

## 1 - Introdução:

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína plasmática, com papel importante no sistema de defesa inato (Thiel et al, 1995), que constitui o primeiro componente de ativação da via das lectinas do sistema complemento e atua na neutralização de microorganismos patogênicos por um mecanismo independente de anticorpo (Turner, 1996; Wallis et al, 2000; Guardia et al, 2003). A MBL é encontrada no soro de mamíferos e é considerada uma proteína de fase aguda (Ezekowitz et al, 1988; Thiel et al, 1992).

O padrão de reconhecimento da MBL é definido através da conformação espacial e do sentido de orientação de seu domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), determinando o tipo de ligante da proteína, que são microorganismos com grande quantidade de manose (ou N-acetil-D-glucosamina ou similar) e glicanos em sua superfície (Jack et al, 2003).

Quando ocorre a ligação ao microorganismo, a MBL pode desencadear várias atividades anti-microbianas. A proteína interage com, pelo menos, quatro proteínas relacionadas ao Sistema serino protease associado (MASP): MASPs 1, 2, 3 e uma forma “truncada” de MASP 2, a Map 19. Essa interação, por sua vez, ativa a cascata do complemento com a lise dos microorganismos diretamente ou com o aumento da fagocitose (Turner, 1996; Wallis et al, 2000; Jack et al, 2003).

O gene *mb12*, localizado no braço q11.2-q21 do cromossomo 10, é formado por quatro exons. Três pontos de mutação foram encontrados na

região estrutural da molécula (códon 52, 54 e 57) resultando em três variantes alélicas chamadas de alelos D, B e C, 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 exon 1 para D, B e C, respectivamente (Steffensen et al, 2000). A região promotora apresenta sítios de ligação para transcrição de fatores envolvidos na regulação da resposta de fase aguda (Guardia et al, 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 et al, 2003). 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).

As 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 et al, 2003). Acredita-se que este defeito seja freqüente na população geral (5 a 7%) sugerindo tratar-se da imunodeficiência primária mais comum (Super et al, 1989; Jack et al, 2001).

Vários estudos associam os níveis de MBL à suscetibilidade a agentes infecciosos. A deficiência de MBL tem sido associada à infecção pelo HIV (Vírus da imunodeficiência humana) e a outros patógenos como bactérias, fungos, parasitas e outros vírus, tanto em crianças quanto em adultos (Kilpatrick et al, 1996-97). O HIV-1 é um vírus com envelope, que

expressa a gp120/gp41, um receptor de fusão protéica na superfície viral. A gp120 é extensivamente glicosilada, com carboidratos em mais da metade de sua massa molecular constituindo um excelente alvo para interação com a MBL (Saifudin et al, 2000).

Os primeiros estudos mostraram que a MBL inibe, *in vitro*, a infecção de linfócitos T CD4+ pelo HIV e liga-se, seletivamente, às células infectadas pelo vírus (Ezekowitz et al, 1989). O papel da MBL na infecção pelo HIV ainda é considerado bipolar, isto é, a MBL ligada ao vírus pode resultar em sua neutralização com a ativação do complemento, mas por outro lado, o vírus pode utilizar a MBL para ligar-se ao receptor do complemento e utilizá-lo como porta de entrada nas células. (Thielens et al, 2002).

Embora diversos estudos avaliem uma possível associação entre a infecção pelo HIV e os genótipos de MBL, correlacionando-os ao desenvolvimento e progressão para a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), (Nielsen et al, 1995; Senaldi et al, 1995; Garred et al, 1997; Thielens et al, 2002; Lian et al, 2004), o papel desta proteína na transmissão materno-fetal do vírus ainda não está esclarecido.

## 2 - Revisão da Literatura:

### 2.a Sistema Complemento:

Em 1888, Nuttall descobriu que hemácias de carneiro possuíam atividade bactericida para *Bacillus anthracis*, que era perdida com o aquecimento do soro a 55°C. Logo após, Bordet (1894) observou que a atividade imune do soro inativado pelo calor poderia ser restaurada com pequenas quantidades de soro fresco não imune, que por si só não apresentava atividade bactericida. Após quase meio século, o sistema complemento foi definido como uma série de proteínas séricas, ativadas sequencialmente, cuja atividade resulta em hemólise (Figuerola et al, 1991; Frank, 1998).

As proteínas do sistema complemento possuem atividade proteolítica, porém são encontradas na forma de pró-enzimas (zimogênio), que são ativadas apenas sob condições particulares. Nos sítios de inflamação, estas enzimas ativadas geram várias funções efetoras, que resultam em potentes eventos inflamatórios (Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005).

Por volta dos anos 80, investigadores mostraram que o sistema complemento é constituído não apenas de componentes solúveis que se depositam na superfície de microorganismos, mas também por proteínas de membrana nas células do hospedeiro, que interagem com aquelas (Figuerola et al, 1991). Cerca de 35 proteínas participam do sistema complemento realizando funções de: proteínas efetoras, de receptores de superfície celular e com atividade reguladora (Frank, 1998) (Tabelas 1 e 2)

Tabela 1 - Componentes das vias clássica, alternativa, das lectinas e da cascata final do sistema complemento.

Proteínas da via clássica		
Proteína	Concentração sérica mg/mL	Função
C1 (C1q <sub>2</sub> )		Inicia a via clássica.
C1q	75-150	Liga-se a porção Fc de anticorpos.
C1r	50	Cliva C1s.
C1s	50	Cliva C4 e C2.
C4	300-600	C4b liga-se a superfície ativadora e a C4a estimula a inflamação.
C2	20	C2a é a enzima ativa das C3 e C5 convertases.
Proteínas da via alternativa		
Proteína	Concentração sérica mg/mL	Função
C3	1000-1200	C3b liga-se a superfície ativadora, componente de C3 e C5 convertase; C3a estimula a inflamação.
Fator B	200	Bb é a enzima ativa de C3 e C5 convertase.
Fator D	1-2	Cliva o fator B quando ligado a C3b.
Properdina	25	Estabiliza a C3 convertase (C3bBb) na superfície ativadora.
Via das lectinas		
Proteína	Concentração sérica mg/mL	Função
MBL	1-2	Ligação a resíduos de açúcares na superfície de microorganismos.
MASP-1	6	Serinoprotease, cliva C2, ativa C3.
MASP-2	0.5	Serinoprotease, cliva C4.
MASP-3	?	Não conhecida.
MAp-19	?	Não conhecida.
L-ficolina	13.7	Associa-se as MASPs e Map19 e pode ativar a via das lectinas.
H-ficolina	15	Associa-se as MASPs e Map19 e pode ativar a via das lectinas.
Cascata final do complemento		
Proteína	Concentração sérica mg/mL	Função
C5	80	C5b inicia o MAC; C5a estimula a inflamação.
C6	45	Liga-se a C5 e recebe C7.
C7	90	Liga-se a C5b6 e insere o complexo na membrana.
C8	60	Liga-se a C5b-7 e inicia a ligação e polimerização de C9.
C9	60	Liga-se a C5b-8 e forma poros na membrana.

Modificado de Abbas et al, 2000; Winkelstein J et al, 2003; Prodinge et al, 2003.

Tabela 2 - Proteínas reguladoras e receptores de superfície dos produtos do complemento.

Proteínas reguladoras da ativação do sistema complemento			
Proteína	Distribuição e concentração sérica (mg/mL)	Interação	Função
Inibidor de C1 esterase (C1-INH)	Proteína plasmática 200	C1r, C1s	Inibidor de serinoprotease, controla as vias clássica e das lectinas.
Fator I	Proteína plasmática 35	C4b, C3b	Serinoprotease, cliva C3b e C4b com auxílio de cofatores.
Fator H	Proteína plasmática 480	C3b	Liga-se a C3b e dissocia-o de Bb; cofator para fator I.
Proteína ligadora de C4 (C4bp)	Proteína plasmática 300	C4b	Liga-se a C4b e dissocia-o de C2a; cofator para fator I.
Properdina	Proteína plasmática 340	C3bBb	Retarda a dissociação espontânea da enzima.
Proteína S	Proteína plasmática 340	C5b-9	Liga-se a C5b-9 na fase fluida, inibe a formação do MAC.
Receptores de superfície			
Proteína cofator de membrana (MCP)	Leucócitos, células epiteliais e endoteliais.	C3b, C4b	cofator para fator I.
“fator acelerador de decaimento” (DAF)	Células sanguíneas, epiteliais e endoteliais.	C4b2a, C3bBb	Dissociação da C3 convertase.
CD59	Células sanguíneas, epiteliais e endoteliais.	C7, C8	Bloqueia a ligação de C9 e impede a formação do MAC.

Modificado de Abbas et al, 2000, Winkelstein et al, 2003; Prodinge et al, 2003.

CR1 - receptor 1 do complemento.

Os hepatócitos sintetizam cerca de 90% dos componentes do sistema complemento. Apenas alguns deles têm sua origem predominantemente fora do fígado, como o C1 no epitélio intestinal e em monócitos/macrófagos; o Fator D no tecido adiposo; as células da medula óssea, particularmente os granulócitos, parecem representar a maior fonte de C7 plasmático. Alguns estudos demonstram outras fontes não usuais das proteínas do

complemento, tais como astrócitos, células endoteliais, linfócitos, epitélio renal, órgãos reprodutores, entre outras (Volanakis, 1998; Prodinge et al, 2003).

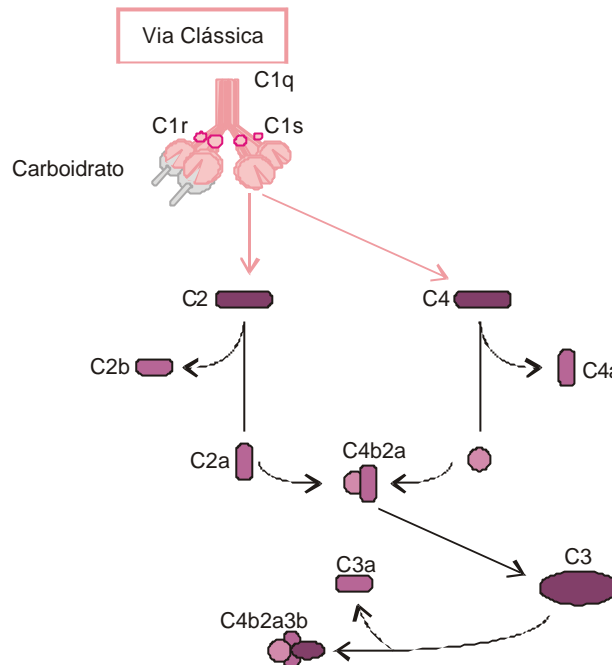
Três **vias de ativação** do sistema complemento têm sido descritas: 1) a via clássica, desencadeada por ligação antígeno-anticorpo; 2) a via das lectinas, ativada através da ligação da MBL a estruturas polissacarídicas na superfície de microorganismos e 3) a via alternativa, que pode ser iniciada pela ligação de C3, ativado espontaneamente no plasma, à superfície de microorganismos. Depois de ativadas, as três vias formam a enzima C3 convertase, que posteriormente resulta na formação da C5 convertase e evoluem para a via terminal comum (C5b-9). Nesta via, os componentes são ativados de maneira não-proteolítica e formam o complexo de ataque a membrana (MAC). Na fase fluida, as proteínas estão inativadas, ou apenas transitoriamente ativadas, e tornam-se estáveis após a sua ligação com microorganismos ou com anticorpos (Volanakis, 1998; Abbas et al, 2000; Prodinge et al, 2003; Janeway et al, 2005).

As proteínas que formam a cascata de ativação da **via clássica** compreendem C1, C2, C4 e C3, nesta ordem, e a regulação é exercida por proteínas como o inibidor de C1 esterase (C1-INH), o DAF, a proteína de ligação à C4 (C4bp), CR1, o fator I e a proteína cofator de membrana (MCP) (Prodinge et al, 2003). A ligação de C1q à superfície de patógenos ou a imunoglobulinas, desencadeia uma alteração conformacional no complexo C1r:C1s, resultando na ativação de C1r que, posteriormente, ativa o C1s associado, para gerar uma serinoprotease ativa. C1s atua nos próximos dois componentes da via clássica C4 e C2, clivando-os em dois fragmentos: C4a,

fragmento pequeno, com baixa atividade quimiotática, e C4b, maior, que sofre uma alteração conformacional. Apenas cerca de 5% do C4b torna-se aderido de forma covalente às partículas de superfície, ao redor do sítio de ativação. Após esta adesão, C2 forma um complexo com C4b, e é clivado por C1s, formando dois fragmentos: o menor, C2b, é liberado na fase fluida e o maior, C2a, mantém-se ligado a C4b, para formar o complexo C4b2a, enzimaticamente ativo, que é a C3 convertase da via clássica (Rother et al, 1985; Figueroa et al, 1991; Winkelstein et al, 2003; Prodinge et al, 2003; Janeway et al, 2005) (Figura 1).



Figura 1 - Representação esquemática da via clássica de ativação do complemento.



Modificado de Walport, 2001.

O C1-INH liga-se à enzima ativa C1r:C1s e causa sua dissociação de C1q, limitando o tempo de duração no qual C1s ativo é capaz de clivar C4 e C2. O complexo C4b2a tem meia-vida curta, após a qual há dissociação de C2a em uma forma inativa. A proteína sérica C4bp liga-se ao C4b, acelerando a sua dissociação do complexo e impedindo a formação de uma nova convertase. E também, atua como cofator para o fator I, que quebra C4b em fragmentos menores, inativos. O DAF associado à membrana acelera a dissociação da C3 convertase aderida à superfície de células do hospedeiro (Abbas et al, 2000; Winkelstein et al, 2003; Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005).

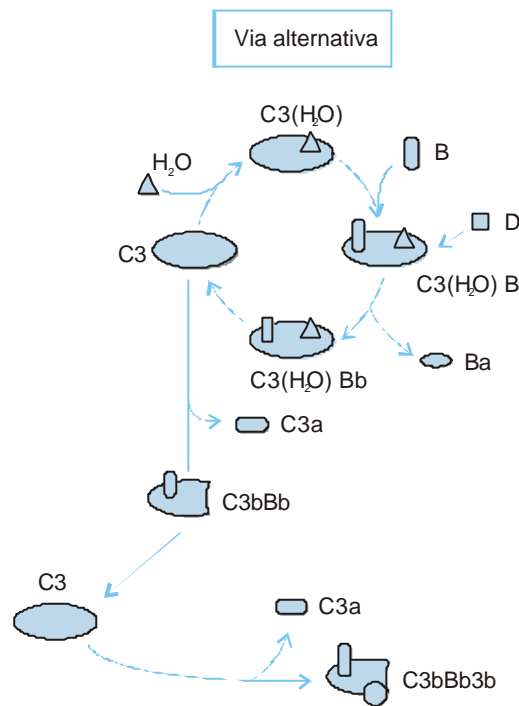
A função mais importante da C3 convertase é clivar um número suficiente de moléculas C3 para produzir C3b, que se adere à superfície do patógeno. Ao mesmo tempo, C3a, o fragmento menor, inicia resposta inflamatória local. A ativação de C3 resulta também na formação da C5 convertase, com a ativação de C5 e início da via terminal (Janeway et al, 2005).

A ativação da **via alternativa** do complemento pode ocorrer em várias superfícies de microorganismos, na ausência de anticorpo específico (Janeway et al, 2005). A ativação de C3, pela clivagem em C3b, é a reação central da cascata. (Prodinger et al, 2003).

Ao contrário das outras vias, a via alternativa não depende de uma superfície ativadora para a sua iniciação, podendo ocorrer hidrólise espontânea de C3. Normalmente, o C3 plasmático é continuamente clivado em baixas doses para gerar C3b. Formando C3a e C3b. C3a, o fragmento menor, é uma potente anafilatoxina e exerce seus efeitos em locais distantes do sítio de ativação. O fragmento maior, C3b, altera sua conformação e liga-se a nucleófilos próprios e a grupos amida ou hidroxila de qualquer molécula ao redor (molécula aceptora), incluindo moléculas de água (Frank, 2000; Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005). Se a ligação não ocorrer, o C3b permanece na fase fluida e é rapidamente hidrolisado, tornando-se inativo e encerrando a ativação da cascata. Caso o C3b se ligue a uma proteína plasmática, o fator B, sofre uma mudança conformacional e ativa o fator D. Este segundo fator determina a quebra do fator B em dois fragmentos Ba, que fica na fase fluida e Bb, que se mantém aderido a C3b, formando o complexo C3bBb a C3 convertase da via alternativa. Essa convertase atua

clivando mais moléculas de C3, induzindo a amplificação da ativação da cascata. O complexo C3bBb é regulado positivamente pela ação da properdina (fator P) que se liga à superfície ativadora e estabiliza a convertase (Abbas et al, 2000; Frank, 2000; Winkelstein et al, 2003; Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da via alternativa de ativação do complemento.



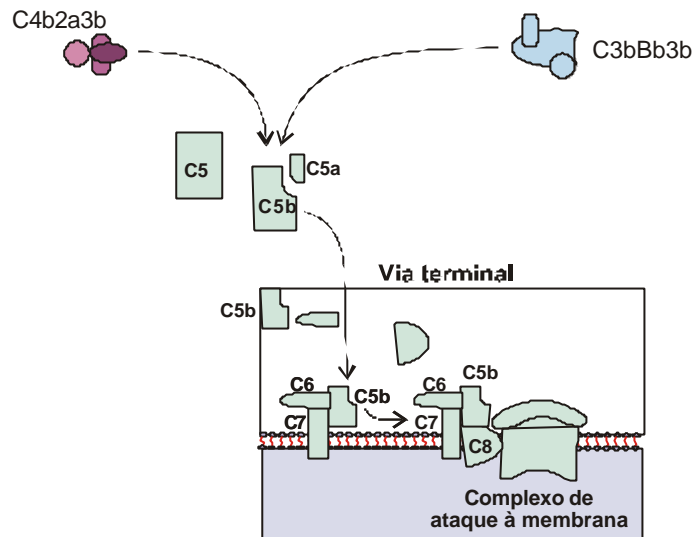
Modificado de Walport, 2001.

Em superfícies não ativadoras do complemento, como por exemplo, as células humanas, os resíduos de ácido siálico na porção de carboidratos das glicoproteínas permitem que o C3b aderido à membrana seja rapidamente ligado ao fator H e, subsequentemente, quebrado pelo fator I. O fator H também pode dissociar o complexo C3bBb formado na membrana

celular ou na fase fluida (Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005). O CR1 e DAF competem com o fator B pelo sítio de ligação de C3b e podem dissociá-lo do complexo C3bBb. O fator I, junto com CR1 e MCP, cliva C3b em iC3b (forma inativa) impedindo a formação de nova convertase (Winkelstein et al, 2003; Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005).

**A via citolítica** ou cascata terminal comum do sistema complemento inicia-se com a ligação do C3b a C3 convertase, formando um complexo trimolecular C4b2aC3b ou C3bBbC3b, que atua como C5 convertase, com seu sítio lítico nas moléculas de C2a e Bb, respectivamente. A convertase quebra C5 em dois fragmentos: C5a, que atua em receptores específicos e promove resposta inflamatória local e C5b, que inicia a formação do complexo C5b-9 terminal (MAC). C5b sofre alteração conformacional e liga-se a C6, formando um complexo que se liga a C7. Há exposição de sítios de ligação na membrana e a incorporação do complexo C5b67. Posteriormente, ocorre a ligação de C8, formando um complexo que já possui atividade lítica. O complexo C5b-8 atua como polimerizador de C9, que por sua vez, começa a aderir-se ao complexo e a formar poros na membrana, resultando em lise celular (Winkelstein et al, 2003; Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005) (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática da cascata terminal do sistema complemento.



Modificado de Walport, 2001.

Caso o complexo C5b-9 permaneça na fase fluida, a proteína S liga-se a ele, impedindo sua inserção na membrana e inibindo a formação do MAC. A proteína de membrana CD59 liga-se ao complexo C5b-8 e inibe a polimerização de C9 (Prodinger et al, 2003).

O sistema complemento possui **funções** importantes na imunidade inata contra agentes infecciosos e na resposta inflamatória, incluindo: atividade quimiotática, clareamento de imunocomplexos, ativação da resposta imune humoral, opsonização, fagocitose e atividade citotóxica e lítica (Figueroa et al, 1991; Frank, 2000; Prodinger et al, 2003; Janeway et al, 2005) (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais funções biológicas do sistema complemento.

Função	Proteínas responsáveis
<b>Proteção contra infecção</b>	
Opsonização	C3 e C4.
Quimiotaxia e ativação de leucócitos	Anafilatoxinas (C5a, C3a e C4a); receptores de anafilatoxinas em leucócitos.
Lise de bactérias e células	MAC
<b>Interface entre imunidade inata e adaptativa</b>	
Aumento da resposta humoral	C3b e C4b; receptores de C3 nas células B e nas APC.
Intensificação da memória imunológica	C3b e C4b; receptores de C3 nas CFD.
<b>Depuração</b>	
Depuração de imunocomplexos dos tecidos	C1q
Depuração de células apoptóticas	C1q

APC – células apresentadores de antígenos.

CFD – células foliculares dendríticas.

Modificado de Walport, 2001.

## 2b. Lectina Ligadora de Manose – MBL:

A lectina de ligação à manose, anteriormente conhecida como proteína de ligação à manose (MBP), pertence a uma família de proteínas chamadas de colectinas. Esta proteína é caracterizada pela presença de três subunidades de cadeias polipeptídicas, de 32 kD, covalentemente ligadas por pontes de dissulfeto (domínio NH<sub>2</sub> terminal, rico em cisteína), uma seqüência de segmento semelhante ao colágeno e um domínio carboxi-terminal (CRD, ligante de cálcio - domínio lectina) em cada subunidade. Esta última porção confere à molécula a capacidade de reconhecer resíduos de carboidratos com especificidade primária para manose, fucose ou N-acetilglucosamina (Holmskov et al, 1994; Summerfield et al, 1995; Prodinger

et al, 1998; Ghiran et al, 2000; Kilpatrick, 2003; Jack et al, 2003), não se ligando significativamente a D-galactose (Jack et al, 2001).

No homem, são reconhecidas três proteínas da família das colectinas: a MBL, que se apresenta sob as formas sérica e hepática, produtos do mesmo gene, e as proteínas surfactantes pulmonares A e D. Todas são proteínas solúveis (Jack et al, 2001; Kilpatrick, 2002). Descreve-se, atualmente, que as ficolinas (H e L), proteínas com domínio de reconhecimento semelhante ao fibrinogênio, também se associam as MASPs e a Map19 e podem ativar a via das lectinas pelo reconhecimento de estruturas de carboidratos específicos. Esta observação indica que a MBL não é o único componente da família das lectinas que ativa o sistema complemento (Schwaeble et al, 2002). Recentemente, foram descritas mais duas formas de colectinas humanas: 1) a colectina hepática-1 (CL-L1) e 2) a colectina placentária-1 (CL-P1) (Ohtani et al, 1999; Ohtani et al, 2001).

O conceito de **via das lectinas** na ativação do sistema complemento é relativamente recente e é decorrente da observação de que resíduos de carboidratos em microorganismos invasores podiam ativar complemento na ausência de anticorpo e por um mecanismo independente da via alternativa. A via das lectinas é composta pela MBL e pelas MASP-1, -2, -3 e a Map-19, porém, apenas MASP-1 e -2 apresentam funções definidas. A MBL circula no sangue em um complexo na forma zimogênio da serinoprotease MASP apresentando a mesma estrutura modular de C1r:C1s (Petersen et al, 2001a; Schwable et al, 2002; Prodingler et al, 2003; Janeway et al, 2005).

Os resíduos de ligação para a MBL na superfície do microorganismo estão arranjados em padrões, com ordem repetitiva. Acredita-se que seja

esta conformação que resulte em alvo apropriado para a ligação da proteína. Os padrões, dos três sítios de ligação ao açúcar de cada subunidade oferecem uma plataforma lisa, com distâncias constantes entre os sítios (45Å) (Jack et al, 2001). Esses sítios constantes e simultâneos são essenciais devido à constante de dissociação (kD) de cada interação separada MBL-açúcar ser relativamente baixa ( $10^{-3}$ M). Todos estes padrões facilitam a interação da MBL com a superfície de microorganismos e minimiza as chances de ligação com as células do hospedeiro, onde são limitados nas glicoproteínas e não estão arranjados de forma repetitiva, com distância de 20-30 Å entre si. Além disso, a maioria das estruturas de carboidratos nas células animais termina com galactose ou ácido siálico, não reconhecidos pelas colectinas (Jack et al, 2001; Gadjeva et al, 2001; Botos et al, 2005).

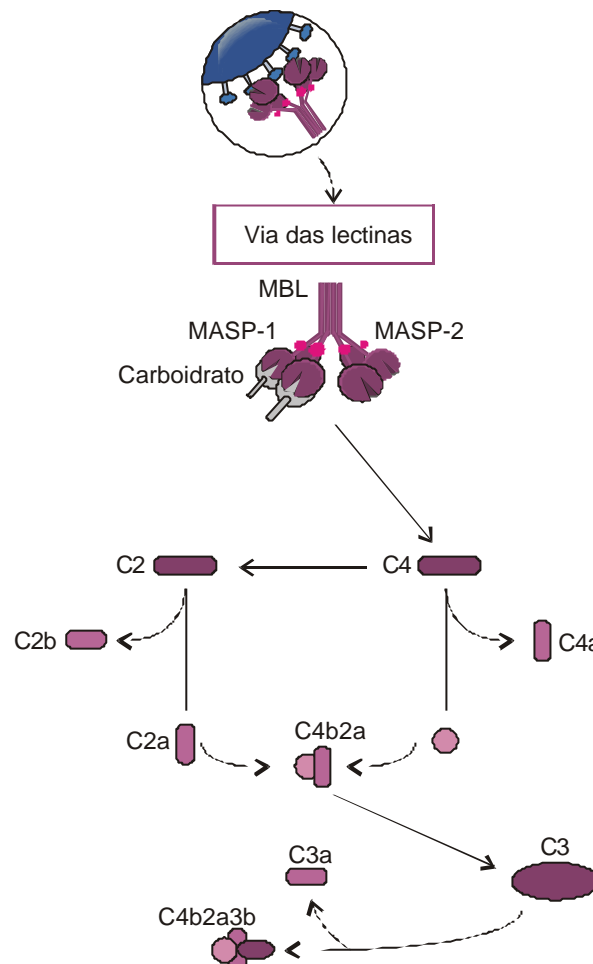
Após a ligação aos resíduos de açúcares, o complexo MBL-MASP sofre alteração conformacional e há uma auto-ativação de uma única cadeia do zimogênio MASP para uma serinoprotease ativa de cadeia dupla. O sítio enzimaticamente ativo na cadeia B da serinoprotease é classicamente descrito como componente catalítico triplo. Composto por serina, histidina e resíduo de ácido aspártico, que estão separados na estrutura primária, mas aproximam-se na estrutura quaternária. Seqüencialmente, há clivagem de C4 e, posteriormente, de C2, formando-se a C3 convertase (C4b2a) tal como na via clássica (Prodinger et al, 2003).

O complexo MBL-MASP-2 é suficiente para ativar o complemento, sem necessidade de outra serino protease, demonstrando assim, que a MASP-2 é o componente efetor da via das lectinas. O complexo MBL-MASP-



1 é responsável pela ativação direta de C3, funcionando como C3 convertase e determinando uma “via alternativa” à via das lectinas, embora alguns autores considerem este assunto controverso (Hajela et al, 2002; Schwaeble et al, 2002). MASP-1 cliva C2 e parece ser capaz de clivar C3 diretamente, enquanto que MASP-2 cliva C4 e C2. As atividades proteolíticas de MASP-1 e MASP-2 são inibidas pelo C1-INH, ambas podendo ligar-se de maneira covalente ao complexo MBL/MASP-2 ativado (Thiel et al, 1992; Reid, 1998; Wallis et al, 2002; Guardia et al, 2003; Prodinge, et al, 2003; Janeway et al, 2005) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da via das lectinas de ativação do complemento.

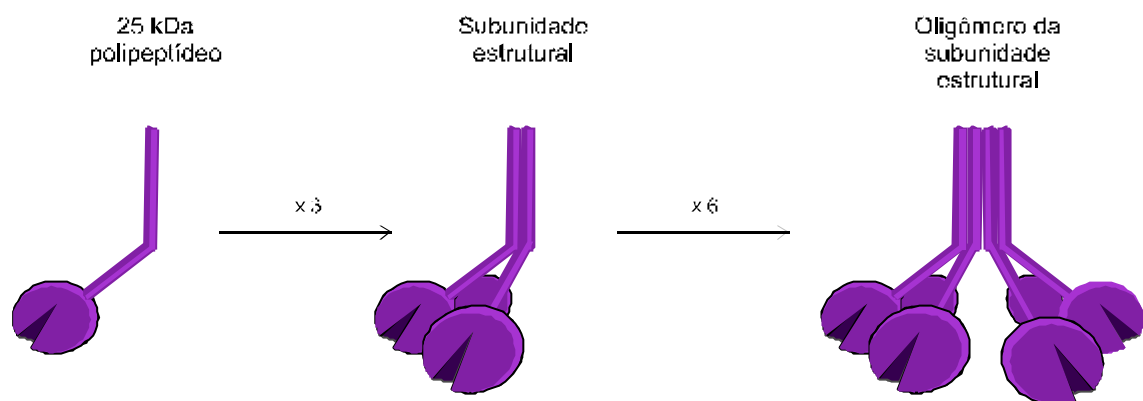


Modificado de Walport, 2001.

Por microscopia eletrônica, a MBL apresenta uma aparência de “buquê de tulipas”, semelhante a C1q. A região de colágeno dos três polipeptídeos forma uma tripla-hélice, formando uma subunidade trimérica de cerca de 90 kD. No soro, um complexo de massa molecular grande (cerca de 200-700 kD) de MBL circulante é evidenciado e, provavelmente, é estabilizado através das regiões NH<sub>2</sub> terminal, ricas em cisteína, das subunidades triméricas adjacentes. Este complexo forma unidades de

dímeros a hexâmeros, mas a sua atividade funcional completa requer a presença das estruturas maiores (Turner, 1996; Saiffudin et al, 2000; Ghiran et al, 2000; Jack et al, 2001) (Figura 5).

Figura 5 - Representação da estrutura polipeptídica da cadeia de MBL.



Modificado de Petersen et al, 2001a.

A MBL é **secretada pelo fígado**, mas monócitos/macrófagos, assim como outros leucócitos, também parecem sintetizar a proteína (Ogden et al, 2001; Kilpatrick, 2003). Seu **nível sérico** é geneticamente determinado, variando de 1 a 2  $\mu\text{g/mL}$  e apresenta elevação de até três vezes na fase aguda do processo inflamatório (Ezekowitz, et al, 1988; Prodingler, et al, 1998; Saiffudin, et al, 2000). Um estudo com análises sucessivas de amostras sanguíneas de crianças, no dia do nascimento, com 1 e 5 meses e com 1 e 2 anos de idade, demonstrou que a concentração sérica de MBL aumenta após o nascimento, tornando-se máxima após 1 mês de vida (Aittoniemi, et al, 1996). Os autores sugerem que a rápida elevação dos níveis séricos de MBL seja devido ao estresse do nascimento e à adaptação

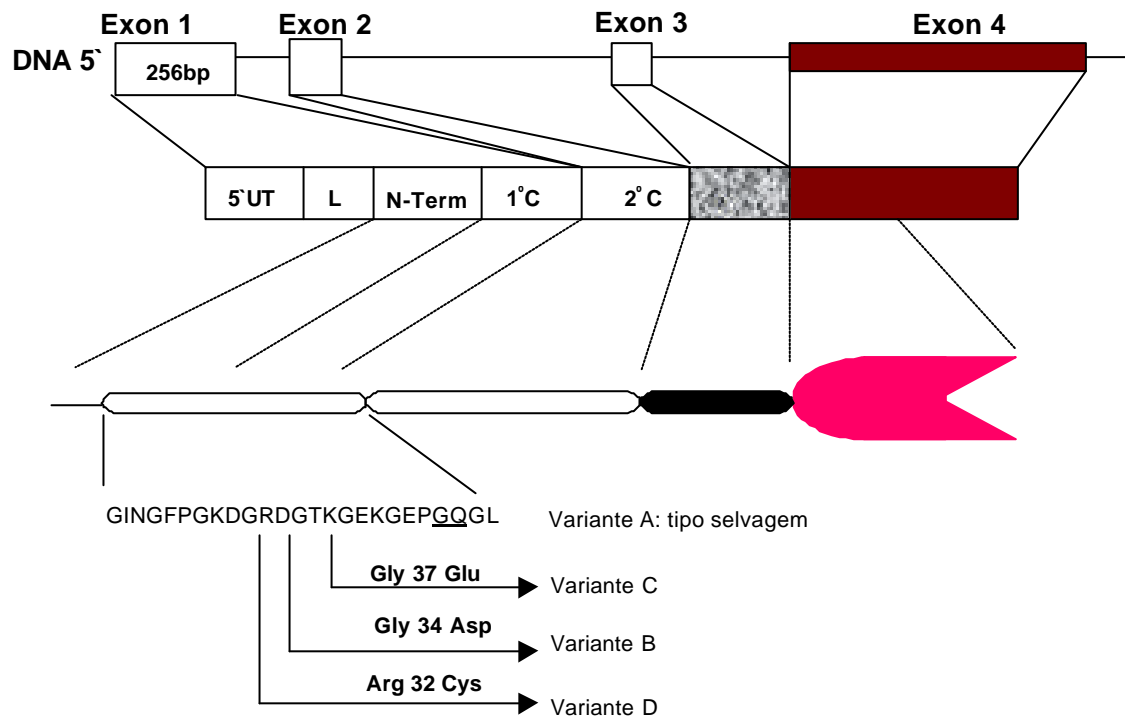
no período neonatal. A concentração de MBL no sangue de cordão umbilical é muito semelhante à encontrada no adulto e não há aumento (ou se há, este é muito pequeno) dos níveis de MBL durante o primeiro trimestre (período mais crítico) de gestação (Kilpatrick et al 1997; Kilpatrick, 2000).

A principal **função biológica** da MBL é a opsonização, pois suas estruturas de colágeno são ligantes para receptores de colectinas presentes nos fagócitos, ou seja, atua diretamente como opsonina (Holmskov, et al, 1994; Summerfield, et al., 1995; Turner, 1996). Sua região N-terminal interage com receptores partilhados com C1q na superfície de fagócitos: cC1qR/calreticulina, uma proteína multifuncional localizada no retículo endoplasmático e na superfície de várias células; gC1qR, uma proteína mitocondrial e C1qRp, expresso na superfície das células mielóides (macrófagos, monócitos e neutrófilos), células endoteliais, plaquetas e células pluripotentes que repopulam a medula óssea (Gadjeva et al, 2001; Holmskov et al, 2003). CR1/CD35 também foi descrito como receptor para todas as opsoninas primárias do complemento: MBL, C1q solúvel, C4b e C3b (Ghiran et al, 2000; Holmskov et al, 2003; Guardia et al, 2003). O CD91 está associado com a captação de células apoptóticas pelos macrófagos, mediada pela MBL (Ogden et al, 2001; Guardia et al, 2003).

A MBL parece ser um dos componentes mais versáteis do sistema imune inato, sendo funcionalmente análoga à IgM pois liga-se a vários substratos através de múltiplos CRD. Esta ligação é fraca, entretanto a interação de vários CRD resulta em maior avidéz. Também pode ser comparada à IgG e IGA, por atuar diretamente como opsonina, interagindo com um ou mais receptores de colectina. E também, assemelha-se à C1q,

interagindo com outras serinoproteases (MASP) para a ativação do sistema complemento (Turner, 1996).

São descritos dois **genes** correlacionados à MBL, o *mbi-1*, um pseudo gene e o *mbi-2*, localizado no braço q11.2-q21 do cromossomo 10, que codifica a proteína. O gene é composto por quatro exons: a) o exon 1 codifica a região 5' não-transcrita, um peptídeo sinal, um seguimento N-terminal rico em cisteína e a primeira porção da região semelhante ao colágeno rica em glicina; b) o exon 2 codifica o restante da região semelhante ao colágeno; c) o exon 3 codifica uma estrutura em espiral  $\alpha$  helicoidal, que é conhecida como a região de "pescoço" e d) o exon 4 codifica o domínio de reconhecimento de carboidrato, que adota uma configuração globular, e a região 3' não-transcrita (Guardia et al, 2003) (Figura 6).

Figura 6 - Representação do gene *mbi-2* e das mutações do exon 1.

Modificado de Guardia et al, 2003 e Petersen et al, 2001a.

As mutações gênicas evidenciadas são resultantes de três substituições nucleotídicas, independentes, no exon 1: no códon 54, decorrente da troca da glicina pelo ácido aspártico (alelo B); no códon 57, decorrente da troca da glicina pelo ácido glutâmico (alelo C) e no códon 52, decorrente da troca da arginina pela cisteína (alelo D). O alelo normal para a MBL é o A e a designação usual para os alelos variantes é O (Turner, 1996; Garred, et al, 1997; Saiffudin, et al, 2000; Petersen, et al, 2001a). Estudos sugerem que todas as três variantes impedem a habilidade da MBL em formar cadeias polipeptídicas com estrutura de tripla-hélice semelhante ao colágeno nas formas homo ou heterozigotas, ou ainda, tornam as subunidades mais vulneráveis à degradação (Butter et al, 2002; Petersen, et al, 2001a; Reid, 1998; Garred, et al, 1997) Conseqüentemente, os alelos B, C e D resultam em deficiência completa ou em níveis séricos baixos da proteína.

A expressão gênica da MBL é diferente nas diversas populações mundialmente estudadas. A variante B é mais freqüente entre caucasianos europeus (29%) e em populações japonesas (37%); a variante C é característica das populações africanas do sub-Sahara, com freqüência de 50 a 60% e a mutação D alcança freqüências baixas em todas as populações (Sumiya et al, 1991; Lipscombe et al, 1992; Sasaki et al, 2000) (Tabela 4).

Tabela 4 - Freqüências alélicas do gene *mb12* em diferentes populações.

População	N	HYP A	LYQA	LYPA	LXPA	HYPD	LYPB	LYPD	LYQC
Dinamarca <sup>a</sup>	250	0.31	0.19	0.04	0.26	0.06	0.11	-	0.03

<b>Dinamarca<sup>b</sup></b>	100	0.285	0.235	0.045	0.195	0.085	0.135	-	0.002
<b>Inglaterra<sup>c</sup></b>	54	0.245	?	?	0.31	0.07	0.085	-	0.01
<b>Inglaterra<sup>d</sup></b>	258	0.33	?	?	0.23	?	?	-	?
<b>Euro-BR<sup>f</sup></b>	202	0.34	0.18	0.08	0.22	0.06	0.11	0.0025	0.0025
<b>Kenia<sup>e</sup></b>	61	0.08	0.25	0.13	0.24	0.04	0.02	-	0.24
<b>Mocambique<sup>a</sup></b>	154	0.06	0.27	0.3	0.13	0	0	-	0.24
<b>Afro-BR</b>	32	0.13	0.25	0.27	0.11	0.02	0.03	0	0.2

Fonte: a) Madsen et al, 1998; b) Steffensen et al, 2000; c) Crosdale et al, 2000; d) Mullighan et al, 2000; e) Madsen et al, 1995; f) Boldt et al, 2002.

A concentração sérica da proteína também varia devido a polimorfismos encontrados na região promotora do gene, responsáveis pela variabilidade dos níveis séricos de MBL na população geral, mesmo em indivíduos saudáveis (Garred, et al, 1997). 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. O haplótipo HY é associado com altos níveis séricos de MBL; LY com níveis intermediários e LX com os níveis séricos mais baixos. 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 et al, 2003). Os haplótipos descritos são HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD. Foram relatados, ainda, outros dois haplótipos: HXPA, encontrado em três pacientes americanos, negros, com diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico e LYPD, recentemente encontrado em um indivíduo brasileiro (Sullivan et al, 1996; Boldt et al, 2002; Steffensen et al, 2003).

As formas alélicas distintas são efetivamente diferentes na ativação do sistema complemento. Acredita-se que essas diferenças, qualitativas e quantitativas, influenciem na predisposição à infecção (Prodinger, et al,



1998) e impeçam a proteína de ativar o sistema complemento (Summerfield, et al, 1995).

Até o presente momento não há consenso clínico do ponto de corte para o valor de referência da proteína. Como guia usa-se: nível sérico alto, acima de 1000 ng/mL; médio, entre 500 e 1000 ng/mL; baixo, porém suficiente, entre 200 e 500 ng/mL e nível sérico muito baixo e provavelmente insuficiente, abaixo de 200 ng/mL (Guardia et al, 2003).

## 2c. Deficiência de MBL e suas Repercussões Clínicas:

A deficiência de MBL foi reconhecida, inicialmente, em 1968, por Miller e col., que descreveram uma criança de 3 meses de idade, do sexo feminino, com quadro de eczema refratário, falência de crescimento e episódios intermitentes de diarreia. A criança apresentava história familiar de eczema atópico grave, em parentes paternos e um primo materno com quadro de dermatite similar ao seu. Após avaliação laboratorial, demonstrou-se 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 col. 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. Em 1989, Super e col. identificaram, pela primeira vez, a deficiência sérica de MBL, usualmente relatada em crianças e também observada em indivíduos adultos. A otite média, a diarreia 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., 1997). 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, 2001).

Alguns trabalhos evidenciam a inter-relação entre MBL e infecções de repetição e sugerem que a proteína desempenhe uma importante proteção adicional contra infecção (efeito ante-anticorpo) em crianças durante o período de imaturidade do sistema imune e de suscetibilidade à infecção (Sastry, et al, 1993). Esta observação pode ser confirmada pela demonstração de nível sérico de MBL maior na população pediátrica que nos indivíduos adultos (Tabela 5).

Tabela 5 - Associação entre proteína ligadora de manose e infecções.

Autores	Quadro Clínico	Resultados
Miller et al, 1968	eczema, diarreia, dermatite grave	Fagocitose ausente.
Soothill et al, 1976	infecção freqüente sem explicação	Fagocitose diminuída em 10 crianças.
Summerfield et al, 1995	infecções não usuais e graves	Mutação no gene da MBL; nível sérico baixo.
Ten et al, 1999	pansinusite, infecções recorrentes	MBL- diminuído; CH50- normal; Imunoglobulinas - normal
Koch et al, 2001	Infecção aguda de vias aéreas (IVAS)	maior risco de IVAS nos pacientes homo e heterozigotos para mutações no gene.
Cedzynski et al, 2004	Infecções do aparelho respiratório pelo VSR	Maior risco de infecção nos pacientes com defeito de resposta humoral e deficiência de MBL.

VRS – vírus sincicial respiratório.

Vários estudos demonstram que a lectina apresenta afinidade por carboidratos presentes em bactérias (*Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, micobactérias, etc.), vírus (*Influenza A*, HIV, etc.), fungos (*Candida*) e parasitas (*Leishmania major* e *L. mexicana*) (Holmskov, et al, 1994; Polotsky, et al, 1997; Guardia et al, 2003) (Tabela 6).

Tabela 6 - Características de ligação da MBL com os microrganismos.

Ligação eficiente	Padrão heterogêneo de ligação	Ligação baixa ou nenhuma ligação
<i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella montevideo</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Veillonella dispar</i> e formas não encapsuladas de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria cinerea</i> e <i>N. subflavi</i> .	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>H. influenzae</i> tipo b, <i>N. meningitidis</i> sorogrupo A, <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Actinomyces israeli</i> , <i>Fusobacteria</i> e <i>Leptotrichia buccalis</i> .	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Clostridium sp</i> , <i>Bacteróides sp</i> , <i>Fusobacteria mortiferum</i> , <i>Eubactéria</i> , <i>Neisseriae mucosa</i> , <i>N. meningitidis</i> sorogrupo B e <i>Cryptococcus neoforman</i> .

Modificado de Guardia et al, 2003.

Há também alguns autores que relatam um papel protetor dos níveis séricos diminuídos de MBL e a infecção por microrganismos intracelulares, o que poderia ser explicado pela diminuição da ativação do sistema complemento com consequente diminuição do processo inflamatório (Sobrog et al, 2003; El Sahly et al, 2004). Mais recentemente, Dahl e col. (2004) publicaram um estudo no qual 9245 pacientes foram avaliados quanto ao nível sérico e a genotipagem de MBL, na tentativa de correlacionar a deficiência da proteína com risco de infecções ou morbidade aumentada por outras doenças, ou comportamentos sociais associados, e não encontraram significância estatística na correlação entre os indivíduos com deficiência de MBL comparados ao grupo controle.

## 2d. Interação MBL e o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1):

Chagas, KN. – Avaliação do Gene Estrutural da MBL e a sua Relação com a Transmissão Materno-fetal do HIV.

O HIV-1, agente etiológico da AIDS, foi inicialmente identificado no tecido linfóide de um paciente masculino, homossexual, de 33 anos de idade, em 1983 (Barre-Sinoussi et al, 1983). O HIV é um RNA vírus, pertence à família dos retrovírus e à subfamília dos lentivírus, caracterizado pela complexidade de seus genomas, pois contém além de genes comuns de retrovírus (*gag*, *pol* e *env*), outros seis genes reguladores: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*. O envoltório externo do vírus é composto por duas glicoproteínas, que se originam de uma proteína precursora, a gp160: as glicoproteínas transmembrana gp41 e de superfície gp120, responsáveis pela interação com os ligantes (Greene, 1991).

A produção dos componentes do HIV está sob comando dos genes virais. O gene *env* é responsável pela codificação das proteínas do envelope, por sua vez as enzimas integrase, protease, transcriptase reversa e ribonuclease são codificadas pelo gene *pol* e o gene *gag* é responsável pela formação dos componentes do “core” (Greene, 1993).

A estrutura da gp120 é importante para a interação vírus-receptor e conseqüente entrada do vírus na célula. Várias pontes de dissulfeto contribuem para a dobradura do envelope. A gp120 é uma proteína muito glicosilada. Os n-glicanos nelas interligados são necessários para a criação, mas não para a manutenção da conformação bioativa. As alterações induzidas por drogas no padrão de glicosilação da gp120 podem impedir a fertilidade do vírus (Greene, 1991; Pavlakis, 1997). O “core” contém quatro proteínas nucleocapsídeos: p-24, p-17, p-9 e p-7. Em seu interior,

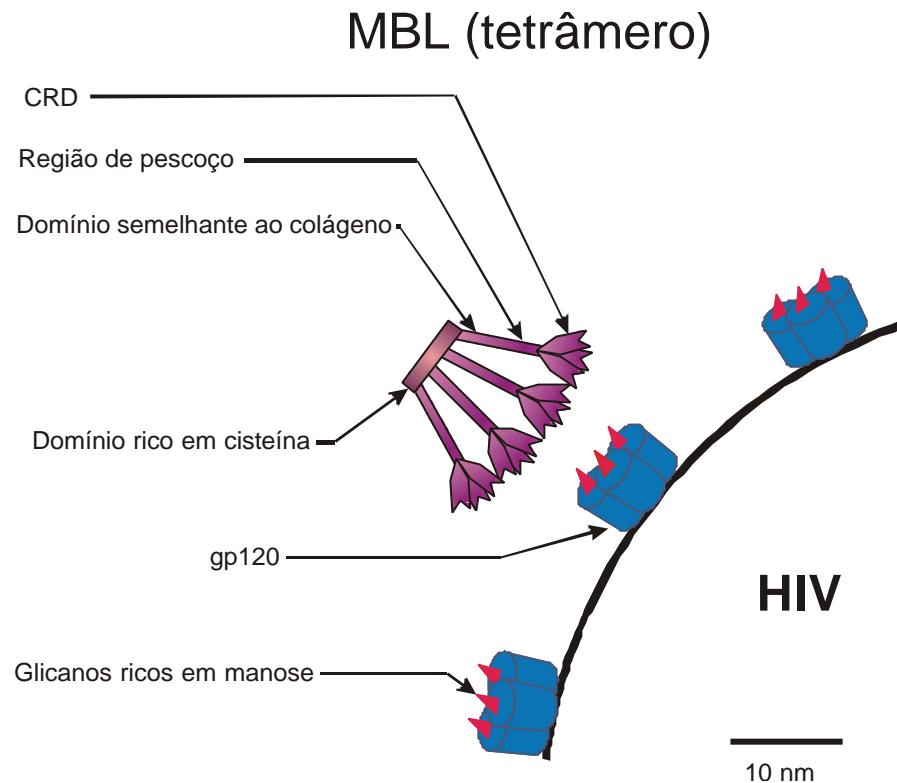
encontram-se as duas fitas de RNA e enzimas virais importantes para a sua replicação: transcriptase reversa, integrase e protease (Greene, 1991).

O papel do sistema complemento na infecção pelo HIV tem sido intensamente avaliado. Em 1987, Perricone e col. verificaram, pela primeira vez, a ativação reduzida das vias clássica e alternativa em pacientes HIV soropositivos. Sölder e col. (1989) observaram que esta ativação poderia ocorrer sem a participação do anticorpo. Foi estabelecido que as proteínas do complemento e os anticorpos competem pelo mesmo sítio de ligação na gp120 (Prohászka et al, 1997a). E também, observou-se que as proteínas DAF e fator H relacionavam-se com a resistência do HIV à lise mediada pelo complemento (Stoiber et al, 1996). Posteriormente, foi evidenciado que a ligação de C1q à porção globular do seu receptor bloqueia a interação entre CD4 e gp120 (Szabó et al, 2001).

As possíveis conseqüências da ativação do complemento pelo HIV poderiam evoluir para dois sentidos distintos: 1) aumento da infecção devido à maior ligação de vírions às células alvo, através de receptores do complemento ou 2) eliminação do vírus devido à sua lise ou à lise das células infectadas, ou ainda, à neutralização do vírus por células fagocitárias (Haurum et al, 1993; Speth et al, 1997; Stoiber et al, 2003).

Com relação à via das lectinas, em 1989, Ezekowitz e col. demonstraram a inibição *in vitro* de células T CD4+ pelo vírus. Pouco tempo depois, foi relatado que a ativação do sistema complemento ocorreria após a ligação da MBL à gp120 (Haurum et al, 1993).

Figura 7- Representação do HIV, e as glicoproteínas de superfície, e sua interação com a MBL.



Modificado de Ji X et al, 2005.

Em 1995, um estudo clínico com 80 pacientes HIV-soropositivos evidenciou que a distribuição do nível sérico de MBL nestes indivíduos era semelhante à de pessoas saudáveis, sem influência no risco de infecção pelo HIV. Porém, o maior número de pacientes com nível sérico indetectável estava presente entre os indivíduos infectados. Não se comprovou a associação entre o nível de MBL e o declínio de células T CD4+; o tempo de demora da soro-conversão ou com a duração da doença até a morte (Nielsen et al, 1995). Senaldi e col. (1995), descreveram que os níveis séricos de MBL estão elevados em todos os estágios da infecção pelo HIV e são estatisticamente semelhantes aos da população normal, corroborando

os dados de Nielsen. Estes autores também não associaram a deficiência de MBL ao desenvolvimento ou à progressão da infecção pelo HIV (Nielsen et al, 1995; Senaldi et al, 1995).

Em 1997, Garred e col. descreveram pacientes, HIV-soropositivos, nos quais a presença das mutações do exon 1 do gene *mb12* (homo e heterozigose) estavam associadas a maior morbi-mortalidade dos pacientes, devido a suscetibilidade aumentada de infecções durante o curso da doença. Por outro lado, as concentrações séricas aumentadas de MBL poderiam ser decorrentes do grande número de infecções oportunistas.

Prohászka e col. (1997a) encontraram níveis séricos de MBL significativamente mais baixos nos indivíduos HIV-soropositivos que no grupo controle HIV-soronegativos e concluem que a MBL pode afetar a progressão da AIDS de duas formas: 1) a MBL pode se ligar a gp120 no envelope dos vírions, resultando em ativação da via das lectinas, e os fragmentos das proteínas ativadas do complemento poderiam se ligar aos vírions e aumentar a sua infectividade e 2) a ativação das vias das lectinas poderia ocorrer através da gp120 livre, adsorvida à célula T CD4+, o que poderia facilitar a destruição destas células e, conseqüentemente, a progressão da AIDS (Prohászka et al, 1997b).

Ao contrário destes relatos, Maas e col. (1998) evidenciaram um efeito protetor, embora fraco, da variante do exon 1 nos pacientes HIV-soropositivos sem doença. Malik e col. (2003) avaliaram pacientes HIV positivos (n=138) e HIV negativos (n=40) e não observaram diferença estatística na freqüência de alelos homo ou heterozigotos da MBL entre os dois grupos. Em um estudo previamente realizado em nosso laboratório,



foram avaliados 107 pacientes HIV positivos, evidenciando-se que 20,6% apresentavam dosagem de MBL acima do limite superior ( $> 7,5 \mu\text{g/mL}$ ) e elevação dos níveis séricos de MBL nos estágios mais avançados da doença, porém sem significado estatístico (Lian et al, 2004). Alves e col. (2004) relataram maiores valores de carga viral nos pacientes soropositivos que apresentavam a variante alélica B, sugerindo que os baixos níveis séricos de MBL nestes pacientes poderiam levar a uma eliminação ineficaz do vírus na circulação e, conseqüentemente, ao aumento da carga viral plasmática. Todos estes relatos demonstram o quão controverso este assunto tem se mostrado.

## **2e. MBL e a Transmissão Materno-Fetal do HIV:**

Considerando-se a importância da MBL na resposta imune inata, sua capacidade de ligação com a gp120 e a dificuldade no estabelecimento dos diversos fatores relacionados com a transmissão materno-fetal do HIV, suspeitou-se da influência desta proteína nesta situação.

Há poucos estudos desenvolvidos, tentando correlacionar o gene da MBL e o risco de transmissão materno-fetal do HIV e, ainda, a evolução para AIDS. Em 1999, Amoroso e col. avaliaram a presença do alelo B em crianças HIV-soropositivas infectadas por transmissão materno-fetal e em crianças expostas ao risco, porém não infectadas. Não houve diferença significativa na frequência de distribuição deste entre os grupos porém, nas crianças infectadas notou-se um risco maior (3.68) para progressão rápida da doença quando a mutação estava presente.

Boniotto e col. (2000) avaliaram a presença de mutações ou polimorfismos da proteína em três grupos de pacientes infectados pelo HIV: 1) filhos de mães HIV positivas infectados pelo vírus, 2) filhos de mães HIV positivas sem infecção viral e 3) pacientes saudáveis, sugerindo que a influência da MBL na transmissão materno-fetal do vírus e a progressão para AIDS poderiam ser decorrentes de mutações da região codificadora do gene *mb12*, que alterariam a estrutura da proteína, ou a região promotora, por regular a concentração sérica da MBL.

Posteriormente, em 2003, Boniotto e col. ainda avaliaram filhos de mães HIV-soropositivas, com e sem infecção, evidenciando maior frequência do alelo O nas crianças infectadas e que a sua presença determinava um risco de 1.37 para a infecção pelo HIV.

Apenas no trabalho mais recente (Arraes et al, 2004) foi feita uma correlação entre os dados maternos e do lactente ao genótipo da MBL, onde se encontrou uma frequência maior de alelos O nas mães transmissoras. Porém, as mães acompanhadas neste estudo não receberam tratamento durante a gestação e os seus filhos também não receberam AZT ao nascimento e durante as seis primeiras semanas de vida. Os autores sugerem que a transmissão materno-fetal do vírus depende somente do genótipo de *mb2* da mãe e da criança.