator protetor para o desenvolvimento da doença cardíaca reumática, esse fator protetor deve-se parcialmente à função do gene *MBL2*, e não da sua serina-protease associada, MASP-2. Uma vez que a frequência do alelo *D120G* é baixa, fato confirmado também na presente análise, estudos futuros com um maior número de indivíduos são necessários para se estabelecer a relação deste e dos demais polimorfismos *MASP2* com a FR, bem como a função dos outros elementos da via das lectinas (ficolinas M, L e H, MASP-1, MASP-3) nesta doença.

O acompanhamento a longo prazo dos pacientes com história de CRA investigados se faz necessário, como intuito de observar quais deles realmente

evoluirão para CRC. Além disso, estudos envolvendo indivíduos de outros centros também são importantes, com o objetivo de confirmar nossos achados.

Em resumo, os genótipos relacionados à maior produção de MBL parecem representar um fator de risco para o desenvolvimento de cardite tanto aguda quanto crônica. Além disso, a MBL e suas variantes genéticas podem desempenhar um papel importante na progressão da doença para a forma crônica. Por outro lado, a presença dos alelos mutantes parece exercer um efeito protetor em relação às manifestações cardíacas da FR, porém parecem estar associados à presença de artrite. O fato que alguns dos pacientes portadores de FR apresentam simultaneamente artrite e cardite como manifestações clínicas deixa claro que a MBL não é o único fator envolvido na complexa patogênese desta doença.

Um modelo experimental de cardite/valvulite reumática foi desenvolvido em 2001 por QUINN et al. Nesta, ratos imunizados com proteína-M recombinante ou miosina humana desenvolveram grãos variados de inflamação do miocárdio e das válvulas cardíacas. Tendo em vista a disponibilidade de anticorpos monoclonais anti-MBL (JORDAN, MONTALTO e STAHL, 2001), um estudo utilizando este modelo poderia ser realizado com o intuito da observação dos resultados in vivo do bloqueio da MBL na cardiopatia reumática induzida. Dentro deste mesmo cenário, poderia ser traçada uma análise do perfil de citocinas pós-bloqueio da proteína, dada a multiplicidade de efeitos que a MBL pode apresentar dentro de cada situação clínica e experimental, conforme mostrado no QUADRO 2.

Até o momento a cardite reumática não conta com nenhum tratamento que efetivamente altere o curso da doença (CARAPETIS, McDONALD e WILSON, 2005). Pelos resultados obtidos nas análises aqui realizadas, abre-se uma nova perspectiva para futuros estudos, visando melhores alternativas terapêuticas para os portadores dessa patologia.

7. CONCLUSÕES

- Os genótipos *YA/YA* e *YA/XA*, que aumentam a taxa de transcrição do gene *MBL2*, estão associados a um aumento superior a duas vezes ($OR > 2$, tabelas 7, 8 e 10) no risco para o desenvolvimento de cardiopatia reumática aguda e crônica na população estudada.
- Concentrações de MBL acima de 2800 ng/ml estão associadas a um aumento de cerca de 3 vezes no risco para o desenvolvimento de CRC.
- O aumento da frequência dos alelos mutantes (*O*) nos controles quando comparada aos pacientes com história de cardite reumática como um todo ($OR: 0,63$, tabela 7) e do alelo mutante *B* quando comparados aos pacientes com história de cardite reumática aguda ($OR 0.36$, tabela 10), sugere um papel protetor das mutações do éxon 1, especialmente do alelo *B*, contra o desenvolvimento de cardite reumática.
- A associação de artrite com genótipos relacionados à baixa concentração de MBL ($OR 0.22$, tabela 13), pode estar relacionada em parte com a diminuição na remoção de imunocomplexos articulares mediada por MBL neste grupo de pacientes.
- O polimorfismo D120G do gene *MASP2* não se mostrou associado à febre reumática na população estudada (tabela 15).
- Finalmente, o gene *MBL2* parece desempenhar um papel imunogenético e inflamatório na FR, o que coloca a terapia anti-MBL como opção para estudos experimentais futuros nesta patologia.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., Lichtman, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em : 20 de maio de 2007.

ADDERSON E., SHIKHMAN A. R. WARD K. E., CUNNINGHAM M. W. Molecular Analysis of Polyreactive Monoclonal Antibodies from Rheumatic Carditis: Human Anti-N-Acetylglucosamine/Anti-Myosin Antibody V Region Genes. **J Immunol**, v. 161, p. 2020-31, 1998.

AITTONIEMI J., RINTALA E., MIETTINEN A., SOPPI E. Serum mannan-binding (MBL) in patients with infection: clinical and laboratory correlates. **APMIS**, v. 105, n. 8, p. 617-22, 1997.

ALVES MEIRA, Z. M., DE CASTILHO, S. R., LINS BAROS, M. V., MARIA VITARELLI, A., DINIZ CAPANEMA, F., MOREIRA, N. S. et al.. Prevalence or rheumatic fever in children from a public high school in Belo Horizonte. **Arq Bras Cardiol**, v. 65, n. 4, p. 331-4, 1995.

APPLIED BIOSYSTEMS. Real time PCR vs Traditional PCR. Disponível em: <www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtqpcr_vs_tradqpcr.pdf> Acesso em 29 de setembro de 2007.

ARAI T., TABONA P., SUMMERFIELD J. A. Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. **QJM**, v. 86, 575-82, 1993.

ARMSTRONG A. J., BISCHOFF J. Heart Valve Development. Endotelial Cell Signaling and Differentiation. **Circul Res**, v. 95, 459-70, 2004.

BAIRD R. BRONZE M. S., KRAUS W., HILL H. R., VEASEY L. G. DALE J. B. Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and synovium. **J Immunol**, v. 146, p. 3132-3137, 1991.

BERDELI A., CELIK H. A., OZYUREK R., AYDIN H. H. Involvement of immunoglobulin FcγRIIA and FcγRIIIB gene polymorphism in susceptibility to rheumatic fever. **Clin Biochem**, v. 37, p. 925-9, 2004.

BERDELI A., CELIK H. A. K., OZYUREK R., DOGRUSOZ B., AYDIN H. H. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. **J Mol Med**, v. 83, p. 535-541, 2005.

BERNIG T., BREUNIS W., BROUWER N., HUTCHINSON A., WELCH R., ROOS, D. et al. An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3' haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. **Hum Gen**, v. 118, p. 404-15, 2005.

BERTOLETTI, J. C. Profilaxia da febre reumática: quando e como fazer. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 1, p. 1-2, 2004.

BLAND E. F., JONES T. D. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: a twenty-year report on 1000 patients followed since childhood. **Circulation**, v. 4, p. 836-843, 1951

BOLDT, A. B., CULPI, L., TSUNETO, L. T., SOUZA, I. R., KUN, J. F., PETZLER-ERLER. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. **Hum Immunol**, v. 67, p. 722-34, 2006

BOUWMAN L. H., ROEP B. O., ROOS A. Mannose Binding Letin: clinical Implications for infection, transplantation and autoimmunity. **Hum Immunol**, v. 67, 247-56, 2006.

BRAUNWALD, E. Valvular Heart Disease. In: BRAUNWALD, E. **Heart Disease: a Textbook of Medicine**. Saunders WB, 1997. p. 1007-18.

CARAPETIS R., CURRIE B. J., GOOD, M. F. Towards Understanding the Pathogenesis of Rheumatic Fever. **Scand J Rheumatol**, v. 25, p. 127-31, 1996

CARAPETIS J. R., McDONALD M., WILSON N. J. Acute Rheumatic Fever. **Lancet**, v. 366, 155-68, 2005.

CEDZYNSKI, M., SZEMRAJ, J., SWIERZKO, A. S., BAK-ROMANISZYN, L., BANASIK, M., ZEMAN, K. et al. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. **Clin Exp Immunol.**, v. 136, p. 304-11, 2004.

CHEN, C. B., WALLIS, R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. **J Biol Chem**, v. 276, p. 26058-65, 2004.

CHEONG J. Y., CHO S. W., LIM S. K., SHIN D. H., YOON S. K. LEE J. E. et al. Lack of association between hepatitis B virus infection and polymorphism of mannose-binding lectin gene in Korean population. **J Kor Med Sci**, v. 20, p. 65-9. 2005.

CHIU Y. Y., HAYASHI M., SCHAFRANSKI M., MESSIAS-REASON I. J. T. Further evidence of inflammation in chronic rheumatic valve disease (CRVD): high levels of advanced oxidation protein products (AOPP) and high sensitive C-reactive protein (hs-CRP). **Int J Cardiol**, v. 109, p. 275-6, 2006.

CHOPRA P., NARULA J., KUMAR A. S., SACHDEVA S., BATHIA M. L. et al. Immunohistochemical characterisation os Aschoff nodules and endomyocardial inflammatory infiltrates in left atrial appendages from patients with chronic rheumatic heart disease. **Int J Cardiol**, v. 20, p. 99-105, 1988.

CHOU H. T., TSAI C. H., TSAI F. J. Association between angiotensin I-converting enzyme and risk of rheumatic heart disease. **Jpn Heart J**, v. 45, p. 949-57, 2004.

CLEMENZA, L., ISENMAN, DE. Structure-guided identification of C3d residues essential for its binding to complement receptor 2 (CD21). **J Immunol**, v. 165, n. 7, p. 3839-46, 2000.

COLLARD C., VAKEVA A., MORRISSEY M. A., AGAH A., ROLLINS S. A., REENSTRA W. R. et al. Complement activation after oxidative stress. Role of the lectin complement pathway. **Am J Pathol**, v. 156 (5), p. 1549-56, 2000.

COLMAN, G., TANNA, A., EFSTATIOU, A., GAWORZEWSKA E. T. The serotypes of *Streptococcus pyogenes* present in Britain during 1980-1990 and their association with disease. **J Med Microbiol**, v. 39, n.165, p. 165-78, 1993.

CROMARTIE W. J., CRADDOCK J. G., SCHWAB J. H., ANDERLE S. K., YANG C. H. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cells walls. **J Exp Med**, v. 146, p. 1585-1602, 1977.

DAHL M.R., THIEL S., MATSUSHITA M., FUJITA T., WILLIS A. C., CRISTENSEN T. et al. MASP-3 and Its Association with Distinct Complexes of the Mannan-Binding Lectin Complement Activation Pathway. **Immunity**, v. 15, p. 127-35, 2001.

DAHL M., TBJAERG-HANSEN A., SCHNAHR P., NORDESTGAARD B. G. A Population-based Study of Morbidity and Mortality in Mannose-binding Lectin Deficiency. **J Exp Med**, v. 199, n. 10, p. 1391-9, 2004.

DAJANI, A. Rheumatic Fever. In: BRAUNWALD, E. Heart Disease: a Textbook of Medicine. Saunders WB, 1997. p. 1769-1775.

DATASUS. Disponível em: <<http://www.tabnet.datasus.gov.br>> Acesso em 20 de maio de 2007.

DAVIES, E. J., TICKLI M. WOODSWORTH B. P. OLLIER W. E. et al. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 110-14, 1995.

DOMMETT R. M., KLEIN N., TURNER W. M. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigen**, v. 68, n. 3, p. 193-209, 2006.

DORNELLES L. N. , PEREIRA-FERRARI L. , MESSIAS REASON I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the

lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 3, p. 463-8, 2007.

DOS REIS, G. A.; BARCINSKI, M. A. Role of macrophage-dependent determinant selection in induction phase of streptococcal carditis. **Lancet**, v. 2, p. 777-9, 1980.

DUZGUN N., DUMAN T., HAYDARDEDEOGLU F. E., TUTKAK H. The lack of genetic association of the Toll-like receptor 2 (TLR2) Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms with rheumatic heart disease. **Clin Rheumatol**, v. 26, n. 6, p. 915-9, 2007.

EL-DEMELLAWY M, EL-RIDI R., GUIRQUIS N. I., ABEL-ALIM M., KOTBY A., KOTB M. Preferential Recognition of Human Myocardial Antigens by T-Lymphocytes from Rheumatic Heart Disease Patients. **Infect Immun**, v. 65, n. 6, p. 2197-2205, 1997.

ENDO M., OHI H., OHSAWA I., FUJITA T., MATSUSHITA M., FUJITA T. et al. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13 (8), p. 1984-90, 1998.

ENDO M., OHI H., OHSAWA I., FUJITA T., MATSUSHITA M. et al. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schönlein purpura nephritis. **Am J Kidney Dis**, v. 35(3), p. 401-719, 2000.

EZEKOWITZ R. A., DAY L. E., HERMAN G. A. A Human-binding Protein is an Acute Phase Reactant That Shares Sequence Homology With Other Vertebrate Lectins. **J Exp Med**, v. 167, p. 1034-46, 1988.

FLEMING, S. D., TSOKOS, G. C. Complement, natural, antibodies, antibodies and tissue injury. **Autoimmun Rev**, v. 5, p. 89-92, 2006.

FIJEN, C. A. P., KUIJPER, E. J., DANKERT, J., DAHA M. R., CAUGANT, D. A. Characterization of *Neisseria meningitidis* Strains Causing Disease in Complement-Deficient and Complement-Sufficient Patients. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 8, p. 2342-5, 1998.

FISCHETTI, V. A. Model of Streptococcal M Protein, 1991. Disponível em: <http://www.rockefeller.edu/vaf/m.htm>> Acesso em 28 setembro 2004.

FONT J., RAMOS-CASALS, M., BRITO-ZERÓN P., NARDI N., IBÁÑEZ^a, SUAREZ B. et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lúpus erythematosus. **Rheumatology**, v. 46, p. 76-80, 2007.

FRANCIS, K., VAN BEEK, J., CANOVA, C., NEAL, J. W., GASQUE, P. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement, **Exp Rev Mol Med**, v. 5 (15), p. 1-19, 2003.

FRASER, W. J., HAFJEJEE Z., JANKELOW D., WADEE A., COOPER K. Rheumatic Aschoff nodules revisited. II. Cytokine expression corroborates recently proposed sequential stages. **Histopathology**, v. 31, p. 460-4, 1997.

FRASER D. A., BOHLSON S. S., JASINKIENE N., RAWAL N., PALMARINI G., RUIZ S. C1q and MBL, components of the innate immune system influence monocyte cytokine expression. **J Leukoc Biol**, v. 80, p. 107-116, 2006.

FROUDE J., GIBOFSKI A., BURSKIRK D. R., KHANNA A., ZABRISKIE J. B. Cross-reactivity between streptococcal and human tissue: a model of molecular mimicry and autoimmunity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 145, p. 5-26, 1989.
GABAY C., KUSHNER I. Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **NEJM**, v. 340, n. 6, 448-54, 1999.

FUJITA, T. Evolution of the Lectin/Complement Pathway and its Role in Innate Immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 2, p. 346-52, 2002

GARRED P., HARBOE M., OETTINGER C., KOCH C., SVEJGAARD A. Dual Role of Mannan-binding Protein in Infections: Another Case of Heterosis? **Eur J Immunogen**, v. 21, p. 125-31, 1993.

GARRED P., MADSEN H. O., BALSLEV U., HOFFMANN B., PEDERSEN C., GERSTOFT J. et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, v. 349, n. 9047, p. 236-40, 1997.

GARRED, P., MADSEN H. O., HALBERG P., PETERSEN J., KRONBORG G., SVEJGAARD A. et al. Mannose-binding lectin polymorphism and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 2145-52, 1999a

GARRED, P., PRESSLER, T., MADSEN H. O., FREDERIKSEN, B., SVEJGAARD, A., HOIBY, N. et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. **J Clin Invest**, v. 104, p. 431-7, 1999.

GARRED P., MADSEN H. O., MARQUART H., HANSEN T. M., SORENSEN S. F., PETERSEN J. et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **J Rheumatol**, v. 27, n. 1, p. 26-34, 2000.

GARRED P., LARSEN F., MADSEN H. O., KOCH C. Mannose-binding lectin revisited. **Mol Immunol**, v. 40, n. 2-4, p. 73-84, 2003.

GENATLAS: GENE DATABASE. Disponível em: <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=MBL2> > Acesso em 28 setembro 2004.

GENERAL PATHOLOGY IMAGES FOR INFLAMMATION AND REPAIR. Rheumatic Carditis. Disponível em: <http://erl.pathology.iupui.edu/C603/GENE428.HTM> > Acesso em 28 setembro 2004.

GHEZZI M. C., RAPONI G., ANGELETTI T. MANCINI C. Serum-mediated enhancement of TNF-alpha release by human monocytes stimulated with the yeast form of *Candida albicans*. **J infect Dis**, v. 178, n. 6, p. 1743-9, 1998.

GHIRAN I., BARBASHOV S. F., KLICKSTEIN L. B., TAS S. W., JENSENIUS J. C., NICHOLSON-WELLER A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **J Exp Med**, v. 192, n. 12, p. 1797-808, 2000.

GIBOFSKY, A. et al. Rheumatic Fever-Associated B cell Alloantigens as identified by Monoclonal Antibodies. **Arthritis Rheum**, v. 28 (9), p. 1047-51, 1985

GIBOFSKY, A., KERWAR, A., ZABRISKIE, J. Rheumatic Fever: The Relationship Between Host, Microbe and Genetics. **Rheum Dis Clin N Am**, v. 24, p. 237-59, 1998.

GIBOFSKY, A; ZABRISKIE, Z. Rheumatic Fever: etiology, diagnosis and treatment. In: KOOPMAN, J. Arthritis and allied conditions. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 1761-1773.

GOLBASI Z., UÇAR O., KELES T., SAHIN A., ÇAGLI K., ÇAMSARI A. Increased levels of high sensitive C-reactive protein in patients with chronic rheumatic valve disease: evidence of ongoing inflammation. **Eur J Heart Fail**, v. 4., n 5, p. 593-5, 2002.

GORDIS, L. The virtual disappearance of rheumatic fever in the United States: lessons in the rise and fall of disease. **Circulation**, v. 72, p. 1155-1162, 1985.

GRAUDAL, N. A., MADSEN H. O. TARP U., SVEJGAARD A., JURIK G., GRAUDAL H. K. et al. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43: p. 515-21, 2000.

GRIFFITHS S., WELTON M., GERSONY M. D. Acute rheumatic fever in New York City (1969-1988): A comparative study of two decades. **J Pediatr**, v. 116, p. 882-887, 1990.

GUILHERME L. WEIDEBACH W., KISS M. H., SNITKOWSKI R., KALIL J.. Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. **Circulation**, v. 83, p. 1995-98, 1991.

GUILHERME L., OSHIRO S. E., FAE K. C., CUNHA-NETO E., RENESTO G., GOLDBERG A. C. et al. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5345-51, 2001.

GUILHERME L., CUNHA-NETO E., COELHO V., SNITKOWSKI R., POMERANTZEFF P. M., ASSIS R. V. et al.. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. **Circulation**, v. 92, n. 3, p. 415-20, 1995.

GUILHERME L., CURY P., DEMARCHI L. M., COELHO V., ABEL L., LOPPEZ A. P. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. **Am J Pathol**, v. 165, n. 5, p. 1583-91, 2004.

GUILHERME L., FAE K., OSHIRO S. E., KALIL J. Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 7, n. 28, p. 1-15, 2005.

HANSEN T. K., THIEL S., KNUDSEN S. T., GRAVHOLT T. H., CHRISTIANSEN J. S., MORGENSEN C. E. et al. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88(10), p. 4857-61, 2003.

HEGGELUND L., MOLLNES T. E., ESPEVIK T., MULLER F., KRISTIANSEN K. I., AUKRUST P. et al. Modulatory effect of mannose-binding lectin on cytokine responses: possible roles in HIV infection. **Eur J Clin Invest**, v. 35, n. 12, p. 765-70, 2005.

HEID C. A., STEVENS J., LIVAK K. J., WILLIAMS P. M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10., 986-94, 1996

HOAL-VAN-HELDEN E. G., EPSTEIN J., VICTOR T. C., HON D., LEWIS L. A., BEYERS N. et al. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. **Pediatr Res**, v. 45, n. 4, p. 459-64, 1999.

HOEYVELD E. V., HOUTMEYERS F., MASSONET C., MOENS L., VAN RANST M., BLANCKAERT N. et al. Detection of single nucleotide polymorphisms in the mannose-binding gene using minor groove binder-DNA probes. **J Immunol Methods**, v. 287, p. 227-230, 2004.

HOVIND P., HANSEN T. K., TARNOW L., THIEL S., STEFFENSEN S., FLYVBJERG A. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes: an inception cohort study. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1223-7, 2005.

IKEDA, K., SANNOH, T., KAWASAKI, T., YAMASHINA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J Biol Chem**, v. 176, p. 7451-4, 1987.

INANC N., MUMCU G., BIRTAS E., ELBIR Y., YAVUZ S., ERGUN T. et al. Serum mannose-binding lectin levels are decreased in behcet's disease and associated with disease severity. **J Rheumatol**, v. 32. n. 2, p. 287-91, 2005.

IP, W. K., LAU Y. L., CHAN S. Y., MOK C. C., CHAN D., TONG K. K. et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern chinese. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 8, p. 1679-87, 2000.

JACK D. L., READ, R. C., TENNER A. J., FROSCHE M., TURNER M. W., KLEIN N. J. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J Infect Dis**, v. 184, n. 9, p. 1152-62, 2002.

JIN Z., JI Z., HU J. Mannose-binding lectin gene site mutations and the susceptibility of rheumatic heart disease. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 81, n. 21, p. 1248-6, 2001. Resumo.

Jones Criteria 1992 Update. Guidelines for diagnosis of rheumatic fever. **JAMA**, v. 269, p. 2069-70, 1992

JORDAN J. E., MONTALTO M. C., STAHL G. L. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. **Circulation**, v. 104: p. 1413-18, 2003.

KAPLAN M. H., DALENBACH F. D. Immunologic studies of heart tissue. III. Occurrence of bound gamma-globulina in auricular appendages from rheumatic hearts. Relationship to certain histopathologic features of rheumatic heart disease. **J Exp Med**, v. 113, p. 1-16, 1961.

KHANNA, A. K. et al. Presence of a non-HLA B cell antigen in rheumatic fever patients and their families as defined by a monoclonal antibody. **J Clin Invest**, v. 83, p. 1710-16, 1989.

KILPATRICK, DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim et Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p.401-13, 2002.

KIRSCHFINK, M., MOLLNES T. Modern Complement Analysis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 6, P. 982-9, 2003.

KOCH A., MELBYE M., SORENSEN P. HOMOE P., MADSEN H. O. MOLBAK K. et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **JAMA**, v. 285 n. 10, p. 1348-9, 2001.

KOTB M., COURTNEY H. S., DALE J. B., BEACHEY E. H. Cellular and biochemical responses of human T-lymphocytes stimulated with streptococcal M proteins. **J Immunol**, v. 142, p. 966-70, 1989.

KUMAR V., GANGULY N. K., ANAND I. S., WAHI, P. L. NADPH oxidase activity in the monocytes and neutrophils of patients with rheumatic fever. **Cardioscience**, v. 2 , n. 2, p. 93-7, 1991.

KUTUKCLER, N.; NARIN, N. Plasma interleukin-7 (IL-7) and IL-8 concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. **Scand J Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 383-5, 1995.

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

LEDDY, J. P., GRIGGS, R. C., KLEMPERER, M. R., FRANK, M. M. Hereditary complement (C2) deficiency with dermatomyositis. **Am J Med**, v. 58, n. 1, p. 83-91, 1975.

LEE Y. H., WITTE T., MOMOT T., SCHMIDT R. E., KAUFMAM K. M., HARLEY J. N. et al. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 12, p. 3966-74, 2005.

LEHNER P. J., DAVIES K. A., WALPORT M. J., COPE A. P., WURZNER R., ORREN A. Meningococcal septicaemia in a C6-deficient patient and effects of plasma transfusion on lipopolysaccharide release. **Lancet**, v. 340, n. 8832, p. 1379-81, 1992.

LESZCZYNSKI P., STRABURZYNSKA-MIGAJ E., KORCZOWSKA I., LACKI J., MACKIEWICZ S. Cardiac valvular disease in patients with systemic lupus erythematosus. Relationship with anticardiolipin antibodies. **Clin Rheumatol**, v. 22, p. 405-8, 2003.

LHOTTA, K.; WURZNER, R.; KONIG, P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transpl**, v. 87, n. 4, p. 374-5, 1999.

LIPSCOMBE, R., J., SUMIYA, M., HILL, A. V., LAU, Y. L., LEVINSKY, R. J., SUMMERFIELD, J. A. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 709-15, 1992.

LOZANO, F, SÚAREZ, B., MUÑOZ, A., JENSENIUS, J. C., MENSA, J., VIVES, J. et al. Novel MASP-2 variants detected among North Africans and Sub-Saharan Individuals. **Tissue Antigens**, v. 66, n. 2, p. 131-5, 2005.

MADSEN H. O., GARRED. P., KURTZHALS, J. O., LAMM, L. U., RYDER, L. P., THIEL, S. et al. A new frequent allele is the missing link in the structural

polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, v. 40, p. 37-44, 1994.

MADSEN H. O., VIDEM V., SVEJGAARD A., SVENNEVIG J. L. GARRED P. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. **Lancet**, v. 352, p. 959-60, 1998.

MADSEN H. O., SATZ M. L., HOGH B., SVEJGAARD A., GARRED P. Different Molecular Events Result in Low Protein Levels of Mannan-Binding Lectin in Populations from South Africa and South America. **J Immunol**, v. 161, p. 3169-75, 1998.

MADSEN H. O., GARRED P., THIEL, S., KURTZHALS J. A. L., LAMN L. U., RYDER L. P. et al. Interplay Between Promoter and Structural Gene Variants Control Basal Serum Levels of Mannan-Binding Protein. **J Immunol**, v. 155, p. 3013-20, 1995.

MARIJON E., OLI E., CELERMAJER D. S., FERREIRA B., MOCUMBI A. O. JANI D. et al. Prevalence of Rheumatic Heart Disease Detected by Echocardiographic Screening. **NEJM**, v. 357, p. 470-6, 2007.

MARTINS T. B., VEASY L. G., HILL H. R. Antibody Responses to Group A Streptococcal Infections in Acute Rheumatic Fever. **Immunology for the Pediatrician**, v. 5, n. 9, p. 832-7, 2006.

MATSUSHITA M., FUJITA T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **J Exp Med**, v. 176, p. 1497, 1992.

MATSUSHITA M., MIYAKAWA H., TANAKA A., HIJIKATA M., KIKUCHI K., KUJIKAWA H. et al. Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis. **J Autoimmun**, v. 17, n. 3, p. 251-7, 2001.

MATSUSHITA M., FUJITA T. The role of ficolins in innate Immunity. **Immunobiology**, v. 205 (4-5), 490-497, 2002.

McBRIDE M. O., FISHER P. B., SUMIYA M., McCLURE M. O., TURNER M. W., SKINNER C. J. et al. Mannose-binding protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. **Int J STD AIDS**, v. 9, n. 11, p. 683-8, 1998.

McLEAN, R. H., WEINSTEIN, A., CHAPITIS, J., LOWENSTEIN, M., ROTHFIELD, N. F. Familial partial deficiency of the third component of complement

(C3) and the hypocomplementemic cutaneous vasculitis syndrome. **Am J Med**, v. 68, n. 4, p. 549-58, 1980.

MEDOF, M. E., NUSSENZWEIG, V. Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor CR1. **J Exp. Med**, v. 159, n. 6, p. 1669-85, 1984.

MESSIAS I. J. T., CAVALCANTI E., RADOMINSKI S. C. Increased frequency of the C4A*6 rare allele in Rheumatic Heart Disease. **Scand J Rheumatol**, v. 4, p. 164-80, 1995.

MESSIAS REASON I.J., SCHAFRANSKI M.D., JENSENIUS J.C., STEFFENSEN R. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. **Hum Immunol**, v. 7, n. 12, p. 991-8, 2006.

MESSIAS REASON, I. J., BOLDT, A. B., MORAES BRAGA, A. C., VON ROSEN SEELING STAHLKE, E., DORNELLES, L., PEREIRA-FERRARI. L. et al. The association between mannan-binding lectin and leprosy: new insight into an old paradigm. **J Infect Dis**, v. 86(11), p. 2322-6, 2007.

MILLER L. C., GRAY E. D. MANSOUR M., ABDIN Z. H., KAMEL R., ZAHER S. et al. et al. Cytokines and Immunoglobulins in Rheumatic Heart Disease: Production by Blood and Tonsillar Mononuclear Cells. **J Rheumatol**, v. 16, p. 1436-42, 1989

MIMORI, M., YAMAUCHI, I., NISHIMURA, Y., TAKADA, K. INAI, S. A case of C5 deficiency with polyarthritis. **Rinsho Byori**. v. 40, n. 6, p. 660-4, 1992. Resumo.

MORGAN, B. P. KEVIN, J., MARCHBANK, M., LONGHI, P., HARRIS, C. L., GALLIMORE, A. M.. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunol Lett**, v. 97, p. 171-9, 2000.

MORRIS K., MOHAN C., WAHI P. L., ANAND I. S., GANGULY N. K. Enhancement of IL-1 and IL-2 production and IL-2 receptor generation in patients with acute rheumatic fever and active rheumatic heart disease; a prospective study. **Clin Exp Immunol**, v. 91, n.3, p. 429-36, 1993.

MORRIS K., MOHAN C., WAHI P. L., ANAND I. S., GANGULY N. K.. Increase in activated T cells and reduction in suppressor/cytotoxic T cells in acute rheumatic fever and active rheumatic heart disease: a longitudinal study. **J Infect Dis**, v. 167 (4), p. 979-83, 1993a.

NADESALINGAM J., DODDS A. W., REID K. B. M., PALANIYAR N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. **J Immunol**, v. 175, n. 3, p. 1785-94, 2005.

NARIN N., KUTUKCULER N., OZYUREK R., BAKILER A. R., PARLAR A., ARCASOY M. Lymphocyte subsets and plasma IL-1 alpha, IL-2 and TNF-alpha concentrations in acut rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 77, n. 2, p. 172-6, 1995.

NAYAR S., NAYAR P.G., CHERIAN K. M. Heart Valve Structure: a Predisposing Factor for Rheumatic Heart Disease. **Heart**, v. 92, p. 1151-2, 2006.

NEPOMUCENO, R. R., TENNER, A. J. C1qRP, the C1q Receptor That Enhances Phagocytosis, Is Detected Specifically in Human Cells of Myeloid Lineage, Endothelial Cells, and Platelets. **J Immunol**, v. 160, p. 1929-35, 1998.

NUSINOW S. R., ZURAW, B. L., CURD, J. G. The hereditary and acquired deficiencies of complement. **Med Clin North Am**, v. 69, n. 3, p. 487-504, 1985.

NYDEGGER U. E., ZUBLER R. H., GABAY R., JOLIAT G., KARAGEVREKIS C. H., LAMBERT P. H., MIESCHER P. A. Circulating complement breakdown products in patients with rheumatoid arthritis. Correlation between plasma C3d, circulating immune complexes, and clinical activity. **J Clin Invest**, v. 59, n. 5, p. 862-8, 1977.

OHLENSCHLAEGER, T., GARRED P., MADSEN H. O., JACOBSEN S. Mannose-Lectin Variant Alleles and the Risk of Arterious Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus, **N Engl J Med**, v. 351, n. 3, 2004.

OGDEN C. A., deCATHELINEAU A., HOFFMANN P. R., BRATTON D., GHEBREHIWET B., FADOK V. A. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **J Exp Med**, v. 194, n. 6, p. 781-95, 2001.

OLESEN, H. V., JENSENIUS, J. C., STEFFENSEN, R., THIEL, S., SCHIOTZ, P. O. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis--disfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. **Clin Immunol**, v. 121., n. 3, p. 324-31, 2006.

PALANIYAR N., NADESALINGAM J., REID K. B. Innate immune collectins bind nucleic acids and enhance DNA clearance in vitro. **Ann N Y Acad Sci**, v, 1010, p. 467-70, 2003.

PATARROYO M. E., WINCHESTER R. J. VEJERANO A., GIBOFSKY A. CHALEM F. ZABRISKIE J. B. et al. Association of a B cell alloantigen with susceptibility to rheumatic fever. **Nature**, v. 278, p. 173-77, 1979.

PEDROSO M. L.. Análise do polimorfismo gênico da lectina ligante de manose em portadores de hepatite C. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Medicina Interna) - Universidade Federal do Paraná (UFPR). Em andamento.

PICKERING, M. C., WALPORT, M. J. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)**, v. 39, n. 2, p. 133-41, 2000.

PREHM S., HERRINGTON C. NICKEL V., VOLKER W., BRIKO N. I., BLINNIKOVA E. I. Antibodies against proteins of streptococcal hyaluronate synthase bind to human fibroblasts and are present in patients with rheumatic fever. **J Anat**, v. 187, p. 271-7, 1995.

QUINN A., KOSANKE S., FISCHETTI V. A., FACTOR S. M., CUNNINGHAM M. W. Induction of Autoimmune Valvular Heart Disease by Recombinant Streptococcal M Protein. **Infect Immun**, v. 69, n. 6, p. 4072-4078, 2001.

RAIZADA V., WILLIAMS R. C. JR, CHOPRA P., GOPINATH N., PRAKASH K., SHARMA K. B. et al.. Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined as monoclonal anti-T-cell antibodies. **Am J Med**, v. 74 (90), p. 225-37, 1983.

RAMMASAWMY R., FAE K. C., SPINA G., VICTORIA G. C., TANAKA A. C., PALACIOS S. A. et al. Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha with clinical outcomes of rheumatic fever. **Mol Immunol**, v. 44(8), p. 1873-8, 2007.

RECTOR A., LEMEY P., LAFFUT W., KEYAERTS E., STRUYF F., WOLLANTS E. et al. Mannan-binding lectin (MBL) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Genes Immun**, v. 2, p. 323-8, 2001.

REDDY K. S., NARULA J. BATHIA S., SCHAIENDRI K., KOICHA M. TANEJA V. et al. Immunologic and immunogenetic studies in rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Indian J Pediatr**, v. 57, n. 5, p. 693-700, 1990.

RUGONFALVI-KISS S., DOSA E., MADSEN H. O., EDRESZ V., PROHASZKA Z. LAKI J. et al. High rate of early restenosis after carotid eversion endarterectomy in homozygous carriers of the normal mannose-binding lectin genotype. **Stroke**, v. 36, n. 5, p. 944-8, 2005.

SAEVARSDOTTIR, S., VIGINGSDDOTTIR T. VIKIGSSON A., MANFREDSDOTTIR V., GEIRSSON A. J., VALDIMARSSON H. Low mannose-binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. **J Rheumatol**, v. 28 (4), p. 728-34, 2001.

SAEVARSDOTTIR, S., STEINSSON, K., LUDVIKSSON, B. R.. Mannan-binding lectin may facilitate the clearance of circulating immune complexes--implications

from a study on C2-deficient individuals. **Clin Exp Immunol**, v. 148(2), 248-53, 2007.

SALLAKCI N., AKCURIN G., KOKSOY S., KARDELEN F., UGUZ A., COSKUN M. et al. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. **J Autoimmun**, v. 25, p. 50-4, 2005.

SAMSONOV M. Y., TILZ G. P., PISKALAKOV V. P., REIBNEGGER G., NASSONOV E. L., NASSONOVA V. A. Serum-soluble receptors for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-2, and neopterin in acute rheumatic fever. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 74, n. 1, p. 31-4, 1995.

SANTOS, I. K., COSTA C. H., KRIEGER H., FEITOSA M. F., ZURAKOWSKI D., FARDIN B. et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 69, n. 8, p. 5212-5, 2001.

SAPRU R. P. , GANGULY N. K. , SHARMA S., CHANDANI R. E.. GUPTA A. K. Cellular reaction to group A bet-haemolytic streptococcal membrane antigen and its relation to complement levels in patient with rheumatic heart disease. **Br Med J**, v. 2, n. 60-84, p. 422-4, 1977.

SASAKI K., TSUTSUMI A., WAKAMUYA N. OTHANI K., SUZUKI Y., WATANABE Y. et al. Mannose-binding lectin polymorphism in patients with hepatitis C virus infection. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, p. 960-5, 2000.

SCHAFRANSKI M. D., STIER A., NISIHARA R., MESSIAS REASON I.J. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clin Exp Immunol**, v. 138, n. 3, p. 521-5, 2004.

SCHLAPBACH, L. J., AEBI, C., OTTH, M., LEIBUNDQUT, K. HIRT, A., AMMANN, R. A. Deficiency of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 associated with increased risk of fever and neutropenia in pediatric cancer patients. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26 (11), p. 989-94, 2007.

SCHLESINGER, L. S., HOROWITZ, M. A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. **J Clin Invest**, v. 85, n. 4, p. 1304-14, 1990.

SCHMIEDT W., KINSCHERF R., DEIGNER H. P. KAMENCIC H., NAUEN O., KILO J. Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, N. 11, p. 1790-5, 1998.

SCHOONBROOD, T. H., HANNEMA, A., FIJEN, C. A., MARKUSSE, H. M., SWAAK, A. J. C5 deficiency in a patient with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, v. 22, n. 7, p. 1389-90, 1995.

SCWAEABLE W., DAHL M. R., THIEL S., STOVER C., JENSENIUS J.C. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology*, v. 205 (4-5), p. 455-466, 2002.

SOOTHILL J. F., HARVEY B. A. Defective opsonisation. A common immunity deficiency. *Arch Dis Child*, v. 51, p. 91-9, 1976.

SORENSEN R., THIEL S., JENSENIUS J. C. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immun*, v. 27, p. 299-319, 2007.

SPETH, C., STOIBER, H., DIERICH, M. P. Complement in Different Stages of HIV Infection and Pathogenesis. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 130, n. 4, p. 247-57, 2003.

SPRONG D., JACK D. L., KLEIN N. J., TURNER M. W., van der LEY P., STEEGHS L. et al. Mannose binding lectin enhances IL-1beta and IL-10 induction by non-lipopolysaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. *Cytokine*, v. 28, n. 2. p. 59-66, 2004.

STEFFENSEN R., THIEL S., VARMINING K., JERSILD C., JENSENIUS J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain with sequence-specific primers. *J Immunol Methods*, v. 241, 33-42, 2000.

STEFFENSEN R., HOFFMANN K., VARMINING K. rapid genotyping gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Immunol Methods*, v. 278 (1-2), p. 191-9, 2003.

STENGAARD-PEDERSEN K., THIEL S., GADJEVA M., MOLLER-KRISTENSEN M., SORENSEN R., JENSEN L. et al. Inherited Deficiency of Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease 2. *N Engl J Med*, v. 349, n. 6: P. 554-60. 2003.

STOLLERMANN G. H. Rheumatogenic group A streptococci and the return of rheumatic fever. *Adv Int Med*, v. 35, n. 1, p. 1-25, 1990.

STOVER C. M., THIEL S., HELEN M., LYNCH N. J., VORUP-JENSEN T., JENSENIUS J. C. et al. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol*, v. 162, n. 6, p. 3481-90, 1999.

STOVER, C., ENDO, Y., TAKAHASHI, M., LYNCH, N. J., CONSTANTINESCU, C., VORUP-JENSEN, T. et al. . The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2–3. **Genes Immun**, v. 2, p. 119-27, 2001.

STOVER C., BARRETT S., LYNCH, N. J., BARKER, J. N. W. N., BURDEN, D. TREMBATH, R. et al. Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 152, p. 1313-5, 2001.

SUMIYA M., SUPER, M., TABONA, P., LEVINSKY, R. J., ARAI, T., TURNER, M. W. et al. Molecular basis of opsonic defect in children. **Lancet**, v. 337, p. 1569-70, 1991.

SUMMERFIELD, J. A., RYDER S., SUMIYA M., THURSZ M., GORCHEIN A., MONTEIL N. A. et al. Mannose-binding protein gene mutations associated with unusual severe infections in adults. **The Lancet**, v. 345, p. 886-9, 1995.

SUMMERFIELD, J. A. et al Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ**, v. 314, N . 7105, p. 1229-31, 1997.

SUPER, M., THIEL, S., LU, J., LEVINSKY, R. J., TURNER, M. W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common effect of opsonisation. **Lancet**, v. 2, p. 1236-9, 1989.

SVARTMAN M., POTTER E. V., POON-KING T., EARLE D. P.. Immunoglobulins and complement components in synovial fluid of patients with acute rheumatic fever. **J Clin Invest**, v. 56, n. 1, p. 111-7, 1975.

TAKAHASHI K., GORDON J., LIU H., SASTRY K. N., EPSTEIN J. E., MOTWANI M. et al. Lack of mannose-binding lectin-A enhances survival in a mouse model of acute septic peritonitis. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 773-84, 2002

TAKAHASHI K., I. P. W. K. E., MICHELOW I. C., EZEKOWITZ, R. A. B. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. **Curr Opin Immunol**, v. 18, 16-23, 2006.

TEILLET F., LACROIX M., THIEL S., WEILGUNY D., AGGER T., ARLAUD A. J. et al. Identification of the Site of Human Mannan-Binding Lectin Involved in the Interaction with Its Partner Serine Proteases: The Essential Role of Lys551. **J Immunol**. v. 178, n. 9, p. 5711-6.

THIEL S., HOLMSKOV U., HVIID L., LAURSEN S. B., JENSENIUS J. C.. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during acute-phase response. **Clin Exp Immunol**, v. 90, p. 31-5, 1992.

THIEL S., VORUP-JENSEN T., STOVER C. M. SCHWAEBLE W., LAURSEN S. B., POULSEN K. et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 506-10, 1997.

THIEL S., FREDERIKSEN P. D., JENSENIUS J. C. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. **Mol Immunol**, v. 43, p. 86-96 2005.

THIEL, S., STEFFENSEN, R., CHRISTENSEN, I. J., IP, W. K., LAU, Y. L., REASON, I. J. et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes Immun**, v. 8, n. 2, p. 154-63, 2007.

THOMAS H. C., FOSTER M., SUMIYA M., McINTOSH D., JACK D. L., TURNER M. W. et al. Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic B hepatitis viral infection. **Lancet**, v. 348, p. 1417-9, 1996.

TORRES, R. S. L. A. Prevalência de estreptococos do grupo A e outros grupos sorológicos em crianças abaixo de sete anos de idade em creches na cidade de Curitiba, Brasil. Londrina, 2000. Monografia (Especialização em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina.

TROELSEN, L. N., GARRED, P., MADSEN, H.O., JACOBSEN, S.. Genetically Determined High serum Levels of Mannose-Binding Lectin and Agalactosyl IgG Are Associated with Ischemic Heart Disease In Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheum**. V. 56, p. 21-29, 2007

TURNER, M. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, V. 17 (11), P. 532-40, 1996.

TURNER, M. The Role Of Mannose-binding Lectin in Health and Disease. **Mol Immun**, v. 40, p. 423-429, 2003.

van de WETERING J. K., van GOLD L. M. G., BATENBURG J. J. Collectins: players of the immune system. **Eur J Biochem**, v. 271, p. 1229-49, 2004

WALLIS, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. **Immunobiol**, v. 212, p. 289-99, 2007.

WALLIS, R., LYNCH, N. J., ROSCHER, S., REID, K. B., SCHWAEBLE, W. J. Decoupling of Carbohydrate Binding and MASP-2 Autoactivation in Variant Mannose-Binding Lectin associated with Immunodeficiency. **J Immunol**, v. 175 (10), p. 6846-51, 2005

WALPORT, M. Complement – First of Two Parts. **N Engl J Med**, v. 344, n. 14, p. 1058-1065, 2001.

WANG Z. Y., MORINOBU S., KANAGAWA S., KUMAGAI S. Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjogren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, v. 60, n. 5, p. 483-6, 2000.

WEILL MEDICAL COLLEGE OF CORNELL UNIVERSITY. Rheumatic Heart: Mitral Stenosis. Disponível em : <http://edcenter.med.cornell.edu/Pathology_mag es/314.gif> Acesso em: 28 setembro 2004.

WEIS W. I., DRICKAMER K., HENDRICKSON W. A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, v. 360, p. 127-34, 1992.

WERTH, V. P., BERLIN J. A., CALLEN J. P., MICK R., SULLIVAN K. E. Mannose binding lectin (MBL) polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. **J Invest Dermatol**, v. 119(6), p. 1394-9, 2002.

WILLIAM, A., ALTO, M. D. Acute Rheumatic Fever: an Update. **Am Fam Phys**, v. 45, p. 613-620, 1992.

WILLIAMS, R. Acute Rheumatic Fever. In: KELLEY, W. Textbook of Rheumatology. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 1529-40.

YEGIN O., COSKUM M., ERTUG H. Cytokines in acute rheumatic fever. **Eur J Pediatr**, v. 156, 25-9, 1997.

YTTING H., CHRISTENSEN I. J., THIEL S., JENSENIUS J. C., NIELSEN H. J. Serum mannan-binding lectin-associated serine protease 2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 4, p. 1441-6, 2005.

YOSHINAGA M., FIGUEROA F., WAHID M. R., MARCUS R. H., SUH E., ZABRISKIE J. B. Antigen Specificity of lymphocytes isolated from valvular specimens of rheumatic fever patients. **J Autoimmun**, v. 8, p. 601-13, 1995.

ZEDAN M. M., el-SHENNAWY F. A. ABOU-BAKR H. M., al-BASOUSY A. M. Interleukin-2 in relation to T cell subpopulations in rheumatic heart disease. **Arch Dis Child**, v. 67, n. 11, p. 1373-5, 1992.

ZEN C. A. 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. Curitiba, 2005. 107 fls. Tese (Mestrado - Medicina Interna), Universidade Federal do Paraná.

ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 11 de outubro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dr. Marcelo Derbli Schafranski
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunico que a **Reaprovação Anual**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA EM PACIENTES PORTADORES DE VALVULOPATIA MITRAL REUMÁTICA", foim analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. O referido documento está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP/HC 491.073/2002-06

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR

ANEXO 2 - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E EXCLARECIDO

3.5. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você é portador de Febre Reumática e está sendo convidado a participar de um estudo intitulado: “Avaliação da Atividade Inflamatória em pacientes portadores de Cardiopatia Reumática Crônica”, e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa é estudar a resposta inflamatória em pacientes portadores de febre reumática.

c) Caso você participe da pesquisa, será necessário responder questionários sobre a sua doença e doar uma amostra de 20 ml de sangue, para estudo.

d) Você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionados com a coleta de sangue

e) O médico, Dr. Marcelo Derbli Schafranski, celular: 42 9982 1841, que poderá ser contatado de manhã e de tarde, de segunda à sexta, é o responsável pelo estudo e fará o acompanhamento através de visitas ambulatoriais, conforme consta no padrão Ético e Vigente no Brasil.

f) 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.

g) 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.

h) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos, etc...) não são da responsabilidade do paciente.

i) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio H.C.

j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

k) Durante o estudo, não há restrição quanto ao uso de medicamentos.

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 e os tratamentos alternativos. 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 o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data: ____/____/____.

Investigador: _____.

Assinatura: _____.

Assinatura do Responsável (se necessário): _____.

ANEXO 3 - PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

EXTRAÇÃO DE DNA – PROTOCOLO JOHN/LAHIRI/NURNBERGER

1. Coletar de 5 a 10 ml de sangue com EDTA
2. Centrifugar por 10 minutos
3. Pipetar a camada intermediária (“*buffy-coat*”) e passar para um tubo falcon de 15 ml
4. Completar até 14 ml com TKM1
5. Acrescentar 100 µl de igepal (Nonidet)
6. Agitar no vórtex para misturar bem o detergente
7. Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm
8. Desprezar o sobrenadante, deixando apenas o pellet
9. Completar até 14 ml com TKM1, suspender o pellet e agitar no vórtex
10. Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm
11. Desprezar o sobrenadante, deixando apenas o pellet
12. Completar até 14 ml com TKM1, suspender o pellet e agitar no vórtex
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 *ependorf* de 1.5 ml
17. Adicionar 50 µl de SDS 10% a 55°C e agitar no vórtex
18. Incubar em banho-maria a 55° C por 24 horas (*overnight*)
19. Retirar do banho e adicionar 300µl de NaCl saturado (6M) e agitar no vórtex
20. Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm
21. Transferir o sobrenadante para 2 tubos *ependorf*, 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 minuto e retirar o sobrenadante com transferpet
25. Lavar o DNA com etanol a 70% a 4°C
26. Retirar o etanol a 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

ANEXO 4 - PLANILHA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Pacientes

	Idade	Sexo	Éxon 1	Promotor	YA/YA + YA/XA	YY	AA	AO	OO	AA/AO	YA/YA	Cardite	CRC	Cirurgia	MBL
1	51	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4000
2	61	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	2000
3	58	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1800
4	63	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	3600
5	56	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	8000
6	38	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	9600
7	55	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3900
8	36	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
9	24	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	8000
10	19	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
11	70	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	4500
12	71	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4000
13	51	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	2300
14	60	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1650
15	44	1	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	780
16	44	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	14000
17	39	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1100
18	38	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3700
19	28	1	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1900
20	26	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	3600
21	43	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1200
22	57	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3000
23	39	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	3000
24	33	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1800
25	50	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	3300
26	59	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1100
27	40	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1700
28	50	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1100
29	56	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	8000
30	57	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	400

31	76	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	480
32	56	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	280
33	33	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	450
34	37	1	AO	XY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
35	61	1	AA	YY	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	3100
36	36	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	9600
37	60	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	720
38	53	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
39	39	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	4100
40	36	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4100
41	56	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	4000
42	35	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	4500
43	51	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	8000
44	58	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3000
45	30	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	7800
46	59	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	60
47	37	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	500
48	34	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1580
49	44	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	4500
50	52	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4000
51	56	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
52	46	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	2600
53	35	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1050
54	34	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4200
55	48	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4200
56	51	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	3100
57	41	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	2200
58	39	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	620
59	42	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4500
60	50	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1300
61	66	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4500
62	35	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	3100
63	59	1	OO	YY	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0

64	42	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	2100
65	38	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3200
66	37	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	3200
67	47	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	9600
68	43	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
69	33	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	2000
70	69	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	200
71	42	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	9600
72	57	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	700
73	45	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	14000
74	32	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1800
75	38	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	8000
76	38	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1500
77	46	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	920
78	30	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1200
79	44	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	920
80	57	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	2100
81	47	0	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	200
82	54	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	3600
83	46	0	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	
84	46	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	3000
85	41	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	700
86	45	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	200
87	43	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	350
88	30	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3500
89	58	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	950
90	46	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1200
91	46	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1900
92	54	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	7000
93	40	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3700
94	32	1	OO	YY	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	320
95	38	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
96	51	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1800

97	46	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	810
98	58	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	3500
99	46	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
100	38	1	OO	YY	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
101	63	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
102	25	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	650
103	56	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	5200
104	40	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	2500
105	40	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	5200
106	31	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	5000
107	46	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	101
1	20	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	
2	22	0	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
3	14	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
4	23	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	
5	18	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
6	24	1	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
7	21	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
8	21	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
9	26	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
10	27	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
11	31	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
12	18	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
13	24	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
14	15	0	OO	YY	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
15	26	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
16	19	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
17	23	0	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
18	31	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
19	8	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
20	29	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	
21	26	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
22	15	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	

23	30	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
24	29	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
25	26	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
26	16	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
27	31	1	OO	YY	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
28	27	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	
29	20	0	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
30	31	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
31	27	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
32	23	0	AO	XY	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
33	23	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
34	16	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
35	25	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
36	26	0	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	
37	22	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
38	33	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
39	15	1	OO	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
40	10	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
41	20	1	AO	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
42	17	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	

Controles

	Idade	Sexo	Éxon 1	Promotor	YA/YA + YA/XA	YY	AA	AO	OO	AA/AO	YA/YA	Cardite	CRC	Cirurgia	MBL
1	41	1	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
2	45	1	AC	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
3	33	0	BB	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4	55	1	BC	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	36	1	BD	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	52	1	CC	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7	38	1	AC	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	70
8	26	0	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	250
9	42	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	280

10	75	0	AC	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	350
11	27	1	BC	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	350
12	60	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	370
13	28	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	370
14	51	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	400
15	78	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	400
16	50	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	400
17	56	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	450
18	41	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	450
19	51	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	480
20	19	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	500
21	20	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	550
22	63	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	600
23	38	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	600
24	61	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	640
25	40	1	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	650
26	37	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	780
27	51	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	800
28	50	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	980
29	49	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1100
30	50	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1100
31	31	1	AC	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1200
32	70	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1400
33	39	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1400
34	56	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1500
35	26	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1700
36	64	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1700
37	52	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1800
38	40	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1800
39	59	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1900
40	31	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2000
41	57	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2050
42	48	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2100

43	57	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2100
44	37	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2500
45	68	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2500
46	59	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2500
47	51	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2600
48	49	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2800
49	37	0	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	3100
50	52	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	3200
51	29	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3500
52	25	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3500
53	34	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	3500
54	45	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	3500
55	52	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	3600
56	29	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4000
57	41	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4200
58	41	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4500
59	54	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4500
60	49	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4500
61	30	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
62	38	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
63	36	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
64	25	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
65	43	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
66	46	1	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
67	54	1	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
68	43	1	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
69	41	1	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
70	39	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
71	40	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
72	60	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
73	37	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
74	45	0	AC	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
75	45	1	AC	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	

76	47	1	AC	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
77	32	1	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
78	34	1	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
79	43	1	BB	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
80	60	1	BB	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
81	42	1	BC	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
82	41	1	BD	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
83	57	0	DB	YY	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
84	47	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
85	36	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
86	53	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
87	56	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
88	32	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
89	40	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
90	43	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
91	39	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
92	25	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
93	43	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
94	53	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
95	41	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
96	38	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
97	41	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
98	43	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
99	63	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
100	43	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
101	37	1	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
102	38	1	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
103	52	1	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
104	52	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
105	52	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
1	20	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
2	22	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
3	19	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	

4	22	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
5	22	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
6	21	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
7	20	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
8	23	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
9	26	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
10	26	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
11	29	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
12	27	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
13	24	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
14	19	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
15	25	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
16	19	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
17	22	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
18	29	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
19	22	0	AA	XX	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
20	23	1	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
21	25	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
22	25	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
23	25	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
24	27	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
25	25	1	AB	XY	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
26	36	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
27	27	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
28	22	0	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
29	26	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
30	24	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
31	23	0	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
32	27	0	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
33	27	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
34	32	1	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
35	25	1	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
36	25	1	AA	XY	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	

37	27	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
38	26	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
39	21	0	AB	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
40	22	0	AD	YY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
41	27	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
42	25	0	AA	YY	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	

Pacientes sem CRC

	Idade	Sexo	Etnia	1º surto	Último	Total	Cardite	Artrite	Nódulos	Eritema	Coréia	Profilaxia correta
1	19	2	1	6	6	1	2	1	2	2	2	1
2	21	1	2	6	8	5	2	1	2	2	2	1
3	13	1	2	12	12	1	1	1	2	2	2	1
4	22	2	1	9	10	5	1	1	2	2	2	1
5	17	2	2	8	8	1	1	2	2	2	2	2
6	23	2	1	5	5	1	2	1	2	2	2	1
7	20	1	1	3	3	1	1	1	2	2	2	1
8	20	2	1	8	8	1	1	1	2	2	2	1
9	25	2	2	7	7	1	1	1	2	2	2	1
10	26	1	1	15	15	1	1	2	2	2	2	1
11	30	2	1	3	3	2	1	2	2	2	2	1
12	17	2	2	9	9	1	1	1	2	2	2	1
13	23	1	1	7	11	2	1	2	2	2	2	1
14	14	1	1	5	5	1	1	1	2	2	2	1
15	25	1	2	5	5	1	1	2	2	2	2	1
16	18	1	2	7	7	1	1	1	2	2	2	1
17	22	1	2	6	6	1	1	2	2	2	2	1
18	31	2	1	7	21	10	1	2	2	2	2	1
19	7	1	2	3	3	1	1	2	2	2	2	1
20	28	2	1	7	7	1	1	2	2	2	2	1
21	25	1	2	8	8	1	1	2	2	2	2	1
22	14	2	2	6	6	1	1	2	2	2	2	1

23	29	1	1	16	16	1	1	2	2	2	2	1
24	28	1	1	6	6	1	1	2	2	2	2	1
25	25	2	1	8	8	1	1	2	2	2	2	1
26	15	2	1	8	8	1	1	2	2	2	2	1
27	30	2	1	11	11	1	1	1	2	2	2	1
28	26	1	1	10	10	1	1	1	2	2	2	1
29	19	1	2	8	8	1	1	2	2	2	2	2
30	30	2	1	5	5	1	1	2	2	2	2	1
31	26	2	1	8	8	1	1	1	2	2	1	1
32	22	1	2	9	9	1	1	2	2	2	2	1
33	22	2	1	11	11	1	1	1	2	2	2	1
34	15	2	1	13	13	1	1	2	2	2	2	1
35	24	2	2	11	11	1	1	2	2	1	2	1
36	25	1	1	14	14	1	1	1	2	2	2	1
37	21	2	2	9	9	4	2	2	2	2	1	1
38	32	2	2	15	17	3	1	2	2	2	1	1
39	14	2	1	10	10	1	2	1	1	2	2	1
40	9	1	2	9	9	2	1	1	1	2	2	1
41	19	2	1	14	14	1	2	1	1	2	2	2
42	16	2	1	13	13	1	2	1	1	2	2	1

Sexo: 1 (M), 2 (F)

Origem étnica: 1 (caucasiano), 2 (afro-brasileiro), 3 (negro)

Profilaxia^{correta}: 1 (sim), 2 (não)

Nos demais campos: 1 (presença do item), 0 (ausência)

MASP

Pacientes					Controles				
	Sexo	Idade	Etnia	MASP		Sexo	Idade	Etnia	MASP
1	2	51	1	AA	1	1	50	2	AA
2	2	61	1	AA	2	2	42	1	AA
3	2	58	1	AA	3	2	34	1	AA
4	1	63	1	AA	4	2	19	1	AA
5	2	56	1	AA	5	1	52	2	AG
6	2	38	2	AA	6	1	54	3	AA
7	1	55	1	AA	7	1	75	2	AA
8	2	36	1	AA	8	1	41	2	AA
9	2	24	2	AA	9	2	78	1	AG
10	2	19	2	AA	10	2	25	1	AA
11	1	70	1	AA	11	2	41	1	AA
12	2	71	1	AA	12	2	37	1	AA
13	2	51	1	AA	13	2	49	2	AA
14	2	60	1	AA	14	2	27	2	AA
15	2	44	2	AG	15	2	61	1	AA
16	2	44	2	AA	16	2	41	1	AA
17	2	39	1	AA	17	2	63	1	AA
18	2	38	1	AA	18	2	57	2	AA
19	2	28	1	AA	19	2	45	2	AA
20	1	26	1	AA	20	2	52	2	AA
21	2	43	2	AA	21	2	49	1	AA
22	2	57	1	AA	22	2	50	1	AA
23	2	39	2	AA	23	2	55	1	AA
24	2	33	1	AA	24	2	48	2	AA
25	1	50	1	AA	25	2	50	1	AA
26	2	17	1	AA	26	2	51	1	AA
27	2	40	2	AA	27	2	64	1	AA
28	2	50	1	AA	28	2	68	1	AA
29	2	56	3	AA	29	2	26	1	AA
30	1	57	1	AA	30	2	60	1	AA
31	2	76	1	AA	31	2	56	2	AA
32	2	56	1	AA	32	2	40	1	AA
33	2	33	1	AA	33	2	56	2	AA
34	2	37	2	AA	34	2	39	1	AA
35	2	61	1	AA	35	2	28	1	AA
36	1	36	1	AA	36	2	49	1	AA
37	1	60	1	AA	37	2	40	1	AA
38	2	53	1	AA	38	2	37	1	AA
39	1	39	1	AA	39	2	31	1	AG
40	2	36	1	AA	40	2	52	1	AA
41	2	56	1	AA	41	2	51	1	AA
42	2	35	1	AA	42	2	36	1	AA
43	1	51	1	AA	43	2	41	3	AA
44	2	58	1	AA	44	2	38	3	AA

45	2	30	1	AA	45	2	59	1	AA
46	2	59	2	AA	46	2	52	1	AA
47	2	37	1	AA	47	1	31	2	AG
48	1	34	1	AA	48	1	44	1	AG
49	2	44	1	AA	49	1	28	3	AA
50	2	52	1	AA	50	2	41	1	AA
51	2	56	1	AA	51	2	41	1	AA
52	1	46	1	AA	52	1	43	1	AA
53	2	35	3	AA	53	1	60	1	AA
54	1	34	1	AA	54	2	43	1	AA
55	2	48	1	AA	55	1	26	3	AA
56	2	51	1	AA	56	2	32	1	AA
57	2	41	1	AA	57	1	27	1	AA
58	2	39	2	AA	58	2	43	1	AA
59	2	42	1	AA	59	2	39	1	AA
60	2	50	1	AA	60	1	31	2	AA
61	1	66	1	AA	61	1	33	2	AA
62	1	35	1	AA	62	2	32	1	AA
63	2	59	1	AA	63	2	29	1	AA
64	2	42	1	AA	64	2	30	1	AA
65	2	38	1	AG	65	2	23	1	AA
66	1	37	1	AA	66	1	22	1	AA
67	1	47	2	AA	67	2	36	1	AA
68	2	43	1	AA	68	1	40	1	AA
69	2	33	1	AA	69	1	37	1	AA
70	2	69	1	AA	70	1	35	1	AA
71	2	42	1	AA	71	1	25	1	AA
72	2	57	3	AA	72	2	20	1	AA
73	2	45	1	AA	73	2	21	1	AA
74	2	32	1	AA	74	1	20	1	AA
75	2	38	3	AA	75	2	41	1	AA
76	2	38	1	AA	76	1	42	1	AA
77	2	46	1	AG	77	2	26	1	AA
78	2	30	1	AA	78	1	38	1	AA
79	2	44	1	AA	79	2	52	1	AA
80	1	57	1	AA	80	1	27	1	AA
81	1	47	1	AA	81	1	47	1	AA
82	2	54	1	AA	82	1	38	1	AA
83	1	46	2	AA	83	1	34	2	AA
84	1	46	3	AA	84	1	19	1	AA
85	2	41	1	AA	85	1	30	2	AA
86	2	45	1	AA	86	1	29	2	AA
87	1	43	1	AA	87	1	34	1	AA
88	2	30	2	AA	88	2	36	1	AA
89	2	58	1	AA	89	1	41	1	AA
90	2	46	1	AA	90	1	28	2	AA
91	2	46	1	AA	91	1	28	1	AA

92	1	54	1	AA	92	1	22	1	AA
93	2	40	1	AA	93	1	32	1	AA
94	2	32	1	AA	94	1	19	1	AA
95	2	38	1	AA	95	1	21	1	AA
96	2	51	1	AA	96	2	42	1	AA
97	2	46	1	AA	97	2	38	1	AA
98	2	58	1	AA	98	2	25	1	AA
99	2	46	1	AG	99	2	52	1	AA
100	2	38	1	AA	100	2	34	1	AA
101	2	63	1	AA	101	1	45	3	AA
102	2	25	1	AA	102	1	24	1	AA
103	2	56	1	AA	103	1	38	1	AA
104	1	40	1	AA	104	2	45	1	AA
105	1	40	1	AA	105	1	29	1	AA
106	2	31	1	AA	106	2	37	2	AA
107	2	46	1	AA	107	1	46	1	AA
108	2	20	1	AA	108	1	31	1	AA
109	1	22	2	AA	109	2	27	1	AA
110	1	14	2	AA	110	2	22	1	AA
111	2	23	1	AA	111	2	22	1	AA
112	2	18	2	AA	112	1	37	2	AA
113	2	24	1	AA	113	1	23	2	AA
114	1	21	1	AA	114	1	33	1	AA
115	2	21	1	AA	115	1	27	1	AA
116	2	26	2	AA	116	2	38	1	AA
117	1	27	1	AA	117	1	39	1	AA
118	2	31	1	AA	118	2	47	1	AA
119	2	18	2	AA	119	1	28	2	AA
120	1	24	1	AA	120	2	27	1	AA
121	1	15	1	AA	121	2	43	1	AA
122	1	26	2	AA	122	2	23	1	AA
123	1	19	2	AA	123	1	33	1	AA
124	1	23	2	AA	124	2	29	1	AA
125	2	31	1	AA	125	2	52	1	AA
126	1	8	2	AA	126	1	29	1	AA
127	2	29	1	AA	127	1	30	2	AA
128	1	26	2	AA	128	2	36	1	AA
129	2	15	2	AA	129	1	43	1	AA
130	1	30	1	AA					
131	1	29	1	AA					
132	2	26	1	AA					
133	2	16	1	AA					
134	2	31	1	AA					
135	1	27	1	AA					
136	1	20	2	AA					
137	2	31	1	AA					
138	2	27	1	AA					

139	1	23	2	AA
140	2	23	1	AA
141	2	16	1	AA
142	2	25	2	AA
143	1	26	1	AA
144	2	22	2	AA
145	2	33	2	AA
146	2	15	1	AA
147	1	10	2	AA
148	2	20	1	AA

**ANEXO 5 - MANUSCRITO REFERENTE À TESE PUBLICADO EM
PERIÓDICO INTERNACIONAL**

The Association Between Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism and Rheumatic Heart Disease

Iara Jose Messias Reason, Marcelo Derbi Schafranski, Jens Christian Jensenius, and Rudi Steffensen

ABSTRACT: Mannan-binding lectin (MBL) is an innate pattern recognition molecule known to play a key role in pathogen clearance. As *MBL2* gene polymorphism is associated to an increased susceptibility to infection, we aimed to determine genetic variations in the *MBL2* gene in rheumatic heart disease (RHD). Genetic variations in the promoter and exon 1 region of the *MBL2* gene were analyzed in 107 patients with RHD and 105 controls by real-time polymerase chain reaction. The frequency of *MBL2** A/A genotype was significantly higher in RHD patients (71/107, 66.36% vs 52/105, 49.52%, $p \leq 0.02$, OR = 1.99, 95% CI, 1.15–3.50). A/A genotypes were associated with higher levels of MBL in RHD compared with controls with the same genotype ($p \leq 0.004$). The frequency of *HYPA/HYPA*, *HYPA/LYQA*, and *LYQA/LYQA* haplotypes was also increased in RHD ($p \leq 0.03$,

OR = 1.98, 95% CI, 1.05–3.73). However, the frequency of *MBL2* variant alleles (termed "O") was lower among patients (39/214, 18.2% vs 63/210, 30.0%, $p \leq 0.006$, OR = 0.52, 95% CI, 0.33–0.82), which was also seen for O/O genotypes (3/107, 2.8% vs 10/105, 9.5%, $p \leq 0.05$, OR = 0.27, 95% CI, 0.07–1.03). This data suggests a role for MBL genotypes in the susceptibility to RHD. However, it still remains unclear whether A/A homozygosity is a risk factor for RHD or rheumatic fever itself. *Human Immunology* 67, 991–998 (2006). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: Mannan-binding lectin; MBL; genetic polymorphism; rheumatic heart disease; rheumatic fever

ABBREVIATIONS

GAS group A streptococci
MBL mannan-binding lectin
PCR polymerase chain reaction

RF rheumatic fever
RHD rheumatic heart disease

INTRODUCTION

Rheumatic fever (RF) is a consequence of upper-respiratory tract infections caused by group A streptococci (GAS) that continues to affect between 3% and 5% of children and adolescents in Brazil [1]. Rheumatic heart disease (RHD) represents the most severe manifestation of RF, affecting 30% to 50% of RF patients who

develop chronic and progressive valvular lesions due to immune-mediated damage [2]. The most affected valve is the mitral, followed by the aortic and tricuspid. RHD is the main cause of chronic cardiopathy in young adults, resulting in high levels of morbidity and mortality, and as such, remains a major concern to public health in developing countries [1, 2].

Although there is much evidence for the role of GAS in the etiology of RF, the pathogenesis of RF and RHD remains an enigma. It is now widely accepted that RF and RHD are related to an autoimmune reaction triggered by GAS in a susceptible host [3, 4]. The pathogenic mechanisms include antigenic mimicry between streptococcal antigens and heart constituents that lead to reactive inflammation and to valvular lesions [5, 6]. It is intriguing why only a small proportion of GAS infected individuals actually develops RF and consequently

From the Department of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil and Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany (I.J.M.R., M.D.S.); Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark (J.C.J.); and Regional Center for Blood Transfusion and Clinical Immunology, Aalborg Hospital, Aalborg, Denmark (R.S.).

Address reprint requests to: Dr. Iara de Messias Reason, R. Padre Camargo, 280, 80.069-900 Curitiba, PR, Brazil; Tel: +055-41-262-6815; Fax: +055-41-262-6815; E-mail: iarareason@hc.ufrpr.br

Received May 31, 2006; revised Aug 28, 2006; accepted August 29, 2006.

Human Immunology 67, 991–998 (2006)
© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006
Published by Elsevier Inc.

0198-8859/06/\$—see front matter
doi:10.1016/j.humimm.2006.08.296

RHD. The host response to streptococcal antigens is under genetic influence, and it is therefore pertinent to search for genetic markers that influence the development of RF and RHD [3, 4].

Mannan-binding lectin (MBL) is a plasma protein involved in the primary defense against microorganisms. MBL binds to carbohydrates, exposing terminal mannose, glucose, *N*-acetylmannosamine, *N*-acetylglucosamine, or fucose, presented by a wide range of pathogens, including GAS [7, 8]. Such structures are often referred to as pathogen-associated molecular patterns. MBL binding to pathogen-associated molecular patterns promotes complement activation and direct complement-mediated killing or killing by phagocytosis. MBL therefore constitutes part of the innate immune defenses, conferring host protection before adaptive immune responses have been activated. MBL deficiency, with a frequency of 10% to 20%, is the most common inherited immunodeficiency and is associated with increased susceptibility to infection and some autoimmune diseases [9–12]. The high frequency of MBL deficiency naturally leads to speculations as to situations where this might be beneficial, such as cases associated with undesirable complement activation and tissue injury.

The human *MBL2* gene is located in the chromosome region 10q11.1–q21 and contains four exons. The intact protein is formed by oligomers of subunits each consisting of three identical polypeptide chains of 32 kDa. Three different missense point mutations in exon 1 result in changes of the primary amino acid sequence. Substitutions in codon 52 (CGT to TGT) exchanges arginine with a cysteine (allele D); in codon 54 the changing of GGC to GAC causes the substitution of glycine with aspartic acid (allele B), and in codon 57 the change of GGA to GAA causes the substitution of glycine with glutamic acid (allele C). The level of MBL is also influenced by mutations in the promoter region, most strongly by the X/Y variants resulting from substitution in base pair –221, less so by substitution in bp –550 (H/L), and even less by P/Q at bp +4 located in the 5'-untranslated portion of *MBL2* gene [7, 13, 14]. All together, seven common haplotypes: HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB, LYQC and one rare LYPD are known [13, 15, 16]. Many investigations on associations between MBL and diseases have been made by genotyping for the exon variations only, without taking into account that the LXPA haplotype is the most common cause of MBL deficiency in Europeans. In addition to the decrease in MBL levels, the missense mutant variants also abolish the capacity of MBL to bind the MBL-associated serine proteases, MASPs, eliminating the ability of activating complement [13, 17].

While MBL is supposed to protect against infectious diseases, high MBL levels could have a proinflammatory role in chronic diseases [18–21]. Previously we found

significantly increased MBL levels in patients with RHD, suggesting that MBL deficiency could exert a beneficial role against the development of the disease [18]. Now we wish to extend this finding by searching for possible associations between MBL alleles and chronic RHD in the same patient cohort.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

One-hundred and seven consecutive and unrelated patients with chronic RHD (25 men, 82 women, mean age of 46.08 ± 11.85 years [median 44], range 19–76 years, Table 1), were investigated. All patients were outpatients of the Cardiology Clinic of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná, Curitiba, Southern Brazil, and experienced previous diagnoses of RF. The heart involvement was established based on echocardiographic findings, confirming mitral valve lesion in all subjects. Thirty patients experienced no valve intervention, and 77 were submitted to valve surgery due to rheumatic etiology (27 patients with commissurotomy, 15 patients with balloon valvuloplasty, 26 patients with a prosthetic biologic valve, and nine patients with prosthetic metallic valves).

Patients presenting recent infection, infective endocarditis, active rheumatic fever, Chagas' disease, or other inflammatory disorders were excluded from the study. The patients' ethnic background was 89 (83.2%) were Caucasian, 12 (11.2%) were mixed race (Caucasian and African-American), five (4.7%) were African-American, and one (0.9%) was American Indian. This patient group is the same cohort of patients as previously investigated by Schafranski *et al.* [18].

One hundred five healthy unrelated, symptom-free individuals (78 female, 27 male, mean age 44.6 ± 11.66 , [median 43] range 19–78 years) from the same geographic area and socioeconomic origin were assessed as controls. The control group was matched with the patients according to their ethnical background as follows: 87 (82.9%) were Caucasians, 14 (13.3%) were mixed race, three were African-American (2.9%), and one (0.9%) was American Indian. Both patients and controls provided written informed consent, and the study was approved by the local Scientific Ethics Committee of the Federal University of Paraná.

MBL Measurement

The concentration of MBL in plasma was determined in 103 patients and 60 controls by a sandwich enzyme immunoassay using commercial kits (Antibody Shop, Copenhagen, Denmark) as reported elsewhere [18]. The cutoff for the assay was 50 ng/ml.

TABLE 1 Frequencies of *MBL2* alleles and genotypes in controls and in patients with rheumatic heart disease

MBL2 alleles	Patients		Controls		p Value ^b
	(n = 107)	Frequency	(n = 105)	Frequency	
Structural alleles					
A	175	0.818	147	0.700	0.006 ^b
O	39	0.182	63	0.300	0.006 ^b
B	29	0.136	44	0.209	0.04 ^b
C	5	0.023	12	0.057	NS
D	5	0.023	7	0.033	NS
Structural genotypes					
A/A	71	0.664	52	0.495	0.02 ^b
A/O	33	0.308	43	0.410	NS
O/O	3	0.028	10	0.095	0.03 ^c
Promoter alleles					
H	73	0.341	63	0.30	NS
L	141	0.659	147	0.70	NS
X	42	0.196	31	0.148	NS
Y	172	0.804	179	0.852	NS
P	165	0.771	163	0.776	NS
Q	49	0.229	47	0.224	NS
Promoter genotypes					
X/X	3	0.028	3	0.028	NS ^c
X/Y	36	0.336	26	0.248	NS
Y/Y	68	0.636	76	0.724	NS

Abbreviations: NS = not significant.

^a *p* = chi-square test.

^b Odds ratio and 95% confidence interval for B allele: OR = 0.59, 95% CI, 0.33–0.99; for A allele: OR = 1.92, 95% CI, 1.22–3.03 and for O allele: OR = 0.52, 95% CI, 0.33–0.82; for A/A genotype: OR = 2.01, 95% CI, 1.15–3.50; for O/O genotype: OR = 0.27, 95% CI, 0.07–1.03.

^c *p* = Fisher test.

DNA Samples

Genomic DNA was extracted from 200 μ l of frozen anticoagulated blood from 212 individuals by using the QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

MBL2 Genotyping

A real-time PCR technique was used to genotype the exon 1 of the *MBL2* gene (codons 52, 54, and 57), where only one PCR reaction is sufficient to genotype one individual unambiguously [21].

We developed a new genotyping method based on the 5' nuclease (TaqMan) assay combined with minor groove binder probes for screening the promoter variants –550, –220, and +4. The method has previously been used successfully to discriminate alleles in the structural region of exon 1 of the *MBL2* gene at codon 52 (allele D), 54 (allele B) and 57 (allele C) [22]. The oligonucleotides were labeled with 6-carboxy-fluorescein [21].

The PCR reactions contained 50 ng DNA, 900 nM primers, and 200 nM probes and TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a final volume of 25 μ l and were performed on a real-time PCR instrument (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR profile was 2 minutes

at 50°C, 10 minutes at 95°C, and 40 cycles of 15 seconds at 92°C and 1 minute at an annealing temperature of 60°C. Endpoint reading of the fluorescence generated during PCR amplification was made on the ABI Prism 7000, and genotype assignments were obtained with the Sequence Detection System (SDS) software (Applied Biosystems).

Statistics

Tests of independence between cases and controls were done using the chi-square test with Yates correction and the Fisher test when appropriate, the odds ratio was calculated as well as the 95% confidence limits. Descriptive statistics for plasma MBL levels are presented by the median, quartile, and range. Comparisons of MBL plasma levels were done using the Mann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis, or analysis of variance tests. For multiple comparison of data, Bonferroni's correction was applied. *p* values less than 5% were considered significant.

RESULTS

The *MBL2* allele, genotype, and haplotype frequencies in patients with RHD and healthy controls are summarized

TABLE 2 Frequencies of *MBL2* haplotypes in controls and in patients with rheumatic heart disease^a

<i>MBL2</i> haplotype	Patients (<i>n</i> = 107)	Frequency	Controls (<i>n</i> = 105)	Frequency	<i>p</i> Value
<i>HYP A</i>	68	0.318	56	0.267	NS
<i>LYP A</i>	23	0.107	25	0.119	NS
<i>LYQ A</i>	44	0.206	35	0.167	NS
<i>LXP A</i>	40	0.187	31	0.148	NS
<i>LYP B</i>	29	0.136	44	0.210	0.06 ^a
<i>LYQ C</i>	5	0.023	12	0.057	NS
<i>HYP D</i>	5	0.023	7	0.033	NS

Abbreviations: NS = not significant.

^a Odds ratio and 95% confidence interval for *LYP B* haplotype: OR 0.59, CI, 0.35–0.99.

in Tables 1, 2, and 3. *MBL2* genotype frequencies were in accordance with Hardy-Weinberg expectations for both groups. The frequency of the *A/A* homozygotes was significantly higher in RHD patients than in the controls (Table 1), even excluding *LXP A/LXP A* genotypes (68/104, 65.38%, vs 49/102, 48.4%, $p \leq 0.018$, OR =

TABLE 3 *MBL2* genotypes in controls and in patients with rheumatic heart disease

Structural genotypes	<i>MBL2</i> genotypes	RHD patients (<i>n</i> = 107)	Controls (<i>n</i> = 105)	<i>p</i> Value
<i>A/A</i>	<i>HYP A/HYP A</i>	15	11	NS
	<i>HYP A/LXP A</i>	11	4	0.04 ^a
	<i>HYP A/LYQ A</i>	12	6	NS
	<i>HYP A/LYP A</i>	2	4	NS
	<i>LYP A/LYP A</i>	2	3	NS
	<i>LYP A/LYQ A</i>	4	5	NS
	<i>LYQ A/LYQ A</i>	7	3	NS
	<i>LXP A/LXP A</i>	3	5	NS
	<i>LXP A/LYP A</i>	8	4	NS
	<i>LXP A/LYQ A</i>	7	9	NS
<i>A/O</i>	<i>HYP A/LYP B</i>	11	18	NS
	<i>LYQ A/LYP B</i>	6	6	NS
	<i>LYP A/LYP B</i>	1	2	NS
	<i>LXP A/LYP B</i>	7	6	NS
	<i>LYP A/LYQ C</i>	2	3	NS
	<i>LXP A/LYQ C</i>	2	2	NS
	<i>HYP A/LYQ C</i>	0	1	NS
	<i>LYQ A/LYQ C</i>	0	1	NS
	<i>HYP A/HYP D</i>	2	1	NS
	<i>LYQ A/HYP D</i>	1	2	NS
<i>O/O</i>	<i>LXP A/HYP D</i>	1	1	NS
	<i>LYP B/LYP B</i>	1	3	NS
	<i>LYQ C/LYP B</i>	1	3	NS
	<i>HYP D/LYP B</i>	1	2	NS
	<i>LYQ C/LYQ C</i>	0	1	NS
	<i>HYP D/LYP B</i>	0	1	NS

Abbreviations: RHD = rheumatic heart disease; NS = not significant.

^a Fisher test. Odds ratio and 95% confidence interval for *HYP A/LXP A* genotype: OR = 2.89, CI, 0.89–9.40.

2.04, 95% CI, 1.17–3.58). On the other hand, the frequency of variant alleles D, B, and C (*O*) was significantly decreased in RHD when compared with the controls (39/214, 18.2% vs 63/210, 30.0%, $p \leq 0.006$, OR = 0.52, 95% CI, 0.33–0.82), which was also observed for *O/O* genotype (3/107, 2.8% vs 10/105, 9.5%, $p \leq 0.03$ (Fisher test), OR = 0.27, 95% CI, 0.07–1.03). No significant difference in the frequency of heterozygous *A/O* genotype was observed among patients and controls (33/107, 30.84% vs 43/105, 40.95%, $p = 0.16$). In addition, the frequency of the genotypes *HYP A/HYP A*, *HYP A/LYQ A*, and *LYQ A/LYQ A*, which are associated with high concentrations of MBL in plasma, were significantly increased in RHD (34/107, 31.8%) when compared with controls (20/105, 19.05%, $p \leq 0.03$, OR = 1.98, 95% CI, 1.05–3.73). There was a significant difference in the distribution of MBL concentration among the different genotypes in RHD ($p \leq 0.000005$) and in controls ($p \leq 0.000002$); (analysis of variance, with Bonferroni correction, significant: $p < 0.0003$ and $p < 0.0002$, respectively). The genotype *LXP A/LXP A* was associated with lower values of MBL, whereas *HYP D* had a milder effect on the MBL concentration, (Figure 1).

A/A genotypes were associated with higher levels of circulating MBL in RHD (4.122 ± 354 ng/ml, median 3600 ng/ml) compared with the controls with the same genotype (2.547 ± 220 ng/ml, median 2500 ng/ml, $p \leq 0.004$, Figure 2). Mutant alleles (*O*) had a suppressive effect on MBL serum levels, both in RHD and healthy controls (Figure 1). In heterozygous (*A/O*) individuals, MBL levels were reduced 5.5 times in RHD and 3.7 times in the controls, whereas in *O/O* homozygotes, the circulating protein was undetectable by enzyme-linked immunosorbent assay in *B/B* and *C/C* genotypes and low in *B/C* genotypes (median 106 ng/ml in RHD and 70 ng/ml in controls) for both groups. There was no significant difference in the concentration of circulating MBL levels between RHD patients and controls, both for heterozygous *A/O* (743 ± 137 ng/ml, median 500, range <50–3300 ng/ml vs 696 ± 126 ng/ml, median 550, range <50–3100 ng/ml, $p \leq 0.85$) and homozygous *O/O* genotypes (133 ± 93 ng/ml, median 40 ng/ml vs 102 ± 62 ng/ml, median 40 ng/ml, $p \leq 0.89$), Figure 2. The MBL concentration among *A/A*, *A/O* and *O/O* carriers was significantly different in both RHD and controls ($p \leq 0.00001$ for both groups, significant: $p < 0.017$, Kruskal-Wallis with Bonferroni correction).

DISCUSSION

Epidemiologic as well as immunogenetic evidences suggest that there are people with higher risk of developing RF and RHD [4]. Although there is some evidence of familial predisposition to the development of RF, no

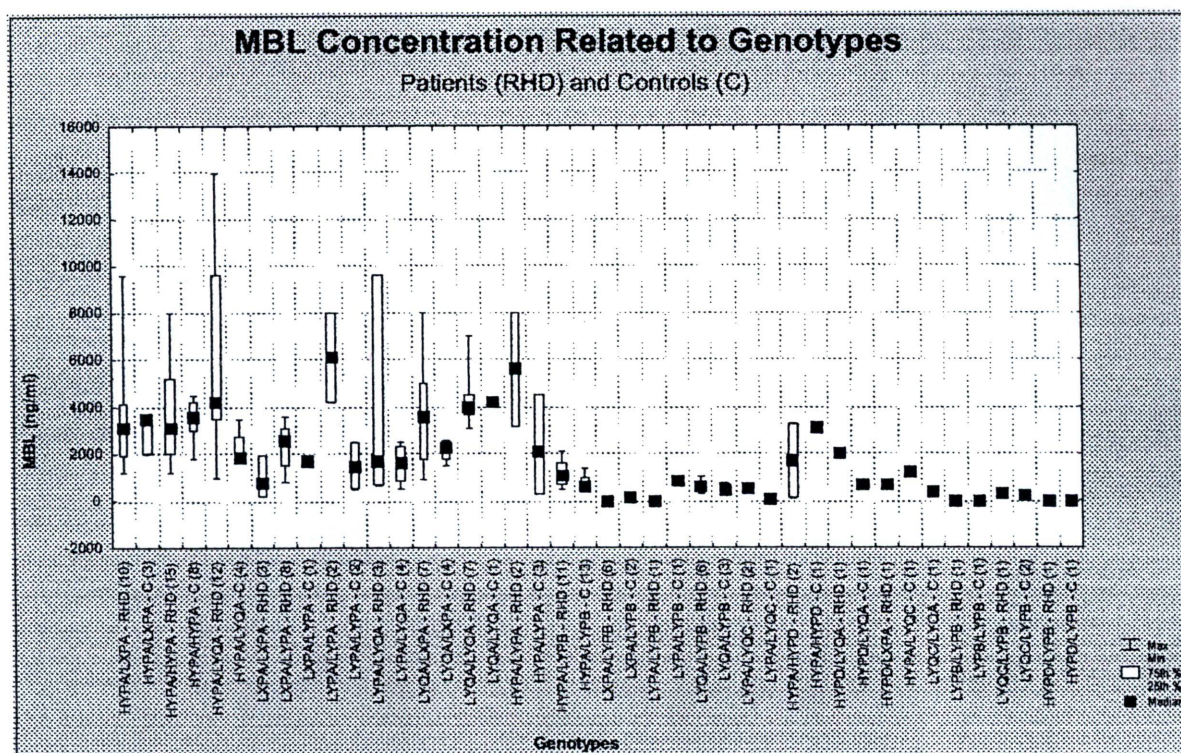


FIGURE 1 Mannan-binding lectin (MBL) levels in plasma related to *MBL2* genotypes in patients with rheumatic heart disease and controls.

well-defined mode of inheritance has been established. It appears that the severity of antecedent throat infections play a major role in the development of RF [4, 23]. The severity of the infection may be related to host defense and genetic factors, besides the GAS virulence.

Involvement of host genetic factors in the susceptibility of RF and RHD has been shown by different authors. Significant associations with different HLA class II antigens were shown in distinct populations. Whereas in North American patients an association with HLA DR4 was present, in Brazilian patients an association with DR7 was reported [24–27]. The significantly higher expression of the B-cell alloantigen D8/17 in RF patients has been recognized across different ethnic and geographic populations [28–30]. Moreover, an immunogenetic role for complement C4 alleles in RHD has been suggested in Brazilian patients [31].

In this study, we have shown that homozygosity for the *MBL2* A wild allele is associated to the risk of RHD, whereas the variant alleles of exon 1 showed a protective effect in the development of the disease. This data suggests a possible role for MBL in the pathogenesis of RHD, which confirms a previous study where MBL

levels were found significantly increased among the same cohort of RHD patients [18].

In general, individuals with homozygosity for *MBL2* variant alleles, which cause abnormal structure of protein and therefore functional MBL deficiency, were shown to have a manifold increased risk for infection and autoimmune diseases [9–12, 32]. In fact, it is well recognized that MBL is a key factor in the initial defense against infection in the nonimmune host, mediating the activation of complement and direct opsonization of several pathogens [33, 34].

MBL having a role in the host defense against GAS and MBL deficiency may be one of the factors related to the susceptibility of acute RF, as also described for other infectious diseases.

GAS is amongst the most common human bacterial pathogens, which presents different evading mechanisms that allow the bacteria to escape from the immune system and cause disease. The major mechanism of host defense against GAS infection is that mediated by phagocytosis and bacterial killing by polymorphonuclear cells and complement-lysis [35]. It has been shown that MBL binds strongly to GAS *in vitro*, promoting complement

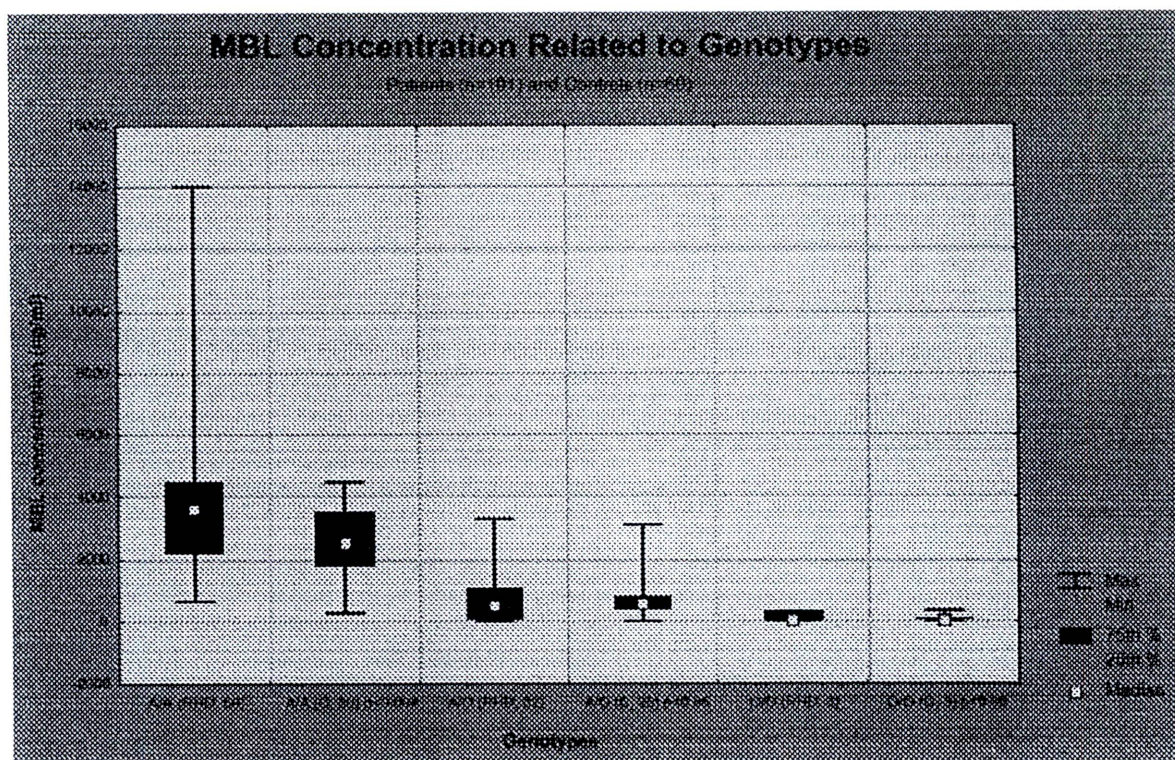


FIGURE 2 Mannan-binding lectin (MBL) levels in plasma related to *MBL2* genotypes in patients with rheumatic heart disease and controls.

deposition [8]. MBL could therefore be involved in the first line of defense against GAS infection, acting as an opsonin, mediating phagocytosis and complement activation. Whether MBL deficiency could account for an increased risk for RF needs further investigation.

Different studies have shown that RHD is an active inflammatory and autoimmune process that culminates in valve injury [36–39]. We show here that patients with homozygosity for the A wild allele presented almost twice the levels of MBL when compared with A/A controls ($p < 0.004$), probably due to the inflammatory response seen in RHD.

This data corroborates the fact that MBL concentration in human plasma may increase by a factor of 1.5–3 in response to cytokines during acute phase response [40]. MBL could exert a modulatory effect on the release of proinflammatory cytokines by macrophages [41], thus MBL may not only be a marker of the inflammatory response due to original underlying reaction, but could also intensify valvular damage due to complement activation.

Our findings indicate that both MBL wild structural alleles and protein levels are associated with the sus-

ceptibility of RHD. There is increasing evidence that MBL is also involved in the modulation of disease severity in both infectious and autoimmune diseases [11, 20, 34]. Indication that homozygosity for MBL wild-type genes is associated with persistent inflammation was shown by Garred *et al.* [20] in rheumatoid patients with late onset disease. Increased levels of plasma MBL have been associated to an increased susceptibility visceral to leishmaniasis [42]. A proinflammatory role of MBL has been shown in an experimental model of ischemic reperfusion injury after myocardial infection, indicating a role for MBL in tissue injury [43]. In addition, MBL deficiency has been shown to ameliorate the severity of chronic inflammatory diseases [44] and to confer protection against severe infection by intracellular pathogens [45].

MBL may be considered a modifying molecule in the physiopathology of RF and RHD, presenting a dual role, on one side conferring protection against initial infection by GAS and on the other side provoking inflammatory response in the chronic stage of the disease. Many factors are certainly involved in the course of RF/RHD, where MBL genotypes as well as MBL protein levels may also

play a role. However, it still remains unclear whether A/A homozygosity is a risk factor for RHD or RF itself.

Further studies including patients with acute RF and with other clinical manifestations are needed to evaluate if A/A genotypes could be considered risk markers for the development of chronic heart disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Angelica Boldt for helpful comments and critical reading of the manuscript. This work was supported by the Brazilian Research Council Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, grant 200936/2004-2 to I.J.M.R.

REFERENCES

- Coordenação de Doenças Crônicas-Degenerativas. Incidência da febre reumática no Brasil. Brasília, Ministério da Saúde, 2003.
- Tanaka AC: Febre Reumática: Critérios Diagnósticos e Tratamento. In Timmerman A, César LAM, Ferreira JEM, Bertolami MC, (eds): Manual de Cardiologia. São Paulo, Atheneu, 2000.
- Guilherme L, Fae K, Oshiro SE, Kalil J: Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Expert Rev Mol Med* 7:1, 2005.
- Gibofsky A, Kerwar S, Zabriskie JB: Rheumatic fever. The relationships between host, microbe, and genetics. *Rheum Dis Clin North Am* 24:237, 1998.
- Cunningham MW: Autoimmunity and molecular mimicry in the pathogenesis of post-streptococcal heart disease. *Front Biosci* 8:533, 2003.
- Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, Pedra F, Neumann J, Goldberg A, Patarroyo ME, Pileggi F, Kalil J: Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* 92:415, 1995.
- Turner MW: The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 40:423, 2003.
- Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW: Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 68:688, 2000.
- Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S: Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 351:260, 2000.
- Graudal NA, Madsen HO, Tarp U, Svejgaard A, Jurik G, Graudal HK, Garred P: The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:515, 2000.
- Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A: Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 349:236, 1997.
- Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW: Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 345:886, 1995.
- Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard A, Garred P: Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol* 161:3169, 1998.
- Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A: Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 155:3013, 1995.
- Boldt AB, Petzl-Erler ML: A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. *Hum Mutat* 19:296, 2002.
- Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC: 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* 241:33, 2000.
- Lipscombe RJ, Lau YL, Levinsky RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW: Identical point mutation leading to low levels of mannose binding protein and poor C3b mediated opsonisation in Chinese and Caucasian populations. *Immunol Lett* 32:253, 1992.
- Schafrański MD, Stier A, Nisihara R, Messias-Reason IJ: Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol* 138:521, 2004.
- Hansen TK, Thiel S, Knudsen ST, Gravholt CH, Christiansen JS, Mogensen CE, Poulsen PL: Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4857, 2003.
- Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sørensen SF, Petersen J, Volck B, Svejgaard A, Graudal NA, Rudd PM, Dwek RA, Sim RB, Andersen V: Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J Rheumatol* 27:26, 2000.
- Mølle L, Steffensen R, Thiel S, Peterslund NA: Chemotherapy-related infections in patients with multiple myeloma: associations with mannan-binding lectin genotypes. *Eur J Haematol* 77:19, 2006.
- Van Hoeyveld E, Houtmeyers F, Massonet C, Moens L, Van Ranst M, Blanckaert N, Bossuyt X: Detection of single nucleotide polymorphisms in the mannose-binding lectin gene using minor groove binder-DNA probes. *J Immunol Methods* 287:227, 2004.
- Senitzer D, Freimer EH: Autoimmune mechanisms in the pathogenesis of rheumatic fever. *Rev Infect Dis* 6:832, 1984.
- Visentainer JE, Pereira FC, Dalalio MM, Tsuneto LT, Donadio PR, Moliterno RA: Association of HLA-DR7

- with rheumatic fever in the Brazilian population. *J Rheumatol* 27:1518, 2000.
25. Guilherme L, Weidebach W, Kiss MH, Snitcowsky R, Kalil J: Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation* 83:1995, 1991.
 26. Anastasiou-Nana MI, Anderson JL, Carlquist JF, Nanus JN: HLA-DR typing and lymphocyte subset evaluation in rheumatic heart disease: a search for immune response factors. *Am Heart J* 112:992, 1986.
 27. Ayoub EM, Barrett DJ, Maclaren NK, Krischer JP: Association of class II human histocompatibility leukocyte antigens with rheumatic fever. *J Clin Invest* 77:2019, 1986.
 28. Harel I, Zeharia A, Kodman Y, Straussberg R, Zabriskie JB, Amir J: Presence of the d8/17 B-cell marker in children with rheumatic fever in Israel. *Clin Genet* 61:293, 2002.
 29. Khanna AK, Buskirk DR, Williams RC Jr, Gibofsky A, Crow MK, Menon A, Fortino M, Reid HM, Poon-King T, Rubinstein P, Zabriskie JB: Presence of a non-HLA B cell antigen in rheumatic fever patients and their families as defined by a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 83:1710, 1989.
 30. Patarroyo ME, Winchester RJ, Vejerano A, Gibofsky A, Chalem F, Zabriskie JB, Kunkel HG: Association of a B-cell alloantigen with susceptibility to rheumatic fever. *Nature* 278:173, 1979.
 31. de Messias IJ, Cavalcanti E, Radominski SC: Increased frequency of the C4A*6 rare allele in rheumatic heart disease. *Scand J Rheumatol* 24:164, 1995.
 32. Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K, Hansen CH, Andersen LH, Hahn GW, Garred P: Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 285:1316, 2001.
 33. Ambrosio AR, Messias-Reason IJT: Leishmania (Viannia) braziliensis: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defense mechanism. *Parasite Immunol* 27:333, 2005.
 34. Tabona P, Mellor A, Summerfield JA: Mannose binding protein is involved in first-line host defence: evidence from transgenic mice. *Immunology* 85:153, 1995.
 35. Bisno AL, Brito MO, Collins CM: Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 3:191, 2003.
 36. Chiu-Braga YY, Hayashi SY, Schafranski M, Messias-Reason IJ: Further evidence of inflammation in chronic rheumatic valve disease (CRVD): high levels of advanced oxidation protein products (AOPP) and high sensitive C-reactive protein (hs-CRP). *Int J Cardiol* 109:275, 2006.
 37. Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, Coelho V, Abel L, Lopez AP, Oshiro SE, Aliotti S, Cunhaneto E, Pomerantzeff PM, Tanaka AC, Kalil J: Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol* 165:1583, 2004.
 38. Golbasi Z, Ucar O, Keles T, Sahin A, Cagli K, Camsari A, Diker E, Aydogdu S: Increased levels of high sensitive C-reactive protein in patients with chronic rheumatic valve disease: evidence of ongoing inflammation. *Eur J Heart Fail* 4:593, 2002.
 39. Yetkin E, Erbay AR, Ileri M, Turhan H, Balci M, Cehreli S, Yetkin G, Demirkan D: Levels of circulating adhesion molecules in rheumatic mitral stenosis. *Am J Cardiol* 88:1209, 2001.
 40. Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC: The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 90:31, 1992.
 41. Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ: Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis* 184:1152, 2001.
 42. Santos IK, Costa CH, Krieger H, Feitosa ME, Zurakowski D, Fardin B, Gomes RB, Weiner DL, Ham DA, Ezekowitz RA, Epstein JE: Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69:5212, 2001.
 43. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL: Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 104:1413, 2001.
 44. Kilpatrick DC: Mannan binding protein in sera positive for rheumatoid factor. *Br J Rheumatol* 36:207, 1997.
 45. Dornelles LN, Pereira-Ferrari L, Messias-Reason I: Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. *Clin Exp Immunol* 145:463, 2006.

**ANEXO 6 – MANUSCRITO REFERENTE À TESE PUBLICADO EM
PERIÓDICO INTERNACIONAL**



Functional *MASP2* gene polymorphism in patients with history of rheumatic fever

Marcelo Derbli Schafranski^a, Lillian Pereira Ferrari^a, Daniela Scherner^a, Renato Torres^b, Iara José de Messias-Reason^{a,*}

^a Departamento de Patologia Médica, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil

^b Departamento de Cardiologia Pediátrica, Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil

Received 16 July 2007; received in revised form 5 November 2007; accepted 13 November 2007

KEYWORDS

Complement;
Rheumatic fever;
Rheumatic heart
disease;
MASP2 gene

Summary In this study we investigated whether partial or total MASP-2 deficiencies resulting from Asp105Gly mutation are associated with rheumatic fever (RF) and chronic rheumatic heart disease (RHD). The Asp105Gly *MASP2* mutation (D105G) was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in 148 patients (43 men and 105 women; mean age 39.1 ± 14.4 years) with a history of RF, including 106 (73%) with RHD and 42 (27%) without cardiac sequelae, and 129 control subjects (52 men and 77 women, mean age 38.4 ± 12.2 years). The D105G mutation was detected in four patients with RHD (3.77%) and in five control subjects (3.88%), all in the heterozygous state. None of the patients without cardiac sequelae had the mutation. No significant difference was found in the frequency of the mutant allele between the groups ($p < 0.6$). These results suggest that the D105G mutation in the *MASP2* gene does not play a major role in the pathogenesis of RF. Whether D105G plays a role in the development of RHD should be ascertained in future studies.

© 2008 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The complement system plays an important role in the innate response, mediating host defenses against infections, modulating inflammation, and affecting the removal of immune complexes and apoptotic cells [1]. Three major pathways are known to activate the complement system: the classical, the alternative, and the lectin pathway. The lectin pathway is activated by the binding of mannose-binding lec-

tin (MBL) and ficolins to carbohydrate residues on the surface of microorganisms, which triggers complement activation through the MBL-associated serine protease (MASP-2) [1,2]. This leads to the activation of C2 and C4 and to the generation of the C3 convertase C4bC2b. Although MBL and ficolins may, by themselves, exert biologic functions such as opsonization and phagocytosis, it seems that their main function is related to the activation of complement [1,2]. Thus the role of MASP-2 is crucial in the progress of complement activation by the MBL/ficolins pathway. Several polymorphisms are present in the *MBL2* gene that are associated with both low protein concentrations in plasma and lack of

* Corresponding author. Fax: 0049-7071-294684.

E-mail address: iarareason@hc.ufpr.br (I. de Messias-Reason).

ABBREVIATIONS

MASP2	MASP-2 gene
MASP-2	mannose-binding lectin-associated serine protease
MBL	mannose-binding lectin
RF	rheumatic fever
RHD	rheumatic heart disease

functional activity [2]. Recently a mutation in the exon 3 of the MASP2 gene, causing the exchange of aspartic acid with a glycine at position 105(D105G) in the mature protein and its deficiency in plasma, was reported in a patient presenting with manifestations of severe autoimmune and infectious diseases [3]. This mutation abrogates the binding of MASP-2 to MBL and ficolins, thus abolishing the activation of the lectin pathway.

An increasing amount of evidence has shown that genetically defined deficiencies of MBL and MASP-2 are associated with susceptibility to infectious and autoimmune diseases [2,4]. Conversely high concentrations of MBL or MBL2-sufficient genotypes have been associated with chronic inflammatory diseases and intracellular infections, supporting a proinflammatory role for MBL in these conditions [5-11].

Rheumatic fever (RF) and its most severe complication, chronic rheumatic heart disease (RHD), are immune-mediated disorders resulting from infection with group A streptococci. The immune damage is believed to be caused by "antigen mimicry" between protein epitopes of group A streptococci and of host tissues (joint, skin, central nervous system, and heart), which leads to tissue damage in susceptible individuals [12]. Although arthritis represents the most frequent manifestation of RF, affecting approximately 90% of individuals, carditis is the most serious manifestation of the disease, affecting 30-50% of RF patients who develop chronic and progressive valvular lesions. This condition results in high morbidity and mortality among young adults and, as such, remains a major public health problem in developing countries.

In previous studies we reported that both the high concentration of MBL in serum and genotypes associated with

the high expression of the protein were related to the development of RHD [7,8]. Considering the pivotal role of MASP-2 in the activation of complement through the MBL/ficolin pathway, the deficiency of MASP-2 is thought to have an important impact in the immune response against pathogenic microorganisms, as is the case of group A streptococci. Therefore in the present study we undertook the investigation of the impact of MASP2 gene polymorphism on the course of RHD in RF patients.

Subjects and methods

Patients

A total of 148 patients were studied. These were 43 men and 105 women (mean age 39.1 ± 14.4 years, range 8-76 years) with a history of RF who were followed at the cardiology outpatient clinic of the University Hospital, Federal University of Paraná (HC-UFPR) and at the Children's Unit of the Pequeno Príncipe Hospital, Curitiba, Southern Brazil. Rheumatic valvar disease was confirmed based on clinical history and transthoracic echocardiography. Of the patients, 42 were without cardiac sequelae, whereas 106 had a history of RHD with mitral stenosis. Among the RHD patients, 76 (71.69%) had previously undergone an invasive procedure for rheumatic etiology and 30 (28.30%) had not. Additional clinical features of the patients are given in Table 1.

In addition 129 healthy subjects (52 men and 77 women; mean age 38.4 ± 12.2 years, range 19-78 years) from the same ethnic background and geographic region served as control subjects. The patients' ethnic backgrounds were as follow: 112 (75.6%) Caucasian, 31 (20.9%) mixed race/ethnicity, and 5 (3.3%) Afro-Brazilian. In the control group, 99 (76.7%) were Caucasian, 24 (18.6%) mixed race/ethnicity, and 6 (4.6%) Afro-Brazilian. The study was approved by the Ethics Committee of HC-UFPR, and patients and controls signed a free informed consent form.

MASP-2 genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood as described previously [13]. A 807-bp fragment of the MASP2 gene was amplified using the following primers: forward: CAGGTCACTGGACAAACAGATCA (located in the promoter region); reverse: CTGCTGGCCTAAGACAGAG (located in intron 3' of exon 3). The DNA fragments amplified by polymerase chain reaction were digested with Hpa II (Promega, Southampton, UK) overnight and analyzed on 2% agarose

Table 1 Clinical characteristics of patients with rheumatic fever (RF) and those with RF with chronic rheumatic heart disease (RHD).

RF patients (n = 42)		RF patients with RHD (n = 106)	
Clinical characteristic		No invasive procedures (n = 30)	
Age at first RF outbreak (years)	8.57 ± 0.5	Degree of mitral stenosis	
Age at last RF outbreak (years)	8.88 ± 0.6	Normal	0
Total number of RF outbreaks	1.59 ± 0.2	Mild	16 (53.3%)
Clinical manifestation		Moderate	11 (36.6%)
Carditis	35 (83.0%)	Severe	3 (10.0%)
Arthritis	19 (45.2%)	Invasive procedures (n = 76)	
Subcutaneous nodules	4 (9.5%)	Commissurotomy	26 (34.2%)
Chorea	3 (7.1%)	Balloon valvuloplasty	15 (19.7%)
Erythema marginatum	1 (2.3%)	Replacement with a biologic valve	26 (34.2%)
		Replacement with a metal valve	9 (11.8%)

gel. The polymerase chain reaction product contains two nonvariable restriction sites for Hpa II that serve as internal controls. Digestion generates three fragments of 487, 260, and 60 bp. The D105G mutation produces a third Hpa II restriction site that splits the 487-bp fragments into two fragments of 355 and 133 bp.

Statistical analysis

A two-tailed Fisher exact test or χ^2 test was used as appropriate to determine differences between the variables. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

The D105G mutation was present in four patients (4/106, 3.77%) with RHD and in five healthy controls (5/129, 3.88%, $p = \text{NS}$). All individuals were heterozygous for the mutant allele. None of the patients without cardiac sequelae presented with the D105G mutation. No difference in the frequency of the mutant allele was observed between the groups (0% in RF; 3.77% in RHD, and 3.88% in healthy subjects, $p < 0.6$), as shown in Table 2.

Among the four RHD patients carrying the D105G mutant allele, three had no mutation in the exon 1 of *MBL2* gene and one patient had a heterozygous mutation for this gene. All four RHD subjects carrying the D105G mutation were female ($p < 0.33$), whereas in the control group three subjects were male and two were female ($p < 0.40$).

Discussion

The regulatory mechanisms of the complement system are finely balanced in such a way that complement activation is focused on the surface of invading microorganisms and complement deposition on self cells is limited by various plasma and cellular factors [1]. An imbalance in these regulatory mechanisms can lead to injury of self tissues.

Under normal circumstances, MBL does not bind to self tissues; however in situations of cellular hypoxia, glycosylation of cell surfaces may occur, which favors MBL binding, leading to complement activation and tissue damage [14].

Thus a beneficial role for MBL deficiency has been proposed in situations associated with undesirable complement activation and self tissue injury, such as in chronic inflammatory diseases [5-8]. Recently data have emerged indicating an active role for MBL in different chronic diseases. High levels of MBL or *MBL2* sufficient genotypes have been associated with persistent inflammation in rheumatoid arthritis [5] and with micro- and macrovascular complications in diabetes mellitus [6]. In addition a key role for MBL in myocardial reperfusion ischemic injury has recently been reported [15].

Therefore MBL is recognized to play a dual role in the immune response. On one hand, MBL deficiency predisposes to autoimmune and infectious diseases [2]; on the other hand it seems to be protective against infection by intracellular pathogens [9-11] and inflammatory diseases [5-7,15].

Activation of the complement cascade by the lectin pathway depends on the interaction of MBL and MASP-2. Individuals homozygous for the D105G variant present with low or no activity of the lectin pathway, whereas heterozygous subjects have half of the amount of MASP-2 [3]. The frequency of the mutant allele was shown to be 5.5% in a Danish population. In the present study, the D105G mutation was observed in 3.88% of the healthy subjects and in 3.77% of the patients with RHD. Interestingly, the mutation was absent in patients with RF without cardiac sequelae, but this difference was not statistically significant. Further studies that include a larger number of subjects should be conducted to establish whether the D105G mutation has a role in the development of RHD.

Previous studies have raised the hypothesis that high levels of MBL and high-production *MBL2* genotypes may play a pathogenic role in RHD [7,8]. The MBL molecule is a pattern recognition molecule that binds to, among other sugars, *N*-acetylglucosamine, one of the main components of heart valves [16]. Thus it would be reasonable to suppose that complement-induced tissue injury would occur to a lesser extent in patients with genotypes related to a lower production of MBL and/or MASP-2.

The results of the present study therefore suggest that if a deficiency in the lectin pathway represented a protective factor against the development of RF or RHD, this protective

Table 2 Frequency of the D105G *MASP2* gene mutation in patients with rheumatic fever (RF) and rheumatic heart disease (RHD) and control subjects.

	Patients			Controls (n = 129)	p
	All (n = 148)	RF (n = 42)	RF with RHD (n = 106)		
MASP2 allele					
A	292 (98.64%)	84 (100%)	208 (98.11%)	253 (98.06%)	ns ^{a,b,c,d}
G	4 (1.35%)	0	4 (1.88%)	5 (1.93%)	ns ^{a,b,c,d}
MASP2 genotype					
AA	144 (97.29%)	42 (100%)	102 (96.22%)	124 (96.12%)	NS ^{a,b,c,d}
AG	4 (2.70%)	0	4 (3.77%)	5 (3.87%)	NS ^{a,b,c,d}
GG	0	0	0	0	NS ^{a,b,c,d}

NS, not significant.

^a All patients vs control subjects.

^b RF patients vs control subjects.

^c RF patients with RHD vs control subjects.

^d RF patients vs those with RF and RHD.

effect would be related to the *MBL2* gene and not to its associated serine protease D105G mutation.

Acknowledgment

This work was supported in part by a research fellowship from the Brazilian National Research Council (to I.J.M.-R.).

References

- [1] McKay I, Rosen F. Complement—first of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058.
- [2] Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;4:423.
- [3] Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen L, et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med* 2003;349:554.
- [4] Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Semin Immunopathol* 2005;27:299.
- [5] Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sorensen SF, Petersen J, et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *J Rheumatol* 2000;27:26.
- [6] Hansen TK. Mannose-binding lectin (MBL) and vascular complications in diabetes. *Horm Metab Res* 2005;37:95.
- [7] Schafranski MD, Stier A, Nisihara R, Messias Reason IJ. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: A beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol* 2004;138:521.
- [8] Messias Reason IJ, Schafranski MD, Jensenius JC, Steffensen R. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. *Hum Immunol* 2006;7:991.
- [9] Santos IK, Costa CH, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2001;69:5212.
- [10] Dornelles LN, Pereira-Ferrari L, Messias-Reason I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: Deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. *Clin Exp Immunol* 2006;145:463.
- [11] Messias-Reason I, Boldt ABW, Moares Braga AC, Stahlke ERS, Dornelles L, Ferrari-Pereira L, et al. The association of mannose-binding lectin gene polymorphism with clinical leprosy: New insight into an old paradigm. *J Infect Dis* 2007;196:1379.
- [12] Guilherme L, Fae K, Oshiro SE, Kalil J. Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1.
- [13] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988;16:1215.
- [14] Collard C, Vakeva A, Morrissey MA, Agah A, Rollins SA, Reenstra WR, et al. Complement activation after oxidative stress. Role of the lectin complement pathway. *Am J Pathol* 2000;156:1549.
- [15] Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 2003;104:1413.
- [16] Nayar S, Nayar PG, Cherian KM. Heart valve structure: A predisposing factor for rheumatic heart disease. *Heart* 2006;92:1151.

**ANEXO 7 - MANUSCRITO REFERENTE À TESE SUBMETIDO PARA
PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL**

High-Producing *MBL2* Genotypes Increase the Risk of Acute and Chronic Carditis in Patients with History of Rheumatic Fever

Marcelo Derbli Schafranski¹, LÍlian Pereira Ferrari¹, Daniela Scherner¹, Renato Torres², Jens Christian Jensenius³, Iara José Messias-Reason¹

1. Departamento de Patologia Médica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil
2. Departamento de Cardiologia Pediátrica, Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil
3. Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark

Conflict of interest: None of the authors declares any conflict of interest.

Word count:

Abstract: 270

Main text: 2067

Correspondence to: Dr. Iara de Messias Reason, R. Padre Camargo, 280, 80.069-900 Curitiba, PR, Brazil; Tel: _055-41-3262-6815; Fax: _055-41-3262-6815; E-mail: iarareason@hc.ufpr.br, iaramessias@yahoo.com.br

Abbreviations:

RF: rheumatic fever

CRHD: chronic rheumatic heart disease

MBL: mannose-binding lectin

PCR: polymerase chain-reaction

SSP: single-stranded polymorphism

Abstract

BACKGROUND: Rheumatic fever (RF) and its most severe sequela, chronic rheumatic heart disease (CRHD), are mediated by an abnormal immunological host response following a *Streptococcus pyogenes* oropharyngeal infection. Mannose-binding lectin (MBL), a collectin that activates complement, binds to N-acetylglucosamine, a molecule present on the streptococcus cell wall and on human heart valves. Previously, we reported an association between MBL serum concentrations and genotypes associated with higher production of this protein and CRHD. Here we investigated further the association between *MBL2* polymorphisms and the presence of carditis in RF. METHODS: Polymorphisms in exon 1 and in the *X/Y* promoter region of the *MBL2* gene were determined by PCR-SSP in 149 patients with a history of RF and 147 controls. RESULTS: Genotypes associated with a higher production of MBL (*YA/YA* and *YA/XA*) were more frequent in the patients with carditis (acute and chronic, n=142) and in the subgroups of patients with CRHD (n=107) and with history of carditis without valve sequela (n=35) when compared to the controls (n=147) [OR 2.44, CI 95% 1.48-4.00, p=0.0006; OR 2.42, CI 95% 1.41-4.16, p=0.001 and OR 2.48, CI 95% 1.09-5.67, p=0.035, respectively]. Logistic regression analysis showed that MBL levels >2800 ng/ml increased the risk of CRHD (OR 2.91, CI 95% 1.41-6.03, p=0.003). Also, among patients with history of RF (n=42), the frequency of the high-producing MBL genotypes was higher in the group that developed acute carditis when compared to the patients without this clinical manifestation (OR: 7.22 CI 95% 1.18-43.98, p=0.031). CONCLUSION: *MBL2* genotypes associated with the high production of MBL seem to be involved in the pathogenesis of rheumatic carditis and its progression to CRHD.

Key-words: mannose-binding lectin, rheumatic fever, rheumatic heart disease, carditis, complement.

Introduction

The pathogenesis of acute rheumatic fever (RF), a late sequela of oropharyngeal infection with Lancefield group A β -hemolytic streptococci is still not completely understood. The main hypothesis for the development of RF is an autoimmune reaction resulting from molecular mimicry between streptococcal antigens and cardiac, articular and central nervous system proteins (Carapetis, 2005). The most severe sequela of acute RF is chronic rheumatic heart disease (CRHD), which is observed in susceptible individuals either as a result of repeated outbreaks of acute rheumatic carditis or of turbulent blood flow which damages the valvar apparatus, with consequent thickening, fibrosis and calcification of the valves (Carapetis, 2005). Elevated serum concentration of immune complexes and complement activation products (C3d) have been observed both in patients with acute RF and in CRHD, suggesting that the complement system might be involved in the pathogenesis of these diseases (Gibofsky, 2001).

Mannose-binding lectin (MBL), a calcium-dependent collectin, is a pattern recognition molecule able to bind to carbohydrates (N-acetylglucosamine, D-mannose, L-fucose, N-acetylmannosamine) present on the surface of viruses, bacteria, fungi and protozoans (Takahashi, 2006). N-acetylglucosamine is one of the main components of the streptococci cell wall (Carapetis, 2005) and of human heart valves (Nayar, 2006). MBL activates the complement system through the lectin pathway, leading to phagocytosis and generating the C3 convertase (C4b2a). *MBL2* gene is located on the short arm of chromosome 10 and comprises four exons (Takahashi, 2006). Three point mutations in exon 1 alter significantly the serum concentrations of MBL (Takahashi, 2006), with the mutant alleles (*D*, *B*, *C*) resulting from mutations in codons 52, 54 and 57, respectively. The variant alleles are collectively named *O*, and the normal allele, *A*. Polymorphisms in the promoter region of the *MBL2* gene (*X/Y*, *H/L*, *P/Q*, at positions -221, -550 and +4, respectively) also affect MBL concentrations, with Y especially and H being associated with high concentrations of circulating protein (Takahashi, 2006). In a previous study we demonstrated that patients with CRHD present significantly higher concentrations of MBL in serum than healthy subjects

(Schafranski, 2004). In addition, by genotyping the structural and promoter regions of the *MBL2* gene, we found that the frequency of the *YA/YA* genotype was significantly higher in patients with CRHD than in healthy controls (Messias Reason, 2006).

Based on these findings, the present study was undertaken to investigate whether *MBL2* gene polymorphism and high serum levels of MBL are risk factors for the development of acute or chronic rheumatic carditis in patients with history of RF.

Methods

Patients and controls

A total of 149 patients (43 males and 106 females, with a mean age of 39.28 ± 14.53 years, range: 8-76) with history of RF were included in the study. They were outpatients at the Children's Unit of the Hospital Pequeno Príncipe and at the Cardiology outpatient clinic of the University Hospital, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Southern Brazil. All the patients were submitted to transthoracic echocardiography for the investigation of valvulopathy and all patients with RHD had a history of mitral stenosis. The control group included 147 healthy subjects (53 males and 94 females, with a mean age of 38.90 ± 13.56 years, range: 19-78) matched with the patients for ethnic, geographic and socioeconomic background (patients vs controls: Caucasians 114/76.51% vs 125/85.03%, Afro-Brazilians 34/22.81% vs 21/14.2% and Native Indians 1/0.6% vs 1/0.6%). The study was approved by the Ethics Committee of Human Research at the HC/UFPR and all subjects signed a free informed consent form.

Serum MBL concentration

Serum MBL concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark). The cutoff value of the assay was 50 ng/ml. This data was already published in our previous study (Schafranski, 2004).

Genotyping of exon 1 and X/Y polymorphisms

DNA was extracted according to the method of Lahiri and Nurnberger (1991). Genotyping of exon 1 and of the *X/Y* promoter region was carried out by PCR-SSP as described previously (Steffensen, 2000) using specific primers for each mutation (Dialab Diagnósticos, Belo Horizonte/MG, Brazil). PCR was carried out in an Eppendorf thermocycler (Eppendorf North America, Inc, New York, NY, USA) and consisted of 10 min. at 95°C, 30 cycles (20 s, 94°C; 20 s, 62°C; 30 s, 72°C) and 5 min. at 72°C for the exon 1 mutations and 10 min. at 95°C, 30 cycles (30 s, 94°C; 30 s, 59°C; 45 s, 72°C) and 5 min. at 72°C for the *X/Y* promoter variants. After amplification, the fragments of known molecular weight were separated by electrophoresis on 2% agarose gel (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and visualized under an ultraviolet transilluminator (Uniscience, São Paulo/SP, Brazil).

Statistical analysis

Independence between cases and controls was tested using the chi-square test with Yates correction and the two-tailed Fisher test, as appropriate. For comparisons between MBL serum concentrations, Mann-Whitney test was applied. A backward logistic regression model was developed to assess the association between demographic data, *MBL2* genotypes, MBL levels and CRHD. Statistical analysis were performed using MedCalc (MedCalc Software, Belgium). A *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

Results

MBL2 allele and genotype frequencies were in accordance with Hardy-Weinberg expectations for both groups, Table 1.

A lower frequency of the *O* allele was observed in patients with history of acute and chronic carditis when compared to the controls (50/284, 18% vs 74/294, 25% *p* = 0.03, OR: 0.63, 95% CI:

0.42-0.95), **Table 1**. A lower frequency of the *B* allele was present in patients with history of carditis without valve sequela as compared to healthy subjects (5/70, 7% vs 51/294, 17%, $p = 0.04$, OR: 0.36, 95% CI: 0.14-0.95), **Table 1**.

No significant differences were observed for the frequency of *C*, *D*, *X* and *Y* alleles between patients subgroups and controls, **Table 1**. A higher frequency of the extended genotypes *YA/YA* and *YA/XA* was observed in RF patients as a whole (105/129, 74%; $p = 0.0006$, OR 2.44, 95%CI 1.48-4.00), in patients with history of carditis (105/142, 74%; $p = 0.0006$, OR 2.44, 95%CI 1.48-4.00), in patients with CRHD (79/107, 74%; $p = 0.001$, OR 2.42, 95% CI 1.41-4.16) and in patients with history of carditis without valve sequela (26/35, 74%; $p = 0.035$, OR 2.48, 95% CI 1.09-5.67) when compared to controls (79/147, 54%), **Table 1**.

Among the RF patients without cardiac sequela, arthritis was more frequently observed in those patients presenting *MBL2* genotypes related to low production of MBL (10/14, 71% vs 10/28, 36%; $p = 0.048$, OR 0.22, CI 95% CI 0.05-0.89), **Table 2**. Regarding the other clinical features of CRHD patients, no significant associations were found with high-producing or other *MBL2* genotypes, **Table 3**.

According to previous findings, MBL serum concentrations were found significantly higher in patients with CRHD than in controls (mean $\pm$ SEM: 2957.60 $\pm$ 287.4 ng/ml vs 1587.63 $\pm$ 177.13 ng/ml, $p < 0.0037$) (Schafranski, 2004). Using receiver operating curve (ROC) analysis, we now found that the critical serum level of MBL associated with the risk of CRHD was 2800 ng/ml.

Using logistic regression the following independent variables: age, gender, presence of the *YA/YA* and *YA/XA* genotypes, and MBL > 2800 ng/ml were analyzed as possible risk factors for the development of CRHD when compared to controls. An OR of 2.91 (CI 95% 1.41-6.03, $p = 0.003$) was achieved for the presence of MBL > 2800 ng/ml, with no statistical significance for the other variables. Forty-six of the 47 patients with MBL > 2800 ng/ml (98%) carried genotypes *YA/YA* and *YA/XA* and 36 of the 57 patients with < 2800 ng/ml (63%) presented non-*YA/YA* and *YA/XA* genotypes ($p = 0.000006$).

In addition, among the patient with history of RF without CRHD (n=42), the *YA/YA* and *YA/XA* genotypes were more frequently observed in the patients with history of carditis than in those without this clinical manifestation (OR: 7.22, CI 95% 1.18-43.98, p=0.031) (**Table 2**).

Discussion

This is to our knowledge the first investigation evaluating whether MBL may be associated with the risk for the development of the major clinical manifestations of RF. A significantly higher frequency of *MBL2* genotypes associated with a higher production of MBL was observed in patients with history of rheumatic carditis as a whole (OR: 2.44) and CRHD (OR: 2.42) when compared to healthy controls. This higher frequency was also observed in patients with history of acute RF that developed acute carditis when compared to those without this clinical manifestation (OR: 7.22). In addition, logistic regression analysis showed that MBL levels >2800 ng/ml increased the risk of CRHD (OR 2.91), concentrations that were strongly related to the *YA/YA* and *YA/XA* genotypes. This data suggests that both high levels of MBL and its associated genotypes have a role in the development of the cardiac manifestations of RF, and that this association is due to a mechanism linked to *MBL2* gene polymorphism and not to an acute-phase reaction.

There is increasing data showing that genetically determined high levels of MBL and related genotypes are associated with the occurrence of cardiovascular. Recently, it has been shown that high serum levels of MBL (>3000 ng/ml) were associated with increased risk of ischemic heart disease, myocardial infarction and premature death in patients with rheumatoid arthritis (Troelsen, 2007). Also, other authors related that homozygous carriers of *MBL2* wild-type alleles presented higher rates of carotid reestenosis after endarterectomy when compared to patients carrying variant alleles (Rugonfalvi-Kiss, 2005).

There is convincing evidence that the clinical manifestations resulting from RF are due to inflammatory and autoimmune reactions (Carapetis, 2005), with involvement of complement in the pathogenesis of both acute RF and CRHD (Gibofsky, 2001). The deposition of immune-complexes

in tissues of patients with acute RF and the subsequent activation of complement might represent the initial event in the vasculitis seen in the tissues of these patients, followed by the participation of self-reactive antibodies (Gibofsky, 2001). Thus, based on the present and previous findings [5,6], activation of complement through the lectin pathway might be an important mechanism intensifying the valvular damage seen in these patients. Nayar et al. (2006) observed myxomatous degeneration in a significant number of heart valves of patients with CRHD. Myxomatous tissue is rich in hyaluronic acid, a high molecular weight polysaccharide consisting of repeated sequences of glucuronic acid and N-acetylglucosamine. The fact that MBL binds to N-acetylglucosamine supports the hypothesis that activation of the complement system in acute rheumatic carditis and CRHD occurs in part through the interaction with this molecule.

Under normal conditions, MBL does not bind to self-tissues; however, in stressful situations such as process mediated by oxidative stress, glycosylation of cell surfaces may occur which leads to the deposition of MBL and complement activation. This is observed in situations of post-reperfusion injury in which MBL seems to play a role (Rugonfalvi-Kiss, 2005). Kumar et al. (1991) studied the activity of NADPH oxidase, an enzyme directly involved in the production of oxygen free radicals, and observed elevated enzymatic activity in patients with acute RF and CRHD. Moreover, Chiu et al. (2006) observed higher concentrations of high sensitivity C-reactive protein and advanced oxidation protein products in patients with CRHD when compared to healthy subjects. In an experimental study, the use of anti-MBL monoclonal antibodies reduced the damage caused by post-reperfusion injury in rats submitted to coronary artery occlusion (Jordan, 2003).

In addition, MBL could also exert a modulatory effect in the secretion of proinflammatory cytokines in both acute carditis and CRHD, intensifying tissue injury. As it is already known, MBL is able to regulate the secretion of inflammatory cytokines from macrophages (Jack, 2001) and increased levels of proinflammatory cytokines has been associated with acute RF as well as CRHD (Davutoglu, 2005).

Moreover, MBL has recently shown to play a role in the clearance of immune-complexes (Saevarsdottir, 2007). Thus the higher frequency of low-producing *MBL2* genotypes in patients with RF presenting arthritis could be reasonably explained by the defective clearance of immune-complexes in the joint space, since this has been considered one of the possible mechanisms linked to this clinical manifestation in RF (Svartunan, 1975).

In summary, genotypes associated with a higher production of MBL seem to represent a risk factor for the development of rheumatic carditis as a whole, and MBL may play an important role in the progression of the disease to its chronic form. Long-term follow-up of patients with acute RF without valve sequela is necessary in order to identify which patients in fact progress to CRHD and the risk factors associated with it. Since no effective treatment for rheumatic carditis is available so far (Carapetis, 2005), anti-MBL therapy might be an interesting alternative in future studies on patients with this disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Brazilian National Research Council CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the Research Fellowship awarded to IJMR .

References

1. Carapetis, J.R., McDonald, M., Wilson N.J., 2005. Acute rheumatic fever. *Lancet*. 366, 155-68.
2. Chiu, Y.Y., Hayashi, M., Schafranski M., Messias-Reason I.J.T., 2006. Further evidence of inflammation in chronic rheumatic valve disease (CRVD): high levels of advanced oxidation protein products (AOPP) and high sensitive C-reactive protein (hs-CRP). *Int. J. Cardiol.* 109, 275-6.
3. Davutoglu, V., Celik, A., Aksoy, M., 2005. Contribution of selected serum inflammatory mediators to the progression of chronic rheumatic valve disease, subsequent valve calcification and NYHA functional class. *J. Heart Valve Dis.* 14, 251-6.
4. Gibofsky, A., Zabriskie, Z., 2001. Rheumatic fever: etiology, diagnosis and treatment. In: Koopman, J, *Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1761-1773.
5. Jack, D.L., Read, R.C., Tenner, A.J. et al., 2001. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Infect. Dis.* 184(9), 1152-62.
6. Jordan, J.E., Montalto, M.C., Stahl, G.L., 2003. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation*. 104, 1413-18.
7. Kumar, V., Ganguly, N.K., Anand, I.S. et al., 1991. NADPH oxidase activity in the monocytes and neutrophils of patients with rheumatic fever. *Cardioscience*. 2 (2), 93-7.
8. Lahiri, D.K., Nurnberger, J.R., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19(19), 5444.
9. Messias Reason, I.J., Schafranski, M.D., Jensenius J.C. et al., 2006. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. *Hum. Immunol.* 2006. 7(12), 991-8.

10. Nayar, S., Nayar, P.G., Cherian, K.M., 2006. Heart valve structure: a predisposing factor for rheumatic heart disease. *Heart*. 92, 1151-2.
11. Rugonfalvi-Kiss, S., Dósa, E., Madsen, H.O. et al, 2005. High rate of early restenosis after carotid eversion endarterectomy in homozygous carriers of the normal mannose-binding lectin genotype. *Stroke*. (36), 944-8.
12. Saevarsdottir, S., Steinsson, K., Ludviksson, B. R., 2007. Mannan-binding lectin may facilitate the clearance of circulating immune complexes--implications from a study on C2-deficient individuals. *Clin. Exp. Immunol*. 148(2), 248-53.
13. Schafranski, M.D., Stier, A., Nisihara, R. et al., 2004. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin. Exp. Immunol*. 138(3), 521-5.
14. Steffensen, R., Thiel, S., Varming, K. et al., 2000. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain with sequence-specific primers. *J Immunol Methods*. 241, 33-42.
15. Svartman, M., Potter, E.V., Poon-King, T. et al., 1975. Immunoglobulins and complement components in synovial fluid of patients with acute rheumatic fever. *J. Clin. Invest*. **56(1)**, 111-7.
16. Takahashi, K., Ip, W.K.E., Michelow, I.C. et al., 2006. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr. Opin. Immun*. 18, 16-23.
17. Troelsen, L.N., Garred, P., Madsen, H.O. et al., 2007. Genetically Determined High serum Levels of Mannose-Binding Lectin and Agalactosyl IgG Are Associated with Ischemic Heart Disease In Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 56, 21-29.

TABLE 1 – DISTRIBUTION OF *MBL2* ALLELES AND GENOTYPES IN PATIENTS WITH HISTORY OF RF AND CONTROLS

	Patients					Controls		
	RF total (n=149)	Carditis/total (n=142)	CRHD (n=107)	AC (n=35)	RF without C (n=7)	(n=147)	p	OR (95% CI)
Alleles								
A	242 (81%)	234 (82%)	175 (82%)	59 (84%)	8 (57%)	220 (75%)	ns ^{a, c, d, e} , 0.03 ^b	0.63 (0.42-0.95) ^b
O	56 (19%)	50 (18%)	39 (18%)	11 (16%)	6 (43%)	74 (25%)		
B	39 (13%)	34 (12%)	29 (13%)	5 (7%)	5 (36%)	51 (17%)	ns ^{a, b, c, e} , 0.04 ^d	0.36 (0.14-0.95) ^c
C	5 (2%)	5 (2%)	5 (2%)	0	0	12 (4%)	ns ^{a, b, c, d, e}	
D	12 (4%)	11 (4%)	5 (2%)	6 (8%)	1 (7%)	11 (4%)	ns ^{a, b, c, d, e}	
X	56 (19%)	54 (19%)	42 (20%)	12 (17%)	2 (14%)	45 (15%)	ns ^{a, b, c, d, e}	
Y	242 (81%)	230 (81%)	172 (80%)	58 (83%)	12 (86%)	249 (85%)		
Genotypes								
A/A	99 (66%)	97 (68%)	71 (66%)	26 (74%)	2 (29%)	83 (56%)	ns ^{a, b, c, d, e}	
A/O	44 (30%)	40 (28%)	33 (31%)	7 (20%)	4 (57%)	54 (37%)		
O/O	6 (4%)	5 (4%)	3 (2.8%)	2 (6%)	1 (14%)	10 (7%)		
Y/Y	96 (64%)	91 (64%)	68 (63%)	23 (66%)	5 (71%)	104 (71%)	ns ^{a, b, c, d, e}	
X/X	3 (2%)	3 (2%)	3 (3%)	0	0	3 (2%)		
X/Y	50 (34%)	48 (34%)	36 (34%)	12 (34%)	2 (29%)	40 (27%)		
Extended Genotypes								
YA/YA + YA/XA	108 (72%)	105 (74%)	79 (74%)	26 (74%)	2 (29%)	79 (54%)	0.001 ^{a, c} ,	2.26 (1.39-3.67) ^a
XA/XA + XA/O + O/O	41 (28%)	37 (26%)	28 (26%)	9 (26%)	5 (71%)	68 (46%)	0.0006 ^b ,	2.44 (1.48-4.00) ^b
							0.035 ^c ,	2.42 (1.41-4.16) ^c
							ns ^e	2.48 (1.09-5.67) ^d

a: RF patients - total vs controls; b: carditis - total vs controls; c: chronic rheumatic heart disease (CRHD) vs controls; d: acute carditis without sequela (AC) vs controls; e: rheumatic fever without carditis (RF without C) vs controls ns: not significant carditis/total = CRHD + AC

TABLE 2 – *MBL2* GENOTYPES ASSOCIATED WITH CLINICAL CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH HISTORY OF RF WITHOUT CRHD

Patients without CRHD	(n=42)	High-Producing <i>MBL2</i>	Low <i>MBL2</i>	p	OR CI (95%)
		Genotypes (n=28)	Genotypes (n=14)		
<i>Clinical characteristics</i>					
Age at first RF outbreak	8.57 ± 3.35 (3-16)*	8.57 ± 3.57 (3-16)*	8.57 ± 3.00 (5-14)*	ns	
Age at last RF outbreak	9.11 ± 3.92 (3-21)*	9.28 ± 4.37 (3-21)*	8.78 ± 2.93 (5-14)*	ns	
Total number of RF outbreaks	1.59 ± 0.25 (1-10)#	1.60 ± 0.33 (1-10)#	1.57 ± 0.38 (1-5)#	ns	
Correct prophylaxis	39 (93%)	29 (97%)	10 (83%)	ns	
<i>Clinical manifestations</i>					
Carditis	35 (83%)	26 (93%)	9 (64%)	0.031	7.22 (1.18-43.98)
Arthritis	20 (48%)	10 (36%)	10 (71%)	0.048	0.22 (0.05-0.89)
Subcutaneous nodules	4 (9%)	2 (7%)	2 (14%)	ns	
Chorea	3 (7%)	3 (11%)	0	ns	
Erythema marginatum	1 (2%)	1 (3%)	0	ns	

High-producing genotypes include *YA/YA* and *YA/XA*

Other genotypes include *XA/XA*, *XA/O* and *O/O*

* media ± SD

media ± SE

TABLE 3 – *MBL2* GENOTYPES ASSOCIATED WITH CLINICAL CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH HISTORY OF RF WITH CRHD

Patients with RHD	High-Producing <i>MBL2</i>		Low <i>MBL2</i>		p	OR CI (95%)
	(n=107)	Genotypes (n=65)	Genotypes (n=42)			
<i>Not submitted to invasive procedures (n=30)</i>		(n=20)	(n=10)			
Degree of mitral stenosis						
Normal	0	0	0	ns		
Mild	16 (53%)	13 (65%)	3 (30%)	ns		
Moderate	11 (37%)	4 (20%)	7 (70%)	0.014	0.10 (0.01-0.61)	
Severe	3 (10%)	3 (15%)	0	ns		
<i>Submitted to invasive procedures (n=77)</i>		(n=45)	(n=32)			
Age at the time of the procedure (years)	38 ± 12*	37.39 ± 10.67 (18-65)*	38.66 ± 13.97 (12-75)*			
Commissurotomy	27 (35.0%)	17 (38%)	10 (31%)	ns		
Balloon valvuloplasty	15 (19%)	9 (20%)	6 (19%)	ns		
Replacement with a biological valve	26 (34%)	13 (29%)	13 (41%)	ns		
Replacement with a metal valve	9 (12%)	6 (13%)	3 (9%)	ns		

High-producing genotypes include *YA/YA* and *YA/XA*

Other genotypes include *XA/XA*, *XA/O* and *O/O*

* media ± SD