BRUNO PAIVA DOS SANTOS

ENVOLVIMENTO DE POLIMORFISMOS DO GENE DE LECTINA DE LIGAÇÃO À MANOSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Artigo apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas – Ênfase Molecular, Celular e Funcional. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências; Departamento de Genética. Artigo redigido seguindo as normas do periódico Tissue Antigens (Blackwell Publishing).

DR. JOSÉ ARTUR BOGO CHIES
Orientador

PORTO ALEGRE

2008

Título Completo:

Envolvimento de Polimorfismos do Gene de Lectina de Ligação à Manose em Paciente com Anemia Falciforme

Título Simplificado:

Polimorfismos de MBL em pacientes com SCD

Santos, BP[1]; Silla, LM da R[2]; Silva, MAL da[2]; Vargas, A[1]; Dresch, C[1]; Chies JAB[1]

[1]Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – RS – Brasil

[2]Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – RS - Brasil

Correspondência: José Artur Bogo Chies

Departamento de Genética UFRGS.

Avenida Bento Gonçalves 9500, Caixa Postal 15053

CEP: 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

Fax: +55 51 3308 7311

e-mail: jabchies@terra.com.br

Resumo

Anemia falciforme (SCD) é uma doença determinada pela homozigose da hemoglobina S e apresenta uma variedade de sintomas que não podem ser explicados somente pela mutação no gene da β-globina. Nos últimos anos têm se cogitado que fatores inflamatórios poderiam interferir na gravidade dos sintomas. Para contribuir na identificação de fatores genéticos que modulariam esse perfil, estudamos o gene da lectina de ligação à manose (MBL), uma importante proteína sérica na imunidade inata que participa no combate a infecções e promoção da inflamação, dois aspectos importantes na SCD. Neste trabalho, analisamos variantes que interferem na concentração e atividade da MBL. Nossos resultados sugerem que as variantes avaliadas não estão diretamente associadas às manifestações clínicas severas e infecções em pacientes com SCD. Porém, nossos dados mostram uma nítida diferença nas freqüências alélicas entre homens e mulheres, cujos homens SCD possuem mais freqüentemente alelos relacionados a níveis séricos mais elevados. Mais estudos devem ser realizados para avaliar o papel dessas variantes em outras características clínicas da SCD bem como o papel de outros genes que modulam respostas imunológicas.

Palavras chave: HbS, hemoglobinopatia, imunidade inata, infecção, inflamação, MBL2, MBP, polimorfismos, sistema complemento.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina S (Hb S) é o resultado de uma mutação pontual no sexto códon (GTG para GAG) do gene da β-globina que substitui um ácido glutâmico por uma valina (1). A homozigose para esta variante caracteriza a anemia falciforme (SCD). Essa mudança permite a Hb S polimerizar em baixas tensões de oxigênio, já que a valina interage com sítios complementares nas cadeias adjacentes da globina, falcemizando o eritrócito (2). O eritrócito falcemizado, então, apresenta várias modificações que o tornam mais aderente à parede vascular da microcirculação caracterizando a crise vaso-oclusiva (CVO), resposável pelas crises de dor e internação dos pacientes. Além disso, os pacientes com SCD apresentam alta suscetibilidade a infecções durante a infância, sendo esta a principal causa de morte em crianças com SCD (3, 4).

Os eventos primordiais para as CVOs incluem a adesão de eritrócitos (reticulócitos e *poorly deformable dense cells*) ao endotélio do capilar venoso (5, 6); adesão endotelial-leucócitos com formação de agregados heterocelulares (leucócitos e células irreversivelmente falcemizadas) que contribuem para a obstrução, resultando em hipóxia local (7); aumento da formação de polímeros de Hb S e propagação da oclusão para vasos adjacentes. Existe também a transmigração dos neutrófilos através de junções gap endoteliais, o que influencia a inflamação. Além desses fatores, há outras condições que favorecem o início da falcemização e das crises vaso-oclusivas, tais como prolongamento do tempo de exposição dos eritrócitos ao ambiente microvascular, homeostasia anormal de cátions e conseqüente desidratação dos eritrócitos (8, 9), alteração no tônus vasomotor favorecendo a vasoconstrição (10), concentração intracelular de Hb S e taxa Hb S/outras hemoglobinas protetivas (11, 12), pH e ativação do sistema de coagulação (13).

Quanto às infecções, as septicemias são fortes indicadores de SCD ainda não diagnosticada, uma vez que a maioria dos eventos de sepse ocorre na primeira infância (14). Os microrganismos mais freqüentes nestes eventos são pneumococos e *Haemophilus influenzae* (15). Acredita-se que as CVOs participam da suscetibilidade a infecções, já que afetariam órgãos importantes do sistema imune, como o baço, ou órgãos que apresentam grande quantidade de células do sistema imune. É no baço que existe grande quantidade de células NK, responsáveis por induzir a apoptose de células que apresentam padrão alterado da expressão de MHC de classe I e de reconhecer antígenos vindos do sangue. Assim, na SCD, observa-se esplenomegalia decorrente da congestão na polpa vermelha pelo seqüestro de eritrócitos falcemizados nos cordões esplênicos e sinusóides, que evolui com a formação de trombose e infartos, culminando com a atrofia e fibrose do órgão. Entretanto, mesmo antes da auto-esplenectomia, a capacidade fagocítica mediada por opsoninas e a produção de anticorpos são afetados no paciente SCD em conseqüência da persistente agressão esplênica, levando a uma asplenia funcional. Essas infecções, acompanhadas de acidose, hipóxia e desidratação, podem desencadear e/ou

intensificar as crises de falcemização, já que favorecem a produção de citocinas inflamatórias, aumentando, assim, a expressão de moléculas de adesão, o que forma um perigoso círculo vicioso para o paciente (16, 17).

Assim, a apresentação clínica da anemia falciforme é o resultado da interação de vários genes, mostrando uma ampla variedade de sintomas que não podem ser explicados somente pela mutação do gene da β-globina (18). Outros genes, não ligados ao lócus da β-globina participam dos eventos patofisiológicos e são, por sua vez, controlados por diferentes genes, conhecidos como pleiotrópicos ou genes de efeitos secundários. A severidade da SCD varia grandemente entre indivíduos, já que os pacientes não têm variantes de genes pleiotrópicos idênticas. Alguns carregam variantes que podem tanto amenizar ou exacerbar o fenótipo básico da SCD. Entre fatores genéticos já associados a alterações na apresentação clínica da SCD podemos citar a ocorrência de características clínicas mais brandas em mulheres e mutações que aumentam a expressão de Hb F (especialmente em haplótipos Senegal e Árabe-Índiano)(19).

Nesse contexto, o gene *MBL2* tem sido documentado como um potencial modulador imunogenético que poderia constituir num risco adicional de infecções na SCD (20). Esse gene codifica a lectina de ligação à manose (MBL; também chamada de proteína de ligação à manose, MBP) que inicia a via das lectinas, uma das cascatas de ativação do sistema complemento. A MBL é formada pela oligomerização de 2 a 6 subunidades idênticas. Cada subunidade é composta de uma região N-terminal rica em cisteína, de uma região análoga à tripla hélice colágena formada por 20 tripletes de Gly-X-Y, de uma região de junção, conhecida como pescoço e de um domínio de reconhecimento de carboidratos, composto por 3 estruturas globulares (21). Esses domínios reconhecem padrões determinados de antígenos distribuídos na parede de microrganismos (22). Assim que a MBL se liga, ela se associa a diferentes serino-proteases associadas à MBL (MASP), que continuam a cascata das lectinas através da MASP-2 (23). MASP-2 se liga a uma região distinta da hélice colágena, no lado C-terminal da curva formada pela seqüência Gly-X-Gly e termina próxima a região do pescoço. A ligação do ligante induz uma mudança conformacional na MASP-2 que ativa seu domínio serino protease (24). Até que ocorra a lise do microrganismo, como principal função da cascata, são liberados intermediários que participam da promoção da resposta inflamatótia (para revisão, vide 25).

Existem diferentes variantes no gene *MBL2* que estão associadas a diferentes concentrações séricas da proteína. Duas variantes, mais estudadas, no promotor: -550, uma substituição C>G (variantes L e H, respectivamente) e -221, uma substituição G>C (variantes Y e X), sendo que a variante X está mais relacionada a baixas expressões do gene (26). Já no primeiro éxon do gene *MBL2*, três variantes, todas levando à substituições nos aminoácidos codificados, são mais estudadas: no códon 52, que envolve a troca de uma arginina por uma cisteína, alelo D; no códon

54, que envolve a troca de uma glicina por um aspartato, alelo B; no códon 57, que envolve a troca de uma glicina por um glutamato, alelo C. É comum na literatura usar a seguinte nomenclatura: o estado selvagem para essas três variantes é considerado "alelo A", a presença de qualquer das três variantes do éxon caracteriza o "alelo O" (27). Este agrupamento é possível pois qualquer das variantes acarreta o mesmo efeito: menor oligomerização das subunidades de MBL, e conseqüente menor indução da ativação do sistema complemento. As variantes do éxon nunca foram encontradas juntas sobre um mesmo cromossomo, e elas estão em forte desequilíbrio de ligação com as variantes da região promotora, sendo encontrados poucos haplótipos para esses marcadores : LXA, LYA, HYA, HXA, LYB, LYC, LYD, HYD e HYB (28). Ainda existe o polimorfismo IVSnt5, no íntron 1 que substitui uma G>A no sítio doador do *splicing* e foi apenas encontrado na população em que foi descrito (20). Quanto aos níveis séricos, nem todos os haplótipos foram testados. O padrão de expressão no soro, de acordo com o haplótipo, está assim estabelecido: HYA>LYA>LXA>>HYD=LYB=LYC (26, 27, 29-32).

Em Chies *et al* (33), considera-se a anemia falciforme como uma condição inflamatória crônica. Em Neonato *et al* (20), os fenótipos menos severos e baixas freqüências de infecções recorrentes estão no grupo de pacientes que carrega os alelos variantes, o que pode ser explicado como um balanço do nível da resposta imune inata. Ou seja, respostas imunes em níveis reduzidos (mas não tão baixos que incapacitem o combate às infecções) seriam melhores para pacientes falcêmicos do que respostas imunes em níveis altos que, se muito intensas, poderiam induzir sintomas inflamatórios adversos. Esse seria um exemplo em que a presença da mutação em homozigose da anemia falciforme estaria atuando em conjunto a outros polimorfismos para fenótipos brandos.

O presente estudo tem como objetivo estabelecer as freqüências alélicas e genotípicas das diferentes variantes *MBL2* citadas em uma amostra de pacientes SCD com o intuito de encontrar relações que ajudem a esclarecer a origem da ampla heterogeneidade clínica da anemia falciforme através de fatores de suscetibilidade que influenciam na morbidade da doença. Também temos como objetivo relacionar os haplótipos com a sintomatologia clínica, principalmente o aparecimento de crises vaso-oclusivas e infecções para que futuramente essas informações possam contribuir em tratamentos diferenciados dos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras populacionais

Nós analisamos 97 pacientes SCD em tratamento no Hospital de Cínicas de Porto Alegre (HCPA). A idade dos pacientes varia de 4 a 67 (idade média 27,5 ±13,1); 52% dos pacientes são homens (n=50) e 48% mulheres (n=47). O sangue foi coletado e estocado a 4°C com EDTA até a manipulação. O termo de consentimento foi assinado pelos pacientes ou por seus representantes legais. Neste trabalho, o termo afro-brasileiros designa indivíduos com características fenotípicas típicas de grupos populacionais nativos da África. Essa nomenclatura não considera apenas ancestralidade mas também características fenotípicas como a cor da pele. Homozigose para Hb S foi diagnosticada por análise molecular como descrito por Huang (34). O grupo controle é composto de afro-brasileiros saudáveis, doadores de sangue. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA.

Definição dos Eventos Clínicos

Os pacientes foram considerados tendo uma história clínica severa quando apresentaram 2 ou mais CVOs por ano (taxa de dor ≥2). Uma história clínica não-grave foi definida como relativa a 1 crise de dor por ano ou menos. Essa classificação foi baseada no período anterior ao tratamento com hidroxiuréia (HU). A HU é uma droga citotóxica usada no tratamento da SCD devido à capacidade de induzir a síntese de HB F e reduzir significativamente as complicações das CVOs. Pacientes com história clínica severa apresentavam muitas vezes infecções recorrentes (especialmente pneumonia) além de taxa de dor ≥2.

Extração de DNA

O DNA foi isolado do sangue periférico usando protocolo descrito por Lahiri e Nurnberger (35). As amostras de DNA foram estocadas a -20ºC.

Genotipagens

Foram usadas diferentes metodologias para a análise das variantes moleculares citadas. Os polimorfismos B, C e IVSnt5 foram analisados por PCR-RFLP usando, para o alelo B, tratamento com a enzima *Ban*I, o alelo C com *Mbo*II e IVSnt5 com *Nla*III. Já o polimorfismo D foi analisado através de ACRS-PCR e tratado com duas enzimas, *Hha*I e *Mlu*I, que confirmam a genotipagem: *Hha*I reconhece o sítio de clivagem do alelo selvagem e *Mlu*I reconhece o sítio de clivagem do alelo variante.

Para os polimorfismos do promotor, um PCR alelo-específico (SSP-PCR) combinado permitiu a identificação dos haplótipos LX, LY, HX e HY. Assim, foram feitas quatro reações

para a mesma amostra usando 4 primers em cada reação: 2 primers específicos e 2 primers de controle interno, que amplificam uma região conservada do gene do CYP2D6.

Análise Estatística

A distribuição dos genótipos foi determinada por contagem direta. As freqüências alélicas e comparação de presença/ausência de alelo foram realizadas por teste Exato de Fischer enquanto que as freqüências genotípicas e comparações por níveis séricos de MBL foram realizadas por qui-quadrado. As análises estatísticas foram feitas através do programa Win-PEPI.

RESULTADOS

Foram realizadas diferentes comparações entre as amostras de pacientes SCD e controles saudáveis. As freqüências genotípicas e alélicas são mostradas na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre as freqüências dos alelos variantes entre as duas amostras populacionais. Porém, quando separamos as amostras de acordo com o gênero (Tabela 2), constatamos a freqüência da variante H aumentada nos homens com SCD (P=0,011) e diminuída em mulheres SCD (P=0,033) quando comparamos aos respectivos controles saudáveis. Ao agruparmos os indivíduos cujos haplótipos são relacionados, na literatura, com diferentes níveis séricos de MBL, vemos que as freqüências são semelhantes entre pacientes e controles (Tabela 2).

A comparação entre homens e mulheres SCD revelou uma menor freqüência do alelo O em homens SCD (P=0,036). Quando separamos os haplótipos de acordo com os níveis séricos de MBL, conforme literatura, vimos que os grupos diferem (P=0,028), sendo que os homens possuem uma maior freqüência de haplótipos relacionados a níveis mais elevados. Porém, quando classificamos os pacientes de acordo com sintomatologia em graves e não-graves, não observamos diferença quanto à distribuição dos genótipos A/O ou haplótipos. Não foram observadas diferenças entre as amostras populacionais de homens e mulheres controles no que concerne as freqüências de haplótipos ou de genótipos A/O.

Quando comparamos os pacientes SCD entre si (Tabela 3), não encontramos associação entre a presença do alelo O ou dos haplótipos e as diferentes situações analisadas: casos graves (2 ou mais CVO por ano) em comparação aos casos não-graves, pacientes com recorrência de infecções versus sem recorrência de infecções, e presença versus ausência de broncopneumonia (BCP).

A variante polimórfica IVSnt5 foi encontrada somente em um paciente, apresentando freqüência de 1/194 alelos analisados.

DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma doença monogênica caracterizada pela homozigose da Hb S. Essa condição define o diagnóstico da doença. No entanto, a associação de variantes de outros genes com a anemia falciforme não significa predisposição à doença mas pode indicar uma participação no desenvolvimento de características clínicas da mesma. Os pacientes SCD podem apresentar um amplo espectro de características clínicas e sintomas que podem ser relacionados com a capacidade de desenvolver resposta imune inflamatória. *A prior*i, a diminuição da intensidade das respostas imunes poderia estar relacionada a fenótipos mais brandos da doença e beneficiaria esses pacientes, os quais desenvolveriam menos freqüentemente CVOs. Em relação a infecções, a MBL pode ser considerada um paradoxo na imunidade inata. Baixos níveis séricos de MBL predispõem o hospedeiro a infecções. No entanto, no estudo de Neonato *et al* (20), por exemplo, maior freqüência das variantes do éxon, as quais estão relacionadas a baixos níveis séricos de MBL, foram encontradas em pacientes SCD que não sofriam de infecções recorrentes. Esses alelos variantes possuem efeito dominante na concentração sérica, assim diminuem consideravelmente os níveis mesmo em heterozigose (36).

Seguindo esse pensamento, nossas análises, considerando as crises graves e não graves de vaso-oclusão não conseguiram corroborar nossa hipótese com o uso desse marcador. Analisamos os casos graves e não-graves classificados de acordo com ocorrência de CVOs (intensidade de inflamação) e recorrência a infecções e presença/ausência de BCP.

Em relação ao alelo H, vimos que ele está em freqüência aumentada em homens SCD quando comparado a homens controles. Mulheres SCD apresentam o perfil contrário: freqüência de H diminuída em comparação às mulheres controle. Esse quadro está de acordo com o fato de homens e mulheres SCD apresentarem características clínicas diferentes, na qual mulheres normalmente apresentam características clínicas mais brandas. O alelo H pode estar associado a outros fatores que contribuem para a severidade da doença, que não os analisados no presente estudo.

Quando comparamos a freqüência do alelo O entre homens e mulheres SCD, observamos uma freqüência mais baixa nos homens. O alelo O está relacionado a níveis intermediários e baixos. Na tabela 2, podemos ver que a freqüência dos haplótipos agrupados de acordo com os altos níveis séricos de MBL em homens está aumentada. Não houve associação quando comparamos casos graves e não-graves classificados de acordo com a ocorrência de CVOs. É importante ressaltar que o aumento no número amostral poderia nos revelar com mais precisão o papel do alelo O na severidade das crises de dor.

É interessante ressaltar que alguns pacientes apresentaram hepatomegalia ou danos no fígado. Sendo o fígado o principal órgão de produção das proteínas de fase aguda e produção de

MBL, outros estudos poderiam elucidar melhor o papel dessas condições na doença. Não sabemos se os níveis das proteínas de fase aguda que incluem MBL estão afetados ou não quando da ocorrência de hepatomegalia na SCD.

Quanto à variante IVSnt5, este é o primeiro estudo que identifica esta variante , além da descrição original (20). No estudo original, 242 crianças afrodescendentes foram analisadas e a variante IVSnt5 foi encontrada em 7 indivíduos, sempre em haplótipo ao LY. No nosso estudo, o indivíduo portador dessa variante possui haplótipo LYA/HYD. A variante IVSnt5, portanto pode estar ligada ao haplótipo LY, como no estudo original. Não existem estudos funcionais da MBL que levem essa variante em consideração. Suspeita-se que esta variante possa relacionar-se a baixos níveis séricos de MBL por interferir em uma seqüência conservada importante para o *splicing* do RNA. Assim, outra seqüência parecida adiante, dentro do íntron, seria usada para promover o *splicing* do mRNA. Vale lembrar que o final do éxon 1 e o éxon 2 são responsáveis por codificar a hélice colágena, que possui sua seqüência com repetições conservadas, assim podemos sugerir que, como os alelos B, C e D, a variante IVSnt5 interfira na torção da subunidade, impossibilitando ou dificultando a oligomerização.

Os pacientes que participaram desse estudo foram classificados como afrodescendentes através de análise de fenótipo. Os polimorfismos de *MBL2* já foram estudados em diferentes populações (para revisão ver 37) e as freqüências encontradas em nosso estudo, aproximam-se muito àquelas encontradas na África sub-sahariana: maior freqüência do alelo C. O alelo B é o mais comum em populações da Eurásia e América. Outros estudos já abordaram as freqüências das variantes de *MBL2* no Brasil, por exemplo, um estudo feito no Paraná (38).

Em conclusão, estudamos variantes no gene *MBL2* em uma população com anemia falciforme, no Sul do Brasil. Nossos dados sugerem que as variantes analisadas não estão diretamente associadas ao desenvolvimento das características clínicas da doença, porém houve diferença nas freqüências alélicas entre homens e mulheres com SCD.

AGRADECIMENTOS

É difícil começar a agradecer, essa é a parte mais emocionante do trabalho. Não quero esquecer ninguém, portanto vou me esforçar. Vou começar por quem participou diretamente comigo na execução do trabalho: o pessoal da Molecular. Gabriela Kniphoff, que nunca hesitou em ajudar, trocar horários de PCR, tirar clivagens, olhar géis, contar histórias: grande parceira de trabalho! Nossas jornadas sempre foram ótimas. Nadine Glesse que encanta todo mundo com o seu jeitinho meigo de ser; as vezes sua 'politesse' nos constrangia e nos dava nos nervos. Paula, com sua delicadeza, paciência, amor ao próximo nos contagia à primeira vista; só nós sabemos o quanto sofremos nas suas mãos e o quanto sentimos sua falta em dois dias de ausência. Fê Malinsky, minha amiga de todas as horas. Não sabe a falta que nos faz. Tiago Dalberto, que pára todos seus experimentos para nos explicar qualquer coisa. Priscila Vianna, grande mulher! Eu nem posso dizer o quanto eu a admiro e aprendo com ela; quero que volte de Paris cheia de histórias boas e fazendo biquinho pra conversarmos na sala de cultura. Larissa Heinzelmann, que sempre teve muita paciência, carinho e nos alertava das peças que a biologia molecular pode nos pregar. Fernanda Rabaioli, que chegou de mansinho no laboratório e esteve presente em absolutamente todos os meus ensaios me dando sugestões ótimas para que eu pudesse melhorar. Priscila Machado, a pequena polegar, que nunca está triste e sempre quer nos agitar! Déia Wieck: eu não vou a esquecer, não. Ela que me ensinou e me fez sentir segurança nas técnicas de todos os dias. Márcia Trein, que diluía nossos tédios/sofrimentos e sempre vinha nos alegrar. Elvira Cordero, com seu português mais fluente que o meu, me ajudou muito com as amostras populacionais. Déia Vargas, que eu admiro tanto! Sempre teve muita paciência em me explicar e muita rapidez em responder as minhas dúvidas via e-mail. Dr. Gustavo Fioravanti que parou absolutamente tudo para me ajudar na estatística e é o meu freguês no truco. Guilherme Rucatti pelas piadas e companhia aos sábados no laboratório. Sua presença é fundamental para a diversão e quebra de monotonia. Meu orientador, José Artur, grande amigo que me conforta nos meus problemas familiares (assim que acabei entrando no lab) e não me deixa salvar o mundo nas conclusões de um único polimorfismo. Obrigado pela paciência que às vezes nem minha mãe tem comigo.

Falando na mãe, ela remete logo ao pai e irmão. Nem preciso dizer o quão presente são e me apóiam em toda e qualquer etapa da minha vida. Amo muito todos vocês. Quanto ao meu trabalho, minha linda tia Talita tem papel crucial. Foi por ela que descobri a beleza da imunologia. Não posso deixar de mencionar na minha vó linda, também, que faz tudo, absolutamente tudo mesmo por mim. Meu 'pretinho', que foi a melhor coisa que apareceu na minha vida. Há cenas dos teus 5 meses de vida não sairão da minha memória NUNCA: teu sorriso, principalmente. Meu coração aperta sempre que penso em ti.

Meus amigos de dentro da faculdade Tielli, Marcela, Raquel, Carol, Dennis, Rodrigo, Gabriel, Amélie. Meus grandes 'múmias'! Obrigado pela companhia e pelas ligações no meio da noite e pelo ombro sempre disponível.

Meus amigos de fora da faculdade (lê-se: de infância): Gustavo, Wolney, Mônica, Hellene, Mathias que me seqüestravam pela madrugada, também passávamos tardes e noites conversando. Obrigado por nunca terem me abandonado e entendido minha ausência nessa peleia da facudade. E aqueles amigos que não são tão de infância, mas que, mesmo longe (SP e destaque especial para Belo Horizonte) estão sempre muito perto. Ainda espero vocês todos aqui em Porto Alegre e espero ir visitá-los breve. Quero destacar que trabalho e história nenhuma se faz sozinho.

Esse estudo foi feito com apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS

[1] Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1021–30.

[2] Bookchin RM, Balazs T, Nagel RL, Tellez I. Polymerisation of haemoglobin SA hybrid tetramers. *Nature* 1977; **269**: 526–27.

[3] Barrett-Connor E. Bacterial infection and sickle cell anemia. An analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. *Medicine* 1971 **50**:97-112.

[4] Ballas SK and Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996 10:1221-1239.

[5] Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. *Proc NatlAcad Sci USA* 1989; **86**: 3356–60.

[6] Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakada MT, Nagel RL, Coller BS. Monoclonal antibodies to _v_3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelial interactions induced by platelet-activating factor. *Blood* 2000; **95**: 368–74.

[7] Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Coller BS, Frenette PS. Primary role for adherent leucocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 3047–51.

[8] Bookchin RM, Lew VL. Sickle red cell dehydration: mechanisms and interventions. *Curr Opin Hematol* 2002; **9**: 107–10.

[9] Gibson JS, Ellory JC. Membrane transport in sickle cell disease.*Blood Cells Mol Dis* 2002; **28**: 303–14.

[10] Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hemat Oncol* 2000; **22**: 515–20.

[11] Setty BN, Kulkarni S, Rao AK, Stuart MJ. Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidlyserine exposure and coagulation activation. *Blood* 2000; **96**: 1119–24.

[12] Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and haemoglobin F. *Blood* 2003; **102**: 365–70.

[13] Franck PF, Bevers EM, Lubin BH, et al. Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer: the cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *J Clin Invest* 1985; **75**: 183–90.

[14] Schutze GE, Mason EOJ, Barson WJ, Kim KS, Wald ER, Givner LB, et al. Invasive pneumococcal infections in children with asplenia. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; **21**:278-82.

[15] Wierenga KJJ, Hambleton IR, Wilson RM, Alexander H, Serjeant BE, Serjeant GR. Significance of fever in Jamaican patients with homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child.* 2001; **84**:156-9.

[16] Falcão RP, Donadi EA. Infecções e imunidade na doença falciforme. AMB *Rev Assoc Med Bras.* 1989;**35**:70-4.

[17] Loggetto SR, Pellegrini-Braga JA, Costa-Carvalho BT, Solé D. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. *Rev Bras Alerg Imunopatol*. 1999;**22**:77-82.

[18] Chui DH, Dover GJ. Sickle cell disease: no longer a single gene disorder. *Curr Opin Pediatr* 2001; **13**: 22–27.

[19] Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, Labie D. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med*. 1985; **14**:880-4.

[20] Neonato MG, Lu CY, Guilloud-Bataille M, Lapoumeroulie C, Nabeel-Jassim H, Dabit D, Girot R, Krishnamoorthy R, Feingold J, Besmond C, Elion J: Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections. *Eur J Hum Genet* 1999; **7**:679-88.

[21] Kawasaki T. Structure and biology of mannan-binding protein, MBP, an important component of innate immunity. *Biochim Biophys Acta*. 1999;**1473:**186-95.

[22] Ezekowitz RA. Role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *J Infect Dis*. 2003;**187** Suppl 2:S335-9.

[23] Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, Jensenius JC. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature.* 1997; **386**:506-10.

[24] Takahashi K, Ip WE, Michelow IC, Ezekowitz RA. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol.* 2006; **18** :16-23.

[25] Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007; **7** :9-18. Review.

[26] 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**:3013-20.

[27] 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* 1998; **161**:3169-76

[28] Oudshoorn AM, van den Dungen FA, Bach KP, Koomen I, Fetter WP, Catsburg A, Savelkoul PH, van Elburg RM. Mannose-binding lectin in term newborns and their mothers: genotypic and phenotypic relationship. *Hum Immunol.* 2008; **69**:344-8.

[29] Ip WK, To YF, Cheng SK, Lau YL: Serum mannose-binding lectin levels and mbl2 gene polymorphisms in different age and gender groups of southern Chinese adults. *Scand J Immunol* 2004; **59**:310.

[30] Lee SG, Yum JS, Moon HM, Kim HJ, Yang YJ, Kim HL, Yoon Y, Lee S, Song K: Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Mol Immunol* 2005; **42**:969-78.

[31] Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG: Analysis of the relationship between mannosebinding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002; **56**:630-38.

[32] 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; **24**1:33-41.

[33] Chies JAB and Nardi NB: Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Medical Hypothesis* 2001; **57**:46-50.

[34] Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ et al. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao* 1989: **16**: 475–82.

[35] Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;**19**:5444.

[36] Wallis R. Dominant effects of mutations in the collagenous domain of mannose-binding protein. *J Immunol.* 2002 May 1;**168**:4553-8.

[37] Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet.* 2000; **2**:305-22.

[38] 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**:722-34. Epub 2006 Jul 10.

Tabela 1. Número de indivíduos seguido das [freqüências genotípicas] e alélica de cada variante estudada na região promotora (H e X) e no éxon 1 (B, C e D) do gene *MBL2* no grupo de pacientes e controles (seguidas do número amostral analisado).

	Genótipo			**Alelo**
L/H	**LL**	**LH**	**HH**	**H**
Pacientes (n=96)	61 [0,636]	27 [0,281]	8 [0,083]	0,224
Controles (n=125)	87 [0,696]	27 [0,216]	11 [0,088]	0,196
Y/X	**YY**	**YX**	**XX**	**X**
Pacientes (n=96)	70 [0,729]	21 [0,219]	5 [0,052]	0,161
Controles (n=125)	82 [0,656]	31 [0,248]	12 [0,096]	0,220
A/D	**AA**	**AD**	**DD**	**D**
Pacientes (n=97)	93 [0,959]	3 [0,031]	1 [0,010]	0,026
Controles (n=102)	97 [0,951]	5 [0,049]	0 [0,000]	0,025
A/B	**AA**	**AB**	**BB**	**B**
Pacientes (n=97)	81 [0,835]	16 [0,165]	0 [0,000]	0,083
Controles (n=138)	118 [0,855]	19 [0,138]	1 [0,007]	0,076
A/C	**AA**	**AC**	**CC**	**C**
Pacientes (n=97)	68 [0,701]	27 [0,278]	2 [0,021]	0,160
Controles (n=112)	85 [0,759]	24 [0,214]	3 [0,027]	0,134

Tabela 2. Haplótipos promotor-éxon agrupados de acordo com descrição na literatura, de relação com níveis séricos de MBL, distribuição genotípica e freqüência dos alelos variantes em homens e mulheres pacientes e controles.

	Pacientes		Controles	
Haplótipos	Homens (n=49)	Mulheres (n=47)	Homens (n=76)	Mulheres (n=20)
1*	30 [0,612]	16 [0,341]	36 [0,474]	11 [0,550]
2**	12 [0,245]	19 [0,404]	26 [0,342]	6 [0,300]
3***	7 [0,143]	12 [0,255]	14 [0,184]	3 [0,150]
A/O				
AA	32 [0,653]	19 [0,404]	41 [0,539]	13 [0,650]
AO	14 [0,286]	24 [0,511]	31 [0,408]	6 [0,300]
OO	3 [0,061]	4 [0,085]	4 [0,053]	1 [0,050]
Alelos				
O	0,204[c]	0,340[c]	0,257	0,200
H	0,296[a]	0,149[b]	0,145[a]	0,325[b]
X	0,143	0,202	0,216	0,250

Alelo O: alelos B+C+D; alelo A: condição selvagem sobre as três posições em um mesmo cromossomo. Somente analisados os indivíduos genotipados para todas as variantes. Haplótipos agrupados de acordo com a potencial produção de MBL sérica 1* = altos níveis: LYA/A, HYA/A , 2** níveis intermediários: LXA/LXA, LYA/O, HYA/O e 3*** níveis baixos: LXA/O, O/O.

[a] P=0,011 [b] P=0,033 [c] P=0,036

Tabela 3. Haplótipos promotor-éxon e genótipos dos polimorfismos do éxon. Também é mostrada amostra de pacientes classificada de acordo com características clínicas.

	Haplótipos			**Genótipos**		
	1*	**2****	**3*****	**AA**	**AO**	**OO**
Pacientes (n=96/97)	46 [0,479]	31 [0,323]	19 [0,198]	52 [0,536]	38 [0,392]	7 [0,072]
Controles (n=98/101)	48 [0,490]	33 [0,337]	17 [0,173]	58 [0,574]	38 [0,376]	5 [0,050]
Pacientes						
Graves (n=57)	26 [0,456]	26 [0,456]	5 [0, 088]	26 [0,456]	26 [0,456]	5 [0,088]
Não-Graves (n=14)	7 [0,500]	5 [0,357]	2 [0,143]	9 [0,692]	4 [0,307]	1 [0,077]
Infecção recorrente (n= 39)	17 [0,436]	15 [0,385]	7 [0,179]	19 [0,487]	17 [0,436]	3 [0,077]
Sem infecção recorrente (n= 44)	20 [0,454]	15 [0,341]	9 [0,205]	23 [0,523]	18 [0,409]	3 [0,068]
BCP (n=40)	17 [0,425]	16 [0,400]	7 [0,175]	20 [0,500]	19 [0,475]	1 [0,025]
Sem BCP (n=57)	30 [0,526]	15 [0,263]	12 [0,210]	33 [0,579]	19 [0,333]	5 [0,088]

Haplótipos agrupados de acordo com a potencial produção de MBL sérica 1* = altos níveis: LYA/A, HYA/A , 2** níveis intermediários: LXA/LXA, LYA/O, HYA/O e 3*** níveis baixos: LXA/O, O/O. BCP: broncopneumonia.