NATASHA REBOUÇAS FERRARONI

**Níveis séricos e polimorfismos gênicos da Lectina
Ligadora de Manose (MBL) e da Serino Protease Associada à
MBL (MASP)-2 em uma amostra da população brasileira**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Anete Sevciovic Grumach

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferraroni, Natasha Rebouças

Níveis séricos e polimorfismos gênicos da Lectina Ligadora de Manose (MBL) e da Serino Protease Associada à MBL (MASP)-2 em um amostra da população brasileira / Natasha Rebouças Ferraroni. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Anete Sevciovic Grumach.

Descritores: 1.Lectina de ligação a manose 2.Via de complemento de lectina de ligação a manose 3.Serina proteases associadas a proteína de ligação a manose 4.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-521/10

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado
Ao meu querido pai, Ferraroni (Daddy),
à minha querida mãe, Maria José (Mama)
ao meu querido marido, Fábio e
à minha princesinha Nicole.
Amo muito vocês.
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meus passos durante toda a jornada;

Aos meus pais José João Ferraroni (Daddy) e Maria José Rebouças Ferraroni (Mama), ambos médicos e pesquisadores, por me mostrarem o valor do conhecimento, por me apoiarem incondicionalmente e pelo exemplo de generosidade e honestidade;

Ao meu marido Fábio Humberto Ribeiro Paes Ferraz, meu grande amor, pela incrível capacidade de tolerância, pelas minhas ausências e exemplo de humildade;

À minha filha Nicole Ferraroni Ferraz, minha maior riqueza, que nasceu em um ano especial de grandes conquistas;

À Dra. Anete Sevciovic Grumach, um exemplo de mestre e orientadora, pela capacidade de liderança e determinação, amizade e carinho, pelas doces palavras nos momentos difíceis, pelo incentivo e oportunidade de aprender cada vez mais, pela companhia nas viagens aos congressos no Brasil e exterior e pelo afeto à minha família;

Aos meus sogros D. Vera Lúcia Ferraz e Sr. Geraldo José Ferraz, pelo afeto e pela acolhida quando das minhas idas à São Paulo;

Ao Dr. Sérgio Crovella, incansável, pelo auxílio não impedido pela distância intercontinental (Itália) se prontificou a participar do trabalho e abriu as portas de seu laboratório para nossos experimentos;

Aos amigos da Universidade Federal de Pernambuco - Lucas Brandão e Rafael Lima, e da Universidade de Trieste (Itália) Ludovica Segat e Alessandra Pontillo pelos ensinamentos de genética;

Ao Dr. Licio Augusto Velloso, preceptor de Residência Médica em Alergia e Imunologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de conhecer a rotina em laboratório e onde realmente conheci o verdadeiro valor da comunidade científica;

Ao Dr. Carlos Loja, pela oportunidade de fazer parte do Serviço de Alergia e Imunologia do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, e dar início a este trabalho em colaboração com aquela Instituição;

À Rosemeire Navickas Constantino da Silva, amiga e companheira de pós-graduação, pelo carinho, paciência e orientação laboratorial;

Aos colegas Rafael Arnold e Josiane Gonçalves, pelo auxílio na organização das amostras;

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte e o LIM-56, pela infra-estrutura além de calorosos colaboradores sempre solícitos;

Ao Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP, pela acolhida;

À Dra. Valéria Aoki, pelo incentivo desde a aprovação para o curso de pós-graduação e pelos valiosos comentários na qualificação;

À Sra. Eli Maria, da secretaria de pós-graduação da Dermatologia, pela presteza ao longo do curso;

À Elisabete Inocêncio, técnica de laboratório do Banco de Sangue do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, pelo auxílio na obtenção das amostras;

À Dra. Izabel Maria de Siqueira, Hemoterapeuta, chefe do Banco de Sangue do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro pela confiança em nós depositada;

Ao Banco de Sangue do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro e aos doadores de sangue por acreditarem na sua valiosa contribuição neste trabalho;

À direção do Hospital Regional da Asa Norte (Brasília-DF), e chefia da Clínica Médica, pela cessão de horário especial, para que pudesse me ausentar das atividades assistenciais quando das idas à São Paulo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"Se você acha que pode, você pode.

Se acha que não pode, tem razão"

Henry Ford

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema Complemento	1
1.2 Via das Lectinas	2
1.2.1 Lectina Ligadora de Manose	2
1.2.2 MASP-2	11
1.2.3 Gene <i>MBL2</i>	13
1.2.3.1 Polimorfismos do gene <i>MBL2</i>	15
1.2.3.2 Genotipagem de SNPs por PCR em tempo real através da curva de <i>melting</i>	24
1.2.4 Deficiência de MBL	26
1.2.5 Gene MASP-2	28
1.2.5.1 Polimorfismos do gene MASP-2	29
1.2.5.2 Genotipagem de SNPs de MASP-2 por PCR em tempo real – <i>TaqMan</i>	33
1.2.6 Deficiência de MASP-2	34
1.2.7 Estudos de associação clínica de doenças relacionadas à deficiência de MBL	35
1.2.8 Doenças dermatológicas com implicações nos níveis de MBL	43
1.2.9 Estudos de associação clínica de doenças relacionadas à deficiência MASP-2	44
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVOS	48
3.1 Geral	48
3.2 Específicos	48
3.2.1 Padronizar técnicas de rotina para:	48
3.2.2 Criar banco de dados para avaliar os níveis séricos normais de MBL e MASP-2 em uma população brasileira	48
4 METODOLOGIA	49
4.1 Casuística e obtenção das amostras	49
4.2 Técnicas Laboratoriais	50
4.2.1 Dosagem da proteína MBL	50
4.2.1.1 Técnica <i>in house</i> de MBL quantitativo	50
4.2.1.2 Técnica de MBL quantitativo <i>KIT HK 323</i>	52

4.2.2	Técnica de dosagem de MASP-2 quantitativo <i>KIT</i> HK 326	53
4.2.3	Genotipagem da proteína MBL	54
4.2.3.1	Gene codificador da lectina ligadora de manose (<i>MBL2</i>)	55
4.2.3.2	Gene codificador da região promotora do gene <i>MBL2</i>	56
4.2.4	Genotipagem da MASP-2	57
4.3	Cálculo da frequência dos alelos	58
4.4	Análise estatística	58
5	RESULTADOS	60
5.1	Caracterização da população estudada	60
5.2	Níveis séricos de MBL <i>in house</i>	63
5.3	Níveis séricos de MBL pelo <i>Kit</i>	64
5.4	Comparação entre valores encontrados nas técnicas MBL <i>in house</i> e <i>Kit</i>	65
5.5	Genotipagem do gene da MBL (<i>MBL2</i>)	66
5.5.1	Genotipagem do éxon 1 do gene <i>MBL2</i>	66
5.5.2	Dosagem de MBL com respectivos genótipos	69
5.5.3	Genotipagem do <i>promoter</i> do gene <i>MBL2</i>	79
5.6	Níveis séricos de MASP-2	90
5.7	Genotipagem do gene MASP-2	96
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÃO	110
8	ANEXOS	111
	ANEXO A - Questionário para doadores de sangue	111
	ANEXO B - Consentimento livre e esclarecido	112
	ANEXO C - Cópia Aprovação do Comitê de Ética do HSE	113
	ANEXO D - Cópia aprovação do comitê de Ética CAPPesq HC-FMUSP	114
	ANEXO E - Reagentes ELISA MBL <i>in house</i>	115
	ANEXO F - Preparo dos reagentes – ELISA para MBL	116
	ANEXO G - <i>Primers</i> , <i>kits</i> e anticorpos utilizados	118
	ANEXO H - Lista de pacientes e resultados	119
9	REFERÊNCIAS	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AcMo	Anticorpo monoclonal
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Anti-HBC	Antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite B
bp	Pares de bases
CCP	<i>Complement control protein</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CUB	C1r/s, Uegf e proteína morfogênica óssea
DRC	Domínio reconhecedor de carboidrato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor-like</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
IQR	Intervalo interquartil
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MAC	Complexo de ataque à membrana
MASP	<i>MBL- Associated Serine Protease</i>
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
PFE	Pênfigo foliáceo endêmico
RR	Risco relativo
rs	<i>reference nucleic acid sequence</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Vs.	<i>Versus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	micra
μg	Micrograma
μM	Micromolar
h	hora
kDa	Kilo Dalton
mL	Mililitro
ng	Nanograma
°C	graus Celcius
rpm	rotações por minuto
s	segundo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ativação do sistema complemento e formação do complexo de ataque à membrana pela via das lectinas	2
Figura 2 -	Estrutura da MBL.....	3
Figura 3 -	Esquema da oligomerização da MBL/MASP-2.....	4
Figura 4 -	Esquema da ligação entre MBL e carboidratos	6
Figura 5 -	Modelo de ativação de MBL/MASP-2.....	7
Figura 6 -	Estrutura da MBL: a) Gênica; b) Protéica e c) Trímero.....	14
Figura 7 -	Representação dos Polimorfismos no gene <i>MBL2</i>	17
Figura 8 -	Concentrações séricas de MBL de acordo com o genótipo estrutural e da região promotora X/Y.....	18
Figura 9 -	Estrutura gênica da MASP-2	29
Figura 10 -	Clivagem da Sonda <i>TaqMan®</i>	34
Figura 11 -	População estudada: distribuição por sexo	62
Figura 12 -	População estudada: distribuição por idade	62
Figura 13 -	Níveis séricos de MBL <i>in house</i>	63
Figura 14 -	Níveis séricos de MBL <i>Kit</i>	64
Figura 15 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>in house</i> vs. MBL <i>kit</i>	65
Figura 16 -	Genotipagem do gene <i>MBL2</i> , mostrando padrão de curvas de <i>melting</i> dos três genótipos possíveis na região do éxon 1	67
Figura 17 -	Genotipagem do gene <i>MBL2</i> em uma amostra de indivíduo sadio, mostrando a perfeita sobreposição entre a curva de <i>melting</i> da amostra e a curva de <i>melting</i> do padrão	67
Figura 18 -	Níveis séricos de MBL <i>in house</i> com respectivos genótipos	70
Figura 19 -	Níveis séricos de MBL <i>Kit</i> com respectivos genótipos.....	71

Figura 20 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>in house</i> e Produção de MBL (haplótipos <i>high producer</i> , <i>low producer</i> e <i>deficient producer</i>).....	73
Figura 21 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>Kit</i> e Produção de MBL (haplótipos <i>high producer</i> , <i>low producer</i> e <i>deficient producer</i>).....	74
Figura 22 -	Correlação entre MBL <i>in house</i> vs. sexo	75
Figura 23 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>Kit</i> vs. sexo.....	76
Figura 24 -	Correlação entre níveis de MBL <i>in house</i> vs. Idade	77
Figura 25 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>Kit</i> vs. idade.....	78
Figura 26 -	Gel em agarose do produto da PCR (coluna 1-18) com 100bp <i>molecular ladder</i> (coluna 19)	79
Figura 27 -	Sequenciamento do <i>promoter</i> X/Y do gene <i>MBL2</i>	80
Figura 28 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>in house</i> e <i>promoter</i> H/L.....	82
Figura 29 -	Correlação entre níveis MBL <i>Kit</i> e <i>promoter</i> H/L.....	83
Figura 30 -	Correlação entre níveis de MBL sérica <i>in house</i> e <i>promoter</i> X/Y	84
Figura 31 -	Correlação entre níveis de MBL sérica <i>Kit</i> e <i>promoter</i> X/Y.....	85
Figura 32 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>in house</i> e <i>promoter</i> P/Q	86
Figura 33 -	Correlação entre níveis séricos de MBL <i>Kit</i> e <i>promoter</i> P/Q	87
Figura 34 -	Níveis séricos de MBL <i>in house</i> e haplótipos de <i>MBL2</i> (A/O) e <i>promoters</i>	88
Figura 35 -	Níveis séricos de MASP-2	90
Figura 36 -	Correlação entre níveis séricos de MASP-2 vs. genótipo de MASP-2	91
Figura 37 -	Correlação entre sexo e níveis séricos de MASP-2	92
Figura 38 -	Correlação entre níveis séricos de MASP-2 vs. idade.....	93
Figura 39 -	Correlação entre níveis séricos de MASP-2 vs. MBL <i>in house</i>	94

Figura 40 -	Correlação entre níveis de MASP-2 vs. Níveis séricos de MBL <i>Kit</i>	94
Figura 41 -	Correlação entre níveis séricos de MASP-2 e produção de MBL (haplótipos <i>high producer</i> , <i>low producer</i> e <i>deficient producer</i>).....	95
Figura 42 -	Genotipagem do gene da MASP-2. Indivíduo homozigoto para os alelos mutantes (C/C), curva azul.....	97
Figura 43 -	Genotipagem do gene MASP-2, indivíduo homozigoto normal (A/A), curva preta.....	98
Figura 44 -	Genotipagem gene MASP-2, indivíduo heterozigoto (A/C), presença de duas curvas – preta e azul.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração sérica de MBL na população européia	19
Tabela 2 -	Frequência do genótipo estrutural <i>MBL2</i> e alelos em diferentes populações.....	21
Tabela 3 -	Frequência dos haplótipos <i>MBL2</i> em diferentes populações	22
Tabela 4 -	Frequência alélica do genótipo <i>MBL2</i> em indivíduos saudáveis no Brasil.....	24
Tabela 5 -	Combinação dos haplótipos do gene <i>MBL2</i> e produção de MBL	28
Tabela 6 -	Nomenclatura dos polimorfismos da MASP-2	31
Tabela 7 -	Frequências do genótipo MASP-2 em populações.....	32
Tabela 8 -	Correlação entre doenças e MBL	42
Tabela 9 -	Frequência gênica de <i>MBL2</i>	68
Tabela 10 -	Genotipagem dos <i>promoters</i> do gene <i>MBL2</i>	81
Tabela 11 -	Haplótipos do gene <i>MBL2</i>	81
Tabela 12 -	Frequência das combinações dos haplótipos do gene <i>MBL2</i> e níveis séricos de MBL	89
Tabela 13 -	Frequência gênica de MASP-2.....	100
Tabela 14 -	Frequência alélica dos genes <i>MBL2</i> e MASP-2	100

RESUMO

Ferraroni NR. *Níveis séricos e polimorfismos gênicos da Lectina Ligadora de Manose (MBL) e da Serino Protease Associada à MBL (MASP)-2 em uma amostra da população brasileira* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 152p.

A Lectina Ligadora de Manose (MBL) é uma proteína que reconhece carboidratos na superfície microbiana levando à ativação do sistema complemento. Este processo é mediado por Serino Proteases tal como a MASP-2. O complexo MBL/MASP-2 é responsável pela formação da C3 convertase C4bC2b. Os níveis séricos de MBL e a MASP-2 (genes *MBL2* e *MASP-2*, respectivamente) são geneticamente determinados, e podem ser influenciados pela presença de polimorfismos em um único nucleotídeo – SNPs em genes codificadores destas proteínas. OBJETIVO: Determinar os níveis séricos e polimorfismos gênicos da MBL e MASP-2 em uma amostra da população brasileira. MÉTODOS: 294 amostras de doadores de sangue [mediana = 36,51 ± 10,56; 18-63 anos; 91/294 (30,95%) sexo feminino, 203/294 (69,05%) sexo masculino] foram genotipadas para os SNPs do éxon 1 (*MBL2*): SNPs localizados nos códons 52 (*Arg*→*Cys*), 54 (*Gly*→*Asp*) e 57 (*Gly*→*Glu*) e SNP *Asp371Tyr* (D371Y, A>C) do gene da MASP-2 (éxon 9). Foi utilizado o ensaio de temperatura de dissociação para éxon 1 (*MBL2*) e sequenciamento direto dos *promoters* (H/L, X/Y e P/Q, nas posições -550, -221 e +4, respectivamente). A combinação das variantes do éxon 1 *MBL2* foram agrupadas e denominadas alelo O e o genótipo selvagem foi denominado A. O éxon 9 da MASP-2 foi genotipado através da plataforma TaqMan. RESULTADOS: *MBL2*: 58,5% A/A, 36,39% A/O e 5,1% O/O; *promoters*: 13% H/H, 39% H/L, 48% L/L; 2% X/X, 26% X/Y, 72% Y/Y; 52% P/P, 37% P/Q, 11% Q/Q; haplótipos encontrados: 15% LXPA, 28% HYPA, 8% LYQO, 12% LYPO, 11% LYPA, 22% LYQA e 4% HYPO. Quanto à produção, 56,12% produziram altos níveis de MBL, 30,61% níveis médios e 13,27% níveis baixos ou insuficientes de MBL. Para MASP-2: 38,78% A/A, 44,56% A/C e 16,67% C/C. CONCLUSÃO: A prevalência (5,1%) SNP O/O do éxon 1 (*MBL2*) está de acordo com a literatura brasileira, é semelhante à européia (4%) e japonesa (5%), menor que a africana (10-14%). Níveis séricos de MBL corresponderam aos genótipos determinados. Esta é a primeira avaliação da frequência do SNP D371Y do gene MASP-2 em uma população brasileira. Os resultados deste trabalho fornecem subsídios para estudos sobre repercussão de MBL e MASP-2 em situações clínicas.

Descritores: 1.Lectina de ligação a manose 2.Via de complemento de lectina de ligação a manose 3.Serina proteases associadas a proteína de ligação a manose 4.Polimorfismo genético.

SUMMARY

Ferraroni NR. *Mannose-binding lectin (MBL) and MBL – Associated Serine Protease (MASP)-2 serum levels and genetic polymorphisms in a Brazilian population sample* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 152p.

BACKGROUND: Mannose-binding lectin (MBL) is a protein that recognizes carbohydrates on microbial surface leading to complement activation. This process is mediated by MBL-associated serine proteases, such as MASP-2. MBL/MASP-2 complex is responsible for generating the C3 convertase C4bC2b. Both MBL and MASP-2 levels are genetically determined, and can be influenced by the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding for these proteins (namely *MBL2* and *MASP-2*). **OBJECTIVE:** to determine MBL and MASP-2 serum levels and the frequencies of *MBL2* and *MASP-2* gene polymorphisms in a Brazilian population sample. **METHODS:** 294 blood donor samples [median age = 36.51 ± 10.56 years, range 18-63, 91/294 (31%) females and 203/294 (69%) males] were genotyped for *MBL2* exon 1 SNPs: single point mutation in codon 52 (Arg→Cys), 54 (Gly→Asp) and 57 (Gly→Glu), and *MASP-2* polymorphism Asp371Tyr (D371Y, A>C) (exon 9). A melting temperature assay was used to perform the genotyping of *MBL2* SNPs. The combination of variants of *MBL2* were grouped together as allele O, wild types were indicated as A. Exon 1 promoters were evaluated by direct genotype sequencing- alleles H/L, X/Y and P/Q (positions -550, -221 and +4, respectively). *MASP-2* exon 9 genotyping was performed by using TaqMan pre-developed assay. **RESULTS:** *MBL2*: 58.5% A/A, 36.39% A/O, 5.1% O/O; promoters: 13% H/H, 39% H/L, 48% L/L; 2% X/X, 26% X/Y, 72% Y/Y; 52% P/P, 37% P/Q, 11% Q/Q; haplotypes: 15% LXPA, 28% HYP A, 8% LYQO, 12% LYPO, 11% LYPA, 22% LYQA and 4% HYPO. *MASP-2*: 38.78% A/A, 44.56% A/C and 16.67% C/C. **CONCLUSION:** The prevalence (5.1%) of O/O genotype of *MBL2* exon 1 SNPs in our population is in accordance with Brazilian reports, similar to European (4%) and Japanese (5%); lower than Africans (10-14%). There is a correlation between MBL serum levels and genotyping. Moreover, this is the first report of D371Y MASP-2 polymorphism frequency in a Brazilian population. Our data may contribute to new insights on the role of MBL and MASP-2 in clinical conditions.

Keywords: 1. Mannose-binding lectin. 2. Complement pathway, mannose-binding lectin. 3. Mannose-binding protein-associated - associated serine proteases. 4. Genetic polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Complemento

O sistema complemento representa um dos mecanismos ativadores e amplificadores da imunidade humoral e inata, promovendo proteção contra invasão de microorganismos através de mecanismos dependentes e independentes de anticorpos. Consiste em um conjunto de proteínas séricas e de superfície celular que interagem entre si e com outras moléculas do sistema imune (Petersen et al., 2001b). Apresenta diversas funções: lise de células, bactérias e envelopes virais; opsonização e fagocitose, além da geração de fragmentos peptídicos que regulam as respostas inflamatórias e imunes.

A maioria das proteínas do sistema complemento está presente na circulação em sua forma inativa. Há três formas de ativação desta cascata, a primeira a ser descrita foi denominada de **via clássica**, que em condições fisiológicas, é ativada por complexos antígeno-anticorpo. A outra via de ativação é a **via alternativa**, que foi descoberta depois, mas, filogeneticamente, é mais antiga e não requer a presença de anticorpo para a sua ativação. A terceira forma de ativação foi descrita mais recentemente e é a **via da MBL** (*Mannan-Binding Lectin*) ou **via das lectinas** (Ikeda et al.,

1987). Esta, é ativada pela lectina ligadora de manose, um membro do grupo das colectinas que reconhece carboidratos das cápsulas de bactérias, vírus, fungos e protozoários. A via das lectinas é composta por cinco proteínas séricas, a MBL, as Proteases Séricas Associadas à MBL (MASP-1, MASP-2, MASP-3) e, mais recentemente, uma pequena proteína associada à MBL (*Small MBL Associated Protein* – sMAP): Map19 (FONTE: Garred et al., 2006, modificado. Figura 1).

FONTE: Garred et al., 2006, modificado.

Figura 1 – Ativação do sistema complemento e formação do complexo de ataque à membrana pela via das lectinas.

1.2 Via das Lectinas

1.2.1 Lectina Ligadora de Manose

A Lectina ligadora de Manose (MBL) é uma proteína sérica constituída por um polipeptídeo dividido em quatro domínios distintos: (1) um pequeno

domínio rico em cisteína, (2) seguido por um domínio de colágeno, (3) uma porção α -hélice chamada de pescoço (do inglês: *neck*) e (4) um domínio reconhecedor de carboidratos (FONTE: modificado de Wallis, 2002. Figura 2).

FONTE: modificado de Wallis, 2002

Figura 2 - Estrutura da MBL

A subunidade desta proteína é formada quando três polipetídios se associam (oligomerização) através das pontes dissulfetos formadas pela interação dos domínios ricos em cisteínas e a primeira porção do domínio de colágeno (Wallis, 2002), originando grandes estruturas proteicas que pela microscopia eletrônica se assemelham a um *bouquet* de tulipas (Figura 3). A MBL sérica constitui-se de uma mistura de oligômeros com 2-6 subunidades de 96-kDa, contudo, somente as moléculas de 4 (tetrâmeros) ou mais subunidades (pentâmeros e hexâmeros) parecem ativar o sistema complemento (Garred et al., 1992).

A reação de oligomerização acontece antes da MBL ser secretada, de forma que a MBL não possa mais interagir formando novas dimerizações (Wallis, 2002). A MBL circulante está ligada a um dos três diferentes zimogênios MASPs (MASPs-1,-2 e -3) e a uma pequena proteína não enzimática, a MAP-19 ou sMAP.

Figura 3 - Esquema da oligomerização da MBL/MASP-2

Por ser membro da família das colectinas (MBL, Conglutinina - BKg, Conglutinina e colectina -43, Proteínas Surfactantes Pulmonar -A e -D), a MBL é caracterizada pela presença de porção de colágeno, que é importante para manter sua integridade estrutural e um domínio de lectina, responsável pelo reconhecimento dos carboidratos (Holmskov et al., 1994; Weis et al.,

1998; Childs et al., 1989). As lectinas são proteínas que contêm estruturas capazes de se ligar a carboidratos (Domínios de Reconhecimento de Carboidratos - DRC) na presença de determinados íons. As lectinas que dependem dos íons cálcio para manter a ligação com o carboidrato e a integridade do DRC, são agrupadas na superfamília das lectinas Tipo C (cálcio dependente), que são, por sua vez, divididas em subgrupos dependendo de sua constituição e seletividade aos açúcares (manose, maltose, frutose, glicose, e N-acetil-D-glucosamina) (Weis et al., 1998).

As lectinas tipo C possuem maior afinidade para resíduos de açúcares contendo grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel piranose em uma orientação equatorial específica (horizontal) (Holmskov et al., 2003). Estes açúcares (manose, N-acetilmanosamida, N-acetilglucosamina, L-fucose, D-glicose) (Childs et al., 1989) são encontrados em abundância nas paredes de vários microorganismos. Vale citar que a galactose e o ácido siálico, que são glicoproteínas próprias, não possuem grupamentos C3-OH e C4-OH reconhecíveis pela MBL, desta forma, a MBL consegue distinguir os açúcares próprios dos não-próprios (Jack et al., 2001a). Os padrões dos três sítios de ligação ao açúcar de cada subunidade oferecem uma plataforma lisa, com distâncias constantes entre os o domínio reconhecedor de carboidrato e o pescoço (*neck*) -45Å (Ng et al., 2002). Estes sítios constantes e simultâneos são essenciais para a ligação da MBL às lectinas devido à constante de dissociação de cada interação separada do complexo "MBL-açúcares" ser relativamente baixa (10^{-3} M). Todos estes padrões facilitam a interação da MBL com a superfície de microorganismos

minimizando as chances de ligação com as células do hospedeiro. No homem, as glicoproteínas não estão arranjas numa forma repetitiva, e as distâncias entre os sítios de ligação são de 20-30Å (Jack et al., 2001a) (Figura 4).

A MBL é uma proteína de fase aguda secretada por hepatócitos. Os níveis de MBL aumentam 1,5 a 3 vezes após cirurgia (Thiel et al., 1992), trauma (Ezekowitz, 1998) e também aumentam após infecção.

A MBL pode ser detectada não só no soro, mas também em fluidos corpóreos incluindo secreção nasofaríngea, ouvido médio, líquido amniótico e fluido sinovial das articulações inflamadas (Holmskov et al., 1993).

FONTE: Janeway, 2005, modificado.

Figura 4 – Esquema da ligação entre MBL e carboidratos

Após a interação entre MBL e o carboidrato da superfície do patógeno, ocorre uma auto-ativação de MASP-2, com exposição de sítios de ligação para C4, ocorrendo posterior liberação de C4a e C4b, este se depositando na superfície do microorganismo sinalizando a fagocitose e neutralização da célula-alvo (Holmskov et al., 1994) (FONTE: Chen, Wallis, 2004, modificado. Figura 5).

Chen e Wallis (2004) propuseram o modelo de ativação de MBL/MASP-2 e reconhecimento de substrato, com a seguinte sequência de eventos:

FONTE: Chen, Wallis, 2004, modificado.

Figura 5 - Modelo de ativação de MBL/MASP-2

a) Ligação de MBL/MASP-2 em ligantes (manose) na superfície de patógeno.

- b) Ligação com o patógeno induz autoativação de MBL/MASP-2 expondo sítios de ligação acessórios para ligação com C4 levando ao recrutamento de C4 sérico.
- c) Mudança conformacional no sítio catalítico ativa MASP-2 e cliva C4.
- d) Anafilatoxina C4a é liberada enquanto que o fragmento C4b se liga covalentemente à superfície celular ou ao próprio complexo MBL/MASP-2.
- e) C2 se liga ao C4b e é clivado tanto pela MASP-2 ou pelos complexos MBL/MASP-1 (não mostrados).
- f) A C3 convertase resultante – C4bC2a ativa a cascata do complemento levando à neutralização da célula- alvo.

Teillet et al. (2007) demonstraram que a ligação entre MBL e MASP-2 ocorre através do aminoácido lisina posicionado na região 55 da cadeia de colágeno. A ativação da MASP-2 através da MBL se dá pelo aumento da autocatálise quando a MBL se liga a uma superfície ativadora (Wallis et al., 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 MASP-2, 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).

Em resumo, a MBL é uma proteína de fase aguda secretada por hepatócitos e participa da resposta imune inata; liga-se à superfície dos patógenos ricos em manose e a receptores específicos em fagócitos, agindo como opsoninas e induzindo fagocitose. Ainda, esta proteína pode eliminar microorganismos ativando a cascata de complemento e induzindo a lise do patógeno.

As funções descritas para MBL são:

- ❖ Ativação de complemento – MBL, por ser homóloga a C1q, pode ativar a via clássica do complemento pela ativação de $C1r_2C1s_2$ independente de C1q. Também ativa C4 e C2 após ligação entre complexo MBL-MASP-2 e superfícies ricas em carboidratos, levando à ativação de C3 pela ação da serino proteases associadas à MBL: MASP-2 (Thiel et al., 1997).
- ❖ Regulação – A região promotora do gene da MBL contém elementos responsivos à proteína de choque térmico e glicocorticóides, o que é característico das proteínas de fase aguda. Níveis de mRNA MBL aumentam após trauma. A MBL sérica é formada rapidamente, de minutos a horas após a infecção, antes da resposta imune humoral estar disponível. Além disso, complexos MBL-MASP interagem com α_2 -macroglobulina, inibidor de C1 esterase e outras serino proteases, com ação inibitória controlando a ativação da cascata do complemento (Turner, 1996).

- ❖ Inflamação – Os fragmentos C5a, C4a e C3a – estes dois últimos em menor potência – são importantes ativadores da inflamação induzindo a permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de fagócitos.
- ❖ Opsonização – A MBL age diretamente como opsonina recobrando a superfície do micróbio, rica em carboidrato, e promovendo a fagocitose (Hartshorn et al., 1993). Também interage com receptores de colectina e C1q em macrófagos (Sullivan et al., 1996; Summerfield et al., 1995).
- ❖ Eliminação de complexos imunes – MBL participe do *clearance* não inflamatório de complexos imunes. Desta forma, deficiência de MBL parece predispor ao desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Saevarsdottir et al., 2006). A solubilização dos complexos imunes ocorre pela ligação entre C4b e C3b do imunocomplexo e o receptor CR1 nas hemáceas, que por sua vez fazem seu transporte para o fígado e baço para serem fagocitados pelo sistema retículo-endotelial.
- ❖ Eliminação de células apoptóticas – A MBL se liga às células apoptóticas autólogas, presume-se que promova o *clearance* de debris celulares (Ogden et al., 2001).
- ❖ Eliminação de patógenos no líquido amniótico – Baixos níveis de MBL foram encontrados em mulheres com abortos recorrentes. Sugeriu-se que baixas concentrações de MBL na unidade feto-placentária aumentariam a suscetibilidade à perda fetal, mediada por desbalanço de citocinas induzido por infecção placentária (Kilpatrick et al., 1995).

1.2.2 MASP-2

A ativação do complemento pela via das lectinas, como já descrito, resulta da ligação da MBL e de ficolinas séricas que se ligam diretamente aos açúcares ou grupos N-acetil em patógenos e ativam as serino proteases associadas à MBL (**MBL-Associated Serine Proteases**) - **MASPs** (Wallis et al., 2007).

Três MASPs diferentes denominadas MASP-1 (Matsushita and Fujita, 1992), MASP-2 (Thiel et al., 1997) e MASP-3 (Dahl et al., 2001), assim como uma proteína não-enzimática associada à MBL de 19kDa (Map19) (Stover et al., 1999) podem se ligar à MBL e às ficolinas através do segmento N-terminal. Constituem proteases homólogas ao C1r e C1s da via clássica e apresentam dois domínios CUB (domínio encontrado no componente complemento **C1r/C1s**, **Uegf** e proteína morfogênica óssea -**Bone**, em inglês), separados por um domínio EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor-like), seguido de dois módulos CCP (**C**omplement **C**ontrol **P**rotein) e um domínio serino protease. MASPs geralmente circulam como zimógenos ligados à MBL.

Dímeros de MBL formam complexos 1:1 com MASPs, enquanto que trímeros e tetrâmeros se ligam a até dois dímeros de MASPs. Complexos MBL-MASP-2 são suficientes para disparar a ativação do complemento clivando C4 e C2 para formar a C3 convertase, que leva à liberação da anafilatoxina C3a e deposição de C3b na superfície da célula-alvo. C3b

sinaliza a célula alvo para fagocitose ou lise pelos fatores mais tardios do complemento.

Dentre as MASPs, apenas MASP-2 tem seu papel definido na ativação do complemento. Estudo recente mostrou que MASP-1 provavelmente apresenta função importante na fase inicial da ativação da via das lectinas, provavelmente ativando MASP-2 (Kocsis et al., 2010). A função de MASP-3 é desconhecida. MASP-1 cliva C2, mas não C4, assim parece amplificar a ativação do complemento iniciada pelos complexos MBL-MASP-2 (Takahashi et al., 2008; Chen and Wallis, 2004). MASP-3 não sofre auto-ativação, assim, provavelmente é ativada através de ação de alguma protease ainda não identificada (Wallis et al., 2007). Moller-Kristensen et al. (2007) sugerem que MASP-1 e MASP-2 cooperam entre si na formação da convertase C4b2a.

Atualmente, o consenso é de que MASP-2 é o principal iniciador da via das lectinas. Além disto, MASP-1 e MASP-2 ambos são capazes de promover o *turnover* de fibrinogênio diretamente pela clivagem do fibrinôgenio e indiretamente pela clivagem da protrombina, gerando trombina ativada (Krarup et al., 2007). Isto sugere que a polimerização da fibrina participaria como mecanismo efetor do sistema imune, ainda pouco conhecido.

1.2.3 Gene *MBL2*

O gene humano da MBL é denominado ***MBL2***. No entanto, um pseudogene denominado *MBL1* também está presente (Guo et al., 1998). Acredita-se que os genes *MBL1* e *MBL2* tenham sua origem de um ancestral comum, o gene MBL, por duplicação gênica (Sastry et al., 1995). Em camundongos, duas diferentes formas de MBL são codificadas por dois genes funcionais distintos denominados *mb1-a* e *mb1-c*, posicionados em diferentes cromossomos, 14 e 19, respectivamente (White et al., 1994), enquanto que os dois análogos humanos *MBL1PI* e *MBL2* respectivamente estão posicionados no cromossoma 10. *MBL1* e *MBL2* têm sido detectados em macacos Rhesus, enquanto que nos chimpanzés e humanos, a MBL é representada apenas pelo gene *MBL2* (Mogues et al., 1996).

O gene humano que codifica MBL (*MBL2*) localiza-se no braço longo do cromossoma 10 – 10q11.2-q21 (Sastry et al., 1989). É formado por 4 éxons e 3 íntrons (Taylor et al., 1989). O éxon 1 codifica toda a porção rica em cisteína e uma parte do domínio colágeno, apresenta sete cópias de Gly-Xaa-Yaa *motifs* típicos para a formação de tripla hélice das estruturas de colágeno. Este padrão se perpetua por 12 repetições adicionais de Gly-Xaa-Yaa no éxon 2. Os éxons 3 e 4 codificam a região do pescoço e do domínio reconhecedor de carboidrato (DRC) respectivamente (Figura 6). Esta última região reconhece não só carboidratos microbianos, como manose e N-acetilglucosamina, mas também, estruturas moleculares em células do hospedeiro apoptóticas incluindo ácidos nucleicos a metaloproteases,

meprin- α e *β* , de forma cálcio-dependente (Nauta et al., 2003; Palaniyar et al., 2004; Hirano et al., 2005).

Figura 6 - Estrutura da MBL: a) Gênica; b) Protéica e c) Trímico

Acredita-se que a região promotora do gene *MBL2* regule grande parte da expressão gênica da proteína (Arai et al., 1993). Contudo, cerca de 1kb acima (*upstream*) do éxon 1 há um éxon alternativo extra denominado éxon 0 que, de certa forma, é capaz de iniciar a transcrição do gene *MBL2* (Naito et al., 1999). Este éxon não é transcrito em proteína e a sua transcrição alternativa codifica um polipeptídeo MBL idêntico àquele predominantemente transcrito. Aproximadamente 10-15% da MBL produzida pelo fígado é originada da transcrição do éxon 0 (Seyfarth et al., 2006).

1.2.3.1 Polimorfismos do gene *MBL2*

O gene *MBL2*, localizado no braço q11.2-q21 do cromossoma 10, é formado por quatro éxons. Três pontos de mutação (polimorfismos de uma única base – SNPs) foram encontrados na região estrutural da molécula (códon 52, 54 e 57) resultando em três variantes alélicas chamadas de alelos D (troca de arginina por cisteína, rs5030737 – R52C), B (troca de uma glicina por ácido aspártico rs1800450 – G54D) e C (troca da glicina por ácido glutâmico rs1800451 – G57E), respectivamente. A forma selvagem é denominada A. Essas mutações ocorrem nos nucleotídeos 223 (C para T), 230 (G para A) e 239 (G para A) do éxon 1 para D, B e C, respectivamente (Steffensen et al., 2000). Em estudos epidemiológicos, estes alelos variantes são comumente agrupados no alelo denominado O. A região promotora apresenta sítios de ligação para transcrição de fatores envolvidos na regulação da resposta de fase aguda (Guardia, 2003). Polimorfismos adicionais foram descritos na região promotora do gene. Duas variações H e L, na posição –550, estão em desequilíbrio de ligação com X e Y, variantes da posição –221, e são encontrados em três haplótipos: HY, LY e LX (Madsen et al., 1995; Steffensen et al., 2000; Guardia, 2003) (Figura 7). O haplótipo HY é associado a altos níveis séricos de MBL; LY com níveis intermediários e LX aos níveis séricos mais baixos (Madsen et al., 1995; Steffensen et al., 2000). Haplótipos de indivíduos contendo a variante X resultam em níveis de MBL similares às variantes B, C e D (Madsen et al., 1995; Steffensen et al., 2000; Guardia, 2003). Os polimorfismos do *promoter* estão em desequilíbrio de ligação forte com os polimorfismos do éxon 1 do

gene MBL2, formando apenas 7 haplótipos comuns (HYPA, LYP A, LYQA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD) e 2 haplótipos raros (HXPA e LYPD), ao contrário dos 64 possíveis.

Estes três alelos variantes apresentam um efeito dominante nos níveis séricos de MBL, mesmo em caso de heterozigose, diminuindo os níveis funcionais de MBL em aproximadamente 90%. Contudo, a consequência da heterozigose para o alelo D é menos prejudicial do que para os alelos B e C.

Desta forma, mutações na região codificadora do gene afetam o nível sérico da proteína e baixas concentrações de MBL têm sido associadas a defeitos de opsonização e fagocitose, resultando em infecções de repetição em recém-nascidos e crianças (Steffensen et al., 2000; Guardia, 2003). Acredita-se que este defeito seja frequente na população geral (5 a 7%) sugerindo tratar-se da imunodeficiência primária mais comum (Jack et al., 2001a; Super et al., 1989).

NOTA: Na região promotora -550 e -221 localizam-se os polimorfismos H/L e X/Y, respectivamente. No éxon 1, na posição +4 está localizado o polimorfismo P/Q, nas posições 223, 230 e 239, estão os polimorfismos estruturais D, B e C, respectivamente e a presença de qualquer um deles implica no polimorfismo denominado "O".

Figura 7 - Representação dos Polimorfismos no gene *MBL2*

O genótipo MBL é um bom preditor da concentração sérica de MBL. Contudo, variantes homozogotas para genes estruturais podem produzir níveis de MBL tão baixos quanto àqueles produzidos por variantes dos *promoters* (Madsen et al., 1995). Homozigotos para as mutações estruturais geralmente têm concentrações muito baixas de MBL, assim como os indivíduos homozigotos para o haplótipo *LXPA*. Os haplótipos estão associados a concentrações progressivamente mais baixas de MBL sérica: *MBL2* HYPA > LYQA > LYPA > LXPA >> HYPD = LYPB = LYQC (Boldt et al., 2006). Além disto, dentro do mesmo genótipo, uma variação da

concentração da proteína pode ser encontrada entre diferentes indivíduos (FONTE: Garred et al., 2003. Figura 8).

FONTE: (Garred et al., 2003).

NOTA: 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.

Figura 8 - Concentrações séricas de MBL de acordo com o genótipo estrutural e da região promotora X/Y

As proteínas originadas da MBL variante (mutante) são instáveis, facilmente degradadas em formas oligoméricas menores (com menor avidéz pelos ligantes e com ineficaz ativação do complemento) e, provavelmente com meia-vida reduzida na circulação (Matsushita et al., 1995; Naito et al., 1999; Larsen et al., 2004). Isto culmina não só com a função reduzida, mas

também na redução absoluta da concentração de polipeptídios de MBL variantes na circulação (Figura 6).

A tabela 1 mostra a frequência dos genótipos de *MBL2* e sua relação com a concentração sérica da MBL na população europeia.

Tabela 1 - Concentração sérica de MBL na população europeia

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/LXP A</i>	11,76	1400	<i>LXP A/HYP D</i>	2,9	20
<i>HYP A/LYQ A</i>	11,76	2400	<i>LYQ A/HYP D</i>	2,9	800
<i>LXP A/LXP A</i>	10,29	200	<i>LYP B/LYP B</i>	2,9	20
<i>LYQ A/LXP A</i>	8,8	1000	<i>HYP A/LYP A</i>	2,9	1900
<i>LYQ A/LYQ A</i>	8,8	1900	<i>HYP A/LYP B</i>	1,4	300
<i>HYP A/LYP B</i>	7,3	400	<i>LYP A/HYP D</i>	1,4	600
<i>LYQ A/LYP B</i>	4,4	300			

FONTE: Kilpatrick, 2002.

NOTA: 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 europeia.

A frequência dos três alelos variantes de *MBL2* apresenta-se de forma diferente nas populações (Tabela 2 e Tabela 3).

O alelo *B* é virtualmente ausente na região oeste da África Sub-Sahariana e ocorre em baixa frequência na África do Norte e do Leste, mas é comum entre os caucasianos (frequência alélica 0,12-0,14) e asiáticos (frequência alélica de 0,11-0,23). A frequência nos índios sulamericanos

pode exceder a 0,50. Em constraste, o alelo *C* é muito comum nos africanos do Sub-Sahara (0,10-0,30), raro entre os caucasianos (menos que 0,03), e ausente entre os asiáticos e índios americanos. A frequência do alelo *D* é menor que os outros dois e parece estar restrito aos caucasianos e populações do leste africano (frequência alélica de 0,06-0,08).

No Brasil, há poucos dados sobre prevalência da deficiência e MBL e MASP-2. Araujo et al. (2007) verificaram a presença de genótipo mutante (O/O) em 6,1% do grupo controle em relação a pacientes com diabetes tipo 1 (10,75%), sugerindo risco maior para o desenvolvimento da doença na infância.

Tabela 2 - Frequência do genótipo estrutural *MBL2* e alelos em diferentes populações

Grupos étnicos	Frequências genótipos (%)					Frequências alélicas		
	A/A	A/B	A/C	A/D	O/O	pB	pC	pD
Europeus								
Dinamarca	60	21	5	10	4	0,12	0,03	0,06
Inglaterra	60	23	3	10	4	0,14	0,02	0,07
Africanos Sub-Sahara								
Quênia (Leste África)	51	6	23	6	14	0,03	0,24	0,05
Gana (Oeste África)	47	1	42	Ne	10	0,004	0,32	0
Namíbia	79	6	14	Ne	1	0,03	0,07	0
Xhosa (Sul África)	51	0	44	Ne	5	0	0,27	0
Asiáticos								
China (Hong Kong)	78	20	Ne	0	2	0,11	0	0
Japão (Kyoto)	59	36	Ne	Ne	5	0,23	0	0
Austrália e Oceania								
Nova Guiné	97	3	Ne	Ne	Ne	0,01	0	0
Austrália	100	Ne	Ne	Ne	Ne	0	0	0
Americanos								
Groenlândia (Esquimós)	78	18	Ne	Ne	4	0,12	0	0
Argentina (Ameríndios Chiriguano)	30	56	Ne	Ne	14	0,42	0	0
Peru (Ameríndios Quechua)	7	28	Ne	Ne	65	0,80	0	0
Brasil*	49,5	20,9	5,7	3,3	9,5	0,21	0,06	0,03

FONTE: *Messias-Reason et al., 2006; Garred, 2008.

NOTA: A corresponde ao alelo *MBL2* normal, B ao alelo do codon 54, C corresponde ao alelo do codon 52. O/O indica qualquer combinação entre os alelos variantes estruturais. (Ne = não encontrados).

Tabela 3 - Frequência dos haplótipos *MBL2* em diferentes populações

População	N	<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>	Homozigotos 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

FONTE: Adaptado de (Madsen et al., 1998a). *Tribos indígenas argentinas.

NOTA: 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.

Brandão et al. detectaram a presença de deficiência de MBL em 6% dos seus controles, em relação a pacientes com dermatite atópica (19%) (Brandao et al., 2008b). Brandão et al. também avaliaram um grupo maior, incluindo 529 controles, estudando diabetes tipo 1 e 5,7% destes controles apresentavam genótipo O/O para *MBL2* (Brandao et al., 2008a). Schafranski et al. (2008) encontraram em controles 6,8% mutantes para MBL, comparando com pacientes com cardite por febre reumática (2,8%). Ramasawmi et al. descreveram 5% do grupo controle de 281 indivíduos apresentavam homozigose mutante de *MBL2* quando comparado aos 90 pacientes com insuficiência aórtica (16%) causado de origem reumática.

Boldt et al. (2006) avaliaram polimorfismo de *MBL2* em várias populações brasileiras, destacamos a da população de brasileiros misturados, descritos como “admixed Brazilian”, sem caracterização étnica definida, que apresentou prevalência de 8% (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência alélica do genótipo *MBL2* em indivíduos saudáveis no Brasil

População	N	A/A	A/O	O/O	A	O
Crianças ^a	214	142 (66,3%)	59 (27,6%)	13 (6,1%)	343 (80,1%)	85 (29,86%)
Adultos ^b	529	354 (66,9%)	145 (27,4%)	30 (5,7%)	853 (80,6%)	205 (19,4%)
Adultos ^c	165	110 (67%)	45 (27%)	10 (6%)	265 (80%)	65 (20%)
Adultos ^d	147	83 (56,4%)	54 (36,7%)	10 (6,8%)	220 (74,8%)	74 (25,1%)
Adultos ^e	281	176 (63%)	91 (32%)	14 (5%)	443 (79%)	119 (21%)
Adultos ^f	107	59 (55%)	40 (37%)	8 (8%)	158 (74%)	56 (26%)

FONTE: a) Araujo et al., 2007; b) Brandao et al., 2008a; c) Brandao et al., 2008b; d) Schafranski et al., 2008; e) Ramasawmy et al., 2008; f) Boldt et al., 2006.

O sequenciamento do *promoter* do gene *MBL2* revelou ser altamente polimórfico e em três posições, em particular, há associação com diferentes níveis de MBL, independentemente dos alelos variantes estruturais da MBL (Madsen et al., 1995; Madsen et al., 1998a). Os três polimorfismos estão localizados nas posições -550 (variante H/L troca de G para C, rs 11003125), -221 (variante X/Y, troca de C para G, rs 7096206) e na porção 5' – não transcrita do éxon 1, na posição +4 (variante P/Q, troca de C para T, rs 7095891). O alelo variante X, no locus -221 do *promoter* é o que apresenta o maior efeito de *down-regulation* entre os três variantes do *promoter* descritos.

Mutações nesta região promotora, que codifica o domínio colágeno-*like*, parecem interferir na habilidade da proteína em formar multímeros estáveis e funcionais (Sumiya et al., 1991; Kurata et al., 1993 Lipscombe et al., 1995).

1.2.3.2 Genotipagem de SNPs por PCR em tempo real através da curva de *melting*

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real é utilizada em diferentes contextos, dentre elas a detecção de SNPs e, particularmente, para quantificação e genotipagem de ácidos nucleicos. Consiste em aplicar o DNA ou RNA, quando precedida de uma transcrição reversa (RT) de um RNA incubado entre 42 – 55°C.

O processo da PCR pode ser dividido em três fases. Primeiro, o DNA de fita dupla é desnaturado em temperatura acima de 90°C, em seguida os *primers* de oligonucleotídeos anelam (pareiam) geralmente entre 50-60°C e, finalmente, a temperatura ótima de extensão do *primer* ocorre entre 70-78°C. A temperatura em que o *primer* se anela ao DNA molde geralmente é referida como Temperatura de anelamento. Esta é a temperatura em que é formado 50% do dímero, oligoneucleotídeo-sequência alvo. No caso da PCR em tempo real, o oligonucleotídeo poderia representar um *primer* ou uma sonda marcada. A temperatura de anelamento difere da T_M e pode ser calculada a partir da T_M : $T_{anneal} = T_M \text{ primer} - 4^\circ\text{C}$ (Mackay, 2004).

A peculiaridade da PCR em tempo real é que o processo de amplificação é monitorizado em tempo real usando técnicas de fluorescência, sem necessidade de uma manipulação pós-PCR (Wilhelm et al., 2003).

Corantes específicos, dentre eles o SYBR Green tem sido incluídos na mistura da PCR, permitindo a quantificação do produto da PCR durante o

processo de amplificação. A fluorescência é monitorada uma vez a cada ciclo e ultrapassa o background de fluorescência no número de ciclos que é dependente da concentração do template inicial. Por outro lado, este corante detecta todos os DNAs de dupla fita, incluindo dímeros de primers e outros produtos indesejados. A especificidade da detecção é dependente da especificidade da amplificação, e não há verificação do produto final (Ririe et al., 1997).

O SYBR Green é um dos métodos mais empregados para realizar a análise de PCR em tempo real. Constitui um corante se que liga a alça menor do DNA dupla fita. Quando esta ligação ocorre, a intensidade da emissão fluorescente aumenta. Quanto mais *amplicons* de dupla fita forem produzidos, maior será o sinal do corante (Kubista et al., 2006; Valasek, Repa, 2005).

A análise da curva de *melting*, uma tecnologia revolucionária patenteada pela Roche Applied Science, baseia-se na adição de um corante ou sonda de oligonucleotídeo sequência-específica, marcados com fluorescência durante as fases da reação em cadeia da polimerase. Após a PCR, uma curva de *melting* é gerada por um aquecimento lento e gradativo da dupla fita amplicon/corante (heteroduplex) medindo a mudança na fluorescência que resulta quando a sonda desnatura, ou *melts*, fora do *amplicon* (Roche Applied Science).

Cada DNA tem sua temperatura de *melting* específica (T_m), que é definida como a temperatura em que 50% do DNA torna-se fita simples. Esta

temperatura é determinada pelo comprimento da fita dupla de DNA, proporção de GC (T_m é maior em fragmentos ricos em GC), e o grau de complementaridade entre as fitas (exemplo, especialmente importante entre fitas heteroduplex) (Arraes et al., 2006; Pryor, Wittwer, 2006).

1.2.4 Deficiência de MBL

A concentração de MBL sérica na população geral apresenta grande variabilidade na circulação, de 20ng/mL a 10.000ng/mL (Steffensen et al., 2000). Os níveis parecem relacionar-se com a idade, sendo baixos ao nascimento, quando comparados aos adultos e atinge níveis de adulto nas primeiras semanas de vida (Teraï et al., 1993; Thiel et al., 1995; Kilpatrick, 1997). Crianças pré-termo apresentam 60% dos níveis das crianças de termo (Lau et al., 1995). Baixos níveis de MBL e a presença de mutações no seu gene têm relação com infecções graves e recorrentes, *déficit* pôndero-estatural e diarreia crônica na infância (Summerfield et al., 1997).

As nomenclaturas “deficiência” e “insuficiência” de MBL são geralmente usadas, apesar de não serem bem definidas. Originalmente, o termo deficiência se referia à concentração muito baixa de MBL, prejudicando a capacidade de opsonizar fungos; este nível foi detectado em 5-10% dos adultos saudáveis (Kilpatrick, 2002; Soothill, 2002).

Quando a via das lectinas foi descrita pela primeira vez, estimava-se que 5-7% da população seria afetada (Soothill, Harvey, 1976). Atualmente, a

deficiência tem sido geneticamente definida pela presença de haplótipo associado à diminuição dos níveis de MBL (Madsen et al., 1995; Summerfield et al., 1997). Ainda, já está descrito quais as combinações de haplótipos que produzem altos níveis de MBL (*High producers*), níveis baixos (*Low producers*) e níveis séricos deficientes (*Deficient producers*) de MBL (Tabela 5) (Bouwman et al., 2006). Cerca de 4% da população são homozigotos para mutações estruturais que impedem a formação de oligômeros de MBL necessários para a atividade funcional e constituem o grupo de deficientes totais de MBL (Super et al., 1989). Aproximadamente 5,3% da população finlandesa apresentam níveis indetectáveis de MBL e a maioria é assintomática (Aittoniemi et al., 1996; Turner, 1996). Outros estudos apontam que 5% dos caucasianos apresentam diminuição sérica de MBL (Holmskov et al., 2003; Garred et al., 2003; Terai et al., 2003; Casanova, Abel, 2004). Kilpatrick (2002) descreveu que 10% da população apresenta deficiência de MBL, tornando-se a mais frequente das imunodeficiências. Contudo, a deficiência de MBL como fator único não parece ser fator de risco para morbimortalidade na população caucasiana adulta, segundo avaliação feita em 9245 indivíduos por Dahl et al. (2004).

Tabela 5 - Combinação dos haplótipos do gene *MBL2* e produção de MBL

Alta produção (High producer)	Baixa produção (Low producer)	Produção deficiente (Deficient producer)
HYPA/HYPA	LXPA/LXPA	LXPA/HYPO
LXPA/HYPA	LYPE/LYPO	LYPO/HYPO
LXPA/LYPE	HYPA/HYPO	LYQO/LYQO
LXPA/LYQA	LYPE/HYPO	HYPO/HYPO
LYPE/HYPA	LXPA/LYQO	LYQO/HYPO
LYPE/LYQA	LYPE/LYQO	LYPO/LYPO
LYQA/LYQA	LYQA/LYQO	LYPO/LYQO
LYPE/LYPE	LYQA/HYPA	
	LYQA/HYPO	

1.2.5 Gene MASP-2

O gene da MASP-2 localiza-se no cromossoma 1p36.23-31, sendo constituído por 12 exons e 6 domínios. A proteína resultante constitui um zimógeno que será ativado durante a ligação entre MBL e MASP-2 na superfície do patógeno. Três tipos de MASPs foram descritas: MASP-1, MASP-2 e MASP-3. As MASPs são similares aos componentes C1r e C1s do complexo C1q. A estrutura gênica da MASP-2 é constituída por 1 domínio CUB-1 (**C**1r/C1s na porção N-terminal, seguida de um domínio **U**egf, um domínio proteína óssea (**B**one) morfogenética-1), seguido de um domínio EGF (fator de crescimento epidermal-*like*), um segundo domínio CUB, dois domínios de proteínas controladores de complemento (CCP1 e CCP2) e um domínio serino protease (Figura 9). Quando ocorre a ligação da MBL ao alvo, o complexo MBL-MASP-2 é capaz de clivar C2 e C4, gerando C3

convertase e, desta forma, dando sequência à cascata do sistema complemento (FONTE: Garred et al., 2006, modificado. Figura 1)

FONTE: Thiel et al., 2007; Sorensen et al., 2005.

NOTA: Posições de troca dos aminoácidos e a duplicação *tandem* no gene MASP-2. A numeração se refere à proteína incluindo a sequência inicial (sequência *leader*) de 15 aminoácidos. O comprimento dos domínios foram desenhados proporcionalmente ao número de aminoácidos nos domínios. Ex.: D371Y – ocorre a troca de um D (aspartato) para T (tirosina), na posição 371 do aminoácido.

Figura 9 - Estrutura gênica da MASP-2

1.2.5.1 Polimorfismos do gene MASP-2

Diversos polimorfismos foram descritos no gene da MASP-2. A mutação no éxon 3 do gene da MASP-2 foi, primeiramente descrita, como associada a manifestações clínicas, por Stengaard-Pedersen et al. (2003). Estes autores verificaram troca do aminoácido ácido aspártico (GGC) para glicina (GAC) no resíduo 120 (D120G), na posição 105 do domínio CUB1 da proteína madura. Como consequência, a MASP-2 é incapaz de se ligar aos

íons de cálcio, impedindo sua interação com MBL, prevenindo desta forma a ativação completa da via das lectinas, e reduzindo a concentração de MASP-2 no plasma.

Lozano et al. (2005) avaliaram o polimorfismo no éxon 3 do gene da MASP-2 em diferentes populações, tendo descrito 3 novas mutações: uma em população africana do sub-Sahara R99Q (Arg84Gln); e duas em africanos do norte da Arábia: R118C (Arg103Cys) e P126L (Pro111Leu). Desta forma, as variações do gene da MASP-2 apresentam uma distribuição geográfica muito evidente. O efeito destas mutações na função de MASP-2 não é bem conhecido.

Thiel et al. avaliaram polimorfismos de MASP-2 em várias populações (chineses, caucasianos africanos, ameríndios e Inuits da Groenlândia) (Tabela 6) para os alelos, a saber: p.R99Q, p.R118C, p.D120G, e p.P126L, que haviam sido avaliados somente em dinamarqueses e espanhóis. Neste estudo também foi identificada uma duplicação *tandem* de 4 aminoácidos, 156_159dupCHNH no domínio EGF da MASP-2 (Thiel et al., 2007).

Tabela 6 - Nomenclatura dos polimorfismos da MASP-2

Alelo	Id. SNP	mRNA NM_006610	Autor
p.R99Q	—	c.296G>A	Lozano et al. (2005)
p.R118C	—	c.352C>T	Lozano et al. (2005)
p.D120G	—	c.359A>G	Stengaard-Pedersen et al. (2003)
p.P126L	—	c.377C>T	Lozano et al. (2005)
p.H155R	rs2273343	c.464A>G	Thiel et al. (2007)
p.156_159dupCHNH	—	c.466_477dupTGCCACAACCAC	
p.D371Y	rs12711521	c.1111G>T	
p.V377A	rs2273346	c.1130T>C	Stover et al.(2001)
p.R439H	rs12085877	c.1316G>A	

FONTE: Thiel et al., 2007.

NOTA: Na escrita c.1111G>T, o 1111 corresponde à posição do cDNA no mRNA NM_006610, contando a partir da metionina do codon iniciador. Isto leva à troca do ácido aspártico por tirosina no resíduo 371 (p.D371Y) quando numerado de acordo com o produto translacional.

Outros polimorfismos estão descritos na base de dados NCBI SNP: H155R (rs2273343), R439H (rs12085877) e ainda não foram avaliados quanto à frequência em populações (Tabela 7).

O polimorfismo rs12711521 A>C (*RefSNP Genotype Survey*) localiza-se no éxon 9 do braço curto do cromossoma 1 (1p36.3-p36.2), consiste na troca de um ácido aspártico por tirosina na posição 371 – D371Y (Asp371Tyr) - na primeira porção da CCP2. Não há estudos sobre a frequência deste polimorfismo no Brasil. Na literatura mundial há dois trabalhos de avaliaram este polimorfismo, um italiano (Segat et al., 2008) e outro chinês (Wang et al., 2009). O trabalho italiano não encontrou associação entre presença deste polimorfismo e hepatocarcinoma,

independente de infecção pelo vírus da hepatite B, C ou outros fatores externos (n=215, 5% C/C) e o estudo chinês não encontrou correlação entre a presença deste polimorfismo e suscetibilidade a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) por coronavírus em populações do norte (n=272, 11% C/C) e do sul (n=104, 9,6% C/C).

Messias-Reason et al. (2008) avaliaram níveis séricos de MBL e MASP-2 em pacientes com pênfigo foliáceo endêmico (PFE), uma doença de caráter auto-imune. Neste trabalho, não foram avaliados os polimorfismos destes pacientes. Os pacientes com pênfigo (n=114) apresentaram aumento não significativo dos níveis de MBL e 6,1% deles apresentaram deficiência de MASP-2, enquanto que 16% dos controles (n=100) apresentaram deficiência de MBL e 3% deles, deficiência de MASP-2. Estes dados indicam que deficiência de MBL e MASP-2 não estão associados à suscetibilidade ao PFE.

Tabela 7 - Frequências do genótipo MASP-2 em populações

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

FONTE: Thiel et al., 2007.

1.2.5.2 Genotipagem de SNPs de MASP-2 por PCR em tempo real – *TaqMan*

Inicialmente, para a detecção dos produtos de PCR em tempo real, foram desenvolvidos corantes, já descritos anteriormente. A plataforma *TaqMan* baseia-se na utilização de sonda de hibridização marcadas com fluoróforo com atividade da *TaqPolymerase* na região 5'. O desenvolvimento de sondas específicas permite a detecção, também específica, para o produto de amplificação do DNA.

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 da exonuclease 5' da *Taq* DNA polimerase, a sonda é degradada, ocorrendo a separação do *quencher* e do fluoróforo (Figura 10), 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. A leitura da fluorescência gerada durante as reações de amplificação é feita através de aparelho específico do fabricante (Applied Biosystems) e a determinação dos genótipos é obtida com o Sistema de Detecção de Sequências (*SDS*, Applied Biosystems).

FONTE: http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologies/Real-TimePCR/TaqManvsSYBRGreenChemistries/index.htm.

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

Figura 10 - Clivagem da Sonda *TaqMan*®.

1.2.6 Deficiência de MASP-2

O complexo MBL-MASP-2 íntegro tem especial importância no mecanismo de defesa inato mediado por complemento (Neth et al., 2002). Contudo, há raros estudos sobre deficiência de MASP-2 e suas manifestações clínicas no que se refere ao rs 12711521.

A deficiência de MASP-2 associada à mutação no éxon 3 (D105G, também denominada D120G incluindo o peptídeo sinal) foi avaliada em uma população Dinamarquesa sadia de 100 pacientes, e a frequência alélica foi de 5,5% (Lozano et al., 2005). Carlsson et al. (2005) demonstraram ser de 1,3% a frequência alélica desta mutação em homozigose em uma população de 200 indivíduos sadios em estudo sobre fibrose cística. Sorensen et al.

(2005) avaliaram 492 dinamarqueses e encontraram 3,6% de alelos mutantes e uma frequência estimada de 1 em cada 1.000.

1.2.7 Estudos de associação clínica de doenças relacionadas à deficiência de MBL

A deficiência de MBL foi reconhecida, inicialmente, em 1968, por Miller et al., que descreveram uma criança de 3 meses de idade, do sexo feminino, com quadro de eczema refratário, déficit pômbero-estatural e diarréia recorrente (Miller, 1968). A avaliação laboratorial demonstrou deficiência na capacidade fagocítica, sem alteração nos demais exames imunológicos avaliados (CH50). Este caso clínico representou, provavelmente, o primeiro relato de deficiência de MBL.

Em 1976, Soothill e Harvey avaliaram 11 crianças e seus familiares, com quadro de infecções de repetição e detectaram um defeito semelhante na opsonização de partículas fúngicas, porém, com manifestações clínicas diferentes (Soothill, Harvey, 1976). Em 1989, Super et al. identificaram, pela primeira vez, a deficiência sérica de MBL, usualmente relatada em crianças e também observada em indivíduos adultos. A otite média, a diarréia crônica e a meningite foram descritas como as infecções mais comuns nesta deficiência, isolando-se nos pacientes patógenos como *S. aureus*, *N. meningitidis*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Candida* (Summerfield et al., 1995; Aittoniemi et al., 1998). Estima-se que, cerca de 5 a 7% dos indivíduos da população geral sejam acometidos por deficiência de MBL, o

que resultaria na imunodeficiência primária mais comum (Super et al., 1989; Jack et al., 2001a).

Summerfield et al. (1997) e Koch et al. (2001) avaliaram os níveis de MBL em crianças e verificaram correlação de níveis baixos com ocorrência de infecções. Kakkanaiyah et al. (1998) demonstraram que baixas concentrações de MBL constituíam fator de risco em mesma proporção nos adultos e nas crianças com infecções recorrentes. As evidências sugerem uma relação entre baixos níveis de MBL e suscetibilidade geral para doenças infecciosas, mas há controvérsias. Recentemente, pacientes com alelos mutantes homozigotos para MBL foram identificados como sendo mais suscetíveis à doença pneumocócica invasiva (Roy et al., 2002).

Sugeriu-se que a insuficiência de MBL somente torna-se clinicamente relevante no contexto de outra deficiência imunológica coexistente. Esta abordagem não foi totalmente confirmada ou refutada. Primeiramente, é verdadeiro que a maioria dos indivíduos na população geral com baixos níveis de MBL ou mesmo níveis muito baixos são saudáveis. Ainda, sintomas clínicos decorrentes da deficiência de MBL foram encontrados em associação com defeitos imunológicos bem estabelecidos: deficiência de subclasses de IgG (Aittoniemi et al., 1998; Dowd, 2007; Krishnaswamy, 2009), defeito de quimiotaxia (Ten et al., 1999) e neutropenia induzida por quimioterapia (Neth et al., 2001; Peterslund et al., 2001). Terceiro, algumas vezes é descrito um fator de risco maior no contexto da doença (imunodeficiência secundária) do que na população geral. Por exemplo,

descreveu-se a associação de baixos níveis de MBL e pneumonia em pacientes com LES (RR = 67,5) (Garred et al., 1999a); diarreia por *Cryptosporidium* em pacientes com AIDS (RR = 8,2) (Kelly et al., 2000); pneumonias bacterianas em pacientes com AIDS (RR = 3,9) (Hundt et al., 2000); e infecção por *Burkholderia cepacea* em pacientes com fibrose cística (RR = 14,9) (Garred et al., 1999b). Destaca-se o interessante achado de que a insuficiência de MBL (tanto no doador como no receptor) é um fator de risco após transplante de medula alogênico. E ainda, baixos níveis de MBL e condições de imunossupressão pré e pós-transplante são aditivos nesta situação (Mullighan et al., 2002).

As concentrações de MBL podem não só afetar a suscetibilidade, mas também influenciar o curso de doenças e, desta forma, a dosagem dos níveis de MBL poderia ter um valor prognóstico (Tabelas 5, 6, 7). Uma das doenças mais estudadas neste aspecto é a artrite reumatóide. Deficiência de MBL foi encontrada na maioria dos doentes com pior evolução clínica (Kilpatrick, 1997; Stanworth et al., 1998). Os cinco estudos de MBL em artrite reumatóide que consideram progressão de doença e gravidade, concordam que a insuficiência de MBL é positivamente associada a sintomas clínico-radiológicos indicando prognóstico ruim (Graudal et al., 1998; Ip et al., 1998; Garred et al., 2000; Jacobsen et al., 2001; Saevarsdottir et al., 2001).

Achados similares têm sido descritos na fibrose cística. Os achados sugerem que a deficiência de MBL poderia predispor à doença pulmonar mais grave nestes pacientes e um estudo indica um risco três vezes maior

de doença em estágio terminal e média de expectativa de vida diminuída em 8 anos. Parece que a *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno respiratório mais comum na fibrose cística) evade o sistema imune assumindo um fenótipo mucóide formando um biofilme resistente a antibiótico (Drenkard, Ausubel, 2002; Worlitzsch et al., 2002). A aparente impossibilidade de ligação da MBL e *P. aeruginosa* sensível a antibiótico pode ser irrelevante (Davies et al., 2000). A lactoferrina, componente do sistema imune inato, tem propriedades anti-biofilme de *Pseudomonas* (Singh et al., 2002) e é possível que a MBL se comporte da mesma maneira. Por outro lado, Carlsson et al. (2005) avaliaram relação entre MBL e fibrose cística e concluíram que a disfunção da via das lectinas, secundária à deficiência de MBL ou deficiência parcial de MASP-2, não influencia a evolução destes pacientes.

Na Síndrome de Sjögren, os pacientes com genótipos variantes de MBL apresentam doença sistêmica e imunológica menos exuberante comparando-se com os outros genótipos (Ramos-Casals et al., 2009). Não houve diferença quanto aos níveis de MASP-2 (D120G) entre os pacientes (n=81) e os controles (n=104). Vale citar que a prevalência do haplótipo O/O (*MBL2*) nos pacientes foi de 15% e nos controles foi de 8%.

No diabetes tipo 1, os pacientes com polimorfismos no gene *MBL2* e consequente diminuição sérica de MBL seriam mais suscetíveis aos agentes infecciosos e poderiam levar à destruição das células β ou ativação do sistema imune. Por outro lado, a MBL poderia modular a gravidade do diabetes tipo 1: altos níveis de MBL ao diagnóstico ou durante a evolução da

doença poderiam ser um fator de risco e/ou marcador para o desenvolvimento de complicações crônicas (Araujo et al., 2007).

No curso da febre reumática, a deficiência de MBL parece predispor à insuficiência aórtica (Ramasawmy et al., 2008) e mitral (Messias Reason et al., 2006). Discute-se de que a MBL teria implicações diferentes, num primeiro momento, confere proteção contra infecção pelo *Streptococcus* do grupo A e, por outro lado, provúoca resposta inflamatória na fase crônica da doença, levando à lesão valvar.

Lúpus eritematoso sistêmico (LES): mutações nos códons 54 e 57 aumentam a susceptibilidade ao LES, a presença de variantes do gene *MBL2* aumenta o risco de atividade da doença e de complicações infecciosas (Garred et al., 2001).

Doença pneumocócica invasiva também foi motivo de estudo clínico para verificar relação entre os sorotipos do *Streptococcus pneumonia* na doença invasiva, e variantes genéticas de MBL (éxon 1) e MASP-2 (éxon 3). Pacientes com genótipos variantes de MBL foram associados à presença de doença pneumocócica invasiva produzida por sorotipos de baixa virulência (OR 5,55, 95% CI 1,4-21,9; p=0,01) (Valles et al., 2010)

A deficiência de MBL confere um fator de proteção para processos inflamatórios e auto-imunes (Casanova, Abel, 2004) e tem sido confirmada em estudos posteriores:

- a) A presença de haplótipos variantes ao longo do globo sugerem que a presença de genótipos com baixa produção de MBL parece ser benéfica e não o contrário (Verdu et al., 2006);
- b) Em situação normal, a MBL não reage com o tecido do hospedeiro, mas pode se depositar em superfícies celulares alteradas secundárias ao *stress* oxidativo, ativando o complemento (Collard et al., 2001). MBL mostrou agravar injúria isquêmica em infarto agudo do miocárdio (Jordan et al., 2001); além disto, a diminuição da inibição do complemento com uso de inibidor de C5 significativamente reduziu a mortalidade após intervenção coronária em pacientes com infarto (Granger et al., 2003).
- c) Baixos níveis de MBL parecem ter efeito protetor a algumas infecções intracelulares como tuberculose (Soborg et al., 2003) e leishmaniose (Alonso et al., 2007; Ambrosio, 2005).

O gene selvagem *MBL2* produz grande quantidade de MBL sérica, contribuindo para a eficiente opsonização de parasitas e micobactéria, o que potencialmente estimula a disseminação hematogênica e a internalização na célula destes organismos (Garred et al., 1992). Assim, indivíduos que apresentam níveis séricos baixos de MBL podem ter uma vantagem sobre aqueles com níveis de MBL normais, que seriam mais suscetíveis à doença por *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 8). A hipótese que explica a vantagem de seleção dos polimorfismos da MBL surgiu de estudos populacionais descrevendo uma alta frequência de mutação nos genes estruturais da MBL em áreas geográficas onde infecção por micobactéria é

endêmica. Por exemplo, o alelo B é encontrado em 42%-46% dos Chiriguaios e Mapuches da América do Sul (Madsen et al., 1998a); nos dinamarqueses e esquimós da Groenlândia em 12% (Garred et al., 2006). O alelo C é mais comum em populações do sub-Sahara africano do que em caucasóides, presente em 23%-29% dos indivíduos na Gâmbia e Quênia (Lipscombe et al., 1992; Madsen et al., 1994; Turner et al., 2000) e somente 3% na Austrália (Minchinton et al., 2002) (Tabela 2). O alelo D é incomum em todos os grupos estudados (Garred et al., 2006) e estes indivíduos apresentam níveis de MBL significativamente maiores que os indivíduos com alelos A/C e A/B (Minchinton et al., 2002).

Ambrosio (2005) demonstrou que a ligação aos parasitas da *Leishmania brasiliensis* não induz ou altera a lise mediada pelo complemento. É provável que a deposição de MBL nas superfícies promastigota e amastigota favoreçam a sua opsonização e fagocitose e, consequentemente, o seu escape da lise pelo complemento.

No que se refere à doença meningocócica, a MBL estimula a fagocitose e morte da *Neisseria meningitidis* por neutrófilos, macrófagos e monócitos, aumenta a capacidade de eliminação deste organismo enquanto modula a resposta imune com menor produção de citocinas pró-inflamatórias (Jack et al., 2001b). A ligação da MBL à *N. meningitidis* é máxima na ausência de resíduos terminais de ácido siálico. A associação entre alelos variantes de MBL e suscetibilidade à doença meningocócica foi demonstrada por Hibberd et al. (1999). (Tabela 8).

Tabela 8 - Correlação entre doenças e MBL

Doenças versus Deficiência de MBL	Referência
Deficiência de MBL confere proteção a:	
Leishmaniose	Alonso et al., 2007
Hanseníase forma lepromatosa	Dornelles et al., 2006
Sjögren	Ramos-Casals et al., 2009
Tuberculose	Soborg et al., 2003
Doença cardíaca reumática	Messias Reason et al., 2006; Schafranski et al., 2004
Malária grave (<i>P. falciparum</i>)	Luty et al., 1998
Filariose	Choi et al., 2001
Deficiência de MBL predispõe a:	
Dermatite atópica	Brandao et al., 2008b; Brandrup et al., 1999; Richardson et al., 1983
Aterosclerose	Madsen et al., 1998b
Diarréia crônica da infância	Candy et al., 1980
Fibrose cística	Garred et al., 1999b
Doença pneumocócica invasiva	Roy et al., 2002
Injúria de isquemia-reperfusão	Collard et al., 2001
HIV	Garred et al., 1997; Nielsen et al., 1995
Malária	Luty et al., 1998
Doença meningocócica	Hibberd et al., 1999
Otite média	Richardson et al., 1983
Abortos recorrentes	Kilpatrick et al., 1995; Kruse et al., 2002
Artrite reumatóide	Graudal et al., 1998; Saevarsdottir et al., 2001
Lúpus eritematoso sistêmico	Garred et al., 2001
Hepatite viral	Matsushita et al., 1998; Thomas et al., 1996
Imunodeficiência comum variável	Mullighan et al., 2000
Dermatomiosite	Werth et al., 2002
Doença pneumocócica invasiva	Roy et al., 2002
Herpes vírus tipo 2	Gadjeva et al., 2004
HPV	Guimaraes et al., 2008; Segat et al., 2009
Diabetes tipo 1	Brandao et al., 2008a
Hepatite B	Brown et al., 2007
Hepatite C	Segat et al., 2007
Herpes simples-meningite Mollaret	Tang et al., 2000
Doenças sem correlação com deficiência de MBL:	
Carcinoma hepatocelular	Segat et al., 2008
Pênfigo foliáceo endêmico	Messias-Reason et al., 2008

FONTE: Kilpatrick, 2002, modificado.

1.2.8 Doenças dermatológicas com implicações nos níveis de MBL

Erupções pustulares recorrentes, erupções folliculite-like, *rash* pustular, erupção com destacamento da pele e hiperpigmentação, úlceras orogenitais, celulite e úlceras de pele em pacientes com deficiência de MBL foram recentemente descritos (Miller et al., 2010). Considerando que a pele representa o maior órgão representativo do sistema imune inato, compreendendo não só barreira física mas também com vários elementos importantes para a resposta imune (ceratinócitos, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas e fibroblastos), vale ressaltar que lesões nesta barreira predispõem a um ambiente propício disseminação de microbiana. Além disto, vigilância imune alterada pode ser fator desencadeante para várias doenças inflamatórias da pele, sugerindo que o mecanismo envolvido seja na eliminação de células apoptóticas e complexos imunes.

A ativação do sistema complemento contra o herpes vírus simples tipo 2 (HSV-2) parece ser mediada principalmente por anticorpos naturais que reconhecem o envelope de glicoproteína na superfície do vírus. Estudos demonstram a ligação entre MBL e HSV-2 via domínios de reconhecimento de carboidratos. A ligação ativa e aumenta a neutralização do vírus, e modula a carga viral e gravidade da infecção (Gadjeva et al., 2004).

Na dermatomiosite, especula-se que haveria uma deficiência no *clearance* de células apoptóticas e complexos imunes. Desta forma, o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos

associada a baixos níveis de MBL parecem contribuir para a patogênese da doença (Werth et al., 2002).

A dermatite atópica complicada com infecções cutâneas parece estar associada à deficiência de MBL (Richardson et al., 1983; Brandrup et al., 1999). A deficiência também foi correlacionada com deficiência de MBL (genótipo O/O) em 19% dos pacientes (n=165) (Brandao et al., 2008b).

Na hanseníase, a deficiência de MBL é fator de proteção em pacientes etíopes infectados com *Mycobacterium leprae* (Garred et al., 1994) e brasileiros (Dornelles et al., 2006).

1.2.9 Estudos de associação clínica de doenças relacionadas à deficiência MASP-2

Schlapbach et al. (2008) avaliaram prematuros (n=32) e altos níveis de MASP-2 no cordão umbilical foram associados ao aumento do risco de enterocolite necrotizante (NEC), talvez porque MASP-2 favoreça a inflamação pela ativação do complemento e possa predispor à NEC.

Ytting et al. (2008) avaliaram prognóstico de 281 pacientes com carcinoma coloretal (seguimento de 7,9 anos) e concluíram que altos níveis séricos de MASP-2 constitui um fator independente de prognóstico ruim e recorrência da doença após sete meses de cirurgia de ressecção curativa.

Garcia-Laorden et al. avaliaram MBL e MASP-2 na suscetibilidade, gravidade e evolução de pneumonia adquirida na comunidade em adultos. 848 pacientes foram comparados a 1447 controles sadios e um grupo de 519 pacientes sem doença relevante como estudo de caso-controle. Foram encontradas frequências similares de alelos e genótipos de *MBL2* e MASP-2 (D120G) entre pacientes e controles. Concluíram que apenas a deficiência de MBL, incluindo heterozigose e homozigose para alelos variantes predispõe à maior gravidade e evolução fatal em pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, independente do microorganismo (Garcia-Laorden et al., 2008).

Schafanski et al. (2008) avaliaram o polimorfismo D105G (= D120G) da MASP-2 em 148 pacientes com febre reumática, sendo 106 com doença cardíaca reumática crônica e 42 sem sequela cardíaca e 129 indivíduos saudáveis. Houve presença deste polimorfismo em 3,77% dos pacientes com sequela reumática e em 3,88% dos controles, todos em heterozigose ($p=0,6$) não havendo diferença estatística entre os grupos. Não houve presença de polimorfismo nos indivíduos com febre reumática sem lesão cardíaca. O estudo sugere que este polimorfismo da MASP-2 não participa da patogênese da febre reumática.

O primeiro trabalho que tentou fazer correlação clínica entre doença e polimorfismo D371Y da MASP-2 foi de Segat et al. (2008), onde foram avaliados os polimorfismos D371Y e D120G em 215 pacientes com hepatocarcinoma celular não encontrou relação entre infecção por vírus

hepatite B e/ou C e presença destes polimorfismos na evolução do hepatocarcinoma.

Trabalho mais recente de Wang et al. avaliou a relação entre infecção pelo Coronavírus e evolução para Síndrome da Angústia Respiratória Grave (SARS) em duas populações chinesas, uma de Beijing (272 pacientes e 232 controles) e uma de Guangzhou (104 pacientes e 291 controles), e não encontrou associação significativa estatisticamente entre a presença do polimorfismo D317Y e SARS (Wang et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Os níveis de MBL e MASP-2 na população brasileira, assim como os polimorfismos envolvidos são pouco conhecidos e há poucos dados sobre a prevalência de MASP-2 em populações. A relevância clínica da deficiência de MASP-2 (rs12711521) é desconhecida e há apenas um caso clínico associado a suscetibilidade ao pneumococo. A caracterização da população brasileira neste sentido permitirá avaliar estas proteínas em várias condições clínicas, dimensionando sua influência na ocorrência e evolução destas doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar, em uma população sadia brasileira, os seguintes aspectos:

1. Níveis séricos de MBL e MASP-2;
2. Frequência dos Polimorfismos de MBL e MASP-2 (D371Y).

3.2 Específicos

3.2.1 Padronizar técnicas de rotina

1. Dosagem de MBL sérica;
2. Dosagem de MASP-2 sérica;
3. Genotipagem do éxon 1 do gene *MBL2* (alelos A/A, A/O e O/O);
4. Genotipagem do *promoter* do gene *MBL2* (alelos X/Y, H/L e P/Q);
5. Genotipagem do polimorfismo D371Y do gene MASP-2.

3.2.2 Criar banco de dados para avaliar os níveis séricos normais de MBL e MASP-2 em uma população brasileira

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística e obtenção das amostras

A coleta de material foi realizada no Banco de Sangue do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE-RJ) de setembro a dezembro de 2004. Os indivíduos que se dirigiam ao banco de sangue para doação de sangue foram convidados a participar do trabalho durante a entrevista médica padronizada (Anexo A). Àqueles que aceitavam participar da pesquisa, foi fornecido e explicado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), previamente aprovado pelo comitê de ética do HSE-RJ (Anexo C), informando os aspectos gerais da pesquisa. O trabalho também foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – HC - FMUSP (Anexo D). O paciente procedia então à doação de sangue habitual. O banco de sangue rotineiramente coleta sangue e armazena em tubo com EDTA e em tubo com gel separador. Dos pacientes concordantes com este trabalho, foram coletadas e aliqüotadas amostra (1,5mL) de sangue total com EDTA e amostra de soro (1,5mL), após centrifugação 3000 rpm por 6 minutos. Todo o material foi estocado temporariamente (aproximadamente 7-14 dias) naquela Instituição a -20°C . O material coletado foi mensalmente encaminhado para o Laboratório de

Investigação Médica LIM-56, Departamento de Dermatologia, na Faculdade de Medicina na USP conforme normas de Biossegurança, sendo então armazenadas a -70°C até o uso.

Desta forma, a população avaliada consiste em doadores de sangue sadios pré-selecionados através de questionário (protocolo próprio do Banco de Sangue) e entrevista com médico (Anexo A), auto-seletivo (voluntários). Os critérios para doação incluíram idade entre 18 e 65 anos, peso acima de 50 quilos, sorologias negativas para o vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) 1 e 2, Vírus T linfotrópico Humano (HTLV) 1 e 2, Antígeno de Superfície do vírus da Hepatite B (HBS-Ag), anticorpo contra o Core do Vírus da hepatite B (Anti-HBC), Chagas, *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) qualitativo e *Treponema pallidum haemagglutination* (TPHA), teste da Mancha (Hemoglobina S). Desta forma os critérios de inclusão foram os mesmos dos critérios de doação de sangue utilizado no Banco de Sangue, os critérios de exclusão foram sorologias positivas para quaisquer doenças acima.

4.2 Técnicas Laboratoriais

4.2.1 Dosagem da proteína MBL

4.2.1.1 Técnica *in house* de MBL quantitativo

A padronização *in house* da dosagem de MBL foi modificada, baseando-se na técnica de ELISA como descrito por Petersen et al. (Petersen et al., 2001a). Incubou-se placas de 96 wells da marca NUNC Maxisorp por 18h, a 4°C, com 100µL de manose a 20µg/mL (diluída em tampão carbonato/bicarbonato a 0,5 molar; pH 9,5). Após o período de incubação a placa foi bloqueada com 200µL de BSA a 1mg/mL diluída em tampão TBS, e incubada por 1h em temperatura ambiente. Em seguida os wells foram lavados com tampão de lavagem (TBS/Tween/cálcio) por quatro vezes, em seguida os controles positivos e negativos e amostras de soros dos pacientes (diluídos 1/100) foram adicionados nas placas em seus respectivos wells, em duplicata. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos, após este período as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem por quatro vezes, seguido da adição de 100µL do anticorpo anti-MBL biotinilado (diluuição 1/10.000 em tampão de diluição). As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2h e novamente lavadas por quatro vezes e então receberam em cada well 100µL de estreptavidina (diluuição 1/10.000 em tampão de diluição) e foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Seguiu-se o processo de lavagem novamente por 4 vezes com tampão de

lavagem, e foram adicionados 100µL por *well* do revelador *Tetramethylbenzidine* (TMB). A placa recebeu nova incubação em temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos, em seguida a reação foi parada pela adição de 50µL de H₂SO₄ seguida de leitura da placa no leitor de ELISA a 450nm (Biotrack II Plate Reader, Amersham Biosciences, England) (Anexos E, F).

4.2.1.2 Técnica de MBL quantitativo KIT HK 323

A placa de ELISA do KIT HK 323 foi incubada com 150µL do tampão de ativação por 30 minutos em estufa a 37°C, em seguida procedeu-se à lavagem da placa por quatro vezes com 200µL de tampão de lavagem em cada *well*. Em seguida foram adicionados 100µL das amostras (1/100) e o soros padrão nos respectivos *wells*. Procedeu-se à incubação por 1 hora em estufa a 37°C. Repetiu-se o processo de lavagem quatro vezes. Adicionou-se 100µL do anticorpo anti-MBL biotinilado em cada *well*, incubou-se a placa por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, repetiu-se o processo de lavagem quatro vezes. Adicionou-se 100µL de estreptavidina peroxidase em cada *well*. Incubou-se a placa por 1h em temperatura ambiente, no escuro. Procedeu-se à lavagem novamente quatro vezes e adicionou-se 100µL por *well* de TMB. Incubou-se a placa por 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Adicionou-se 100µL do tampão de paragem em cada *well* e procedeu-se à leitura realizada em leitor de ELISA a 450nm (Biotrack II Plate

Reader, Amersham Biosciences, England) (Anexo G). Valores de detecção do *kit* :0,41 a 100ng/mL.

4.2.2 Técnica de dosagem de MASP-2 quantitativo *KIT* HK 326

Os níveis séricos de MASP-2 foram avaliados por ELISA através do *KIT* HK 326 (Hycult biotechnology). Adicionou-se à placa do *KIT* 100µL de amostras e padrões, em duplicata, e procedeu-se à incubação em temperatura ambiente por 1h. Em seguida, foi feita lavagem da placa por 4x utilizando-se 200µL por *well* de tampão de lavagem. Foram adicionados 100µL de anticorpo biotinilado anti-MASP-2 em cada *well* e realizada incubação da placa por 1h em temperatura ambiente. Repetiu-se a lavagem por 4x. Adicionou-se 100µL de estreptavidina peroxidase em cada *well* e incubou-se a placa por 1h em temperatura ambiente, no escuro. A placa foi novamente lavada por quatro vezes e adicionou-se 100µL por *well* de TMB. Procedeu-se à incubação por 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com 100µL de tampão de paragem. A leitura foi realizada no período de 30 minutos em leitor de ELISA a 450nm (Biotrack II Plate Reader, Amersham Biosciences, England). Valores de detecção do *kit*: 1,6 a 100ng/mL.

4.2.3 Genotipagem da proteína MBL

Duzentas e noventa e quatro amostras de DNA foram extraídas de sangue total com *KIT* QIAmp DNA Blood Mini *kit* (Qiagen) (Lote nº 124120582) conforme instrução do fabricante. Em resumo, colocou-se 20µL de Qiagen protease em tubo de congelamento de 1,5mL, e foram adicionados 200µL de sangue total de cada amostra estudada. Em seguida, adicionou-se 200µL do Buffer AL (Qiagen) e feita homogeneização com Vórtex durante 15s. O material foi incubado por 10 minutos a 56°C. Após este tempo procedeu-se a uma centrifugação rápida (*spin*), e foram adicionados 200µL de etanol. O material foi homogeneizado novamente com Vórtex por 15s, seguido de nova centrifugação rápida (*spin*). O conteúdo foi transferido para colunas com sílica que se encaixavam adequadamente em cada tubo de congelamento, e centrifugado a 8000rpm por 1 minuto, descartando-se posteriormente o tubo coletor. A coluna foi novamente transferida e acrescentou-se 500µL de solução de lavagem 1 (AW1) ao tubo, que foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. A coluna foi a seguir transferida e o restante descartado. Acrescentou-se 500µL da solução de lavagem 2 (AW2). Centrifugou-se o material a 14000 rpm por 3 minutos. A coluna foi transferida para novo tubo de congelamento de 1,5mL, previamente identificado, e o restante foi descartado. Adicionou-se 100µL do tampão AE. O material foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto, descartou-se a coluna de sílica e o DNA genômico (aproximadamente 500ng) foi armazenado a -70°C.

4.2.3.1 Gene codificador da lectina ligadora de manose (*MBL2*)

A detecção dos polimorfismos do éxon 1 do gene MBL foi realizada como descrito previamente (Hladnik et al., 2002), baseado no ensaio de temperatura de dissociação usando o Rotor GeneTM RG 3000 (Uniscience-Corbett Research) como plataforma, bem como *primers* específicos (Anexo G), em *amplicon* de aproximadamente 1200bp.

Os SNPs do éxon 1 analisados estão dispostas nos códons -52, -54 e -57. Os três SNPs foram analisados no mesmo produto da PCR em tempo real através da curva de dissociação (curva de *melting*) e agrupadas no alelo “O” quando alguma mutação ocorria nos códons como descrito por Madsen et al. (Madsen et al., 1998a). A amplificação do éxon 1 da *MBL2* foi realizada para um volume final de 25µl com SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems Part number 4334973), 0,5µM de cada primer (*forward* e *reverse*) (Anexo G) e cerca de 20ng de DNA genômico molde. As condições térmicas do ciclo foram: início com uma desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de uma desnaturação a 95 °C por 15s e um anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

Após a amplificação do éxon 1, o produto resultante foi submetido ao protocolo de ensaio de temperatura de dissociação também utilizando o Rotor GeneTM RG 3000 (Uniscience-Corbett Research).

Os cálculos referentes à variação da emissão do fluoróforo foram automaticamente realizados pelo *software* Rotor GeneTM RG 3000 (Uniscience-Corbett Research) versão 6.0 (build 41) gerando curvas de

dissociação permitindo a detecção dos SNPs: genótipo A/A (uma curva T_m $83,1 \pm 0,1$), A/O (duas curvas T_m $82,6 \pm 0,3$; $80,7 \pm 0,1$), O/O (uma curva T_m $81,7 \pm 0,1$).

Os controles da PCR em tempo real foram desenhados a partir de amostras previamente sequenciadas e cedidas pela equipe liderada pelo professor Sergio Crovella da Universidade Federal de Pernambuco/ Universidade de Trieste – Itália.^{1#} Desta forma, conhecendo os genótipos das amostras controles foi possível a genotipagem das amostras desconhecidas. Um controle interno da reação, livre de DNA, foi realizado para avaliar a qualidade e contaminação da reação.

4.2.3.2 Gene codificador da região promotora do gene *MBL2*

Foram analisadas três regiões na região do *promoter* do gene *MBL2*, -550 (H/L), -221(X/Y) e +4 (P/Q). A amplificação do DNA genômico do gene *MBL2* foi realizada usando *primers* (*primer forward* 5'-GCCAGTGGTTTTTGA CT CAC-3' e *reverse* 5'-CCTCATATCCCCAGGCAGT-3') desenhados com base no banco do genoma humano – GenBank (acesso: NT_008583) com *software* Primer Express 2.0. (Applied, 2002).

As reações de PCR foram realizadas no Thermal cycler 9700 (Applied Biosystems) usando tampão PCR uma vez, 1U de Taq Gold,

^{1#} Departamento de Genética - LIKA, UFPE e Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo. Sezione di Genetica, Università di Trieste, Italy.

0,4mM dNTPs e 2mM MgCl₂. As condições de amplificação foram 10min a 95 °C, depois 40 ciclos de 95 °C 30s, 54 °C 30s, 72 °C 1 min e extensão final 72 °C 7min. Os produtos de PCR foram observados, sob luz ultravioleta (UV), em gel de agarose a 2%, corado com o intercalante de DNA, brometo de etídio.

O sequenciamento do DNA dos produtos de PCR foi realizado com BigDye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 2.0* (Applied Biosystems). As sequências de DNA foram detectadas e analisadas no sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

4.2.4 Genotipagem da MASP-2

O polimorfismo rs12711521 (D371Y, A>C) da CCP2 localizado no éxon 9 do gene situado no braço curto do cromossoma 1 (1p36.3-36.2) foi avaliado através da técnica de PCR em tempo real pela plataforma *TaqMan* (ID: C_22271950_20, Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. O polimorfismo encontrado é a troca de A/C a seguir: GTACTCCACTCGGCCACTGGGTAGAT[A/C]ATCAGGAGGGCCACAGTCA ACAACT. A PCR foi realizada em volume final de 5µl contendo aproximadamente 10ng de DNA genômico molde, 2,5µL de Universal PCR TaqMan Super Mix uma vez (part nº 4364338 – Applied Biosystems) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de

ciclo: 10 min a 95 °C 10 min, seguido de 40 ciclos de 15s a 95°C e 60s a 60 °C.

Sondas ligadas aos fluoróforos VIC e FAM® (part nº 4351379 - Applied Biosystems) foram desenvolvidas para a detecção específica dos alelos A e C, respectivamente. A leitura da fluorescência gerada durante as reações de amplificação foi feita no *ABI 7300*, e a determinação dos genótipos foi obtida com o Sistema de Detecção de Sequências (*SDS*, Applied Biosystems).

4.3 Cálculo da frequência dos alelos

O cálculo da frequência dos alelos foi realizado manualmente através da soma de quantas vezes um gene herdado (alelos) ocorreu na população estudada e dividiu-se o valor pelo número total de genes (alelos) de um dado locus desta população (Klein, 1990).

4.4 Análise estatística

O poder da amostra foi avaliado pelo software *Epilnfo*™ (Centers for Diseases Control, 2007). A combinação dos haplótipos de MBL foi obtida através do software *Arlequin* versão 3.11 (Excoffier, Schneider 2005) e o

equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo Programa R (R Development Core, 2008).

Variáveis quantitativas de distribuição assimétrica foram comparadas segundo sexo utilizando-se teste da soma dos postos de Wilcoxon (Walker, 2010). Estas variáveis foram também comparadas entre tres grupos independentes aplicando-se o teste nao-paramétrico de Kruskal-Wallis (Walker, 2010) seguido de testes de permutação (Good, 1993) para obtenção de valores de p ajustados para comparações múltiplas, quando observou-se significância estatística no teste Kruskal-Wallis (Walker, 2010; Westfall, 1993; Westfall, 1999). Simulação de Monte Carlo foi utilizada para a estimação de um exato valor-p nos testes Kruskal-Wallis pois um dos grupos apresentou reduzido tamanho de amostra (SAS Institute, 2008). Simulações de Monte Carlo e testes de permutação (em comparações múltiplas) foram baseados em 20000 replicações.

Análise de correlação linear foi efetuada utilizando-se método não-paramétrico – o coeficiente de correlação de Spearman, com intervalo de confiança 95% (IC95%) estimado segundo a transformação z de Fisher, dado a não-normalidade dos dados (Conover, 1999; Armitage, 2002).

A concordância entre os métodos clínicos MBL *in house* e MBL *Kit* foi avaliada com o coeficiente de correlação de concordância e correspondente IC95% proposto por Lin (Lin, 1989; Lin, 2000). O coeficiente de Lin combina precisão e acurácia para determinar se dados desviam significativamente da linha de perfeita concordância (linha de 45 graus com origem no 0 dos eixos

x e y). O coeficiente de Lin é assintoticamente normal para dados de distribuição não-normal (assimétrica) e varia de -1 (perfeita concordância inversa) a 1 (perfeita concordância). Uma perfeita concordância corresponderia a todos os pares de observações distribuídos na linha de perfeita concordância. Excelente concordância foi definida como valor do coeficiente de Lin maior que 0.90 (Lin, 1989; Shoukri, 1996; Lin, 2000).

Associações com a variável categórica ordinal Produção de MBL foram analisadas em tabelas de contingência 3x3 via teste exato de Kruskal-Wallis (Siegel, 1988). Normalidade de variáveis quantitativas foi avaliada com teste D'Agostino-Pearson e inspeção de histogramas (D'Agostino, 1990). As variáveis categóricas foram apresentadas de forma descritiva com contagens e proporções. Variáveis quantitativas de distribuição assimétrica foram descritas com mediana e intervalo interquartil. Variáveis quantitativas de distribuição normal foram descritas com média $\pm$ desvio padrão. Todas as probabilidades de significância (valores de p) apresentadas são do tipo bilateral e valores menores que 0,05 considerados estatisticamente significantes. A análise estatística dos dados foi efetuada utilizando-se o programa de análise estatística SAS 9.2 (SAS Institute, 2008).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população estudada

Foram avaliados 294 indivíduos sendo 91/294 (30,95%) do sexo feminino e 203/294 (69,05%) do sexo masculino (Figura 11). A média das idades foi de 37 anos e a mediana de 36,51 ($\pm 10,56$), mínimo de 18 e máximo de 63 anos (Figura 12) (Anexo H).

Figura 11 - População estudada: distribuição por sexo

Figura 12 - População estudada: distribuição por idade

5.2 Níveis séricos de MBL *in house*

Os níveis séricos de MBL *in house* variaram de 48 a 3821 $\mu\text{g/mL}$, mediana 1307 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13).

Figura 13 – Níveis séricos de MBL *in house*

5.3 Níveis séricos de MBL pelo *Kit*

Os níveis séricos de MBL *kit* variaram de <410 a 3128 $\mu\text{g/mL}$, mediana 1131 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14).

Figura 14 - Níveis séricos de MBL *Kit*

5.4 Comparação entre valores encontrados nas técnicas MBL *in house* e *Kit*

Observou-se forte e significativa concordância entre níveis séricos de MBL *in house* e MBL *Kit* segundo o coeficiente de correlação de concordância (CCC) proposto por Lin (CCC=0.92 IC95% 0.905-0.935; N=294) (Figura 15) (Lin, 1989, 2000).

Figura 15 - Correlação entre níveis séricos de MBL *in house* vs. MBL *kit*

5.5 Genotipagem do gene da MBL (*MBL2*)

5.5.1 Genotipagem do éxon 1 do gene *MBL2*

A curva de *melting* realizada após amplificação do éxon 1 da *MBL2* permitiu identificar os três genótipos possíveis. As curvas de dissociação das amostras foram calculadas diretamente pelo *software* do Rotor Gene 3000, onde cada um dos genótipos obteve um pico de *melting* característico (Figura 16). O genótipo selvagem A/A apresentou um pico de temperatura em $80,4^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; as amostras mutadas (O/O) apresentaram temperatura de *melting* menor $79,5^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. As amostras heterozigotas A/O apresentaram pico semelhante ao A/A ($80,0^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$) (Figura 17) porém o padrão da curva, com um “ombro” na temperatura aproximada de 78°C permite a discriminação entre as amostras selvagens e heterozigota.

Figura 16 - Genotipagem do gene *MBL2*, mostrando padrão de curvas de *melting* dos três genótipos possíveis na região do éxon 1

Figura 17 - Genotipagem do gene *MBL2* em uma amostra de indivíduo sadio, mostrando a perfeita sobreposição entre a curva de *melting* da amostra e a curva de *melting* do padrão.

As frequências do genótipo da *MBL2* em 294 indivíduos foram de 58,5% A/A, 36,39% A/O e 5,1% O/O. No sexo feminino, 64,84% (59/91) correspondem ao A/A, 30,77% (28/91) ao A/O e 4,39% (4/91) ao O/O e no sexo masculino 55,66% (113/203) correspondem ao A/A, 38,92% (79/203) ao A/O e 5,42% (11/203) ao genótipo O/O (Tabela 9). Não houve diferença estatística entre os sexos ($p=0,34$).

Tabela 9 - Frequência gênica de *MBL2*

Frequência Haplótipo <i>MBL2</i>	Total N=294	Sexo Feminino N= 91	Sexo Masculino N=203
A/A	172 (58,50%)	59 (64,84%)	113 (55,66%)
A/O	107 (36,39%)	28 (30,77%)	79 (38,92%)
O/O	15 (5,1%)	4 (4,39%)	11 (5,42%)

5.5.2 Dosagem de MBL com respectivos genótipos

Observou-se diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *in house* ($p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis). Os níveis séricos de MBL *in house* variaram de 48 a 3821 $\mu\text{g/mL}$, mediana 1306 $\mu\text{g/mL}$. Para o genótipo A/A houve variação de 241 a 3821 $\mu\text{g/mL}$, A/O variou de 48 a 3007 $\mu\text{g/mL}$ e O/O de 93 a 2366 $\mu\text{g/mL}$. A mediana de MBL sérica *in house* foi estatisticamente maior no grupo 1 (A/A) quando comparado ao grupo 2 (mediana(intervalo interquartil – IQR):2224(1336) vs. 615(565); $p < 0,0001$; teste de permutação). A mediana de MBL sérica *in house* foi estatisticamente maior no grupo 1(A/A) quando comparado ao grupo 3 (mediana(IQR):2224(1336) vs. 204(148), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana de MBL sérica *in house* foi estatisticamente maior no grupo 2 quando comparado ao grupo 3 (mediana(IQR):615(565) vs. 204(148); $p = 0,0389$; teste de permutação) (Figura 18).

Figura 18 - Níveis séricos de MBL *in house* com respectivos genótipos

Os níveis séricos de MBL obtidos com o *Kit* variaram de <410 a 3128 µg/mL. Os níveis de MBL variaram de <410 a 3128 no genótipo A/A (mediana 1757 µg/mL), <410 a 2182 no genótipo A/O (mediana 471 µg/mL) e de <410 a 2139 no genótipo O/O (mediana 0). Observou-se diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *Kit* ($p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (A/A) quando comparado ao grupo 2 (mediana(IQR): 1757(1825) vs. 471(377,4), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (A/A) quando comparado ao grupo 3 (mediana(IQR): 1757(1825) vs. 0(142,6), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana de MBL sérica *Kit* foi estatisticamente maior no grupo 2 (A/O) quando comparado ao grupo 3 (O/O) (mediana(IQR) 471(377,4) vs. 0(142,6), $p = 0,0354$, teste de permutação) (Figura 19).

Figura 19 - Níveis séricos de MBL *Kit* com respectivos genótipos

Quando os haplótipos foram agrupados pela capacidade de produção de MBL: Produtores de altos níveis de MBL (*high producers*), produtores baixos de MBL (*low producers*) e produtores deficientes de MBL (*deficient producers*) (Bouwman et al., 2006), observou-se diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *in house* ($p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (*high producers*) quando comparado ao grupo 2 (*low producers*) mediana(IQR): 2278(1267) vs. 693(451) $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (*high producers*) quando comparado ao grupo 3 (*deficient producers*) (mediana(IQR): 2278(1267) vs. 246(157), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana de MBL sérica *in house* foi estatisticamente maior no grupo 2 (*low producers*) quando comparado ao grupo 3 (*deficient producers*) (mediana(IQR) 2278(1267) vs. 246(157), $p = 0,0028$; teste de permutação) (Figura 20).

Figura 20 - Correlação entre níveis séricos de MBL *in house* e Produção de MBL (haplótipos *high producer*, *low producer* e *deficient producer*)

Em se tratando dos níveis séricos de MBL *Kit* e sua correlação com *high producers*, *low producers* e *deficient producers*, observou-se diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *Kit* ($p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (*high producers*) quando comparado ao grupo 2 (*low producers*) mediana(IQR): 1830(1073) vs. 506(456) $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (*high producers*) quando comparado ao grupo 3 (*deficient producers*) (mediana(IQR): 1830(1073) vs. 147(85), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana de MBL sérica *Kit* foi estatisticamente maior no grupo 2 (*low producers*) quando comparado ao grupo 3 (*deficient producers*) (mediana(IQR) 506(456) vs. 147(85), $p = 0,0054$, teste de permutação) (Figura 21).

Figura 21 – Correlação entre níveis séricos de MBL *Kit* e Produção de MBL (haplótipos *high producer*, *low producer* e *deficient producer*)

Quanto ao sexo, não se observou diferença significativa nas medianas de MBL sérica *in house* (mediana(IQR): 1146(1756) vs. 1692(1928) $p=0,0684$ (Teste da soma dos postos de Wilcoxon) (Figura 22).

Figura 22 – Correlação entre MBL *in house* vs. sexo

Ainda em relação ao sexo, também não se observou diferença significativa nas medianas de MBL sérica *Kit* (mediana(IQR): 1004(1415) vs. 1421(1648) $p=0,1187$ (Teste da soma dos postos de Wilcoxon) (Figura 23).

Figura 23 – Correlação entre níveis séricos de MBL *Kit* vs. sexo

No que se refere à idade, não se observou correlação linear significativa ($Rho = -0,04432$ IC 95% $-0,157913$ $0,070427$ $p=0,4493$ (coeficiente de correlação de Spearman) com os níveis de MBL sérica *in house* (Figura 24). O mesmo ocorreu com MBL sérica *Kit* ($Rho = -0,03109$ IC 95% $-0,144962$ $0,083604$ $p=0,5958$) (Figura 25).

Figura 24 - Correlação entre níveis de MBL *in house* vs. Idade

Figura 25 - Correlação entre níveis séricos de MBL *Kit* vs. idade

5.5.3 Genotipagem do *promoter* do gene *MBL2*

A avaliação dos *promoters* foi feita por sequenciamento direto, o produto da PCR de uma amostra está representada na Figura 26.

Figura 26 – Gel em agarose do produto da PCR (coluna 1-18) com 100bp *molecular ladder* (coluna 19)

O sequenciamento de um dos promoters (X/Y) está representado na Figura 27.

Figura 27 – Sequenciamento do *promoter* X/Y do gene *MBL2*

As frequências dos polimorfismos dos promotores do éxon 1 do gene *MBL2* estão representadas na Tabela 10 e seus respectivos haplótipos na (Tabela 11)

Tabela 10 – Genotipagem dos *promoters* do gene *MBL2*

SNP			n.	%
HL	Alelo	H	190	0,32
		L	398	0,68
	Genótipo	HH	38	0,13
		HL	114	0,39
		LL	142	0,48
XY	Alelo	X	87	0,15
		Y	501	0,85
	Genótipo	XX	6	0,02
		XY	75	0,26
		YY	213	0,72
PQ	Alelo	P	412	0,70
		Q	176	0,30
	Genótipo	PP	152	0,52
		PQ	108	0,37
		QQ	34	0,11

Tabela 11 - Haplótipos do gene *MBL2* *

HAPLÓTIPO	%		
LXA	0,15	LXPA	0,15
HYA	0,28	HYP A	0,28
LYO	0,20	LYQO	0,08
		LYPO	0,12
LYA	0,33	LYPA	0,11
		LYQA	0,22
HYO	0,04	HYPO	0,04

* NOTA: Em relação aos alelos variantes B, C e D do gene *MBL2*, quando agrupados no alelo “O” podem ser assim identificados: LYQO=LYQC; LYPO=LYPB+LYPD; HYPO=HYPD.

Levando-se em consideração apenas o *promoter* em separado, observou-se diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *in house* quando correlacionadas com os *promoters* H/L ($p < 0,0001$, teste de Kruskal-Wallis). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (H/H) quando comparado ao grupo 2 (H/L) (mediana(IQR): 2160,5(1923) vs. 1532,5(1772) $p = 0,0285$ teste de permutação). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (H/H) quando comparado ao grupo 3 (L/L) (mediana(IQR): 2160,5(1923) vs. 934(1648), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana de MBL sérica *in house* foi estatisticamente maior no grupo 2 (H/L) quando comparado ao grupo 3 (L/L) (mediana(IQR) 1532,5(1772) vs. 934(1648), $p = 0,0059$; teste de permutação (Figura 28).

Figura 28 – Correlação entre níveis séricos de MBL *in house* e *promoter* H/L

Também observou-se diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *Kit* quando correlacionados com *promoter* H/L ($p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (H/H) quando comparado ao grupo 2 (H/L) mediana(IQR): 1642(1593) vs. 1340(1515) $p = 0,0161$, teste de permutação. A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (H/H) quando comparado ao grupo 3 (L/L) (mediana(IQR): 1642(1593) vs. 775,5(1422), $p < 0,0001$, teste de permutação. A mediana de MBL sérica *Kit* foi estatisticamente maior no grupo 2 (H/L) quando comparado ao grupo 3 (L/L) (mediana(IQR) 1340(1515) vs. 775,5(1422), $p = 0,0097$; teste de permutação) (Figura 29).

Figura 29 - Correlação entre níveis MBL *Kit* e *promoter* H/L

Em relação ao *promoter X/Y*, não se observou diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *in house* ($p=0,2536$, teste Kruskal-Wallis) (Figura 30).

Figura 30 – Correlação entre níveis de MBL sérica *in house* e *promoter X/Y*

Da mesma forma, não se observou diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *Kit* ($p=0,4123$, teste Kruskal-Wallis) (Figura 31).

Figura 31 - Correlação entre níveis de MBL sérica *Kit* e *promoter X/Y*

No que se refere ao *promoter* P/Q, não se observou diferença significativa entre as medianas de MBL sérica *in house* ($p=0,4602$, teste Kruskal-Wallis) (Figura 32).

Figura 32 – Correlação entre níveis séricos de MBL *in house* e *promoter* P/Q

Ainda em relação ao promotor P/Q, também não se observou associação significativa entre os níveis de MBL sérica *Kit* ($p=0,4505$, teste Kruskal-Wallis) (Figura 33).

Figura 33 – Correlação entre níveis séricos de MBL *Kit* e *promoter* P/Q

A relação entre os níveis de MBL e os genótipos A/O agrupados com promotor do éxon 1 está representada abaixo (Figura 34), e está de acordo com a literatura (FONTE: Garred et al., 2003. Figura 8).

NOTA: Os espaços cheios representam a distância interquartis, e as barras representam a variação do 10° ao 90° percentil. Os resultados são referentes a pacientes dinamarqueses.

Figura 34 - Níveis séricos de MBL *in house* e haplótipos de *MBL2* (A/O) e *promoters*

As frequências das combinações dos haplótipos do gene *MBL2* estão representados na tabela 12.

Tabela 12 – Frequência das combinações dos haplótipos do gene *MBL2* e níveis séricos de MBL

HAPLÓTIPO	Frequência	%	Frequência Cumulativa	% Cumulativa	MBL <i>in house</i> µg/mL mediana	MBL <i>Kit</i> µg/mL mediana
1:HYPA/HYPA	31	10,54	31	10,54	2507	2259
2:LXPA/HYPA	24	8,16	55	18,71	2068	1792
3:LXPA/LXPA	8	2,72	63	21,43	812,5	656
4:LXPA/LYPA	8	2,72	71	24,15	1941	1343
5:LXPA/LYQA	16	5,44	87	29,59	1876	1491
6:LYPA/HYPA	19	6,46	106	36,05	2358	1833
7:LYQA/HYPA	26	8,84	132	44,90	2355	1912
8:LYPA/LYQA	33	11,22	165	56,12	2251	1861
9:LYQA/LYQA	6	2,04	171	58,16	1876	1612
10:LYPA/LYPA	1	0,34	172	58,50	1223	1002
11:LYPA/LYPO	7	2,38	179	60,88	702	538
12:HYPA/HYPO	6	2,04	185	62,93	783	783
13:LYPA/HYPO	31	10,54	216	73,47	559	503
14:LXPA/LYQO	6	2,04	222	75,51	232	0
15:LYPA/LYQO	19	6,46	241	81,97	677	483
16:LYQA/LYQO	15	5,10	256	87,07	744	502
17:LXPA/HYPO	12	4,08	268	91,16	895,5	809,5
18:LYQO/HYPA	11	3,74	279	94,90	741	475
19:LYPO/HYPO	4	1,36	283	96,26	289	0
20:LYQO/LYQO	4	1,36	287	97,62	381	0
21:HYPO/HYPO	1	0,34	288	97,96	151	0
22:LYQO/HYPO	1	0,34	289	98,30	583,5	320
23:LYPO/LYPO	1	0,34	290	98,64	259	0
24:LYPO/LYQO	4	1,36	294	100,00	155,5	0

5.6 Níveis séricos de MASP-2

Os níveis séricos de MASP-2 variaram de 600 a 3822 $\mu\text{g/mL}$, mediana 2477 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35).

Figura 35 - Níveis séricos de MASP-2

Foram encontrados níveis que variaram de 2127 a 3822 no genótipo A/A (mediana 3335 $\mu\text{g/mL}$), 1522 a 2987 no genótipo A/C (mediana 2301 $\mu\text{g/mL}$) e de 600 a 2492 no genótipo C/C (mediana 731 $\mu\text{g/mL}$). Observou-se diferença significativa entre as medianas de MASP-2 sérica ($p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (A/A) quando comparado ao grupo 2 (A/C) (mediana(IQR):3335(340) vs. 2301(354), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana foi estatisticamente maior no grupo 1 (A/A) quando comparado ao grupo 3 (C/C)

(mediana(IQR): 3335(340) vs. 731(139), $p < 0,0001$, teste de permutação). A mediana de MASP-2 sérica foi estatisticamente maior no grupo 2 (A/C) quando comparado ao grupo 3 (C/C) (mediana(IQR) 2301(354) vs. 731(139), $p < 0,0001$, teste de permutação) (Figura 36).

Figura 36 - Correlação entre níveis séricos de MASP-2 vs. genótipo de MASP-2

Quanto ao sexo, não se observou diferença significativa nas medianas de MASP-2 sérica (mediana(IQR): 2483(1124) vs 2457(1248) $p=0,5157$, teste da soma dos postos de Wilcoxon) (Figura 37).

Figura 37 - Correlação entre sexo e níveis séricos de MASP-2

Quanto à idade, não se observou correlação linear significativa ($Rho = 0,01003$ IC 95% $-0,104486$ $0,124275$ $p=0,8642$) nos níveis séricos de MASP-2 (coeficiente de correlação de Spearman) (Figura 38).

Figura 38 – Correlação entre níveis séricos de MASP-2 vs. idade

Verificando os níveis de MASP-2 e comparando com os níveis séricos de MBL *in house*, não houve correlação significativa ($Rho = -0,01093$ IC 95% $-0,125165$ $0,103592$ $p=0,8521$, coeficiente de correlação de Spearman) (Figura 39). O mesmo ocorreu com quando níveis de MASP-2 foram comparados com níveis de MBL *Kit* ($Rho = -0,01895$ IC 95% $-0,133050$ $0,095653$ $p=0,7465$) (Figura 40).

Figura 39 – Correlação entre níveis séricos de MASP-2 vs. MBL *in house*

Figura 40 – Correlação entre níveis de MASP-2 vs. Níveis séricos de MBL *Kit*

Comparando as medianas dos níveis de MASP-2 com os haplótipos do gene *MBL2* produtores de altos níveis (*high producers*), baixos níveis (*low producers*) e níveis deficientes (*deficient producers*) de MBL, não se observou diferença significativa ($p=0,8295$; Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 41).

Figura 41 – Correlação entre níveis séricos de MASP-2 e produção de MBL (haplótipos *high producer*, *low producer* e *deficient producer*)

5.7 Genotipagem do gene MASP-2

A representação gráfica da avaliação dos genótipos dos SNPs do gene MASP-2 estão representados nas Figuras 42, 43 e 44.

As frequências de genótipo da MASP-2 em 294 indivíduos foram de 38,78% A/A, 44,56% A/C e 16,67% C/C. No sexo feminino, 39,56% (36/91) correspondem ao A/A, 43,96% (40/91) ao A/C e 16,48% (15/91) ao C/C e no sexo masculino 38,42% (78/203) correspondem ao A/A, 44,83% (91/203) ao A/C e 16,75% (34/203) ao genótipo C/C (Tabela 13). Não houve diferença estatística entre os sexos ($p=0,98$).

As frequências alélicas estão representadas na Tabela 14, o gene *MBL2* apresentou frequência de 76,7% para o alelo A, e frequência de 23,3% para o alelo O. Gene da MASP-2 rs12711521 apresentou frequência alélica de 61,05% para o alelo A e 38,959% para o alelo C.

NOTA: o software utilizado o FAM® apresenta cor azul, enquanto o VIC®, a cor preta. O FAM® se liga ao DNA com mutação, sendo assim, o indivíduo mutante apresentará apenas uma sonda ativa, e a reação da PCR será exibida com a formação de uma curva de cor azul. Já o fluoróforo VIC® (cor preta) se liga ao DNA selvagem, e a reação será representada por apenas uma curva de cor preta (Figura 43). Se o indivíduo for heterozigoto, a reação exibirá duas curvas, referentes às duas sondas ativas, com cores diferentes (azul e preta) (Figura 44).

Figura 42 - Genotipagem do gene da MASP-2. Indivíduo homozigoto para os alelos mutantes (C/C), curva azul

Figura 43 - Genotipagem do gene MASP-2, indivíduo homozigoto normal (A/A), curva preta

Figura 44 - Genotipagem gene MASP-2, indivíduo heterozigoto (A/C), presença de duas curvas – preta e azul

Tabela 13 - Frequência gênica de MASP-2

Frequência Haplótipo MASP-2	Total N=294	Sexo Fem. N= 91	Sexo Masc. N= 203
A/A	114 (38,78%)	36 (39,56%)	78 (38,42%)
A/C	131 (44,56%)	40 (43,96%)	91 (44,83%)
C/C	49 (16,67%)	15 (16,48%)	34 (16,75%)

Tabela 14 - Frequência alélica dos genes *MBL2* e MASP-2

Gene	Frequência alélica (%)
MBL	
A	76,7
O	23,3
MASP-2	
A	61,05
C	38,95

6 DISCUSSÃO

O primeiro relato de associação entre deficiência de MBL e doença ocorreu em 1968 (Miller, 1968). Uma criança do sexo feminino apresentava eczema grave, diarreia e infecções bacterianas recorrentes não responsivas ao uso de antibiótico ou corticoterapia. A avaliação laboratorial mostrou defeito da fagocitose para partículas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), amido de arroz e *Staphylococcus aureus* por leucócitos polimorfonucleares. Este defeito era soro dependente, já que infusão de plasma fresco corrigiu a deficiência de fagocitose. O defeito imunológico também foi observado em vários familiares da paciente e, desta forma, presumiu-se que seria uma condição de caráter genético. Ainda não se sabia que se tratava da MBL.

Em 1989, Super et al. identificaram este defeito de fagocitose como sendo a causa de múltiplas infecções em alguns pacientes, corroborando com o achado descrito por Miller et al. Em 1991, Sumiya et al. descreveram os primeiros polimorfismos no gene *MBL2*. Os polimorfismos, afetando os códons responsáveis pela codificação estrutural da MBL, levam à incapacidade de multimerização da MBL e inatividade funcional (Larsen et al., 2004), assim como mutações na região promotora (Madsen et al., 1995). A MBL está complexada à um zimogênio, MASP-2, e este complexo MBL-

MASP-2 quando ativado, resulta na ativação do sistema complemento, pela via das lectinas. Desta forma, a integridade desta via depende não só da MBL, mas também da MASP-2.

Os polimorfismos de uma única base (SNPs) são considerados uma valiosa ferramenta na identificação de genes envolvidos em doenças mendelianas, poligênicas e multifatoriais. Constituem troca de uma única base nitrogenada na sequência de DNA, encontrada em pelo menos 1% da população. Quando ocorrem dentro de um gene ou de uma região reguladora perto de um gene, podem afetar sua função. Seguindo este princípio, o presente trabalho avaliou polimorfismos do gene *MBL2* e MASP-2 (D371Y).

Acreditava-se que a deficiência de MBL estaria presente em 5% da população e alguns trabalhos estipulam 10% (Kilpatrick, 2002). Sendo assim, iniciaram-se os estudos populacionais. A relevância clínica da deficiência de MBL e MASP-2 têm sido muito estudada, e várias doenças têm sido avaliadas isoladamente (Tabela 8). No que se refere à MASP-2, em particular, não há descrição na literatura sobre prevalência da deficiência do polimorfismo D371Y (rs12711521), por nós estudada.

Nosso objetivo foi de estudar uma população saudável, para verificar quais seriam os níveis séricos e polimorfismos gênicos de MBL e MASP-2. A casuística do estudo tem origem no Banco de Sangue do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, onde doadores de sangue foram convidados a participar. Inicialmente, foram avaliados 300 indivíduos, sendo

208 do sexo masculino e 92 do sexo feminino, de setembro a dezembro de 2004. O poder da amostra foi avaliado como sendo acima de 99,99% tomando-se em consideração de que no ano de 2004, o Brasil apresentava, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) uma estimativa da população brasileira adulta em 180 milhões de habitantes (Epi Info™). Considerou-se que 5% apresentariam deficiência de MBL (Casanova and Abel, 2004). Contudo, algumas amostras foram excluídas, por material escasso, totalizando **294**, sendo **91** do sexo feminino e **203** do sexo masculino.

No que se refere à maioria masculina da amostra, 203/294 participantes (69,05%), isto se deve à predominância deste sexo na população doadora de sangue em nosso país. Contudo, este dado não é relevante já que a herança gênica da MBL e da MASP-2 não são ligadas ao sexo.

A padronização do ELISA para MBL sofreu algumas modificações feitas por nós para que o tempo de execução fosse menor, já que a técnica original dispndia de muito tempo – quatro dias. Conseguimos padronizar a mesma técnica para um período de dois dias após vários experimentos, modificando nisto as incubações, passando as mesmas de temperatura ambiente para estufa a 37°C. A concentração da manose também sofreu alteração, pois com a quantidade da técnica orginal não obtivemos sucesso. Foram necessárias fazer várias concentrações de manose a partir de 1µg/mL a 20µg/mL, obtendo-se a melhor resposta com 20µg/mL. Além disto,

o anticorpo anti-MBL biotinilado foi usado na diluição de 1/7000, 1/10.000 e 1/21.000 para padronização, contudo a melhor concentração foi a de 1/10.000.

Para avaliar o polimorfismo do gene *MBL2*, optou-se pelo ensaio da PCR em tempo real seguido da curva de dissociação (curva de *melting*) pela sua especificidade, baixo custo e por ter sido padronizado pelo grupo do Prof. Sergio Crovella (Instituto Burlo Garofollo, Trieste, Itália) (Arraes et al., 2006), o que agilizou a implantação em nosso laboratório. Os ensaios de sequenciamento direto também já estavam padronizados pelo grupo acima, facilitando a sua implementação para nossas amostras. O mesmo motivo explica a opção da avaliação dos SNPs da MASP-2, realizada por PCR em tempo real na plataforma *TaqMan*.

Dentre os trabalhos realizados no Brasil, nenhum deles foi feito com doadores de sangue. Assim, pudemos comparar nossa casuística apenas com grupos controles de estudos de pacientes com doenças avaliadas para os polimorfismos de MBL. Estes trabalhos revelaram uma prevalência do genótipo O/O de 5,7% a 6,8% (Tabela 4), enquanto que nossos resultados foram semelhantes, de 5,1%. A frequência alélica também mostrou-se não variar muito, com valores de 74,8% a 80,6% para o alelo A nos grupos controles *versus* 76,7% em nossa população. Para o alelo O, a frequência nos grupos controles variou de 25% a 30% enquanto que no nosso grupo foi de 23,3%.

Comparando nossa frequência de 5,1% do alelo O/O com trabalhos internacionais, os valores se assemelham aos da Dinamarca (6%), Inglaterra (7%), Groenlândia (4%) e Japão (5%); porém são inferiores aos encontrados no Quênia (13%), Argentina (14%) e Peru (65%) (Madsen et al., 1998a).

Vários trabalhos têm demonstrado a alta frequência dos alelos variantes do gene *MBL2* no mundo, com poucas exceções. Isto nos leva a considerar que a baixa concentração de MBL poderia não ser uma desvantagem, mas sim um fator de proteção para algumas doenças. Neste contexto temos, por exemplo, aquelas causadas por micobactérias (*Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*) ocorrem mais frequentemente em pacientes com níveis aumentados de MBL; a fagocitose via complemento como resultado da opsonização parece facilitar estas infecções intracelulares (Garred et al., 1994). Assim, polimorfismos do gene *MBL2* poderiam ser mantidos através de heterozigose – o que seria vantajoso para indivíduos heterozigotos – em analogia ao clássico exemplo do traço falcêmico na África (alelo HbS). Hellemann et al. descreveram pacientes heterozigotos para variantes estruturais do gene *MBL2*, quando admitidos em unidades de terapia intensiva, apresentaram sobrevida maior, mesmo quando outros co-fatores foram considerados (Hellemann et al., 2007). Na população do Benin (África), foi descrito um aumento dos variantes heterozigotos entre adultos comparando com recém-nascidos (Dossou-Yovo et al., 2007), sugerindo morte prematura destas crianças.

No que se refere à etnia da população estudada, o ideal seria caracterizar as raças através da avaliação do DNA mitocondrial (mtDNA), que é usado para estudar a evolução humana. O mtDNA é mais estável que o DNA nuclear, apresenta genoma haplóide (herança materna) e não sofre recombinação. Como a miscigenação racial no Brasil é comum, a raça é um dado que não permite comparar com fidedignidade aos outros estudos que avaliam MBL em populações bem definidas (ex.: esquimós, dinamarqueses, etc.). Assim, ousamos extrapolar os achados de Alves-Silva et al. (Alves-Silva et al., 2000) que estudaram os haplótipos dos ancestrais das linhagens de mtDNA no Brasil. Foi verificado que indivíduos do sudoeste (n=99, representado pelo estado de Minas Gerais) apresentam a seguinte frequência de ancestrais: 33% de ancestrais americanos nativos, 34% de africanos e 31% europeus. Levando em consideração os dados dos questionários dos indivíduos entrevistados para doação de sangue, no qual o indivíduo denominava sua raça (dados não mostrados), as frequências foram: 73,13% (215/294) caucasianos, 19,05% (56/294) africanos e 7,82% (23/294) mestiços. Optou-se por não utilizar esta informação, baseado no estudo de cor e ancestrais genômicos em brasileiros, de Parra et al. (Parra et al., 2003) cujos resultados sugerem que, no Brasil, em nível individual, a cor é preditor fraco de ancestral africano, estimado por marcadores moleculares.

Apesar da etnia ser um ponto delicado deste trabalho, vale ressaltar que a etnia dos grupos controle dos trabalhos citados, em especial os brasileiros, foram molecularmente caracterizados apenas por Boldt et al.

(2006). Foram avaliadas frequências dos haplótipos de MBL em seis diferentes populações brasileiras, em um trabalho epidemiológico para verificar os polimorfismos em várias populações (afro-brasileiros, euro-brasileiros, brasileiros orientais, índios Kaingang e Guarani, e mestiços). Na população de mestiços, com 107 indivíduos, foram encontradas as seguintes frequências: HYPA 24%, LYQA 22%, LYPA 8%, LXPA 19%, LYPB 17%, LYQC 3%, HYPD 7% (Boldt et al., 2006), não muito diferentes quando comparadas às da nossa casuística: HYPA 28%, LYQA 22%, LYPA 11%, LXPA 15%, LYPB+LYPD= 12% (corresponde ao LYPO), LYQC (=LYQO) 8%.

Sabemos que os polimorfismos de *MBL2* variam entre populações (Boldt et al., 2006; Bouwman et al., 2006; Casanova, Abel, 2004). A frequência do haplótipo HYPA varia de 6% em Moçambique (Madsen et al., 1998) até 81% nos Esquimós (Madsen et al., 1995); LYQA varia de 0 nos Esquimós e Mapuches (Argentina) (Madsen et al., 1995; Madsen et al., 1998) até 27% em Moçambique (Madsen et al., 1998); haplótipo LYPA varia de 0,07% nos índios Guarani (Boldt et al., 2006) até 30% em Moçambique (Madsen et al., 1998); LXPA varia de 1% em Chiriguanos (Argentina) (Madsen et al., 1998) até 24% na Dinamarca (Steffensen et al., 2000) e Quênia (Madsen et al., 1995); LYPB varia de 0 em Moçambique até 46% nos Mapuches (Madsen et al., 1998); LYQC varia de 0 nos Chiriguanos (Madsen et al., 1998) até 24% em Moçambique (Madsen et al., 1998) e Quênia (Madsen et al., 1995). O haplótipo HYPD varia de 0 em Moçambique (Madsen et al., 1998) até 8% na Austrália (Minchinton et al., 2002). Haplótipo

LYPD é raro, frequência de 0 nas populações, exceto no Brasil (euro-brasileiros) de 0,03% (Boldt et al., 2006).

Comparando nossos resultados com outros grupos populacionais, o haplótipo HYP A (28%) foi menor que nos índios Kaingang (56%), índios Guarani (50%) e maior que em Moçambique (6%) (Madsen et al., 1998). O haplótipo LYQ A (22%) foi similar aos Dinamarqueses (20%) (Steffensen et al., 2000) e maior que nos Esquimós (0) (Madsen et al., 1995), índios Kaingang (0,4%) e índios Guarani (5%) (Boldt et al., 2006). O haplótipo LYP A (11%) foi menor que em Moçambique (30%) (Madsen et al., 1998) e maior que nos índios Guarani (0,07%) (Boldt et al., 2006). O haplótipo LXPA (15%) foi menor que no Quênia (24%) (Madsen et al., 1995) e maior que nos índios Kaingang (0,06%), Guarani (0,03%). O haplótipo LYPO (=LYPB+LYPD) (12%) foi menor que índios Kaingang (29%) e Guarani (44%) e maior que Moçambique (0) (Madsen et al., 1998). O haplótipo LYQO (=LYQC) 8% foi menor que no Quênia (Madsen et al., 1995) e Moçambique (Madsen et al 1998) e maior que índios Kaingang (0,04%) e Guarani (0) (Boldt et al., 2006). O haplótipo HYPD (4%) foi menor que Austrália (8%) (Minchinton et al., 2002), igual ao Quênia (4%) (Madsen et al., 1995) e maior que nos índios Kaingang (0) e Guarani (0) (Boldt et al., 2006).

A primeira descrição de deficiência de MASP-2 rs12711521 (D371Y), a troca do ácido aspártico pela tirosina (Stengaard-Pedersen et al., 2003) ocorreu em um paciente com quadro de infecção pneumocócica invasiva e doença auto-imune, e foi considerado um “achado” (Jensenius J, informação

verbal)² já que o paciente apresentava várias outras mutações concomitantes: MASP-2(D120G) e MBL (alelo B) (Stengaard-Pedersen et al., 2003). Isto corrobora com o fato de que a deficiência de MBL pode não ter valor clínico relevante se o paciente tiver o sistema imune intacto. Este achado nos estimulou a avaliar a ocorrência desta mutação em uma população sadia.

O resultado, por nós encontrado, de que os níveis séricos de MASP-2 não se correlacionaram com os níveis de MBL *high*, *low* e *deficient producer* pode suscitar a questão de que o SNP avaliado não tenha efeito biológico e, portanto, relevância clínica no fenótipo quando esta for uma alteração única no sistema imune, em indivíduos saudáveis. Vale ressaltar que apenas 38,78% dos indivíduos não apresentaram este SNP (A/A).

O projeto Hap Map, que descreve os polimorfismos gênicos em diferentes populações (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12711521), descreve que a frequência da distribuição de MAF (*minor allele frequency*) para o gene MASP-2 é a seguinte: na Europa 14, na Ásia varia de 28-40, na África do Sub-Sahara 90 (o menor alelo nesta população é A, enquanto que nas outras é o alelo C). O MAF da nossa casuística é de 38,95. Se considerarmos que o perfil racial da população brasileira é decorrente de uma miscigenação entre Caucasianos, Americanos nativos (índios) e

² Informação fornecida por Jens Jensenius no Congresso Europeu em Imunodeficiências (ESID) em Hertogenbosch, 2008.

Africanos, nosso resultado intermediário entre europeus 14% e africanos do Sub-Sahara 90% é algo que corresponde à nossa expectativa.

Este é o primeiro trabalho que descreve a prevalência de 16,67% do alelo mutante (C/C), com frequência alélica de 61,05% para o alelo A e 38,95% para o alelo C. Há um único trabalho italiano que estudou este polimorfismo em pacientes com hepatocarcinoma, cujo grupo controle (n=164) de pacientes apresentou 6% de indivíduos mutantes (C/C), valor de quase um terço dos nossos resultados ($p = 7,3 \times 10^{-8}$). Ainda, a frequência alélica dos italianos foi de 80% para o alelo A e 20% para o alelo C (Segat et al., 2008). Outro trabalho, publicado em 2009 por Wang et al. descreve prevalência deste polimorfismo em duas populações da China: região sul, 13,4% ($p = 0,25$) e norte 15,1% ($p = 0,085$) nos indivíduos dos grupos controles na população de Beijing (n=232) e de Guangzhou (n=291), respectivamente. Ou seja, não houve diferença estatística entre nosso grupo e os outros descritos.

Especula-se que a presença da variante D371Y da MASP-2 tenha papel na autoimunidade (Crovella S, informação verbal)³, mas seu papel não está definido.

A possibilidade de avaliar os níveis de MBL e MASP-2 sérica com técnicas padronizadas na rotina laboratorial traz a oportunidade de implementar o conhecimento sobre a via das lectinas e pode ter um

³ Informação fornecida por Sergio Crovella no II Simpósio Internacional de Imunodeficiências primárias (SIDEPI) em São Paulo, 2009.

importante impacto no diagnóstico e tratamento das imunodeficiências primárias. Vale citar que a reposição de MBL em pacientes com esta imunodeficiência tem sido descrita em estudos de fase I, II e III (Summerfield, 2003; Valdimarsson, 2003; Valdimarsson et al., 2004).

Portanto, o número crescente de estudos para determinar a relevância dos níveis de MBL e MASP-2, ou mesmo, a presença de polimorfismos destas proteínas em situações clínicas, tornou necessário estabelecer padrões de normalidade em uma população brasileira. Com relação especificamente a MASP-2, o polimorfismo estudado não havia sido avaliado em nossa população e há poucos dados na literatura. Há a possibilidade que estas proteínas tenham um papel modulador de processos inflamatórios na vigência de outros defeitos imunológicos e, embora, sem repercussão por um defeito isolado, não devem se consideradas irrelevantes.

7 CONCLUSÃO

A padronização da técnica de ELISA para MBL *in house* mostrou forte correlação com o método de ELISA feito pelo *Kit* comercial, permitindo um menor custo na realização destas dosagens.

Os níveis séricos de MBL se correlacionaram com os seus respectivos genótipos A/A, A/O e O/O, assim como os níveis séricos de MASP-2 corresponderam ao seu respectivo genótipo (A/A, A/C e C/C) no que se refere ao polimorfismo D371Y (rs12711521), independentemente de sexo ou idade. Estes dados confirmam a padronização adequada de ambos os ensaios.

O estabelecimento de valores das proteínas MBL e MASP-2, com os polimorfismos presentes em uma população sadia permitem a utilização destas informações em estudos sobre sua repercussão em situações clínicas.

ANEXO A – Questionário para doadores de sangue

Obrigado por ter vindo doar sangue. Por favor, leia com atenção este questionário e responda com sinceridade a todas as perguntas. As respostas são absolutamente sigilosas. Lembramos que o questionário é para verificar se a sua doação põe em risco a sua saúde e a saúde das pessoas que vão receber o seu sangue. Responder até os itens 24 (para homens) e 26 (para mulheres).

1. Já doou sangue, quando foi a última vez? Onde?	SIM	NÃO
2. Sentiu-se mal após a doação?	SIM	NÃO
3. Tem tonteiças habitualmente?	SIM	NÃO
4. Dormiu bem esta noite?	SIM	NÃO
5. Está se sentindo bem?	SIM	NÃO
6. Está gripado, com tosse, dor de garganta?	SIM	NÃO
7. Teve diarreia, emagrecimento, febre nos últimos meses?	SIM	NÃO
8. Tem alergia?	SIM	NÃO
9. Usou algum medicamento, AAS, anti-inflamatório nos últimos 7 dias?	SIM	NÃO
10. Ingere bebida alcoólica diariamente?	SIM	NÃO
11. Bebeu hoje?	SIM	NÃO
12. Usou ou usa droga injetável?	SIM	NÃO
13. Se relacionou sexualmente com alguém que usa droga injetável?	SIM	NÃO
14. Fez alguma cirurgia nos últimos 6 meses?	SIM	NÃO
15. Recebeu transfusão de sangue ou derivados no último ano?	SIM	NÃO
16. Recebeu alguma vacina no último ano?	SIM	NÃO
17. Já teve hepatite? Icterícia?	SIM	NÃO
18. Já teve sífilis ou outra doença sexualmente transmissível?	SIM	NÃO
19. Teve doença de Chagas? Malária?	SIM	NÃO
20. Esteve em zona endêmica nos últimos 3 anos?(lugares que tenham doenças como Malária, doença de Chagas etc.)	SIM	NÃO
21. Teve alguma outra doença?	SIM	NÃO
22. Tem Diabetes?	SIM	NÃO
23. Tem problemas cardíacos?	SIM	NÃO
24. Tem problemas respiratórios?	SIM	NÃO
25. Fez endoscopia há menos de 1 ano?	SIM	NÃO
26. Tem infecções de repetição? (uso freqüente de antibióticos)	SIM	NÃO
SOMENTE PARA SER RESPONDIDO POR DOADORA FEMININA:		
27. Está Grávida? Amamentando?	SIM	NÃO
28. Sofreu aborto nos últimos 3 meses?		
OS ITENS A SEGUIR SERÃO PREENCHIDOS PELO MÉDICO:		
29. Tem tatuagem? <i>Piercing</i> ? Faz acupuntura? Quanto tempo?	SIM	NÃO
30. Já fez sexo por dinheiro?	SIM	NÃO
31. Freqüenta termas, casa de massagem?	SIM	NÃO
32. Já teve relação sexual com pessoa que usa ou já usou droga na veia?	SIM	NÃO
33. Já teve relação sexual com pessoa com exame positivo para AIDS ou Hepatite?	SIM	NÃO
34. Já fez teste para AIDS? Se sim, por que motivo?	SIM	NÃO
35. Quantos parceiros sexuais teve neste último ano?		
36. Já esteve internado? Clínicas? Manicômio? Penitenciária? Por quê?	SIM	NÃO
37. Usou ou usa droga?	SIM	NÃO
38. Já teve relação sexual com outro homem? (relação homossexual)?	SIM	NÃO

ANEXO B – Consentimento livre e esclarecido

TRABALHO: PREVALÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL) EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Laboratório de Investigação Médica (LIM56), Depto. de Dermatologia, Faculdade de Medicina da USP juntamente com o Serviço de Alergia e Imunologia, Depto. de Clínica Médica do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE-RJ) e o Serviço Médico de Hemoterapia do HSE-RJ estão desenvolvendo uma pesquisa com o objetivo de compreender melhor a função do sistema de defesa (imunológico) mais precisamente, uma via do sistema complemento, a via da Proteína Ligadora de Manose (MBL). Os responsáveis pela pesquisa são Dra. Anete Grumach (USP), Dr. Carlos Loja (HSE-RJ), Dra. Natasha Ferraroni (HSE-RJ) e Dra. Izabel Maria de Siqueira (Serviço de Hemoterapia, HSE-RJ). Este estudo tem como objetivo conhecer a ocorrência da deficiência de MBL em uma população brasileira. A MBL participa da proteção contra infecções causadas por bactérias, fungos e vírus. Para este estudo é necessária a coleta de 4 mL de sangue para realização de exames laboratoriais específicos. O(A) Sr(a) não tem obrigação de contribuir para este estudo e sua recusa não ocasionará em prejuízo em sua doação de sangue. Nós o(a) escolhemos porque é aparentemente saudável, já que deseja doar seu sangue. Se você concordar em participar desta pesquisa, serão coletados 4mL de sangue do seu braço durante a doação de sangue, em uma única ocasião. Você será convocado(a) por telegrama para coletar uma segunda amostra no Banco de Sangue do Hospital dos Servidores do Estado apenas se o exame estiver alterado (chance de 5 em cada 100 pacientes, de acordo com trabalhos estrangeiros). Como em qualquer coleta de sangue pode haver desconforto local, o que já ocorreria pelo próprio procedimento da doação de sangue; a única diferença é que serão coletados 4 mL a mais. Não haverá dano psíquico, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano em qualquer fase desta pesquisa. Não haverá ressarcimento das despesas com transporte ou outras despesas, já que o(a) doador(a) comparece de livre e espontânea vontade para o ato da doação de sangue. Em nenhum momento seu nome será divulgado em publicações, relatórios, ou em quaisquer outros meios de comunicação, sendo, portanto, o resultado desta pesquisa confidencial. Este estudo não prevê benefícios diretos para você, mas, poderá ajudar no desenvolvimento de métodos para melhorar o diagnóstico e tratamento de defeitos da resposta imunológica. Caso alguma informação obtida a partir dessa pesquisa possa ser útil ao doador, nós o(a) avisaremos. Para o esclarecimento de eventuais dúvidas, entrar em contato com: Dra. Anete Grumach (11) 3066-7499 ou Dra. Natasha Ferraroni, 21-2540-0612, 8176-3899. Serviço de Hemoterapia: 21-2213-2502. Comitê de Ética: 21-2291-3131, R:3544

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Rio de Janeiro, _____ de _____ 2004.

Assinatura do paciente ou responsável legal

Dra. Natasha R. Ferraroni

ANEXO C – Cópia Aprovação do Comitê de Ética do HSE

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
HOSPITAL DOS SERVIDORES DO ESTADO**

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2004.

Do: CEP-HSE
Ao Ilmo Sr. Dr. Carlos Pinto Loja Neto.

Assunto: Aprovação do Protocolo CEP: 000.172.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital dos Servidores do Estado, analisou e considerou aprovado em 14 de junho de 2004, o protocolo de pesquisa intitulado: "Prevalência da deficiência de lectina ligadora de manose (MBL) em uma população brasileira", na versão original São Paulo, 2004, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido, na versão original sem data, cujo pesquisador principal é o Dr. Carlos Loja, chefe do Serviço de Alergia deste Hospital, estando o projeto de pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, devendo o pesquisador principal:

- 1- enviar os relatórios da pesquisa nas datas estabelecidas na folha de rosto e segundo critérios que se façam necessários pelo Comitê e pelo pesquisador;
- 2- notificar imediatamente o Comitê em caso de algum evento que possa comprometer a integridade física ou psíquica dos sujeitos da pesquisa e mediante a possibilidade de algum dano aos sujeitos;
- 3- submeter ao Comitê qualquer alteração ou emenda ao protocolo.

Dr. Marcos Henrique Manzon
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos do HSE

ANEXO D – Cópia aprovação do comitê de Ética CAPPesq HC-FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1236/05**, intitulado: "Prevalência da deficiência da lectina ligadora de manose (MBL) em uma população brasileira." apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Anete Sevciovic Grumach

Pesquisador(a) Executante: Dra. Natasha Rebouças Ferraroni

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO E – Reagentes ELISA MBL in house

- Azida sódica (609374 Sigma®)
- BSA – Albumina bovina humana (A-3294 Sigma®)
- CaCl_2 (C- 1015 Sigma®)
- EDTA (E-81861 Sigma®)
- H_2SO_4 (A-1060-01 Synth®)
- Manose (M-7504 Sigma®)
- NaCl (S-6191 Sigma®)
- Streptavidina-peroxidase (A-6029 Sigma®)
- Tetramethylbenzidine (TMB) (00-2023 Invitrogen®)
- Tris HCL (T-3253 Sigma®)
- Tris Base (T-1503 Sigma®)
- Tween 20 (63158 Sigma®)

ANEXO F - Preparo dos reagentes - ELISA para MBL

- TAMPÃO TBS (Solução estoque – 10X concentrado)
0,1 M de Tris- HCL
1,4 M de NaCl
Diluir em água ultrafiltrada
pH 7,4
- TAMPÃO TBS USO (1X CONCENTRADO)
Diluir TBS 10X concentrado em Água ultrafiltrada
Adicionar 1/100 de azida sódica 9,9%
- TAMPÃO TBS/TWEEN 0,05%
Adicionar ao TBS 1X Tween a 0,05%
- TAMPÃO TBS / TWEEN 0,5% / Ca^{2+} (Solução estoque – 10X concentrado)
0,1 M de Tris-HCL
1,4 M de NaCl
0,99% de Azida sódica
0,5% de Tween 20
50 mM de Ca^{2+}
Diluir em água ultrafiltrada
- TAMPÃO TBS / TWEEN 0,05% / Ca^{2+} (Solução uso)
Diluir o tampão 10X concentrado em água ultrafiltrada
- ALBUMINA BOVINA/HUMANA – (2mg/mL)
2mg de BSA
Diluir em Tampão 1 mL TBS com 0,1% de azida sódica

- TAMPÃO ROSA (Diluição)
20 mM de Tris-Base (2,42g)
1 M de NaCl (58,44g)
10m mM de CaCl₂ (1,10g)
1 mg de BSA/mL
1000 mL de água ultrafiltrada
pH para 7,4
- TAMPÃO CARBONATO/BICARBONATO
Peso molecular para uso = 0,5M
Preparo para 200mL a 0,5M
50 mL de carbonato
150 mL de bicarbonato
pH 9,5
Colocar em frasco transparente
Conservar em geladeira
- TAMPÃO CARBONATO (Na₂CO₃) PESO MOLECULAR = 0,5M
26,4975g de carbonato
500 mL de água destilada
pH 9,5
- TAMPÃO BICARBONATO (NaHCO₃)
Peso molecular 0,5M
21,002g de bicarbonato
500 mL de água destilada
pH 9,5

ANEXO G – *Primers, Kits e anticorpos utilizados*

Catálogo	Descrição	Marca
1002480677	MBL FWD <i>primer</i> 5'-GGCTTCCCAGGCAAAGATG-3'	Operon
1002480678	MBL REV <i>primer</i> 5'-AGCCCAACACGTACCTGGTT-3'	Operon
4351379	<i>TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays C_22271950_20</i>	Applied Biosystems
N808-0247	<i>AmpliTaq Gold DNA Polymerase</i>	Applied Biosystems
4364338	<i>TaqMan Master Mix</i>	Applied Biosystems
4334973	<i>SyberGreen PCR Masbeer Mix</i>	Applied Biosystems
4337450	<i>Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standard version 1.1</i>	Applied Biosystems
SER 101	<i>MBL Standard Serum SER 101</i>	Antibodyshop
SER 102	<i>MBL Oligomer deficient serum B/B genotype</i>	Antibodyshop
HYB131-01B	<i>Anti Mannan-binding lectin (human MBL) biotinylated</i>	Antibodyshop
HK 326	<i>Human MASP-2 ELISA Kit</i>	Hycult biotechnology
HK 323	<i>Human MBL ELISA Kit</i>	Hycult biothecnology

ANEXO H – Lista de pacientes e resultados

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
1	M	38	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	1565	1712	2567
2	M	46	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AC	980	1127	1810
3	M	27	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AA	3452	3098	3241
4	F	48	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	CC	3459	3110	2492
5	M	27	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	CC	3372	3121	892
6	M	46	A/O	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPO	D	AC	890	930	2563
7	M	30	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	CC	142	<410	804
8	M	29	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	CC	3369	2732	698
9	M	57	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	3396	2935	3127
10	M	32	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	3387	2896	2994
11	M	49	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	870	710	2123
12	M	33	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	3349	2972	3266
13	M	60	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	1979	1754	2258
14	F	30	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AA	2930	2785	3421
15	M	19	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	3366	2784	2553
16	M	37	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	3426	2536	2172
17	M	45	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AA	934	769	3190
18	F	56	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AA	2983	2867	3345
19	M	27	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	3328	3043	2076
20	M	31	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	910	833	2161
21	M	49	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	2773	2521	3398
22	M	21	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	478	561	3239
23	F	21	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	2131	1481	2540
24	F	48	A/O	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPO	D	CC	901	689	721
25	M	27	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	833	527	2356
26	M	44	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	1629	1491	3430
27	M	27	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AA	946	709	3465
28	F	44	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	280	<410	265
29	M	46	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	CC	2387	1922	843
30	M	37	O/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPO/LYQO	D	AC	131	<410	2381
31	M	36	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	1505	1288	3611
32	M	21	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	351	<410	2134
33	M	46	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	2312	2119	2388
34	M	34	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AA	3274	1605	3151
35	M	24	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	CC	3282	1660	604
36	M	35	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	990	872	3412
37	F	40	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	2359	2121	3647

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (continuação)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
38	M	31	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	816	544	3056
39	M	44	A/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPO	L	AA	946	623	3279
40	M	36	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	3342	2822	3176
41	M	37	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	170	<410	3432
42	M	37	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AC	2242	2474	2094
43	M	60	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	CC	1572	1146	744
44	M	34	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	CC	559	477	858
45	M	40	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	AC	1227	1092	1823
46	F	38	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AC	1258	1425	2003
47	M	35	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	CC	1295	1557	1004
48	M	43	A/O	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQO	D	AC	163	<410	2131
49	F	36	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	1610	1581	3409
50	F	52	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	CC	1491	1286	991
51	F	23	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AC	1050	1169	1980
52	F	54	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYP A	H	AC	1533	1256	2111
53	M	23	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	CC	1206	1387	693
54	F	35	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYP A	H	AC	1872	1578	2056
55	F	41	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	465	<410	2321
56	M	33	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	CC	924	1344	841
57	M	44	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	152	<410	2208
58	M	30	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AA	1688	1473	3367
59	M	38	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AA	1752	1531	3342
60	M	32	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AA	1229	1443	3005
61	M	19	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AC	241	<410	2750
62	M	18	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	L	AC	455	<410	2576
63	M	46	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AA	951	1388	3409
64	M	34	A/A	L/L	X/X	P/P	LXPA/LXPA	L	CC	427	<410	647
65	M	44	O/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPO	D	AC	216	<410	2540
66	F	52	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	CC	1318	923	817
67	M	25	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AA	1467	1221	3497
68	F	32	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AA	293	<410	3651
69	M	45	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYP A	H	CC	925	1445	798
70	M	35	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	530	413	2233
71	M	37	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AA	1562	1343	3263
72	F	63	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AC	1629	1401	2076
73	F	44	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AC	1379	1211	2421
74	F	26	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	347	<410	2415

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (continuação)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
75	M	29	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	1407	1329	2187
76	M	25	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AA	1384	1102	3329
77	M	27	A/O	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYPO	L	CC	843	731	755
78	F	44	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	AA	1622	1338	3049
79	M	39	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	2214	1833	3624
80	M	22	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AC	1639	1311	2419
81	M	47	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYP A	H	AA	1532	1288	3218
82	M	25	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AC	3461	2877	2066
83	F	26	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYP A	L	AC	840	767	2731
84	F	43	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AC	1712	1378	2378
85	M	41	A/O	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPO	D	AA	204	<410	3409
86	F	47	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AA	1824	1612	3690
87	M	40	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYP A	H	AA	2138	1833	3298
88	F	34	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AA	2258	1914	2967
89	M	32	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	AA	2315	1897	2690
90	M	51	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	CC	2278	2027	600
91	M	28	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	CC	856	728	675
92	F	35	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AA	1846	1539	3822
93	F	21	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	CC	215	<410	741
94	M	22	A/A	L/L	X/X	P/P	LXPA/LXPA	L	AC	713	982	2147
95	M	46	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AA	561	715	3491
96	F	28	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AC	3429	2834	2609
97	M	37	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	AA	2745	2238	3712
98	M	52	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYP A	L	AC	256	<410	2198
99	F	19	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AC	3821	2779	2391
100	M	44	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	2461	2067	3776
101	F	26	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	1829	1507	3511
102	M	42	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	CC	1582	1329	836
103	M	38	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	AC	1720	1405	2175
104	M	60	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYP A	H	AC	2314	1710	2471
105	M	25	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AC	2370	2014	2804
106	F	25	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AA	1692	1477	3419
107	M	41	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	CC	851	640	731
108	F	33	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYP A	H	AC	2157	1902	2307
109	M	48	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	322	<410	2129
110	M	31	A/O	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPO	D	AA	3007	2182	2993
111	F	56	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	2301	1922	3091

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (continuação)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
112	M	59	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AA	1786	1342	3277
113	M	47	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AC	1237	871	2799
114	M	45	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	CC	990	628	812
115	M	31	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AC	2776	2015	2312
116	M	52	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	2366	1926	3489
117	F	48	A/O	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPO	L	AC	873	624	2632
118	M	23	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AC	3111	2432	2377
119	M	35	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AA	844	631	3286
120	M	23	A/A	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPA	H	AC	1223	1002	2608
121	M	35	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	48	772	3472
122	F	18	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	321	<410	2711
123	F	21	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	2658	2295	2407
124	F	50	A/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPO	L	AC	648	491	2131
125	M	50	A/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPO	L	AC	345	<410	2351
126	M	25	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	1134	1143	2483
127	M	36	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	328	<410	2186
128	M	42	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	1639	1455	2364
129	M	41	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AA	2224	1833	3209
130	M	33	A/A	L/L	X/X	P/P	LXPA/LXPA	L	CC	832	648	724
131	M	53	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AA	379	<410	2981
132	M	29	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	887	642	2579
133	M	32	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	CC	651	509	648
134	F	37	O/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQO/LYQO	D	CC	187	<410	716
135	M	36	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AC	1365	1116	2182
136	M	47	O/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPO/HYPO	D	AC	93	<410	2599
137	M	25	A/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPO	L	AA	424	<410	3519
138	M	35	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	2224	1971	2622
139	F	36	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	823	576	2987
140	M	30	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	1447	1092	2655
141	F	39	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AA	3145	1050	3649
142	F	44	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	1495	1163	2376
143	F	30	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	CC	3218	2782	682
144	F	19	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	528	<410	3488
145	M	27	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	CC	973	699	829
146	F	27	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	L	AA	730	485	3782
147	M	46	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AC	2473	1935	2012
148	F	24	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	2040	1733	2405

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (continuação)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
149	M	35	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	1354	1103	3169
150	F	48	A/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPO	L	AA	935	782	3274
151	M	47	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	692	503	3641
152	F	32	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AC	1876	1421	2397
153	M	32	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	615	488	2631
154	M	50	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	CC	1808	1523	739
155	M	44	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AC	2170	1923	2589
156	M	18	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AA	1624	1343	3146
157	M	19	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AC	741	475	2702
158	M	26	A/O	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPO	L	AA	950	721	3319
159	M	28	A/A	L/L	X/X	P/P	LXPA/LXPA	L	AC	880	763	2691
160	F	29	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	2484	1958	2360
161	F	54	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	L	AA	463	<410	3294
162	F	32	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	921	737	2422
163	M	50	O/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPO/LYQO	D	AA	204	<410	3614
164	M	40	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AA	1655	1423	3196
165	M	26	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	3139	2844	2207
166	F	39	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	2866	2179	3623
167	M	39	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	2395	1872	2821
168	F	35	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	1270	622	3676
169	M	29	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	712	510	3593
170	M	39	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	3130	2644	2760
171	F	45	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	CC	2959	2322	655
172	M	37	A/O	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPO	L	AC	311	<410	2278
173	F	35	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	281	<410	2747
174	M	37	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	CC	1823	1640	723
175	F	54	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	2920	2773	2218
176	M	46	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	234	<410	3212
177	M	38	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	2846	2507	3498
178	F	43	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AA	3067	2633	3341
179	M	45	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	CC	299	<410	1107
180	F	38	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AC	3053	2748	1933
181	M	42	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	2566	2133	2187
182	M	30	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AA	228	<410	3021
183	F	24	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	2373	1982	3713
184	M	44	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	821	457	2182
185	M	63	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	CC	683	478	727

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (continuação)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
186	M	54	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	2097	1624	1633
187	M	27	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AC	2208	1821	2034
188	M	46	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	880	502	2354
189	M	33	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	CC	2623	2279	824
190	M	32	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	492	<410	3588
191	F	26	A/A	L/L	X/X	P/P	LXPA/LXPA	L	CC	793	664	674
192	M	20	O/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPO/HYPO	D	AC	283	<410	1933
193	M	18	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	982	734	2339
194	F	35	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	CC	2224	1849	613
195	M	21	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	CC	161	<410	741
196	M	61	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	143	<410	2117
197	F	22	A/A	L/L	X/X	P/P	LXPA/LXPA	L	AC	886	612	1877
198	M	27	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	744	603	2207
199	M	39	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	2877	2403	1839
200	M	26	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	2306	1830	2129
201	M	21	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	694	512	2588
202	M	33	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AC	3186	2659	1733
203	M	47	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	1438	1134	3501
204	F	40	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	3329	2723	2111
205	M	44	O/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPO/LYPO	D	AC	259	<410	2355
206	F	53	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AA	625	483	3120
207	M	48	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	821	642	2373
208	F	56	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	3200	2794	3108
209	M	43	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AA	792	471	2877
210	M	26	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AA	2384	1922	2905
211	M	26	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AA	2358	2056	3144
212	M	33	A/O	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPO	L	AA	723	544	3431
213	M	35	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	298	<410	1705
214	M	44	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	468	<410	3378
215	M	35	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	3486	2809	3499
216	M	18	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AC	3335	1004	2128
217	M	44	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	3498	3128	3256
218	F	34	A/O	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQO	D	AC	232	<410	2173
219	M	36	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AA	920	771	3306
220	M	27	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	1491	1285	3479
221	F	33	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AA	673	429	3188
222	M	48	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AA	3336	3091	2994

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (continuação)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
223	M	40	O/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPO/LYQO	D	CC	164	<410	838
224	M	21	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	2493	2115	1877
225	F	28	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	1945	1669	2301
226	M	56	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	824	669	2466
227	M	46	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AC	631	447	2094
228	F	29	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	AC	2333	2104	2294
229	F	27	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPA	H	AC	3219	2893	1826
230	F	39	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	2771	2496	2033
231	F	48	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AA	198	<410	3509
232	F	38	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AA	1933	1620	3158
233	F	45	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AC	1260	822	2455
234	F	34	O/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQO/LYQO	D	AA	2366	2139	3002
235	F	25	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	2981	2664	3428
236	M	28	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	AC	271	<410	2679
237	M	20	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	3326	3022	2216
238	M	39	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	3342	2778	2531
239	F	26	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	CC	3114	2886	648
240	F	38	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	1993	1639	2457
241	M	26	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	AC	2732	2451	2349
242	F	54	O/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPO/HYPO	D	CC	392	<410	722
243	M	42	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	677	438	1872
244	M	44	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	443	<410	2246
245	M	36	A/O	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQO	D	AA	143	<410	3174
246	M	21	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	1491	1027	2127
247	M	47	O/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPO/HYPO	D	AC	295	<410	2584
248	M	21	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AC	926	782	2677
249	M	42	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	285	<410	3325
250	M	26	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	191	<410	3527
251	F	26	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AA	964	702	2955
252	M	40	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	853	724	2295
253	F	50	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AA	2674	2449	3466
254	F	33	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	276	<410	3394
255	M	30	A/O	H/H	Y/Y	P/P	HYPA/HYPO	L	AC	466	<410	2721
256	M	34	A/O	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQO	D	AA	288	<410	3052
257	M	21	O/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPO/LYQO	D	AC	147	<410	2134
258	M	27	O/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQO/LYQO	D	AC	141	<410	2325
259	M	51	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	CC	2664	2388	693

continua

*Produção de MBL: H= *High producer*, L= *Low producer*, D= *Deficient producer*.

Lista de pacientes e resultados (conclusão)

N	Sexo	Idade	MBL2	HL	XY	PQ	Haplótipo	Prod. MBL*	MASP-2	MBL in house (µg/mL)	MBL KIT (µg/mL)	MASP-2 (µg/mL)
260	M	46	O/O	H/H	Y/Y	P/P	HYPO/HYPO	D	AA	151	<410	3386
261	M	53	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	AC	1688	1271	2248
262	M	38	A/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQO	L	AC	330	<410	2184
263	M	28	A/A	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQA/LYQA	H	CC	2284	1823	719
264	F	49	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AC	2842	2409	1671
265	F	50	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	113	<410	2454
266	F	26	A/O	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQO	D	CC	286	<410	722
267	F	45	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	2351	2181	2199
268	F	24	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AA	339	<410	3168
269	M	19	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYPO	H	AC	1146	836	2251
270	M	32	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	AC	1136	936	1841
271	M	42	A/O	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQO	L	AA	910	783	3522
272	M	40	A/A	L/L	Y/Y	P/Q	LYPA/LYQA	H	CC	2850	2458	749
273	F	37	A/A	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPA	H	CC	1151	996	685
274	F	33	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	2849	1662	3028
275	M	32	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	288	<410	3607
276	M	33	A/A	H/L	X/Y	P/P	LXPA/HYPA	H	CC	2684	2321	844
277	M	22	A/O	L/L	Y/Y	P/P	LYPA/LYPO	L	AA	702	538	3623
278	M	57	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AC	191	<410	2159
279	F	34	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	CC	1784	1512	623
280	M	18	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AA	2507	2259	3426
281	M	27	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	2545	1760	2630
282	M	44	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	2533	1692	3306
283	M	25	A/O	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPO	L	AC	419	<410	2471
284	M	35	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPA	L	CC	183	<410	803
285	M	44	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AA	2487	2128	2921
286	F	40	O/O	L/L	Y/Y	Q/Q	LYQO/LYQO	D	AA	575	<410	3525
287	M	42	A/O	H/L	Y/Y	P/Q	LYQO/HYPO	L	AA	951	640	3612
288	M	40	A/A	L/L	X/Y	P/Q	LXPA/LYQA	H	AA	1922	1474	3189
289	M	38	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AC	1210	928	1522
290	F	54	A/A	H/H	Y/Y	P/P	HYP A/HYP A	H	AA	3423	2736	2714
291	M	50	A/A	H/L	Y/Y	P/Q	LYQA/HYPA	H	AC	1295	872	2147
292	M	19	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	AA	2871	2552	3266
293	M	26	A/A	H/L	Y/Y	P/P	LYPA/HYPA	H	CC	3344	2639	659
294	F	48	A/O	L/L	X/Y	P/P	LXPA/LYPO	D	AA	246	<410	3495

9 REFERÊNCIAS

Aittoniemi J, Baer M, Soppi E, Vesikari T, Miettinen A. Mannan binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. *Arch Dis Child*. 1998;78:245-248.

Aittoniemi J, Miettinen A, Laippala P, Isolauri E, Viikari J, Ruuska T, Soppi E. Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr*. 1996;85:906-909.

Alonso DP, Ferreira AF, Ribolla PE, de Miranda Santos IK, do Socorro Pires e Cruz M, Aécio de Carvalho F, Abatepaulo AR, Lamounier Costa D, Werneck GL, Farias TJ, *et al*. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis*. 2007;195:1212-1217.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67:444-461.

Ambrosio AR. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Ativação do sistema complemento e interação com a lectina ligante da manose (MBL). In *Ciências Farmacêuticas*. Curitiba: Universidade Federal Paraná; 2005.

Applied B. Primer Express 2.0. Foster City, CA, USA; 2002.

Arai T, Tabona P, Summerfield JA. Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. *Q J Med*. 1993;86:575-582.

Araujo J, Brandao LA, Guimaraes RL, Santos S, Falcao EA, Milanese M, Segat L, Souza PR, de Lima-Filho JL, Crovella S. Mannose binding lectin gene polymorphisms are associated with type 1 diabetes in Brazilian children and adolescents. *Hum Immunol.* 2007;68:739-743.

Armitage P, Berry G, Matthews JNS. (eds.) *Statistical Methods in Medical Research.* 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2002.

Arraes LC, de Souza PR, Bruneska D, Castelo Filho A, Cavada Bde S, de Lima Filho JL, Crovella S. A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:719-723.

Boldt AB, Culpi L, Tsuneto LT, de Souza IR, Kun JF, Petzl-Erler ML. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. *Hum Immunol.* 2006;67:722-734.

Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol.* 2006;67:247-256.

Brandao LA, Guimaraes RL, Araujo J, Arraes LC, Segat L, Crovella S. Association between MBL2 polymorphism and T1D: does ethnicity play a role in the susceptibility of this multifactorial disease? *Hum Immunol.* 2008a;69:577-579.

Brandao LA, Guimaraes RL, Carrera M, Milanese M, Segat L, Luiz de Lima-Filho J, Arraes LC, Crovella S. MBL2 functional allelic variants and increased risk for the development of atopic dermatitis in Brazilian children. *Arch Dermatol.* 2008b;144:412-413.

Brandrup F, Homburg KM, Wang P, Garred P, Madsen HO. Mannan-binding lectin deficiency associated with recurrent cutaneous abscesses, prurigo and possibly atopic dermatitis. A family study. *Br J Dermatol*. 1999;140:180-181.

Brown KS, Ryder SD, Irving WL, Sim RB, Hickling TP. Mannan binding lectin and viral hepatitis. *Immunol Lett*. 2007;108:34-44.

Candy DC, Larcher VF, Tripp JH, Harries JT, Harvey BA, Soothill JF. Yeast opsonisation in children with chronic diarrhoeal states. *Arch Dis Child*. 1980;55:189-193.

Carlsson M, Sjöholm AG, Eriksson L, Thiel S, Jensenius JC, Segelmark M, Truedsson L. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. *Clin Exp Immunol*. 2005;139:306-313.

Casanova JL, Abel L. Human Mannose-binding Lectin in Immunity: Friend, Foe, or Both? *J Exp Med*. 2004;199:1295-1299.

Centers for Diseases Control, a.P. USA Epi Info 3.4.3 Software. Atlanta, GA; 2007.

Chen CB, Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem*. 2004;279:26058-26065.

Childs RA, Drickamer K, Kawasaki T, Thiel S, Mizuochi T, Feizi T. Neoglycolipids as probes of oligosaccharide recognition by recombinant and natural mannose-binding proteins of the rat and man. *Biochem J*. 1989;262:131-138.

Choi EH, Zimmerman PA, Foster CB, Zhu S, Kumaraswami V, Nutman TB, Chanock SJ. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun.* 2001;2:248-253.

Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. *Am J Pathol.* 2001;159:1045-1054.

Conover WJ. ed. *Practical Nonparametric Statistics*. 3 ed. New York: Wiley; 1999.

D'Agostino, R.B., Balanger, A., D'Agostino, R.B. Jr. A suggestion for using a powerful and informative tests of normality. *Am Stat.* 1990.

Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity.* 2001;15:127-135.

Davies J, Neth O, Alton E, Klein N, Turner M. Differential binding of mannose-binding lectin to respiratory pathogens in cystic fibrosis. *Lancet.* 2000;355:1885-1886.

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;145:463-468.

Dossou-Yovo OP, Lapoumeroulie C, Hauchecorne M, Zaccaria I, Ducrocq R, Krishnamoorthy R, Rahimy MC, Elion J. Variants of the mannose-binding lectin gene in the Benin population: heterozygosity for the p.G57E allele may confer a selective advantage. *Hum Biol.* 2007;79:687-697.

Dowd MM, Tangsinmankong N, Siri DD, Hartel AS, Brauer KS, Umeh IN, Day NK, Sleasman JW. Association between mannose-binding lectin deficiency and immunoglobulin subclass 4 deficiency in children with recurrent infections. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:S71.

Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. 2002;416:740-743.

Ezekowitz RA. Genetic heterogeneity of mannose-binding proteins: the Jekyll and Hyde of innate immunity? *Am J Hum Genet*. 1998;62:6-9.

Gadjeva M, Paludan SR, Thiel S, Slavov V, Ruseva M, Eriksson K, Lowhagen GB, Shi L, Takahashi K, Ezekowitz A, *et al*. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin Exp Immunol*. 2004;138:304-311.

Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodriguez de Castro F, Aspa J, Briones ML, Garcia-Saavedra A, Rajas O, Blanquer J, Caballero-Hidalgo A, Marcos-Ramos JA, *et al*. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:368-374, 374 e361-362.

Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem Soc Trans*. 2008;36:1461-1466.

Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet*. 1994;21:125-131.

Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol Immunol*. 2003;40:73-84.

Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 2006;7:85-94.

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.* 1997;349:236-240.

Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A, Andersen V, Jacobsen S. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999a;42:2145-2152.

Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sorensen SF, Petersen J, Volck B, Svejgaard A, Graudal NA, Rudd PM, *et al.* Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J Rheumatol.* 2000;27: 26-34.

Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1999b;104:431-437.

Garred P, Thiel S, Madsen HO, Ryder LP, Jensenius JC, Svejgaard A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. *Clin Exp Immunol.* 1992;90:517-521.

Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun.* 2001;2:442-450.

Good P. ed. Permutation tests: A Practical Guide to Resampling Methods for Hypothesis Testing. New York: Springer-Verlag; 1993.

Granger CB, Mahaffey KW, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Rollins S, Todaro TG, Nicolau JC, Ruzyllo W, *et al.* Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. *Circulation*. 2003;108:1184-1190.

Graudal NA, Homann C, Madsen HO, Svejgaard A, Jurik AG, Graudal HK, Garred P. Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *J Rheumatol*. 1998;25:629-635.

Guardia A, Lozano F. Mannose-binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. *Rev Med Microbiol*. 2003;14:41-52.

Guimaraes V, Guimaraes R, Brandao L, Baldez da Silva MF, Milanese M, Segat L, Castelletti H, Bruneska D, de Lima Filho JL, de Freitas AC, *et al.* Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol*. 2008;69:273-278.

Guo N, Mogues T, Weremowicz S, Morton CC, Sastry KN. The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. *Mamm Genome*. 1998;9:246-249.

Hartshorn KL, Sastry K, White MR, Anders EM, Super M, Ezekowitz RA, Tauber AI. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest*. 1993;91:1414-1420.

Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, Bonde J, Jarlov JO, Wiis J, Faber T, Wetterslev J, Garred P. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients. *Hum Mol Genet.* 2007;16:3071-3080.

Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet.* 1999;353:1049-1053.

Hirano M, Ma BY, Kawasaki N, Okimura K, Baba M, Nakagawa T, Miwa K, Oka S, Kawasaki T. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta. *J Immunol.* 2005;175:3177-3185.

Hladnik U, Braida L, Boniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso A, Crovella S. Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis. *Clin Exp Med.* 2002;2:105-108.

Holmskov U, Holt P, Reid KB, Willis AC, Teisner B, Jensenius JC. Purification and characterization of bovine mannan-binding protein. *Glycobiology.* 1993;3:147-153.

Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today.* 1994;15:67-74.

Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:547-578.

Hundt M, Heiken H, Schmidt RE. Association of low mannose-binding lectin serum concentrations and bacterial pneumonia in HIV infection. *AIDS.* 2000;14:1853-1854.

Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem*. 1987;262:7451-7454.

Ip WK, Chan SY, Lau CS, Lau YL. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1663-1668.

Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev*. 2001a;180:86-99.

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*. 2001b;184:1152-1162.

Jacobsen S, Madsen HO, Klarlund M, Jensen T, Skjodt H, Jensen KE, Svejgaard A, Garred P. The influence of mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. TIRA Group. *J Rheumatol*. 2001;28:935-942.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*. 6th ed. New York: Garland Science; 2005.

Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation*. 2001;104:1413-1418.

Kelly P, Jack DL, Naeem A, Mandanda B, Pollok RC, Klein NJ, Turner MW, Farthing MJ. Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology*. 2000;119:1236-1242.

Kilpatrick DC. Mannan binding protein in sera positive for rheumatoid factor. *Br J Rheumatol*. 1997;36:207-209.

Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572:401-413.

Kilpatrick DC, Bevan BH, Liston WA. Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 1995;10:2501-2505.

Klein J. The major histocompatibility complex. In *Immunology*. Massachusetts: BSC Inc.; 1990. pp. 161-197.

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*. 2001;285:1316-1321.

Kocsis A, Kekesi KA, Szasz R, Vegh BM, Balczer J, Dobo J, Zavodszky P, Gal P, Pal G. Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *J Immunol*. 2010;185:4169-4178.

Krarpur A, Wallis R, Presanis JS, Gal P, Sim RB. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One*. 2007;2:e623.

Krishnaswamy G, Miller CWT, Chi DS. Genetic-molecular defects in MBL-MASP pathway and association with selective immunoglobulin deficiencies: implications for host defense. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:S12.

Kruse C, Rosgaard A, Steffensen R, Varming K, Jensenius JC, Christiansen OB. Low serum level of mannan-binding lectin is a determinant for pregnancy outcome in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187:1313-1320.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, *et al*. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27:95-125.

Kurata H, Cheng HM, Kozutsumi Y, Yokota Y, Kawasaki T. Role of the collagen-*like* domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;191:1204-1210.

Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *J Biol Chem*. 2004;279:21302-21311.

Lau YL, Chan SY, Turner MW, Fong J, Karlberg J. Mannose-binding protein in preterm infants: developmental profile and clinical significance. *Clin Exp Immunol*. 1995;102:649-654.

Lin L.I.-K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*. 1989;255-268.

Lin, L.I.-K. A note on the concordance correlation coefficient. *Biometrics*. 2000;324-325.

Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet*. 1992;1:709-715.

Lipscombe RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology*. 1995;85:660-667.

Lozano F, Suarez B, Munoz A, Jensenius JC, Mensa J, Vives J, Horcajada JP. Novel MASP2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens*. 2005;66:131-135.

Luty AJ, Kun JF, Kremsner PG. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 1998;178:1221-1224.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:190-212.

Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*. 1994;40:37-44.

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*. 1995;155:3013-3020.

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*. 1998a;161:3169-3175.

Madsen HO, Videm V, Svejgaard A, Svennevig JL, Garred P. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. *Lancet*. 1998b;352:959-960.

Matsushita M, Ezekowitz RA, Fujita T. The Gly-54-->Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. *Biochem J.* 1995;311(Pt 3):1021-1023.

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.* 1992;176:1497-1502.

Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. *J Hepatol.* 1998;29:695-700.

Messias-Reason I, Bosco DG, Nisihara RM, Jakobsen LH, Petzl-Erler ML, Jensenius JC. Circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 in endemic pemphigus foliaceus. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33:495-497.

Messias Reason IJ, Schafranski MD, Jensenius JC, Steffensen R. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. *Hum Immunol.* 2006;67:991-998.

Miller C, Wilgenbusch S, Michaels M, Chi DS, Youngberg G, Krishnaswamy G. Molecular defects in the mannose binding lectin pathway in dermatological disease: Case report and literature review. *Clin Mol Allergy.* 2010;8:6.

Miller ME, Seals J, Kaye R, Levitsky LC. A familial, plasma associated defect of phagocytosis: a new cause of recurrent bacterial infections. *Lancet.* 1968;ii:60-63.

Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol.* 2002;56:630-641.

Mogues T, Ota T, Tauber AI, Sastry KN. Characterization of two mannose-binding protein cDNAs from rhesus monkey (*Macaca mulatta*): structure and evolutionary implications. *Glycobiology*. 1996;6:543-550.

Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjöholm A, Matsushita M, Jensenius JC. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol*. 2007;19:141-149.

Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes TP, Schwarzer AP, Szer J, Tait BD, Bik To L, *et al*. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2002;99:3524-3529.

Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol*. 2000;51:111-122.

Naito H, Ma Y, Uemura K, Arano Y, Kawasaki T. Metabolic properties of normal and mutant mannan-binding proteins in mouse plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;256:231-234.

Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, Ryder LP, Koch C, Garred P. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:2853-2863.

Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet*. 2001;358:614-618.

Neth O, Jack DL, Johnson M, Klein NJ, Turner MW. Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-

binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2002;169:4430-4436.

Ng KK, Kolatkar AR, Park-Snyder S, Feinberg H, Clark DA, Drickamer K, Weis WI. Orientation of bound ligands in mannose-binding proteins. Implications for multivalent ligand recognition. *J Biol Chem*. 2002;277:16088-16095.

Nielsen SL, Andersen PL, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin Exp Immunol*. 1995;100:219-222.

Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2001;194:781-795.

Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, Shih MJ, Dodds AW, Reid KB. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J Biol Chem*. 2004;279:32728-32736.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:177-182.

Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius JC. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods*. 2001a;257:107-116.

Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol*. 2001b;38:133-149.

Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet*. 2001;358:637-638.

Pryor RJ, Wittwer CT. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods Mol Biol*. 2006;336:19-32.

R Development Core, T. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; 2008.

Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nisihara R, Messias Reason IJ, Grinberg M, Tarasoutchi F, Kalil J, Guilherme L. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:932-936.

Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Soria N, Nardi N, Vargas A, Munoz S, Bove A, Suarez B, Lozano F. Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48:65-69.

Richardson VF, Larcher VF, Price JF. A common congenital immunodeficiency predisposing to infection and atopy in infancy. *Arch Dis Child*. 1983;58:799-802.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245:154-160.

Roy S, Knox K, Segal S, Griffiths D, Moore CE, Welsh KI, Smarason A, Day NP, McPheat WL, Crook DW, *et al*. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet*. 2002;359:1569-1573.

Saevarsdottir S, Kristjansdottir H, Grondal G, Vikingsdottir T, Steinsson K, Valdimarsson H. Mannan-binding lectin and complement C4A in Icelandic multicase families with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1462-1467.

Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Vikingsson A, Manfredsdottir V, Geirsson AJ, Valdimarsson H. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. *J Rheumatol*. 2001;28:728-734.

SAS Institute I. The NPAR1WAY Procedure. In *SAS/STAT® 92 User's Guide*. Cary, N.C: SAS Institute Inc.; 2008. pp. 4438-4497.

Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med*. 1989;170:1175-1189.

Sastry R, Wang JS, Brown DC, Ezekowitz RA, Tauber AI, Sastry KN. Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collectin genes. *Mamm Genome*. 1995;6:103-110.

Schafrański MD, Pereira Ferrari L, Scherner D, Torres R, Jensenius JC, de Messias-Reason IJ. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. *Mol Immunol*. 2008;45:3827-3831.

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*. 2004;138:521-525.

Segat L, Crovella S, Comar M, Milanese M, Zanotta N, Fabris A, Trevisiol C, Rossi T, De Seta F, Campello C. MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus-related cervical cancer. *Hum Immunol*. 2009;70:436-439.

Segat L, Fabris A, Padovan L, Milanese M, Pirulli D, Lupo F, Salizzoni M, Amoroso A, Crovella S. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. 2008;15:387-391.

Segat L, Silva Vasconcelos LR, Montenegro de Melo F, Santos Silva B, Arraes LC, Moura P, Crovella S. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. *Clin Immunol*. 2007;124:13-17.

Seyfarth J, Garred P, Madsen HO. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbi2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol*. 2006;43:962-971.

Shoukri MM, Edge VL. ed. *Statistical Methods for Health Sciences*. Florida: CRC Press; 1996.

Siegel S, Castellan NJ, ed. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1988.

Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002;417:552-555.

Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis*. 2003;188:777-782.

Soothill JF. Mannose-binding lectin. *Lancet*. 2002;359:82.

Soothill JF, Harvey BA. Defective opsonization. A common immunity deficiency. *Arch Dis Child*. 1976;51:91-99.

Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27:299-319.

Stanworth SJ, Donn RP, Hassall A, Dawes P, Ollier W, Snowden N. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998;37:186-188.

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*. 2000;241:33-42.

Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen LT, Sjolholm AG, Fugger L, Jensenius JC. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med*. 2003;349:554-560.

Stover CM, Thiel S, Thelen M, Lynch NJ, Vorup-Jensen T, Jensenius JC, Schwaebler WJ. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol*. 1999;162:3481-3490.

Sullivan KE, Wooten C, Goldman D, Petri M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1996;39:2046-2051.

Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet*. 1991;337:1569-1570.

Summerfield JA. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:770-773.

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.* 1995;345:886-889.

Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ.* 1997;314:1229-1232.

Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet.* 1989;2:1236-1239.

Takahashi M, Iwaki D, Kanno K, Ishida Y, Xiong J, Matsushita M, Endo Y, Miura S, Ishii N, Sugamura K, *et al.* Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol.* 2008;180:6132-6138.

Tang YW, Cleavinger PJ, Li H, Mitchell PS, Smith TF, Persing DH. Analysis of candidate-host immunogenetic determinants in herpes simplex virus-associated Mollaret's meningitis. *Clin Infect Dis.* 2000;30:176-178.

Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J.* 1989;262:763-771.

Teillet F, Lacroix M, Thiel S, Weilguny D, Agger T, Arlaud GJ, Thielens NM. Identification of the site of human mannan-binding lectin involved in the interaction with its partner serine proteases: the essential role of Lys55. *J Immunol.* 2007;178:5710-5716.

Ten RM, Carmona EM, Babovic-Vuksanovic D, Katzmann JA. Mannose-binding lectin deficiency associated with neutrophil chemotactic unresponsiveness to C5a. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:419-424.

Terai I, Kobayashi K, Fujita T, Hagiwara K. Human serum mannose binding protein (MBP): development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and determination of levels in serum from 1085 normal Japanese and in some body fluids. *Biochem Med Metab Biol*. 1993;50:111-119.

Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Miyakawa H, Mafune N, Kikuta H. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur J Immunol*. 2003;33:2755-2763.

Thiel S, Bjerke T, Hansen D, Poulsen LK, Schiotz PO, Jensenius JC. Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system. *Pediatr Allergy Immunol*. 1995;6:20-23.

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*. 1992;90:31-35.

Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJ, Eiberg H, Gadjeva M, Ruseva M, Jensenius JC. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun*. 2007;8:154-163.

Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, *et al*. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. 1997;386:506-510.

Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet*. 1996;348:1417-1419.

Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*. 1996;17:532-540.

Turner MW, Dinan L, Heatley S, Jack DL, Boettcher B, Lester S, McCluskey J, Robertson D. Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1481-1486.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29:151-159.

Valdimarsson H. Infusion of plasma-derived mannan-binding lectin (MBL) into MBL-deficient humans. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:768-769.

Valdimarsson H, Vikingsdottir T, Bang P, Saevarsdottir S, Gudjonsson JE, Oskarsson O, Christiansen M, Blou L, Laursen I, Koch C. Human plasma-derived mannose-binding lectin: a phase I safety and pharmacokinetic study. *Scand J Immunol*. 2004;59:97-102.

Valles X, Roca A, Lozano F, Morais L, Suarez B, Casals F, Mandomando I, Sigauque B, Nhalungo D, Esquinas C, *et al*. Serotype-specific pneumococcal disease may be influenced by mannose-binding lectin deficiency. *Eur Respir J*. 2010;36:856-863.

Verdu P, Barreiro LB, Patin E, Gessain A, Cassar O, Kidd JR, Kidd KK, Behar DM, Froment A, Heyer E, *et al*. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet*. 2006;15:2650-2658.

Walker GA, Shostak J, ed. Common Statistical Methods for Clinical Research with SAS® Examples, 3rd ed. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2010.

Wallis R. Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein. *Immunobiology*. 2002;205:433-445.

Wallis R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*. 2007;212:289-299.

Wallis R, Dodds AW, Mitchell DA, Sim RB, Reid KB, Schwaebble WJ. Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway. *J Biol Chem*. 2007;282:7844-7851.

Wang Y, Yan J, Shi Y, Li P, Liu C, Ma Q, Yang R, Wang X, Zhu L, Yang X, *et al*. Lack of association between polymorphisms of MASP2 and susceptibility to SARS coronavirus infection. *BMC Infect Dis*. 2009;9:51.

Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*. 1998;163:19-34.

Werth VP, Berlin JA, Callen JP, Mick R, Sullivan KE. Mannose binding lectin (MBL) polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. *J Invest Dermatol*. 2002;119:1394-1399.

Westfall PH, Tobias RD. Multiple Comparisons and Multiple Tests using the SAS System. Paper presented at: Proceedings of the 24th Annual SAS® Users Group International Conference (Florida), 1999.

Westfall PH, Young SS, ed. Resampling-based multiple testing: examples and methods for P-value adjustment. New York: John Wiley & Sons; 1993.

White RA, Dowler LL, Adkison LR, Ezekowitz RA, Sastry KN. The murine mannose-binding protein genes (Mbl 1 and Mbl 2) localize to chromosomes 14 and 19. *Mamm Genome*. 1994;5:807-809.

Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:e56.

Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, *et al*. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. 2002;109:317-325.