



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA LECTINA LIGADORA DE
MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS COM HEPATITE C**

IGOR TEIXEIRA CAVALCANTI

ORIENTADOR
PROF. DR. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO

FEVEREIRO, 2007

IGOR TEIXEIRA CAVALCANTI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA LECTINA LIGADORA DE
MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS COM HEPATITE C**



Tese de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica, da Universidade
Federal de Pernambuco, visando
obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica, área de concentração
Bioquímica de Macromoléculas.

APROVADA POR:

RECIFE, FEVEREIRO DE 2007

Cavalcanti, Igor Teixeira

Caracterização molecular da lectina ligadora de manose (MBL) em indivíduos com hepatite C / Igor Teixeira Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2007.

59 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteínas 2. Lectina ligadora de manose (MBL) 3. Eletroforese 4. Hepatite C I. Título.

577.112 CDU (2.ed.)
572.6 CDD (22.ed.)

UFPE
CCB – 2007-059

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Igor Teixeira Cavalcanti** realizada em 27 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 27 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação do mestrando **Igor Teixeira Cavalcanti**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, Chefe do Depto. de Bioquímica, na impossibilidade da presença da Coordenadora do Curso supra citado, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação do aluno, de seu orientador, o Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, da sua Co-Orientadora, Profa. Dra. Patrícia Mendes Muniz Freire de Moura, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, na qualidade de Presidente, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Maria Tereza dos Santos Correia, os três do Depto. de Bioquímica e a Profa. Dra. Patrícia Mendes Muniz Freire de Moura, do Depto. Patologia/UPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Caracterização molecular de lectina ligadora de manose (MBL) em indivíduos com hepatite C"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação do mestrando, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Patrícia Mendes Muniz Freire de Moura, em seguida para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, e finalmente para o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, os quais agradecerem o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar o candidato. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do CCB/UFPE. Após alguns comentários, a Banca decidiu por unanimidade, conceder a menção **"Aprovado com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 27 de fevereiro de 2007.

Eduardo S. Carneiro Beltrão
Patrícia Mendes Muniz Freire de Moura
Maria Tereza dos Santos Correia
Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Igor Teixeira Cavalcanti

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver.

Em especial, a minha mãe e ao meu irmão, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado quando mais preciso, em todos os momentos.

Aos meus queridos professores Patrícia Moura e Eduardo Beltrão, por tudo que me ensinaram, pela oportunidade de trabalhar com eles, pela excelente convivência, harmonia, amizade, atenção, e pelos momentos de apoio e entendimento. Graças à competência e a acessibilidade mostrada por eles, tive condições de me sentir mais seguro e estimulado para a realização das atividades do curso e do projeto.

A Diego Araújo Albuquerque, pelo seu companheirismo e por está comigo no projeto desde os passos iniciais, sempre ajudando, opinando, participando de todas as etapas cruciais, em alguns momentos até tendo que permanecer altas horas no laboratório pela minha insistência.

A todos os professores do departamento de bioquímica da UFPE, aos quais sempre se mostraram bastante receptivos, compreensivos e encorajadores nos momentos mais críticos do mestrado. Tive a oportunidade de assimilar um pouco da experiência de cada um, sendo de imensa importância para consolidação das minhas idéias e senso crítico.

A José Miron de Oliveira e Neide Maria Fernandes Ferreira, sempre muito gentis e amigáveis comigo, foram companheiros e grandes incentivadores desde a época que eu iniciei no curso de extensão do departamento de bioquímica.

A minha turma do mestrado, em especial as minhas amigas Janielle Guimarães, Rosa Guedes e Paula Hirakawa, pelos bons momentos compartilhados ao longo do curso.

A todos os membros dos setores de Bioquímica e de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), com os quais tive a oportunidade de me aproximar, interagir, aprender, dividir as experiências, questionar as dúvidas, além de compartilhar alguns momentos de descontração.

A Ricardo de Souza Silva, um grande amigo que esteve comigo em muitos momentos dentro do laboratório, me ajudou muito em algumas etapas experimentais, transmitindo valiosas informações e sempre mantendo o senso de humor e extrema simpatia.

A prof^a Edileuza Brito, do Laboratório de Imunoparasitologia do Aggeu Magalhães, por doar um pouco do seu tempo para me ensinar a técnica do Western blot, assim como ter gentilmente cedido o sistema semi-seco, o qual é correntemente utilizado no referido laboratório. Recebeu-me com muita simpatia, atenção, dedicação e paciência.

A todos os meus verdadeiros amigos, por serem verdadeiros em todas as horas, mesmo nas situações mais difíceis.

Não poderia deixar de fazer menção as minhas grandes amigas Marianna Guerra e Rafaela Aguiar, sempre presentes em meu coração, são verdadeiras preciosidades que só por existirem na minha vida me deixam mais feliz e estimulado para enfrentar os problemas do cotidiano.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO	08
	ABSTRACT	09
1	REVISÃO DA LITERATURA	10
1.1	O SISTEMA IMUNOLÓGICO: UMA BREVE VISÃO	10
1.2	DESCOBERTA DA MBL	12
1.3	LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)	14
1.4	BIOQUÍMICA DA MBL	15
1.5	GENÉTICA DA MBL	17
1.6	FORMAS MOLECULARES FUNCIONAIS DA MBL	20
1.7	IMUNOLOGIA DA MBL	21
1.8	TÉCNICAS APLICADAS A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MBL	23
1.9	HEPATITES VIRAIS	26
1.10	HEPATITE C	27
1.11	MBL E INFECÇÃO DA HEPATITE C	28
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
4	ARTIGO CIENTÍFICO	34
	ABSTRACT	35
1	INTRODUCTION	36
2	MATERIALS E METHODS	38
3	RESULTS AND DISCUSSION	40
4	REFERÊNCIAS	43
5	CONCLUSÕES GERAIS	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7	ANEXOS	60

RESUMO

A lectina ligadora de manose (MBL), membro das lectinas tipo-C, apresenta capacidade de se ligar através de múltiplos sítios a várias estruturas de carboidratos e promover a ativação do complemento. Os baixos níveis da MBL estão relacionados com a maior susceptibilidade as várias doenças infecciosas. Diferentes ensaios utilizados para a determinação da lectina não têm sido eficazes na identificação das várias formas moleculares da MBL presentes na circulação. Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil molecular da MBL no soro de pacientes com hepatite C usando um método de purificação com base em microplacas cobertas com discos de nitrocelulose, seguida a identificação protéica por ensaios de imunoreconhecimento, SDS-PAGE (redutora e não-redutora) e análise por Western blot. Os resultados do método de purificação mostraram uma boa eficiência de ligação da membrana coberta com manana e a identificação da MBL foi confirmada para todos os genótipos por DOT-ELISA convencional. No geral, poucas bandas foram visualizadas nas amostras submetidas ao ensaio de purificação, os quais podem estar correlacionadas com a quantidade muito pequena de proteína presente. As bandas revelaram algumas diferenças para o padrão de bandamento entre os genótipos avaliados AA, AO e OO, mostrando marcações acentuadas nas faixas de 50-90 kDa e 180 kDa, sendo equivalentes a variantes estruturais de baixa massa molecular e estruturas de alta massa molecular, respectivamente. Na análise por SDS-PAGE não-redutora, foram visualizadas uma larga faixa de massas moleculares, tais como as formas triméricas (3x3), dímeros, e bandas de subunidades estruturais da MBL identificadas em algumas amostras, sobretudo nos indivíduos com genótipo tipo selvagem AA. No Western blot, foi confirmado a presença das formas de baixa e alta massas semelhantemente ao observado nos géis de eletroforese, com destaque na detecção de formas de 128 e 32 kDa. Estes resultados sugerem um método para purificação protéica simplificado e de baixo custo para a MBL, o qual foi possível avaliar um perfil diferenciado das formas moleculares presentes no soro de pacientes infectados pelo vírus HCV. Vale ressaltar que este é um importante passo para uma maior elucidação da relação estrutura/genótipo e função da MBL em relação a hepatite C e que pode ser de fundamental importância na resposta ao tratamento.

Palavras-chave: Lectina ligadora de manose, MBL, eletroforese, proteína

ABSTRACT

Mannan-binding lectin (MBL), a member of the type-C lectins, is able to bind through multiple sites to various carbohydrate structures and activate complement. Low levels of MBL have been linked with susceptibility to several infectious diseases. Different assays used to MBL determination haven't been able to identify widely its molecular forms in the circulation. This work aimed to evaluate the molecular profile of MBL in serum of hepatitis C patients using lectin separation assay in microplates with nitrocellulose discs followed by immunorecognition and SDS-PAGE (reducing and non-reducing) 10% and Western blot analysis. The separation assay results showed a good binding efficiency of mannan-coated membrane and the MBL identification was confirmed to all genotypes by conventional dot-ELISA. Generally, few bands were visualized in samples submitted to separation assay, which might be correlated with very low MBL amount. The bands revealed some differences for the migration pattern between AA, AO and OO genotypes, showing detected marks in the range 50-90 kDa and 180 kDa, equivalents to low molecular mass variants of MBL structural subunits and high molecular mass, respectively. Non-reducing SDS-PAGE showed a greater range of molecular species, such as trimers (3x3), dimers and structural units MBL bands in some samples, mainly in AA individuals. The Western blot analysis confirmed the presence of high and low molecular mass similarly observed in the SDS-PAGE, with highlight the detection of 128 and 32 kDa MBL forms. This results suggests a simple and low cost separation method for MBL in which it was possible to evaluate the profile of serum forms of this lectin in Hepatitis C patients. This is an important step for the understanding the structure/genotype of MBL in this pathology which could be associated to the response to treatment.

Keywords: Mannan-binding lectin, MBL, electrophoresis, protein

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O SISTEMA IMUNOLÓGICO: UMA BREVE VISÃO

O sistema inato constitui uma importante ferramenta para a defesa imunológica, assim como o sistema adaptativo, pela capacidade de distinguir o que é “próprio” do que é estranho e potencialmente danoso. Desta forma o sistema adaptativo apresenta mecanismos sofisticados para estabelecer tolerância e respostas específicas. Já a defesa inata é menos sofisticada e é constituída de barreiras físico-químicas. A pele, a região muco-ciliar do pulmão, os peptídeos antimicrobianos, os anticorpos naturais, o sistema complemento, a proteína ligante de lipopolissacarídeo, certas classes de linfócitos, as células NK, e os macrófagos dos tecidos conferem uma importante limitação ao processo infeccioso. Este repertório de moléculas junto com outras moléculas e células e os seus muitos produtos biologicamente ativos agem de forma coordenada e constituem uma ampla rede da defesa imediata do hospedeiro.

O mecanismo imunológico inato tem atraído cada vez mais o interesse por parte dos pesquisadores, não somente pela sua atuação na defesa imediata contra infecções, mas também devido a sua importância na ativação de uma resposta imune específica adequada. Atualmente entende-se que a imunidade inata não age de forma isolada, separada ou paralela à imunidade adaptativa, mas proporcionalmente os dois sistemas interagem produtivamente e sinergicamente. Exemplos que podem ser citados incluem a amplificação da resposta de anticorpos pelos componentes do sistema complemento gerados não especificamente (Dempsey *et al.*, 1996) e o papel de anticorpos naturais na neutralização viral (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000).

Intrínseco à imunidade inata está a sua habilidade de reconhecer agentes infecciosos e diferenciá-los do que é próprio do organismo. Assim, um ponto chave na defesa inata tem sido a evolução de classes de moléculas denominadas moléculas de reconhecimento padrão. Essas moléculas reconhecem certos padrões de estruturas que estão dispostos na superfície dos microrganismos, os também chamados de padrões moleculares associado à patógenos ou PAMPs (Medzhitov & Janeway, 2002). Os PAMPs representam estruturas invariáveis expostas tais como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, mananas, RNA de fita dupla e DNA bacteriano. Estas moléculas facilitam a fagocitose e lise dos microrganismos invasores e fornece um efetivo meio de articulação com a imunidade adaptativa. A deficiência do sistema

imune inato provavelmente predispõe ao desenvolvimento de sepsis por permitir a rápida multiplicação dos patógenos no estágio inicial da infecção. Receptores Toll-like, colectinas e ficolinas são exemplos de moléculas de reconhecimento. A MBL é uma das colectinas humanas mais estudadas (Worthley *et al.*, 2005).

Os imunologistas têm apreciado e explorado por um longo período as lectinas que são sintetizadas a partir de microrganismos, plantas, e invertebrados, o que possibilitou mais recentemente aos pesquisadores o entendimento de que tais proteínas de reconhecimento a açúcar apresentam papéis de forma variada na defesa imune de mamíferos. Bordet & Streng (1906) descreveram a primeira lectina animal, a congulinina, pela sua habilidade de aglutinar eritrócitos cobertos com anticorpos e fatores do complemento. Posteriormente, essa proteína seria classificada como uma proteína de reconhecimento a carboidratos dependente de cálcio (Leon & Yokohari, 1964). Sabe-se atualmente que a congulinina faz parte de um grupo de proteínas que são compostas de estruturas colágenas e domínios de reconhecimento a carboidratos (CRDs) denominado colectinas (Holmskov *et al.*, 1994).

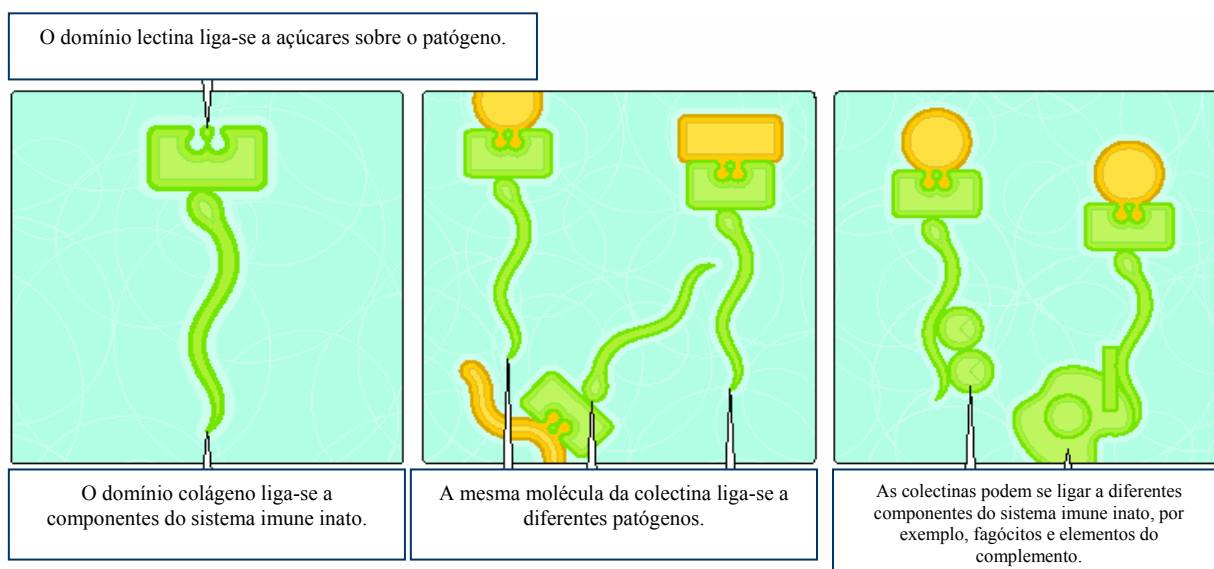


Figura 1. Colectinas podem reconhecer diferentes microrganismos e se ligar a várias moléculas do sistema imune inato. Fonte: Section 3.qxd, page 12 (16/06/05).

O termo colectina significa que as moléculas desse grupo apresentam em suas estruturas um domínio terminal NH_2 do colágeno e um domínio terminal COOH da lectina. Oito diferentes membros tem sido identificados na família colectina: a lectina ligadora de manose (MBL), congulinina, proteína surfactante A (SP-A), SP-D, colectina (CL)-43, CL-46, CL-P1 e CL-L1. Com exceção da congulinina, CL-43 e CL-46, as colectinas são amplamente distribuídas entre as diferentes espécies. São moléculas solúveis que possuem um domínio

específico de reconhecimento a carboidratos (CRD), o qual desempenha um importante papel em “traduzir” a informação biológica mediada pelos carboidratos comumente presentes na superfície dos patógenos (Drickamer, 1989; Crouch *et al.*, 2000; Hakansson & Reid, 2000; Crouch & Wright, 2001; Holmskov *et al.*, 2003). As colectinas podem ser encontradas no sangue e nas superfícies mucosas de vários organismos.

De forma a efetivar a eliminação dos patógenos, as colectinas cooperam com os fagócitos e com os fatores humorais, incluindo o sistema complemento. Todas as colectinas, exceto a colectina da placenta-1, ligam-se a manose, glicose e outros monossacarídeos presentes na superfície de microrganismos alvos que apresentam grupos hidroxilas no plano equatorial dos átomos de carbono 3 e 4 do anel de piranose (Ng *et al.*, 1996).

1.2 DESCOBERTA DA MBL

A descoberta da lectina ligadora de manose provavelmente data por volta da década de 40, quando foi descoberto que componentes lábeis ao calor presentes no soro, denominados de β -inibidores, eram capazes de neutralizar o vírus influenza e de inibir a hemaglutinação induzida por esse vírus, tendo sido atribuído posteriormente a lectina ligadora de manose (Malhotra and Sim, 1995). No entanto, a moderna história da deficiência da MBL data de 1968, quando Miller e colaboradores analisaram o soro de uma paciente com uma deficiência no processo de fagocitose. No caso, uma pequena garota apresentava sinais clínicos de dermatite severa, diarreia persistente e infecções bacterianas recorrentes. Seus leucócitos polimorfonucleares possuíam a habilidade de fagocitose enormemente prejudicada, interferindo na eliminação *in vitro* de partículas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi sugerido, neste estudo, a presença de um fator plasmático (opsonina) até então desconhecido, e que tal fator, ou seja, a MBL seria uma condição herdada, já que a mãe da referida paciente e vários outros parentes quando submetidos à mesma análise apresentaram também a deficiência fagocítica, com exceção do pai.

Mais estudos na década de 70 e 80 foram realizados e mostraram que esse particular defeito de opsonização e fagocitose, funções atribuídas a MBL, predispõe a infecções respiratórias, diarreias e desenvolvimento deficiente durante a infância. Em 1975, Robinson e colaboradores detectaram a presença de uma proteína ligadora de manose a qual não estava

associada com atividade enzimática durante a purificação da enzima α -manosidase do fígado humano por cromatografia de afinidade. Subseqüentemente, lectinas semelhantes têm sido isoladas do fígado e do soro de coelho (Kawasaki *et al.*, 1978; Kozutsumi *et al.*, 1980), do fígado e dos linfonodos de camundongo (Kawasaki *et al.*, 1980; Mizuno *et al.*, 1981) e de humanos (Wild *et al.*, 1983).

Soothill e Harvey (1976) observaram novamente a existência de um mecanismo semelhante de deficiência na opsonização e fagocitose de partículas fúngicas da *Saccharomyces cerevisiae* no soro de 11 crianças com infecções freqüentes e inexplicadas. A deficiência foi também registrada em aproximadamente 5% de uma população adulta aparentemente saudável e, segundo os autores, tal deficiência poderia ser corrigida, *in vitro* ou *in vivo*, através da infusão de plasma normal. Posteriormente em 1989, Super e colaboradores identificaram, pela primeira vez, a deficiência sérica da MBL e associaram a isso a falha na opsonização da *Saccharomyces cerevisiae*. A otite média, a diarreia crônica e a meningite foram descritas como as infecções mais comuns nessa imunodeficiência, isolando-se nos pacientes patógenos como *S. aureus*, *N. meningitidis*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Candida* (Aittoniemi *et al.*, 1997). Estima-se que cerca de 5 a 7% dos indivíduos da população geral sejam acometidos por deficiência da MBL, o que resultaria na imunodeficiência primária mais comum (Jack *et al.*, 2001).

No entanto, a primeira revelação de que a MBL agiria diretamente como uma opsonina veio a ser relatada nos estudos de Kuhlman e colaboradores (1989). Essa propriedade é análoga a uma das principais características dos anticorpos IgG e nesse estudo foi demonstrado que tanto a MBL nativa como a recombinante são capazes de se ligarem à *Salmonella enterica*, a qual expressava um polissacarídeo rico em manose. Tais interações resultavam na ligação, na captura e na morte pelos fagócitos da bactéria sinalizada. Esta atividade direta de opsonina seria mediada através de um receptor colectina específico expressado nas superfícies das células fagocíticas. Malhotra e colaboradores (1990) relataram também a presença de um receptor colectina, mas que esse seria expressado em uma ampla variedade de células e que consistia de duas cadeias idênticas de 60 kDa. No caso, o receptor mostrava similaridade na seqüência das cadeias à calreticulina, uma proteína intracelular de ligação ao cálcio. Outros estudos por Tenner e colaboradores (1995) sugeriram que a MBL pode acentuar a fagocitose através de um receptor C1q, o qual é expresso em macrófagos, monócitos e neutrófilos.

1.3 LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

A MBL é uma proteína de fase aguda secretada na corrente sanguínea, e é principalmente sintetizada pelo fígado (Ezekowitz *et al.*, 1988; Sastry *et al.*, 1991). Em roedores, coelhos e macacos Rhesus, duas formas da MBL têm sido identificadas (MBL-A e MBL-C), enquanto que em humanos e em chimpanzés somente uma forma está presente (Mogues *et al.*, 1996). A lectina tem importância na promoção da opsonização e na acentuação do processo fagocítico de patógenos, células defeituosas ou células apoptóticas previamente opsonizadas (Hartshorn *et al.*, 1993). Além disso, a MBL pode formar complexos com 3 serino-proteases (MASPs), ativando uma via específica do sistema complemento, a via das lectinas (Selander *et al.*, 2006).

A deficiência da MBL tem sido associada com o aumento do risco de infecção em uma variedade de situações clínicas (Kilpatrick, 2002). O status da lectina exibe enorme influência em indivíduos nos quais a imunidade adaptativa esteja imatura, a exemplo de crianças muito novas, ou esteja comprometida, tais como na fibrose cística, após tratamento quimioterápico ou no processo de transplante de medula óssea (Garred *et al.*, 1999; Peterslund *et al.*, 2001; Mullighan *et al.*, 2002). Muitos estudos realizados no intuito de revelar o papel da MBL diante das doenças foram conduzidos previamente em populações pediátricas, nas quais a detecção dos baixos níveis da lectina esteve comumente associada a infecções generalizadas, sobretudo do trato respiratório (Koch *et al.*, 2001). Vale ressaltar que as concentrações da MBL no sangue do cordão umbilical são geralmente menores do que na circulação de indivíduos adultos (Thiel *et al.*, 1995; Kilpatrick *et al.*, 1997), mas há um rápido aumento durante a primeira semana de vida (Teraí & Kobayashi, 1993), e durante a infância os níveis permanecem um pouco mais elevados do que em adultos (Teraí *et al.*, 1993; Aittoniemi *et al.*, 1996).

A atuação da MBL na defesa do organismo, principalmente no sistema imune inato foi também questionada nos estudos de Aittoniemi e colaboradores (1996). Os autores avaliaram os níveis séricos da MBL nas diversas faixas etárias e verificaram o nível mais alto em crianças de um mês de vida, provavelmente relacionada ao estresse do nascimento e adaptação no período neonatal. Durante toda infância o nível sérico da MBL manteve-se mais elevado que nos adultos. Acredita-se, portanto, que a alta concentração de MBL coincide com a fase de adaptação ambiental das crianças jovens e provavelmente como uma resposta protetora contra contato antigênico maciço, reforçando assim a hipótese de que a lectina atua

na defesa contra as infecções, principalmente, no período de imaturidade do sistema imune e de maior susceptibilidade aos agentes infecciosos.

1.4 BIOQUÍMICA DA MBL

A MBL humana é uma glicoproteína complexa, cujas cadeias polipeptídicas tem peso molecular de 32 kDa com 248 aminoácidos cada. Consiste de quatro domínios distintos: o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), “pescoço”, colágeno e N-terminal (Presanis *et al.*, 2003). Na região C-terminal da cadeia ocorre o CRD, caracterizado por apresentar um arranjo compacto e permitir as ligações seletivas da colectina a carboidratos complexos específicos, na presença do cálcio. De acordo com van de Wetering e colaboradores (2004), o CRD apresenta 22 resíduos de aminoácidos conservados, incluindo resíduos de cisteína, os quais seriam responsáveis pela especificidade de ligação à manose, N-acetilglicosamina e glicose, pela formação de pontes dissulfeto intra-cadeias e pela constituição de sítios de ligação ao cálcio.

Em direção a região N-terminal da cadeia, encontra-se uma região hidrofóbica denominada “pescoço” (*neck*), a qual permite o correto alinhamento das cadeias colágenas para a trimerização das cadeias. Mais adiante, ainda em direção ao N-terminal, há a região colágeno, caracterizada por conter 19 seqüências repetidas de glicina-X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, com maior freqüência de prolina ou hidroxiprolina. Seu padrão de repetição das seqüências glicina-X-Y é interrompido por uma região de flexibilidade da MBL, possibilitando às subunidades triméricas uma angulação ou dobramento na porção posterior à região central. As hélices colágenas de três cadeias polipeptídicas se “entrelaçam” umas com as outras para constituírem um domínio estável, importante na formação da unidade estrutural. A região N-terminal possui cisteínas, as quais estão envolvidas nas interações covalentes entre as três cadeias polipeptídicas constituintes das subunidades e também responsável pela ligação covalente das várias subunidades na formação da estrutura oligomérica (Dahl *et al.*, 2001; Terai *et al.*, 2003).

Por microscopia eletrônica, a MBL apresenta a aparência de um “buquê de tulipas”, semelhante ao componente C1q, primeiro componente de ativação da via clássica do complemento. Três cadeias polipeptídicas formam uma tripla hélice na região colágena, constituindo uma subunidade trimérica de cerca de 90 kDa, denominada forma monomérica da lectina. No soro um complexo de alta massa molecular (cerca de 200-700 kDa) da MBL

circulante é evidenciado e provavelmente é estabilizado através das regiões N-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 de estruturas maiores (Saiffudin *et al.*, 2000).

O domínio de reconhecimento a carboidrato (*carbohydrate recognition domain* - CRD) da MBL foi inicialmente cristalizado nos estudos de Drickamer (1992) com base num oligômero rico em manose. Foi observado que a ligação aos açúcares envolve pontes de hidrogênio para quatro resíduos de aminoácidos e ligações coordenadas para o íon cálcio no sítio ligante. A estrutura apresenta um arranjo modificado dos grupos funcionais em função da especificidade ao carboidrato, dispondo de três e quatro hidroxilas, e sendo deduzido a partir de análises de ligação a uma variedade de açúcares. Holmskov *et al.* (1993) salientaram que a seletividade ao carboidrato poderia ser alterada com a modificação do grupo 4-OH no plano equatorial, específico a manose, para o grupo 4-OH no plano axial, específico a galactose, por mutação sítio-dirigida introduzindo os resíduos encontrados nas lectinas tipo-C ligantes de galatose. Os autores, no entanto, não detectaram atividade da lectina após a modificação.

A discriminação entre estruturas “próprias” e “não-próprias” do organismo pela MBL reside na especificidade CDR e no arranjo espacial dos sítios ligantes, separados por algo em torno de 45-54 Å (Turner, 1996; Gadjeva *et al.*, 2001). Esta distância é suficiente para tornar praticamente impossível a interação de um oligossacarídeo rico em manose de mamíferos com mais de um domínio lectina, enquanto que as estruturas dos açúcares com padrões repetitivos sobre a superfície de muitos microrganismos constituem alvos ideais para os três domínios CRD. Além disso, a presença de resíduos de ácido siálico é considerada como fator de proteção da ligação da MBL para a maioria das células de mamíferos (Ogden *et al.*, 2001).

Embora a afinidade de cada interação açúcar-lectina seja muito fraca, somente de 10^{-3} M (Iobst *et al.*, 1994), o fato é que a proteína é capaz de se ligar a múltiplos sítios simultaneamente, assegurando a essa uma alta estabilidade de ligação (Turner, 2003). O CRD é açúcar seletivo e cálcio dependente, permitindo que a MBL reconheça preferencialmente a N-acetilglicosamina, manose, fucose e glicose (Turner, 1996). A característica dessas hexoses é a orientação dos grupos 3- e 4-hidroxilas, as quais devem ser expostas por unidades terminais não-redutoras (Figura 2) (Gadjeva *et al.*, 2001).

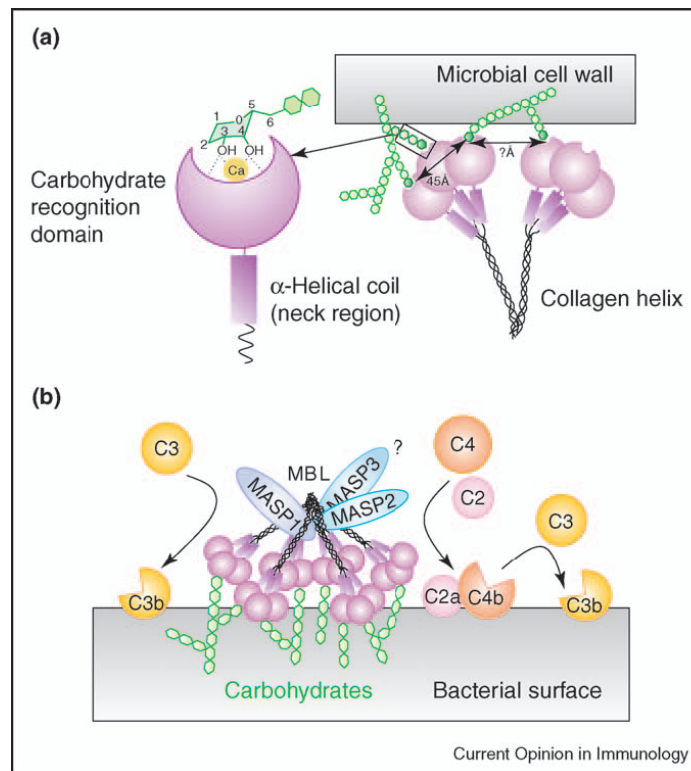


Figura 2. (a) Diagrama esquemático da ligação da MBL a hexoses que apresentam grupos hidroxilas na posição equatorial e ligação dos múltiplos sítios ligantes. (b) Modelo de interação da MBL com as serino-proteases (MASPs) e a clivagem de componentes do complemento. Fonte: Current Opinion in Immunology 2006, 18:16–23.

1.5 GENÉTICA DA MBL

São descritos dois genes correlacionados à MBL, o *MBL-1*, um pseudo-gene, e o *MBL-2*, localizado no braço q11.2-q21 do cromossomo 10, que codifica a proteína. O gene é composto por quatro exons: 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; o exon 2 codifica o restante da região semelhante ao colágeno; o exon 3 codifica uma região uma estrutura em espiral α -helicoidal, que é também conhecida como a região de pescoço e o exon 4 codifica o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), que adota uma configuração globular, e a região 3' não-transcrita (Figura 3) (Sastry et al., 1989; Guardia *et al.*, 2003).

Muitos polimorfismos no DNA têm sido caracterizados nesse gene, dos quais seis são conhecidos por resultarem em consideráveis variações na quantidade e/ou funcionalidade da proteína produzidos por indivíduos com genótipo selvagem. Três mutações pontuais são localizados no éxon 1 (Arg52Cis, Gli54Asp, e Gli57Glu), as quais provocam substituições de aminoácidos no domínio colágeno (Lipscombe *et al.*, 1995; Terai *et al.* 2003). Estas mutações são também conhecidas como variantes D, B e C, respectivamente, com a letra A representando o alelo tipo selvagem. A região codificada pelo gene *MBL2*, que esteja associada a qualquer uma das três mutações, é coletivamente denominada de O. Portanto, portadores homozigotos tipo selvagem são referidos como A/A, heterozigotos com um tipo selvagem são A/O, e indivíduos heterozigotos compostos ou homozigoto mutante são O/O (Nuytinck & Shapiro, 2004).

Tais substituições na sequência nos aminoácidos resultam numa diminuição da funcionalidade da MBL por interferir na associação e/ou estabilidade da unidade estrutural trimérica da lectina, resultando na incapacidade da unidade básica estrutural em formar os altos oligômeros (Larsen *et al.*, 2004). Com grande relevância, dados de alguns estudos, como o de Larsen e colaboradores (2004) indicaram que a atividade de fixar o complemento não está somente relacionada à integridade estrutural da tripla hélice, mas, especialmente a presença de um número suficiente de altos oligômeros, principalmente as formas tetraméricas ou maiores.

As mutações no gene *MBL2*, associadas aos níveis alterados da lectina funcional, ocorrem com variadas freqüências nas diferentes populações. A variante estrutural B tem sido relatada em 22-28% das populações Euroasiáticas, enquanto que a variante C é mais característica das populações africanas do sub-Sahara, alcançando freqüências de 50-60%. A mutação D pode alcançar a freqüência de 14% nas populações européias, mas pode também se apresentar com índices menores nos outros grupos étnicos. Outros estudos relataram que numa população coreana 34% tem a variação no alelo B, impacto comparado ao de uma população dinamarquesa, onde foi observado que 39% tem posse de uma das três variantes estruturais (Madsen *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005). Já em uma população australiana, 42% foram heterozigotos para uma das três variantes e apresentaram níveis significativos mais elevados do que os apresentados pelas populações coreanas e dinamarquesas (Minchinton *et al.*, 2002). Em geral, os níveis do soro da MBL funcional variam amplamente entre os indivíduos saudáveis, variando desde níveis indetectáveis a níveis acima de 20.000 µg/L (Madsen *et al.*, 1998; Turner & Hamvas, 2000).

Mutações na região promotora do gene (*MBL2*) são também relevantes. Polimorfismos em um único nucleotídeo estão presentes na posição -550 (G→C, alelos H e L), -221 (G→C, alelos X e Y) (Madsen et al., 1998). Haplótipos (com gene estrutural tipo selvagem) contendo “X” produzem níveis similares àqueles com variantes estruturais B, C e D. Outro polimorfismo é encontrado numa região não-tradutora do primeiro éxon e designado de P ou Q. Por causa do desequilíbrio de ligação (“linkage”), esses vários dimorfismos se combinam para formar um número limitado de sete ou oito haplótipos conhecidos (Petersen *et al.*, 2001). A frequência dos sete haplótipos varia consideravelmente entre as populações, refletindo os respectivos períodos das mutações inseridas, a história das migrações humanas e a pressão ambiental seletiva agindo sobre o genoma humano.

O genótipo é um bom indicador dos níveis circulante da MBL na população, mas não pode prever com exatidão a MBL plasmática nos indivíduos. Por exemplo, 90% dos indivíduos que são homozigotos para o alelo selvagem (AA) têm MBL >0,6 µg/mL, e cerca de 85% de heterozigotos (AO) têm MBL <0,6 µg/mL (Madsen *et al.*, 1994). Homozigotos para a mutação estrutural quase sempre apresentam pouquíssima MBL detectável por ELISA, e os genótipos com duas cópias do haplótipo LXPA apresentam baixas concentrações de MBL no plasma. Na maioria dos genótipos, no entanto, uma ampla faixa de concentração é encontrada e necessita particularmente ser “estimulada” em alguns indivíduos, ao passo que baixas concentrações podem ser encontradas, e podem ser explicadas não somente pelo genótipo (Crosdale *et al.*, 2000; Kruse *et al.*, 2002).

Minchinton e colaboradores (2002) examinaram a MBL em um coorte de 236 doadores de sangue australianos e encontraram que os doadores com genótipo A/D tiveram níveis significativamente mais altos da proteína do que os doadores A/B e A/C. Também notaram que por meio do ELISA e do ensaio de deposição de C4 que tal genótipo apresentou uma maior capacidade de ligação à manana bem como uma maior capacidade de ativar o complemento. Uma possível explicação para o fato estaria na ausência de impacto da variante D para as seqüências Gly-Aa₁-Aa₂ da cadeia de aminoácidos da MBL, o que evidencia as diferenças estruturais e funcionais entre as combinações alélicas em uma situação heterozigota.

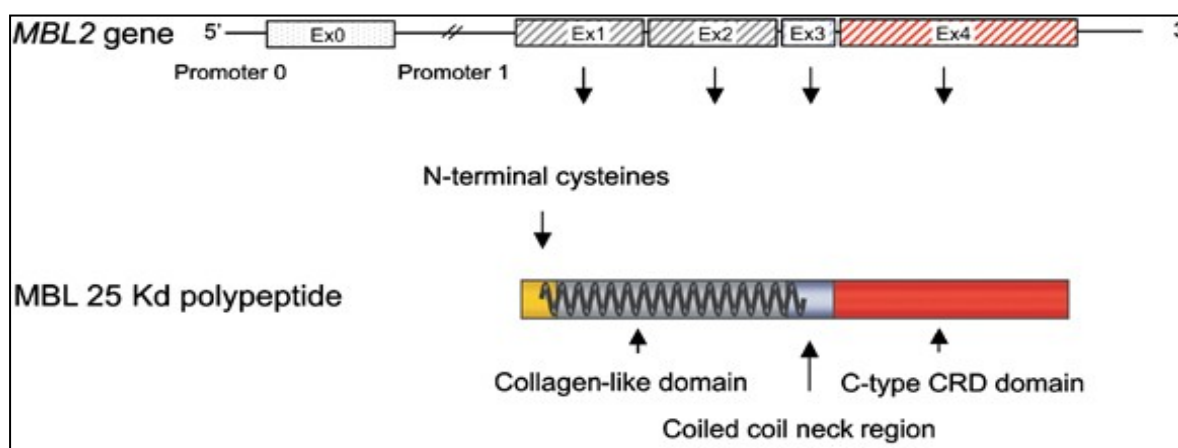


Figura 3. Representação esquemática do gene MBL2 e os códons de mutação no gene.
Fonte: Garred *et al.*, 2006.

1.6 FORMAS MOLECULARES FUNCIONAIS DA MBL

Várias formas oligoméricas da MBL, atribuídas às diferentes capacidades funcionais, têm sido relatadas como circulantes no plasma humano. Essas variações estruturais podem consistir desde a observação de uma única unidade estrutural, denominada de monômero (formada por três cadeias polipeptídicas), à formação dos altos oligômeros, a exemplo dos hexâmeros (Lipscombe *et al.*, 1995; Yokota *et al.*, 1995) (Figura 4). Alguns estudos têm indicado que a forma tetramérica da MBL é suficiente para desencadear a ativação do sistema complemento, enquanto que as formas diméricas ou triméricas podem opsonizar os patógenos suficientemente para o reconhecimento e processamento fagocítico (Super *et al.*, 1992; Yokota *et al.*, 1995). A oligomerização da proteína é essencial para a sua atividade biológica no sistema imune por permitir a ligação a carboidratos específicos dispostos na superfície de uma ampla variedade de patógenos, tais como vírus, bactérias, fungos e parasitas, ativando a deposição de fatores do complemento através de complexos com serino-proteases (MASPs), e promovendo a lise celular e a eliminação do invasor (Turner, 2003).

Estudos moleculares da MBL no plasma humano determinaram a existência de duas formas da proteína, uma forma de alta massa molecular e uma de baixa massa molecular. Fazendo associação com o genótipo, vários autores observaram que os indivíduos portadores do alelo selvagem apresentam predomínio das formas oligoméricas da lectina na circulação (tetrameros, pentâmeros, hexâmeros...), com uma menor identificação das formas dimérica, e triméricas, de baixa massa molecular (Lipscombe *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005; Terai *et al.*,

2003; Roos *et al.*, 2004). No entanto, no soro dos indivíduos heterozigotos é relatado principalmente estas últimas formas, com a presença das altas formas oligoméricas da MBL em menor proporção, porém estruturalmente similares as apresentadas pelo genótipo selvagem (Lipscombe *et al.*, 1995; Matsushita *et al.*, 2000; Garred *et al.*, 2003; Terai *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2004). Nos heterozigotos os níveis sanguíneos da MBL podem estar reduzidos em até 100 vezes quando comparados aos selvagens ao passo que nos homozigotos mutantes, os níveis da MBL são quase indetectáveis (Garred *et al.*, 1992; Lipscombe *et al.*, 1992; Madsen *et al.*, 1994, 1995, 1998; Crosdale *et al.*, 2000).

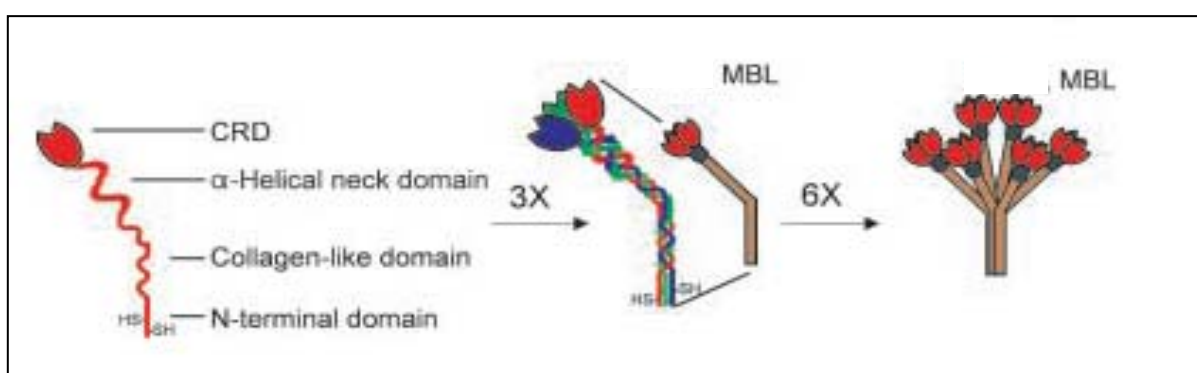


Figura 4. Representação esquemática da organização estrutural da MBL. Três subunidades estruturais são ligadas em tripla hélice, formando as unidades triméricas. Estas unidades se ligarão via resíduos de cisteína do domínio N-terminal para formar os altos oligômeros. Fonte: van de Wetering *et al.* (2004); Eur. J. Biochem. 271,1229–1249.

1.7 IMUNOLOGIA DA MBL

A MBL é o único membro da família das colectinas que promove a ativação do sistema complemento (Presanis *et al.*, 2003). Este sistema compreende um arranjo complexo de proteínas não-enzimáticas e enzimas que são essenciais para a operação de ambas as imunidades inata e adaptativa (Gadjeva *et al.*, 2001). Há três caminhos diferentes para a ativação do complemento; podendo ser pela via alternativa na qual é ativado diretamente o componente C3, e pelas vias clássica e da lectina nas quais o componente C4 é clivado, sendo a primeira pela ligação do C1q a imunocomplexos e a segunda pela ligação da lectina ligadora de manose a entidades que expressam padrões apropriados de açúcares. A via da lectina apresenta muitas similaridades com a via clássica e também, em até certo ponto, com a via alternativa. Ambos, MBL e C1q, ligam-se aos seus ligantes com as cabeças globulares, e suas

regiões colágenas ligam-se a receptores tais como a calreticulina (cC1qR) ou o receptor do complemento 1 (CR1) (Tenner *et al.*, 1995; Ghiran *et al.*, 2000). Os oligômeros da MBL são complexados com as serino-proteases associadas MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (Gadjeva *et al.*, 2001). A MASP-2 e a MASP-3 têm similaridades estruturais com os componentes C1r e C1s do complexo C1 da via clássica enquanto que a MASP-1 tem um resíduo serina ativo com homologia ao C2. A MASP-2 tem sido mostrado clivar os componentes C2 e C4 de forma semelhante ao C1s e daí gerar a C3 convertase (Saevarsdottir *et al.*, 2004).

A contribuição da MBL para a defesa imune inata é provavelmente não limitada à ativação do complemento. Evidências têm emergido que a MBL pode também promover a opsonofagocitose independente do complemento, modular a inflamação, e possivelmente promover a apoptose (Turner, 2003; Saevarsdottir *et al.*, 2004). Tomadas juntas essas funções, a MBL pode ser considerada como peça-chave da imunidade inata, dada a sua posição no reconhecimento microbiano, e na eliminação, inflamação e morte celular.

Várias manifestações clínicas são acentuadas pela deficiência das formas oligoméricas da MBL, notavelmente patógenos extracelulares e doenças auto-imunes (Summerfield *et al.*, 1997; Turner, 1998). A falha na ativação do sistema complemento, provocada pela presença das formas de baixo peso molecular, também tem sido relacionada a interações defeituosas com as MASPs (Matsushita *et al.*, 1995; Wallis, 2002; Larsen *et al.*, 2004). Por outro lado, alguns estudos indicaram que altas concentrações da lectina ligadora de manose podem ser prejudiciais e predispor a um agravamento de doenças severas provocadas por patógenos intracelulares, os quais “sobrevivem” e se replicam nos monócitos e macrófagos (Kuipers *et al.*, 2003). Garred *et al.* (1994) confirmaram essa teoria através da análise de 36 pacientes etíopes que sofriam de leprose, causada pelo *Mycobacterium leprae* e Bonar *et al.* (2004) investigaram a função da MBL em 68 pacientes com tuberculose, os quais apresentaram níveis significativamente altos da proteína, podendo assim ser desvantajoso na infecção micobacteriana. Uma correlação direta também tem sido encontrada nos estudos de Santos *et al.* (2001), onde os altos níveis da MBL favoreciam o desenvolvimento de leishmaniose visceral invasiva, provocada pelo protozoário intracelular *Leishmania chagasi*.

1.8 TÉCNICAS APLICADAS A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MBL

Atualmente nos experimentos realizados com MBL, a análise quantitativa é considerada algo relativamente simples, isso porque já existem muitos kits comerciais de ELISA. Thiel *et al.* (2002) estabeleceram um ensaio *in-house* para detectar a MBL e compararam seus resultados com os kits comerciais, onde observaram que todos funcionaram satisfatoriamente. Os autores ficaram surpresos com os resultados comparativos, já que o ensaio próprio baseado na captura da MBL numa superfície de manana seguida da detecção por anticorpo específico anti-MBL (MAb 131-1) apresentou exatamente o mesmo resultado como um ensaio “sanduíche” empregando dois anticorpos. A presença de pequenas quantidades de não-manana ligada e da MBL de baixa massa molecular nos indivíduos com variantes estruturais têm sido notada (Lipscombe *et al.*, 1995; Garred *et al.*, 2003).

Ensaio que se baseiam na imobilização da manana e no reconhecimento imunológico por anticorpos anti-MBL específicos visam estimar os níveis funcionais da colectina por meio das suas propriedades de ligação ao carboidrato. Thiel *et al.* (2002) avaliaram a atividade do complexo MBL-MASP realizando a incubação das amostras diluídas do soro em poços cobertos com manana e inseriram anticorpo anti-C4 para determinar a quantidade de componentes C4b ligada na superfície. Os resultados do ensaio funcional mostraram que os soros deficientes em MBL apresentaram uma fraca deposição dos fragmentos do complemento na fase sólida, sugerindo uma maior dificuldade de interação das formas variantes da lectina com as MASPs. Posteriormente, Thiel *et al.* (2006) citaram um kit comercialmente disponível para estimar a ativação do complemento pela MBL (Wieslab, Lund, Suécia). Este kit se revelou mais sensível por medir a quantidade de complexo de ataque à membrana (MAC) solúvel depositada sobre uma superfície de manana, detectando os defeitos em qualquer dos componentes constituintes, desde a MBL ao fragmento C9.

A MBL foi inicialmente isolada do soro humano em 1983 por cromatografia de afinidade, com uso de uma coluna Sepharose-manana (manana acoplada a uma matrix de Sepharose) na presença de íons cálcio (Kawasaki *et al.*, 1983). Publicações posteriores com MBL utilizaram essencialmente o mesmo procedimento de purificação no soro e plasma (Summerfield & Taylor, 1986; Lu *et al.*, 1990). Com o intuito de se obter a MBL de maior pureza, alguns autores utilizaram outros princípios cromatográficos como a cromatografia de troca iônica e a gel filtração (Kawasaki *et al.*, 1989; Kyogashima *et al.*, 1990). Tan *et al.* (1996) descreveram um procedimento no qual a purificação da MBL foi obtida por meio da

precipitação do plasma humano com 7% de PEG (polietilenoglicol), seguida pela adsorção em cromatografia de afinidade de Sepharose-manose. Laursen (2003) salientou a importância da purificação da MBL para utilização da lectina como produto medicinal, a qual poderia ser usada na terapia de substituição ou reposição em pacientes com a deficiência da MBL associada com sintomas clínicos, e assim, portanto, no tratamento ou prevenção de infecções. O autor fez uso da cromatografia de afinidade em uma matrix polissacarídica não-conjugada (sem carboidratos ligantes na matrix), a considerando vantajosa por apresentar um alto grau de purificação.

Ensaio realizado por Garred e colaboradores (2003) e Terai e colaboradores (2003) têm detectado com maior precisão as formas de baixa massa molecular da MBL. Terai e colaboradores (2003) examinaram o soro de indivíduos japoneses com genótipos determinados da MBL por gel filtração em Superose utilizando FPLC e ensaiaram os padrões de eluição da proteína usando um sistema próprio de ELISA. Duas formas da lectina com diferentes massas moleculares foram encontradas nesse soro, uma de 750 kDa e a outra de 400-450 kDa, onde a identificação de uma ou de ambas as formas indicaram três tipos de padrões de eluição: o tipo 1 de alta massa molecular com capacidade de ligação à manana e formação do complexo MASP-1/3, o tipo 2 de baixa massa molecular e sem essas capacidades e o tipo 3 de ambas as formas, correspondendo, respectivamente, ao tipo selvagem (AA), a uma mutação homozigota no códon 54 (B/B) e a um heterozigoto (A/B). Quando comparados com os níveis da proteína relatados em estudos anteriores, somente o do tipo selvagem foi similar, já que os níveis dos outros genótipos nesses estudos foram muito menores.

Lipscombe e colaboradores (1995) realizaram a identificação das formas de baixa massa molecular da MBL no soro de indivíduos com diferentes genótipos. Os autores relataram que a forma tipo selvagem (A/A) da proteína foi eluída de uma coluna Superdex 200 de gel filtração correspondendo a 500 kDa, enquanto que o tipo mutante (B/B) correspondeu a 240-380 kDa. Eles analisaram esses eluídos por SDS-PAGE não redutora e em seguida por Western Blot com anticorpos anti-MBL, e encontraram que a fração da MBL selvagem consistiu de uma mistura de oligômeros formados por duas a oito subunidades de peso molecular em torno de 200-700 kDa, com dímeros e trímeros constituindo as formas predominantes. Já a fração da MBL mutante foi predominantemente composta de formas com 120-130 kDa, possivelmente correspondendo ao monômero ou a uma forma anômala compreendendo quatro subunidades de 32 kDa.

A análise por imunoblot dos oligômeros da MBL no plasma humano, combinada com a quantificação (ELISA) e com os ensaios funcionais da lectina (deposição de C4) permite um melhor entendimento da estrutura nativa e as funções associadas da MBL circulante. Diferenças visíveis foram observadas nos padrões do imunoblot entre indivíduos de diferentes genótipos nos estudos de Dean e colaboradores (2005), particularmente entre indivíduos A/A e os que apresentaram A/C e O/O. No plasma destes indivíduos o padrão dos oligômeros da MBL variaram de uma única banda de 88 kDa, correspondendo a unidade estrutural, a formas que apresentaram um padrão correspondente ao tipo selvagem.

Apesar dos numerosos estudos sobre a estrutura da MBL no plasma humano, a relação entre a estrutura oligomérica da proteína expressada pelos indivíduos com as mutações, e sua habilidade de opsonização e capacidade de ativar o sistema complemento em humanos parece ainda não ter sido completamente investigada.

Garred e colaboradores (2003) analisaram 92 soros diferentes utilizando a técnica de gel filtração em coluna Superdex 200 seguida de ELISA de duplo anticorpo. Diferentemente de um estudo já realizado anteriormente pelo próprio Garred e colaboradores (1992), os autores propuseram o uso de um novo anticorpo monoclonal de captura anti-MBL (clone 131-11) para o ELISA, visando caracterizar melhor a estrutura molecular da MBL encontrada no soro normal e no soro defeituoso. Observaram que os mutantes homozigotos da MBL podiam ser detectados em quantidades similares às quantidades observadas para os heterozigotos A/O, mas ainda menores do que os selvagens A/A. Ou seja, a lectina A/A apresentou massa molecular entre 400-600 kDa, enquanto que a variante homozigota ou heterozigota da MBL apresentou massa molecular em torno de 150 kDa. Já o soro dos heterozigotos A/B e A/C continham MBL de alta e baixa massa molecular. Na análise por SDS-PAGE e imunoblot do soro dos indivíduos com diferentes haplótipos, os que apresentaram o genótipo A/A, com diferentes tipos promotores, tinham predominantemente os “altos” oligômeros, enquanto que os soros A/B, A/C e A/D continham graus variáveis de altos e baixos oligômeros, dependendo do tipo promotor no haplótipo normal A. Nos homozigotos mutantes, foram visualizadas acentuadamente as formas de baixa massa molecular, com ausência dos “altos” oligômeros. Estudos ainda demonstram que os heterozigotos A/D tendem a possuir cadeias oligoméricas da MBL mais estáveis e assim concentrações mais elevadas da proteína em relação aos A/B e A/C.

1.9 HEPATITES VIRAIS

A hepatite é uma doença gastroenterológica que apresenta como principal característica a inflamação do fígado. São muitas as causas e sinais clínicos, prognóstico e terapia, dependendo do agente causador. Ao lado de agentes químicos, como o álcool e o paracetamol, e as desordens auto-imunes, o principal fator indutor das hepatites é a infecção viral (Neuberger *et al.*, 1980; Walsh & Alexander, 2000; Obermayer-Straub *et al.*, 2000). Os vírus das hepatites (A-G), o citomegalovírus, o vírus Epstein-Barr, o adenovírus, o herpes simplex, o vírus coxsackie e o vírus da febre amarela têm todos sido associados com o desenvolvimento da hepatite, provocando a doença em diferentes graus de intensidade.

As hepatites virais podem se manifestar como aguda ou crônica. O curso clínico da doença aguda varia de assintomático não requerendo tratamento, para a deficiência total do fígado, como a falha hepática fulminante, o qual tem uma alta taxa de mortalidade mesmo quando se submete a intensa terapia, e freqüentemente requer transplante hepático (Willians, 1996). A doença aguda, no entanto, é mais comumente auto-limitada e resolvida dentro de um período de seis meses. Já a hepatite crônica é definida como uma inflamação ativa do fígado persistindo por um tempo maior que seis meses, embora a hepatite crônica inativa exista para algumas formas da doença viral onde a replicação do vírus está presente num período mais extenso do que seis meses, mas os pacientes são assintomáticos e não têm sinais bioquímicos da doença. A hepatite crônica ativa pode conduzir a cirrose hepática, a qual é caracterizada pela necrose celular, fibrose e reduzida função do fígado. A progressão da cirrose é determinada pela duração e severidade da inflamação na doença crônica aumentando significativamente o risco de se desenvolver carcinoma hepatocelular que pode ser fatal (Thomas *et al.*, 2005).

Os vírus das hepatites A-E (referidos como HAV, HBV, HCV, HDV, HEV) podem todos causar hepatite aguda por um curto período, embora a hepatite aguda na infecção pelo HCV tem clínica branda e raramente resulta em um curso fulminante. A hepatite D é encontrada somente em conjunção com a hepatite B. A infecção crônica é mais freqüentemente associada com o HBV, HCV, HDV e HGV. A infecção crônica com o HGV tem somente sido observada na presença da infecção com as hepatites virais A-C e não está associada com danos ao fígado. Embora o HBV e o HCV sejam completamente distintos, a infecção com esses vírus são as causas mais comuns de hepatite crônica e ambos são referidos como a causa significativa de morbidade e mortalidade no mundo inteiro. A

infecção crônica pelo HBV afeta 360 milhões de pessoas e 600.000 morrem anualmente de doenças do fígado relacionada ao HBV. A infecção crônica com o HCV afeta mais do que 170 milhões de pessoas em todo o mundo e 280 mil morreram de doença hepática relacionada ao HCV em 2001 (Bowden, 2001; Michielsen *et al.*, 2005).

1.10 HEPATITE C

A hepatite C é caracterizada por uma taxa de 75-85% de progressão a cronicidade após a fase aguda. A infecção pelo HCV é altamente prevalente em algumas áreas da África, Tailândia, Egito, China, Vietnã e Indonésia e presente em incidência na Europa central e nordeste, parte dos Estados Unidos, América Central, Nova Zelândia, África do Sul e Ásia. Rotas importantes na transmissão do HCV são parenteral, ou seja, através do sangue infectado e o contato prévio com produtos contaminados com sangue, havendo também a transmissão por uso de drogas intravenosas, com riscos menores associados com a exposição perinatal e o contato sexual (Shepard *et al.*, 2005; Sy & Jamal, 2006). Diagnósticos sorológicos envolvem a detecção de anticorpos anti-HCV para as proteínas estruturais e não-estruturais e ensaios moleculares para a detecção do RNA-HCV (Brown *et al.*, 2007). A detecção e a quantificação do RNA-HCV são usadas para se fazer o acompanhamento da progressão da doença e a resposta à terapia, na avaliação da biópsia do fígado.

O HCV é um vírus envelopado de RNA de cadeia simples, com cerca de 9.400 nucleotídeos, membro da família Flaviviridae, e foi inicialmente descoberto por Choo e colaboradores em 1989 (Choo *et al.*, 1991). O genoma de 9,4 kb codifica proteínas estrutural e não-estrutural, incluindo proteases virais e glicoproteínas de superfície (Thomson & Finch, 2005; Brass *et al.*, 2006). As glicoproteínas E1 e E2 são expressas como heterodímeros não-covalentes no envelope viral. Ambas contêm glicanos N-ligados (Goffard & Dubuisson, 2003) e constituem alvos em potencial para a interação com a MBL.

O HCV existe como uma variedade de genótipos definidos como grupos filogeneticamente distintos que diferem na distribuição geográfica e epidemiológica e aproximadamente em 30% na sequência do genoma. Os seis genótipos (1-6) são subdivididos em subtipos (a-t) (Simmonds *et al.*, 2005). As diferenças entre os genótipos no curso clínico e na associação às doenças têm sido investigadas com achados conflitantes. A respeito disso, parece ser um consenso que a infecção com o vírus tipo 1b aumenta o risco de

desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (Simmonds, 1997). Há também uma significativa variação entre os genótipos e a resposta ao tratamento. Outros fatores que parecem influenciar a progressão da doença na infecção pelo HCV incluem gênero, grupo étnico, consumo de álcool, rota de transmissão, idade, duração da infecção e infecção dupla com HIV ou HBV (Alberti *et al.*, 1999; Chen & Morgan, 2006).

1.11 MBL E INFECÇÃO DA HEPATITE C

Em termos de infecção viral, a MBL tem sido relatada participar da resposta imune contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), Influenza A, Ebola, Marburg, Herpes Simplex Vírus 2 e os vírus da hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente) (Ji & Gewurz, 2005; Ji *et al.*, 2005; Gadjeva *et al.* 2004; Kase *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1996; Chong *et al.*, 2005; Kilpatrick *et al.*, 2003). No caso do HBV e do HCV, mutações da MBL têm sido ligada a progressão da doença e a resposta ao tratamento (Brown *et al.*, 2007).

Poucos estudos têm examinado a relação entre os polimorfismos da MBL e a infecção pela hepatite C. Os estudos diferem quanto aos coortes usados, a categorização dos sujeitos e as mutações do gene da MBL investigadas. Estudos realizados em pacientes japoneses descreveram associações entre a mutação e a concentração da MBL, a progressão da doença e a resposta ao tratamento (Matsushita *et al.*, 1998a; Matsushita *et al.*, 1998b; Sasaki *et al.* 2000). Um outro estudo utilizando-se um coorte europeu não encontrou correlação entre o genótipo da MBL e a doença pelo HCV (Kilpatrick *et al.*, 2003).

Das três mutações estruturais, somente o polimorfismo no códon 54 (alelo B) foi encontrado no coorte japonês e isto foi positivamente associado com a diminuição dos níveis no soro da MBL, progressão da doença e resposta ao tratamento (Matsushita *et al.*, 1998a; Matsushita *et al.*, 1998b). Sasaki e colaboradores (2000) analisaram 52 pacientes infectados com o HCV, os quais foram classificados como tendo hepatite inativa crônica (CIH, n=8), hepatite ativa crônica (CAH, n=31), e cirrose hepática (LC, n=13). Cinquenta indivíduos japoneses negativos para o anticorpo HCV e HBsAg (antígeno “s” do vírus da hepatite B) foram utilizados como grupo controle. Neste estudo, pacientes homozigotos ou heterozigotos para o alelo B apresentaram reduzidas concentrações da MBL comparados com os homozigotos para o tipo selvagem e a presença de mutação no alelo B aumentou a possibilidade de progressão da hepatite crônica ativa ou cirrose.

Estudos desenvolvidos por Matsushita e colaboradores (1998a) descreveram uma correlação negativa entre a presença de mutação B e o sucesso na resposta a terapia. Inicialmente 93 pacientes com biópsia comprovada ao HCV foram examinados pós-tratamento e divididos em respondedores (SR, n=45) e não-respondedores (NR, n=48) ao tratamento com interferon. Pacientes no grupo SR tornaram-se negativo no RNA-HCV e tiveram níveis normais no soro de ALT (alanina aminotransferase) após 6 meses. NR permaneceram positivos ao RNA-HCV após 6 meses. Duzentos e dezoito indivíduos negativos para HCV, HIV e HBV foram usados como controle. Pacientes homozigotos para o alelo B foram encontrados mais freqüentemente entre NR do que SR e controles. Em um segundo estudo, Matsushita e colaboradores (1998b) investigaram a distribuição dos polimorfismos nas regiões -550, -221, +4, junto com as três variantes estruturais. Cento e cinquenta e nove pacientes com HCV, histologicamente comprovado, foram divididos em SR (n=52), NR (n=107) e compararam com 218 controles saudáveis como antes. Haplótipos da MBL foram divididos em XB (LXPA ou LYPB heterozigotos ou homozigotos) e YA (homozigotos para ambos alelos Y e A). Pacientes com haplótipos XB foram mais freqüentemente associados com baixas concentrações de MBL e pouca resposta ao interferon.

No estudo de um coorte europeu, Kilpatrick e colaboradores (2003) inferiram o genótipo da MBL quanto aos níveis de expressão da lectina. Cento e oitenta pacientes com HCV foram agrupados de acordo com a resposta a terapia (SR, n=37; NR, n=30), progressão da doença (progressão lenta, n=10; progressão rápida, n= 16) e apresentando sinais de cirrose (n=29). A progressão foi considerada rápida se a cirrose foi desenvolvida em 20 anos de infecção, comparados com nenhuma fibrose após período superior a 25 anos. Cada grupo de pacientes foi categorizado de acordo com os níveis circulantes da MBL (grupo 1, menor igual do que 0,1µg/mL; grupo 2, <1,15µg/mL; grupo 3, <2,5µg/mL; grupo 4, maior ou igual a 2,5 µg/mL). O genótipo da MBL não foi determinado para qualquer paciente. Grupos baseados nas concentrações da MBL foram assumidos estarem compreendidos nos homozigotos polimórficos (grupo 1), heterozigotos (grupos 2 e 3) e homozigotos tipo selvagem (grupo 4). Um grupo controle consistiu de 566 doadores de sangue saudáveis. Nenhuma relação aparente significativa foi observada entre a concentração da MBL e a progressão da doença ou resposta ao tratamento. No entanto, uma tendência dos altos níveis da MBL foi observada em pacientes com HCV comparado aos controles.

Dumestre-Perard e colaboradores (2002) relataram um método para calcular a atividade específica da MBL circulante. Segundo os autores, o interesse na determinação da

atividade específica da MBL reside no seu uso potencial para a exploração biológica de certas patologias. Isso foi bem ilustrado em pesquisa anterior de monitoramento do componente C4 no tratamento da hepatite C crônica, onde o consumo do complemento no soro dos pacientes com diminuição da atividade específica C4 foi observado. Foi sugerido então que a redução da atividade do componente C4 não foi dependente da via clássica, mas da via das lectinas, em virtude das concentrações dos componentes C1q, C4, C3 e MBL estarem próximas do normal e nenhum complexo inibidor C1s-C1 ser detectado. Observou-se também uma diminuição significativa na atividade específica da MBL em pacientes com HCV comparados com os controles saudáveis. Além disso, a atividade específica da MBL medida em não-respondedores ao tratamento com interferon-alfa foi significativamente mais baixa quando comparado aos respondedores.

Yuen e colaboradores (1999) estudaram a relação entre os níveis da lectina no soro e as mutações no gene da MBL em pacientes chineses assintomáticos com hepatite B e portadores de hepatite C. Foi observado que dos 64 portadores assintomáticos da hepatite B analisados, 13 apresentaram mutação no códon 54, a qual em comparação com o grupo controle saudável, não teve uma taxa significativamente aumentada. No entanto, os níveis da MBL desses portadores assintomáticos foram significativamente menores quando comparados com os dos controles. Nos 44 pacientes com hepatite C crônica analisados, 12 apresentaram a referida mutação, não havendo neste caso diferenças significativas entre a taxa de mutação e os níveis da MBL quando comparados com os controles. Segundo os autores, apesar das mutações no gene da MBL não aumentarem a susceptibilidade da persistência da infecção pela hepatite B e hepatite C, não se concluiu se essas infecções virais crônicas afetariam os níveis da MBL. Neste estudo foi encontrado que embora a presença de tais hepatites tenda às baixas concentrações da MBL, a principal causa dos níveis baixos verificados seria resultado da mutação. Considerando os pacientes com as hepatites crônicas B e C e os controles sem mutação, foi observado que os níveis da MBL foram significativamente menores nas hepatites, até mesmo em relação aos portadores assintomáticos com funcionamento bioquímico do fígado normal ou próximo do normal.

Há duas possíveis explicações para a diminuição nos níveis da MBL em pacientes com hepatite B e hepatite C. A primeira é que ao contrário de uma infecção aguda, a infecção viral crônica pode suprimir a produção protéica não-especificamente. A segunda é baseada em um estudo prévio que tem mostrado que o polimorfismo no gene promotor da MBL (HL, XY) pode explicar os baixos níveis da lectina em indivíduos sem mutações estruturais no gene (Madsen *et al.*, 1995).

2 JUSTIFICATIVA

Devido o papel fundamental da MBL para o sistema imunológico frente as doenças infecciosas, torna-se relevante o estudo desse componente da imunidade inata para um melhor entendimento da susceptibilidade à infecção pelo HCV, fornecendo assim conhecimento para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e/ou de conduta com os pacientes. A MBL atua na primeira linha de defesa contra infecções, sendo considerada molécula essencial na promoção da opsonização e fagocitose dos diversos microrganismos patogênicos e também na ativação da cascata do sistema complemento. Alterações genéticas nessa lectina interferem na sua estrutura e em sua função biológica. Desta forma, a caracterização molecular da MBL em pacientes brasileiros com HCV do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco, busca contribuir para a elucidação do comportamento molecular da lectina e a relação com a genética, a infecção por HCV e seu tratamento. Juntando-se a esta avaliação do arranjo molecular da MBL, percebe-se uma lacuna quanto a testes funcionais rápidos, práticos e reprodutíveis que possam estimar, com sensibilidade, moléculas de MBL de alta e baixa massa molecular.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

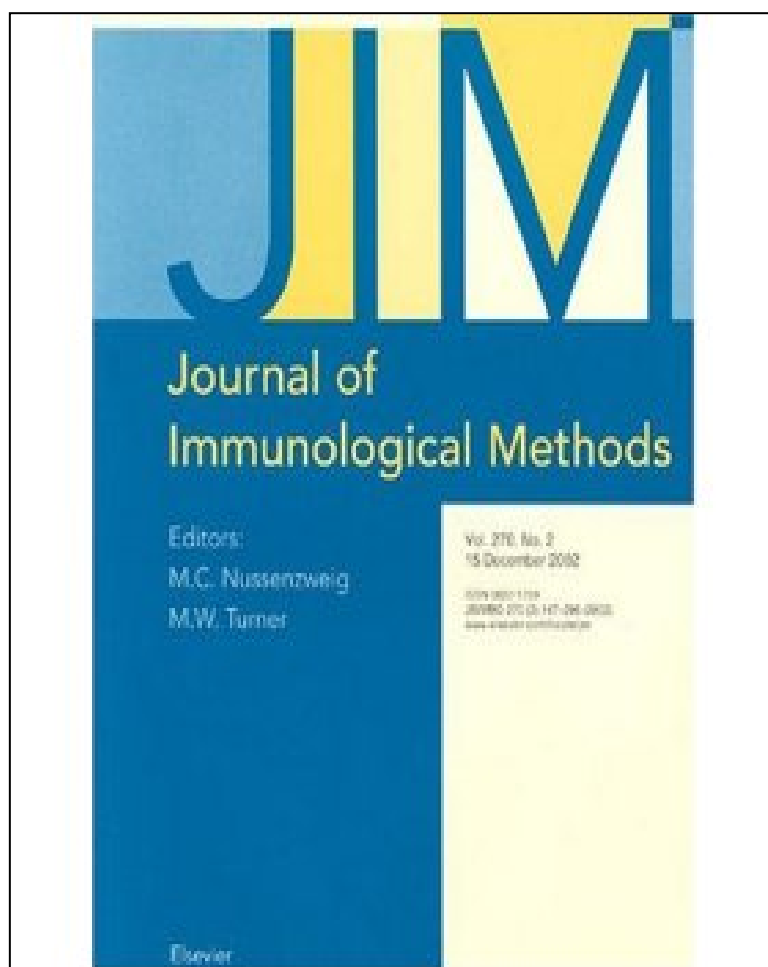
Caracterizar estruturalmente a composição polipeptídica da MBL expressa em indivíduos de diferentes genótipos e infectados com o vírus HCV.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer um ensaio de purificação de MBL de pacientes HCV positivos (AA, AO e OO) através da imobilização de manana em membrana de nitrocelulose e imuno-reconhecimento;
- Quantificar a MBL em amostras sorológicas de pacientes HCV positivos;
- Determinar as diferentes formas oligoméricas da MBL com base na massa molecular e correlacionar com os genótipos AA, AO e OO em pacientes HCV positivos;

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser submetido ao **JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS**



**PURIFICAÇÃO E PERFIL DE FORMAS MOLECULARES DA LECTINA
LIGADORA DE MANOSE (MBL) DE INDIVÍDUOS HCV POSITIVOS**

**(Purification And Molecular Mass Profile Of Mannan-Binding Lectin In Hepatitis C
Patients)**

Cavalcanti, I.T.^{a,b,c}, Albuquerque, D.A.^{a,c}; Moura, P.M.^{a,c}; Beltrão, E.I.C.^{a,b*}.

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

^bDeptº. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

^cLaboratório de Biologia Molecular de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil.

* Correspondência: Dr. Eduardo Beltrão. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Recife, Pernambuco, Brazil. 50670-910. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

ABSTRACT

Mannan-binding lectin (MBL), a member of the type-C lectins, is able to bind through multiple sites to various carbohydrate structures and activate complement. Low levels of MBL have been linked with susceptibility to several infectious diseases. Different assays used to MBL determination are not able to identify the heterogeneous molecular forms in the circulation. This work aimed to establish a method to evaluate the heterogeneous molecular profile of MBL in serum of hepatitis C patients using lectin binding assay with mannan-coated nitrocellulose discs. Separation of molecular mass by SDS-PAGE 10% (reducing and non-reducing conditions) and immunoblotting were used to identify the specific bands. The mannan-coated nitrocellulose assay (dot-N-Man) results showed a good binding efficiency of and the MBL specific bands were seen in all genotypes by conventional dot-ELISA. Generally, few bands were visualized in samples submitted to separation assay, which might be correlated with very low MBL amount. The bands revealed some differences for the migration pattern between AA, AO and OO genotypes, showing detected marks in the range 50-90 kDa and 180 kDa, equivalents to low molecular mass variants of MBL structural subunits and high molecular mass, respectively. Non-reducing SDS-PAGE showed a greater range of molecular species, such as trimers (3x3), dimers and structural units MBL bands in some samples, mainly in AA individuals. The Western blot analysis confirmed the presence of high and low molecular mass similarly observed in the SDS-PAGE, with highlight the detection of 128 and 32 kDa MBL forms. This results suggests a simple and low cost separation method for MBL in which it was possible to evaluate the profile of serum forms of this lectin in Hepatitis C patients. This is an important step for the understanding the structure/genotype of MBL in this pathology which could be associated to the response to treatment.

Keywords: MBL, HCV, SDS-PAGE, Western blot

1. INTRODUCTION

The immune innate response is a critical determinant of organism susceptibility to infection. This is particularly important when the adaptative immunity is immature or compromised (Holmskov et al., 1994; Turner, 1996). Mannan-binding lectin (MBL) is a important component of innate immunity. The MBL is a multimeric molecule which bind pathogens and activate the complement system antibody-independent. The protein binds sugar repetitive patterns, such as mannose and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) arranged in high density on surface of bacteria, yeast, protozoans, parasites and virus, but not the mammalian cells (Gadjeva et al., 2001). The MBL binding results in change conformation of structure activating specific molecules, such as serine-proteases associated (MASPs) and initiates the complement cascade (Petersen et al., 2001).

The MBL primary structure is a 96 kDa α -helical molecule, consisting of three 32 kDa collagens chains, each one showing a carbohydrate recognition domain (CRD). This structural unit is stabilized by disulfide linkages through cysteine-rich residues of N-terminal region. MBL is detected by its different molecular forms in circulation, including single structural units, dimers, trimers, tetramers and higher mass structures. The capacity of binding to sugars residues is highly dependent of oligomerization state in the serum, with the low molecular mass forms (dimers, trimers) showing the capacity of signal to the phagocytes the invader pathogen and enable phagocytosis process (Yokota et al., 1995). The high mass molecular forms has higher capacity to form complexes with MASPs and, therefore, activated the complement system, enhancing the inflammatory process (Minchinton et al, 2002; Garred et al., 2003).

The serum MBL levels, like its the functional activity has been linked to common genetic variants in the *MBL2* gene. Three polymorphisms in the exon 1 affects the collagen region of structure, give rise to allelic variants B, C and D (Lipscombe et al., 1996, Teillet et al., 2005).

While A means wild type allele, B, C and D letters are related with the structural mutations in codons 54, 57 and 52, respectively. These mutations lead the MBL production of aberrant forms. The protein with genetic alterations shows large difficult to bind to the specific oligossacharides and to associate the MASPs (Petersen et al., 2001). In addition the structural mutations, many polymorphisms has been described in the MBL2 promoter region (Madsen et al., 1995). This mutations corresponds to H/Y, X/Y and P/Q alleles in -550, -221 and +4 gene positions. The three loci are closely related and four promoter haplotypes (LXP, LYP, LYQ e HYP) are commonly found (Madsen et al., 1998; Turner, 2003).

In an attempt to elucidate the relation between levels, function and MBL genotype, many authors have used different kind of techniques. The most commom assay is ELISA. This assay is used for measure protein levels in serum employing specific antibodies. Mannan binding assay and C4 deposition assay has also been many used for evaluation of functional activity of MBL and complement activation *in vitro* (Holmskov et al., 1993, Minchinton et al., 2002, Garred et al., 2003, Dean et al., 2005). However, detection of variants molecular forms from people infected with infectious diseases hasn't been analyzed enough, there are some studies that correlate the functional characteristics of lectin with *MBL2* mutations in healthy individuals.

The present study aimed to propose a practical and low cost purification assay for MBL molecular forms characterization in HCV-infected individuals at the attempt to associate structure and lectin genotype. We wait contribute to important information for understanding of the MBL molecular profile in serum from hepatitis C patients, as correlate with treatment response.

2. MATERIALS E METHODS

Samples: Thirty HCV-positive patients serum samples (AA = 10; AO = 10; OO = 10) were used in the experiments. These patients to be part of the project “Response to hepatitis C treatment and capacity for fix mannose by mannan-binding lectin” developed in the Molecular Biology of Viruses Laboratory at the Pernambuco State University under approval of the ethic committee of the Oswaldo Cruz University Hospital (UPE/021/05 in 11/05/2005).

Dot N-man: This method was modified from the method described by Rogan et al (1991) and Romia et al (1992). Nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech.) were cut with paper puncher (disc forms) and put into holes of a microplate (Maxi Sorp, Nunc, Denmark). Mannan solution (300mg/mL; Sigma, St. Louis, USA) in tris-buffered saline solution (TBS)-Tween 20 (100mM, pH 7.4) was added to the membranes and allowed to dry at 25°C. After washes with TBS-Tween 20, membranes were incubated with albumin solution (50mg/mL; BSA, Sigma Chemical Co.) for 1h at 25°C. Six washes with TBS-Tween 20 were done and blood samples in TBS-Ca⁺⁺ (140 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.4), were incubated overnight at 4°C. Membranes were washed with TBS-Tween 20 and MBL elution was performed with a solution of NaCl (1M) or mannose (varying from 300mM to 600mM). Samples with the same genotype were pooled and lyophilized and stored at -20°C until use.

Dot-blot: MBL separated by Dot-N-man were immobilized onto nitrocellulose membranes in disc forms (as describe previously). After samples immobilization by air drying at 25°C, membranes were incubated with 0.1 mL of BSA (5%) for 1 hr. TBS-Tween 20 (0.05%) were used to wash the membranes (six times). Primary antibody (rabbit anti-MBL polyclonal

serum; AntibodyShop, Copenhagen, Denmark) was incubated for 16hs at 4° C followed by the secondary antibody (IgG anti-rabbit conjugated to peroxidase, Sigma, St. Louis, USA) for 1h at 25°C under gentle stirring. Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ (10mg + 1μL) were used to reveal the immunological reaction.

SDS-PAGE: Experiments were carried out according to Laemmli (1970). MBL samples were diluted (1:2) in sample buffer (Tris-HCl, pH 6.8; 20% glycerol; 4% SDS; 2% Bromophenol Blue, 5% beta-mercaptoethanol), warmed up to 100° C in water bath for 5 minutes and then applied and run on a discontinuous gels SDS-PAGE system with 4% stacking gel and 10% separating gel at 75 V and 40 mA. Sigma Molecular Weight Marker kit (St. Louis, USA) broad range (30-200 kDa) were used for size determination. Bands were visualized with Commassie solution or silver staining.

Western blot: Semi-dry Method used was described by Lissilour & Godinot (1990). SDS-PAGE MBL bands were transferred to nitrocellulose membranes. After that membranes were incubated with phosphate buffered saline solution (PBS; 0.01M, pH 7.2) supplemented with skimmed milk solution (5%) for 90 minutes at 25°C under gentle stirring. Three PBS-Tween 20 (0.05%) washes were developed for 10 minutes each. MBL was immune recognized with primary antibody, 1:100 (rabbit anti-MBL polyclonal serum; AntibodyShop, Copenhagen, Denmark) was incubated for 16 h at 4° C followed by the secondary antibody, 1:5000 (IgG anti-rabbit conjugated to peroxidase, Sigma, St. Louis, USA) for 1 h at 25°C. Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ (10mg + 1μL) were used to reveal the immunological reaction.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, a technique for MBL purification (Dot N-man) from total blood samples of HCV patients were carried out using mannan immobilization onto nitrocellulose membrane. MBL was then analyzed by dot-blot, SDS-PAGE and western blot regarding the molecule structure in the three genotypes (AA, AO and OO).

MBL separation yield was of 4 to 8% of the total blood sample (10 μ L at 0.2 g/mL). MBL specific recognition was detected and confirmed by immuno-reaction (Figure 1).

Electrophoretic profile of MBL molecular forms revealed differences among the three genotypes (AA, AO e OO). AA individuals presented high molecular forms (180 kDa) as well as molecular forms of 55-95 kDa (Figure 2A). Low molecular form band, 32 kDa related to the structural subunit of MBL, were not observed in our SDS-PAGE, except for one sample of AA (Figure 2A-4).

Three out of ten AO individuals presented a band profile similar to the wild genotype (Figure 2B-1,5,6), while one did not presented visible bands (Figure 2B-3). In OO mutant individuals bands of 55-66 kDa were observed but without the presence of higher molecular forms and also one related to the structural subunit. Recombinant MBL was presented as one band of 55 kDa (Figure 2B-4) which indicates that MBL molecules separated by Dot N-man could have undergone structural alterations.

AA individuals presented high molecular forms of 97-205, 214 and 270 kDa, where the last one is equivalent to the oligomer formed by three monomers of the lectin (Figure 3A). The structural unit of 88 kDa was absent in most of the individuals but in two samples (Figure 3A-2,6) where bands of 37 kDa and 25 kDa were observed.

In AO and OO individuals it was observed bands of 205, 66 and 55 kDa (Figure 3B).

Samples of AA presented bands of 66 kDa and 55 kDa but one also presented a 180 kDa band (Figure 4A). Bands of 25 kDa were also observed in SDS-PAGE under reduction conditions (Figura 4B).

Dean et al. (2005) related that despite numerous studies on the structure of MBL in human plasma, the relationship between the oligomeric structure of MBL expressed by individuals with coding variants, and its opsonisation ability and capacity to activate the complement cascade in humans has never been comprehensively investigated.

The bands visualized in our study is in accordance with Garred et al. (2003) e Lee et al. (2005). One of the most important point in MBL studies is the presence of many heterologomeric forms in the blood circulation which varies from dimers to hexamers. This oligomerization pattern can be more complex is the allelic variants were also taken account. Yokota et al. (1995) observed that in humans and rabbits trimers, tetramers and pentamers were the main forms and that the last two exhibit complement activation action.

Lipscombe et al. (1995) observed bands of MBL with molecular massa round 128 kDa that is not very common to this lectin. They considered them as anomalous monomeric forms probably with insertion of extra peptide chains in their structure. Garred et al. (2003) visualized bands of 50 and 75 kDa in SDS-PAGE assays. They suggested incomplete molecular forms for MBL.

AO individuals can exhibit three variants among them only the variant D (A/D) interfere in a minor oligomerization of MBL (Presanis, 2003). Pacientes HCV-positive have presented frequently the variant B (A/B) as the main one as reported by Matsushita et al. (1998a). In patients with this variant B high molecular forms have been detected but with also a high detection of monomeric forms. In our study it was observed a band disposition between what is observed for wild-type and homozigous individuals and heterozigous (A/O)

presenting bands of high molecular form found in heterozygous with variant C (A/C) as depicted by Dean et al. (2005).

The absence of high molecular forms in our OO individuals are not in accordance with the results presented by Garred et al. (2003) and Dean et al. (2005). Dean et al (2005) also reported that OO individuals present bands of 88 kDa revealing MBL monomers in the circulation. As well as bands of 30 kDa. In our study the non-visualization of the 30 kDa band can be explained to the low affinity ability of this molecular form to mannan. Sample elution used in the method applied in this study can be the cause of molecular form alterations as also observed by Dean et al. (2005).

Dumestre-Perard et al. (2002) questioned the possible relationship between structural polymorphism of MBL and its oligometization state. They also reported the difficulties to evaluate MBL profile based in the proteic content and genotyping. Lipscombe et al. (1995) reported that wildtype MBL presented a molecular mass of 500 kDa while mutant was characterized by molecular forms of 240-380 kDa.

Our results indicated that both, low and high molecular forms, were identified and that also varied with the genotyping for MBL. As described we visualized the incomplete forms of MBL. These variant forms can be related to the instability of the molecule and to the purification process as well as to the electrophoresis preparation. The detection of heteroligomeric forms of MBL in our study can be associated to the chronic condition of the patients (hepatic lesion and intense inflammatory activity) as observed by Dumestre-Perard (2002). Our results depicted the molecular forms of MBL in HCV patients contributing for the understanding the structure/genotype of MBL in this pathology which could be associated to the response to treatment.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank to Dr. Francisco Montenegro and Dra. Leila Beltrão from Oswaldo Cruz University Hospital for the kind donation of blood samples of HCV patients.

4. REFERENCES

- Benstein, B.D., Ourth, D.D., Crouse, D.T., Shanklin, D.R., 2004. Ureaplasma urealyticum binds mannose-binding lectin. *Experimental and Molecular Pathology*. 77: 138–144.
- Dahl, M.R.; Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A.C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J.C., 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15: 127–135.
- Dean, M. M., Heatley, S., Minchinton, R. M., 2005. Heteroligomeric forms of codon 54 mannose binding lectin (MBL) in circulation demonstrate reduced in vitro function. *Molecular Immunology*. 43 (7): 950-61.
- Dumestre-Perard, C., Ponard, D., Arlaud, G.J., Monnier, N., Sim, R.B., M.G. Colomb, M.G., 2002. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. *Molecular Immunology*. 39:465–473.
- Frederiksen, P.D, Thiel, S., Jensen, L., Hansen, A.G., Matthiesen, F., Jensenius, J.C., 2006. Quantification of mannan-binding lectin. *J Immunol Methods*. 315(1-2):49-60.
- Garred, P., Larsen, F., Madsen, H.O., Koch, C., 2003. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol. Immunol*. 40: 73–84.
- Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R., Madsen, H.O., 2006. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun*. 7(2):85-94.
- Holmskov, U., Jensenius, J. C., 1993. Structure and function of collectins: Humoral C-type lectins with collagenous regions. *Bernig. Inst. Mitt*. 3, 224-235.
- Kurata, H., Sannoh, T., Kozutsumi, Y., Yokota, Y., Kawasaki, T., 1994. Structure and function of mannan-binding proteins isolated from human liver and serum. *J Biochem (Tokyo)*. 115(6):1148-54.
- Laemmli, U.K., Favre, M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol*. 80: 575–599.
- Lee, S.G., Yum, J., Moon, S.H., Kim, M.H., Yang, J.Y., Kim, J.H., Yoon, L.Y., Lee, S., Song, K., 2005. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Mol. Immunol*. 42: 969–977.

- Lipscombe, R. J., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Turner, M. W., 1995. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 85: 660–667.
- Lissilour, S., Godinot, C., 1990. Influence of SDS and methanol on protein electrotransfer to Immobilon P membranes in semidry blot systems. *Biotechniques*. (4):397-8, 400-1.
- Madsen, H. O., Garred, P., Kurtzhals, J. A. L., Lamm, L. U., Ryder, L. P., Thiel, S., Svejgaard, A., 1994. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding lectin. *Immunogenet.* 40, 37–44.
- Madsen, H.O., Garred, P., Thiel, S., Kurtzhals, J.A.L., Lamm, L.U., Ryder, L.P., Svejgaard, A., 1995. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J. Immunol.* 155: 3013–3020.
- Madsen, H.O., Satz, M.L., Høgh, B., Svejgaard, A., Garred, P., 1998. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol.* 161: 3169–3175.
- Matsushita, M., Hijikata, M., Ohta, Y., 1998a. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene *MBL*. *Arch. Virol.* 143: 645–651.
- Minchinton, R.M., Dean, M.M., Clark, T.R., Heatley, S., Mullighan, C.G., 2002. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol.* 56 (6): 630-41.
- Petersen, S.V., Thiel, S., Jensenius, J.C., 2001. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol. Immunol.* 38, 133.
- Presanis, J. S, Kojima, M., Sim, R.B., 2003. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society Transactions*; Vol 31, part 4.
- Roos, A., Garred, P., Wildenberg, M. E., Lynch, N. J., Munoz, J. R., Zuiverloon, T. C., Bouwman, L. H., Schlagwein, N., Fallaux van den Houten, F.C., Faber-Krol, M. C., Madsen, H.O., Schwaible, W.J., Matsushita, M., Fujita, T., Daha, M. R., 2004. Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose binding lectin deficiency. *Eur. J. Immunol.* 34: 2589–2598.
- Teillet, F., Dublet, B., Andrieu, J.P., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., 2005. The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: chemical characterization, carbohydratebinding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases. *J. Immunol.* 174, 2870.
- Terai, I., Kobayashi, K., Matsushita, M., Miyakawa, H., Mafune, N., Kikuta, H., 2003. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur. J. Immunol.* 33: 2755–2763.
- Thiel, S., Møller-Kristensen, M., Jensen, L., Jensenius J.C., 2002. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Immunobiology.* 205(4-5):446-54.

Thiel, S., Frederiksen, P.D., Jensenius, J.C., 2006. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol. Immunol.* 43, 86.

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

Valdimarsson, H, Stefansson, M, Vikingsdottir, T, Arason, G.J, Koch, C, Thiel, S; *et al.*, 1998. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand J Immunol.* 48: 116–23.

Yokota, Y., Arai, T., Kawasaki, T., 1995. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 117: 414–419.

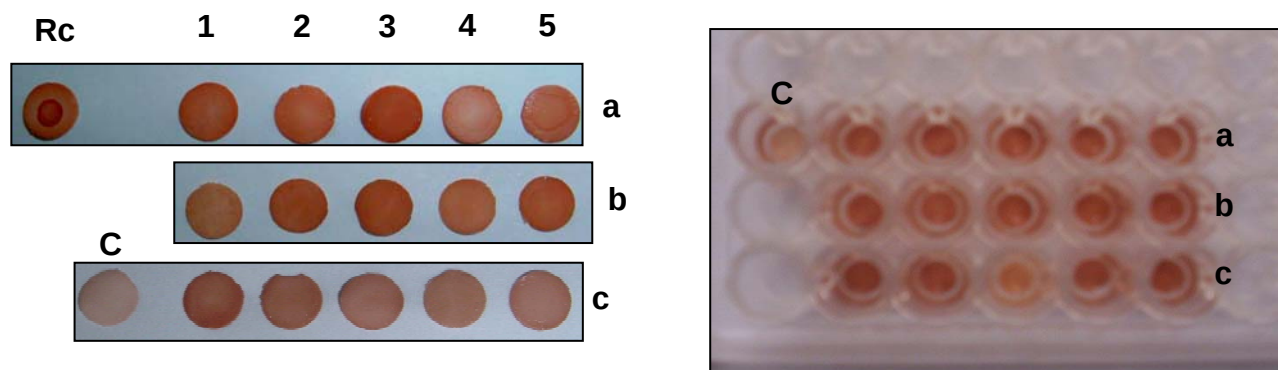


Figure 1. Immune recognition by dot blot assay on nitrocellulose using anti-MBL polyclonal antibody. In all samples were visualized brown color development. The letters **a**, **b** and **c** is related to AA, AO and OO hepatitis C patients respectively. The negative control is designed as **C**. MBL recombinant has been used as positive control and designed as **Rc**.

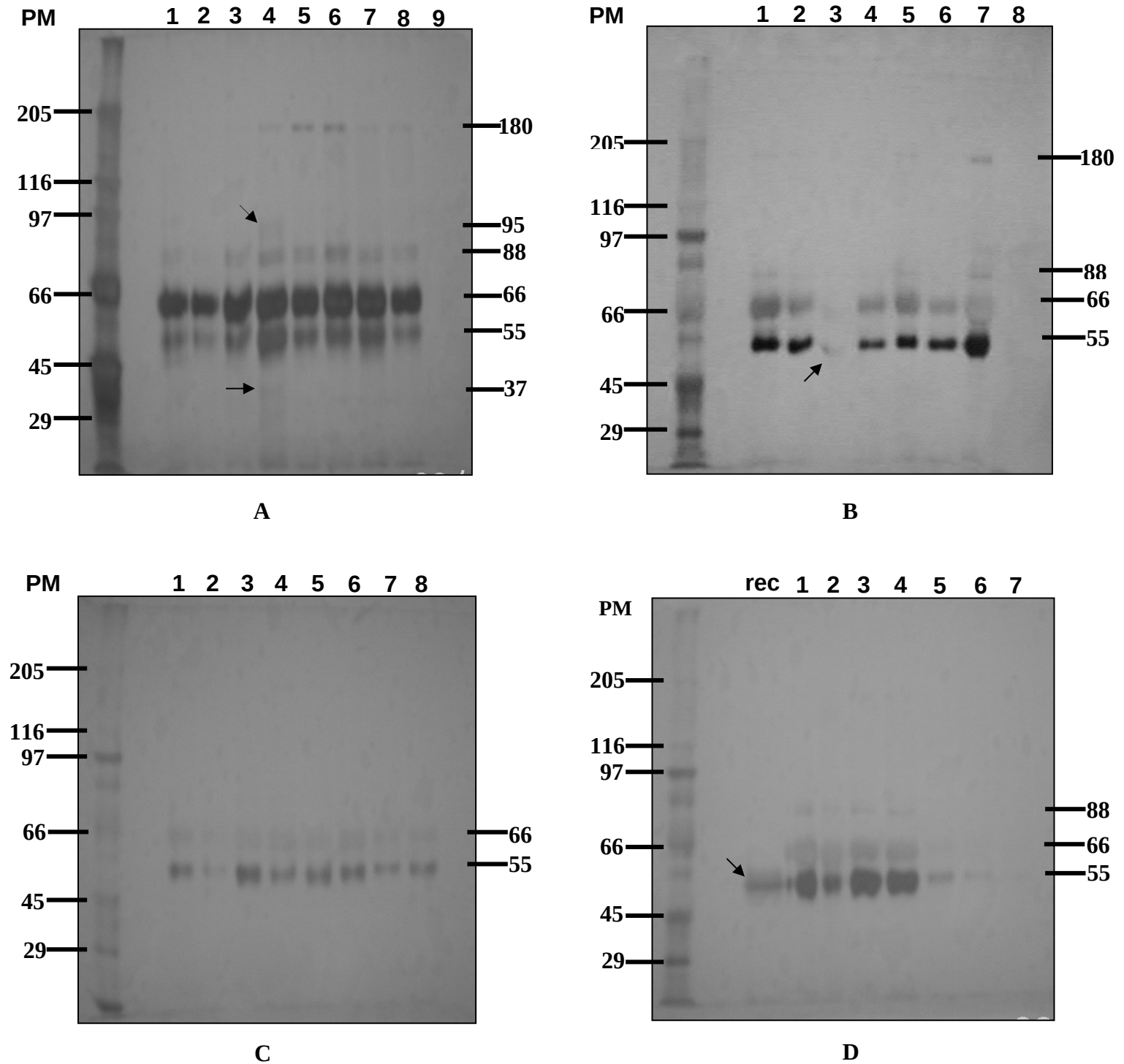


Figure 2. MBL molecular mass identified by reducing SDS-PAGE. **(A)** Individuals with AA genotype where more intense bands were visualized. Arrows show the 37 and 95 kDa bands, corresponding monomeric and dimeric forms variations. **(B)** Individuals with AO genotype reveals few high molecular mass forms, with bands almost undetectable at the sample nº 3. **(C)** Individuals with OO genotype. **(D)** A 55 kDa band of MBL recombinant was visualized (rec).

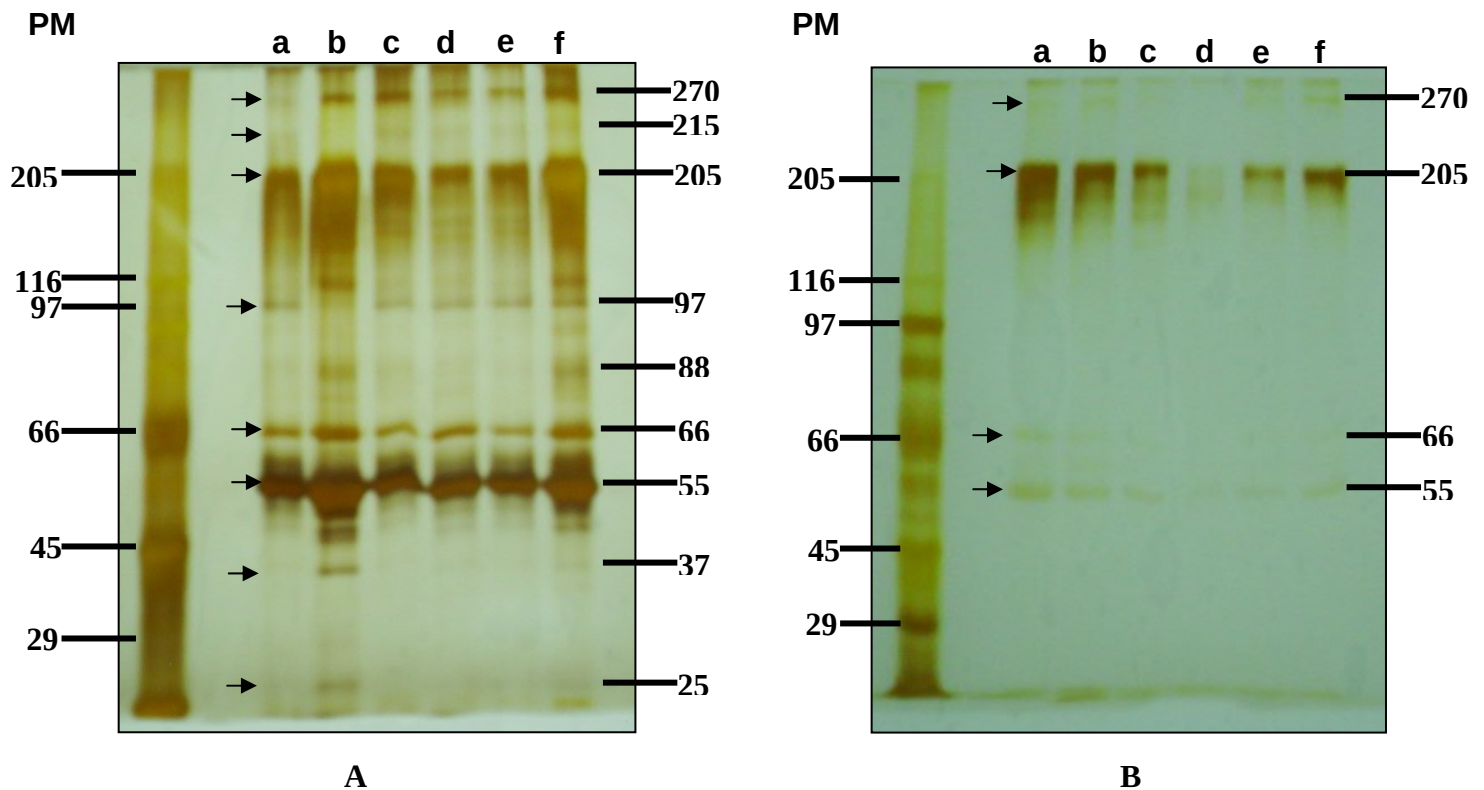


Figure 3. Molecular forms of MBL identified by non-reducing SDS-PAGE. **(A)** AA samples with presence of a high range of molecular mass. A 25 kDa band also was observed at the number 2. **(B)** A0 (1,2,3) and 00 (4,5,6) samples. It was observed bands with less intensity, but for all A0 and 00 samples were detected high molecular bands.

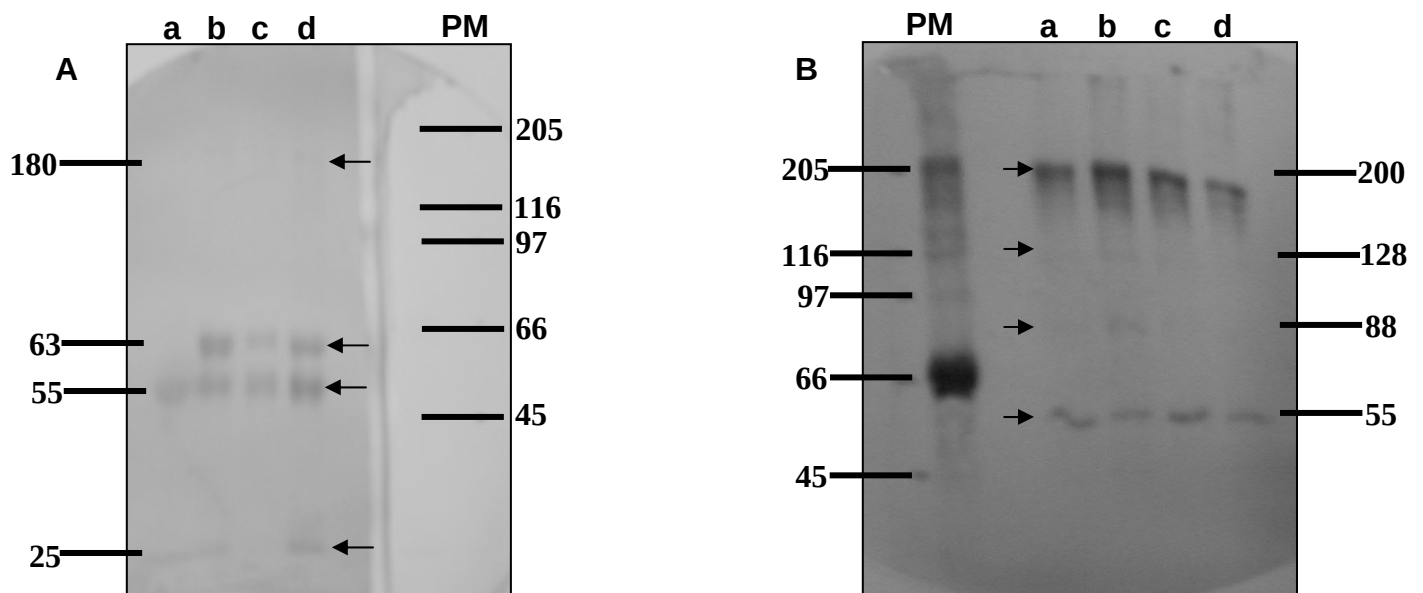


Figure 4. Molecular forms of MBL identified by antibody immune recognition. **(A)** SDS-PAGE under reducing conditions and detected by immunoblot of wild-type (AA) samples after purification assay. It was visualized a weak band of 25 kDa. **(B)** Non-reducing SDS-PAGE and immunoblot of wild-type AA samples after purification assay. Less intense staining of the 128, 88 and 55 kDa weak bands were observed. High molecular mass forms were well defined in the range of 200 kDa.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- O ensaio estabelecido em nosso estudo (dot-N-man) teve êxito na detecção da lectina ligadora de manose no soro de pacientes com hepatite C.
- Além de propormos uma técnica de ligação a manana mais simples e com maior praticidade, conseguimos visualizar a presença de formas de baixa massa molecular da MBL através do reconhecimento por anticorpos específicos, evidenciando principalmente as estruturas anômalas da lectina.
- A caracterização estrutural em relação aos genótipos (AA, AO e OO) mostraram resultados consistentes, com variações pronunciadas entre os indivíduos com o gene selvagem e os que apresentaram o gene mutante, com a observação de um perfil molecular característico em cada genótipo.
- As estruturas diméricas e triméricas da MBL foram as formas mais comumente observadas nos diferentes genótipos, em alguns casos com a presença das formas monoméricas e subunidades estruturais presentes.
- Apesar de selecionarmos uma pequena amostragem com distribuição similar para cada genótipo, pudemos sugerir que a determinação desse perfil molecular, com formas de alta massa molecular presentes, podem está associadas à fase crônica da hepatite C, na qual a maioria dos pacientes se encontram.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aittoniemi, J.; Miettinen, A.; Laippala, P.; Isolauri, E.; Viikari, J.; Ruuska, T.; Soppi, E., 1996. Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr.* 85 (8): 906-9.
- Aittoniemi, J.; Rintala, E.; Miettinen, A.; Soppi, E., 1997. Serum mannan binding lectin (MBL) in patients with infection: clinical and laboratory correlates. *Act. Path. Micro. et Immunol. Scand.* 105, 617–622.
- Alberti, A., Chemello, L., Benvegna, L., 1999. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 31(Suppl 1):17–24.
- Bonar, A.; Chmiela, M.; Rozalska, B., 2004. Level of mannose-binding lectin (MBL) in patients with tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol.* 72 (5-6): 201-5.
- Bordet J.; Streng, O., 1906. Les ph'énom'enes d'absorption de la congulin du serum de boeuf. *Ann. Inst. Pasteur.* 49:260–76.
- Bowden, S., 2001. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol.* 16:124–31.
- Brass, V., Moradpour, D., Blum, H.E., 2006. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): update. *Int J Med Sci.* 3:29–34.
- Brown, K.S, Keogh, M.J, Tagiuri, N, Grainge, M.J, Presanis, J.S, Ryder, S.D, et al., 2007. Severe fibrosis in hepatitis C virus infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding-lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex. *Clin Exp Immunol.* 147: 90–8.
- Chen, S.L, Morgan, T.R., 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 3:47–52.
- Chong, W.P, To, Y.F, Ip, W.K, Yuen, M.F, Poon, T.P, Wong, W.H, et al., 2005. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 42:1037–45.
- Crosdale, D.J.; Ollier, W.E.R.; Thomson, W.; Dyer, P.A.; Jensenius, J.C.; Johnson, R.W.G.; Poulton, K.V., 2000. Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Eur. J. Immunogenet.* 27: 111–117.
- Crouch, E.; Hartshorn, K.; Ofek, I., 2000. Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol. Rev.* 173:52–65.
- Crouch, E.; Wright, J.R., 2001. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 52: 1–554.

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

Dean, M. M.; Heatley, S.; Minchinton, R. M., 2005. Heteroligomeric forms of codon 54 mannose binding lectin (MBL) in circulation demonstrate reduced in vitro function. *Molecular Immunology*. 43 (7): 950-61.

De Miranda Santos, I.K.F.; Costa, C.H.N.; Krieger, H.; Feitosa, M.F.; Zurakowski, D.; Fardin, B.; Gomes, R.B.B.; Weiner, D.L.; Harn, D.A.; Ezekowitz, R.A.B.; Epstein, J.E., 2001. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 69: 5212-5215.

Dempsey, P.W.; Allison, M.E.D.; Akkaraju, S.; Goodnow, C.C.; Fearon, D.T., 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 271, 348–350.

Drickamer, K., 1989. Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif. *Biochem Soc Trans.* 17(1):13-5.

Drickamer, K., 1992. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 360: 183–186.

Dumestre-Perard, C.; Ponard, D.; Drouet, C.; Leroy, V.; Zarski, J.-P.; Dutertre, N.; Colomb, M.G., 2002 a. Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 127:131–136.

Dumestre-Perard, C.; Ponard, D.; Arlaud, G.J.; Monnier, N.; Sim, R.B.; M.G. Colomb, M.G., 2002 b. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. *Molecular Immunology*. 39:465–473.

Ezekowitz, R.A.; Day, L.E.; Herman, G.A., 1988. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med.* 167:1034–46.

Gadjeva, M.; Thiel, S.; Jensenius, J.C., 2001. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 13(1):74-8.

Gadjeva, M., Paludan, S.R., Thiel, S., Slavov, V., Ruseva, M., Eriksson, K., et al., 2004. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin Exp Immunol.* 138:304–11.

Gales, M. J.; Korth, M. J.; Tang, N. M., 1997. Evidence that hepatitis C resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non structural 5A protein. *Virology*, 230:217-27.

Garred, P.; Madsen, H.O.; Kurtzhals, J.A.; Lamm, L.U.; Thiel, S.; Hey, A.S.; Svejgaard, A., 1992. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. *Eur J Immunogenet.* 19(6):403-12.

- Garred, P.; Harboe, M.; Oettinger, T.; Koch, C.; Svejgaard, A., 1994. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet.* 21(2):125-31.
- Garred, P.; Pressler, T.; Madsen, H.O; Frederiksen, B.; Svejgaard, A.; Hoiby, N.; *et al.*, 1999. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 104: 431-7.
- Garred, P.; Larsen, F.; Madsen, H.O.; Koch, C., 2003. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol. Immunol.* 40: 73-84.
- Ghiran, I.; Barbashov, S. F.; Klickstein, L.B.; Tas, S.W.; Jensenius, J.C.; Nicholson-Weller A., 2000. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med.* 192:1797-808.
- Goffard, A., Dubuisson, J., 2003. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie.* 85:295-301.
- Graudal, N.A.; Homann, C.; Madsen, H.O; Svejgaard, A.; Jurik, A.G; Graudal, H.K. *et al.*, 1998. Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *J Rheumatol.* 25: 629-35.
- Hakansson, K; Reid, K.B., 2000. Collectin structure: a review. *Protein Science.* 9:1607-17.
- Hartshorn, K.L; Sastry, K; White, M.R; Anders, E.M; Super, M; Ezekowitz, R.A; Tauber, A.I., 1993. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest.* 91(4):1414-20.
- Holmskov, U., Jensenius, J. C., 1993. Structure and function of collectins: Humoral C-type lectins with collagenous regions. *Bernig. Inst. Mitt.* 3, 224-235.
- Holmskov, U; Malhotra, R.; Sim, R.B.; Jensenius, J.C., 1994. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today.* 15(2):67-74.
- Holmskov, U; Thiel, S; Jensenius, J.C., 2003. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*; 21: 547-78.
- Iobst, S.T; Wormald, M.R; Weis, W.I; Dwek, R.A; Drickamer, K., 1994. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *J Biol Chem.* 3; 269 (22):15505-11.
- Jack, D.L.; Klein, N.J.; Turner, M.W.; 2001. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol. Rev.* 180: 86-99.
- Ji X, Gewurz, H, Spear, G.T., 2005. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol.* 42:145-52.
- Ji X, Olinger, G.G, Aris, S, Chen, Y, Gewurz, H, Spear, G.T., 2005. Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization. *J Gen Virol.* 86:2535-42.

- Kase, T.; Suzuki, Y.; Kawai, T.; Sakamoto, T.; Ohtani, K.; Eda, S.; Maeda, A.; Okuno, Y.; Kurimura, T.; Wakamiya, N., 1999. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology*, 97: 385-392.
- Kawasaki, T.; Etoh, R.; Yamashina, I., 1978. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 81(3):1018-24.
- Kawasaki, T.; Mizuno, Y.; Masuda, T.; Yamashina, I., 1980. Mannan-binding protein in lymphoid tissues of rats. *J Biochem (Tokyo)*. 88 (6):1891-4.
- Kawasaki, T., Kawasaki, N., Yamashina, I., 1989. Mannose/N-acetylglucosamine-binding proteins from mammalian sera. *Methods Enzymol.* 179:310-21.
- Keil, W.; Geyer, R.; Dabrowski, J.; Dabrowski, U.; Niemann, H.; Stirm, S.; Klenk, H. D., 1985. Carbohydrates of influenza virus. Structural elucidation of the individual glycans of the FPV hemagglutinin by two-dimensional ¹H NMR and methylation analysis. *EMBO J.* 4: 2711-2720.
- Kilpatrick, D.C.; Bevan, B.H.; Liston, W.A., 1995. Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.*, 1 Hum. Reprod. 10: 2501-2505.
- Kilpatrick, D.C.; Liston, W.A.; Midgley, P.C., 1997. Mannan binding protein in human umbilical cord blood. *Natural Immunity*. 15: 234-240.
- Kilpatrick, D.C., 2002. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta.* 1572(2-3):401-13.
- Kilpatrick, D.C., Delahooke, T.E.S., Koch, C., Turner, M.L., Hayes, P.C., 2003. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. *Clin Exp Immunol*; 132: 92-95.
- Kyogashima, M, Krivan, H.C, Schweinle, J.E, Ginsburg, V., Holt, G.D. Glycosphingolipid-binding specificity of the mannose-binding protein from human sera. *Arch Biochem Biophys.* 283(1):217-22.
- Koch, A.; Melbye, M.; Sorensen, P.; Homoe, P.; Madsen, H. O.; Molbak, K.; Hansen, C. H., Andersen, L. H.; Hahn, G. W.; Garred, P., 2001. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 285:1316-1321.
- Kozutsumi, Y.; Kawasaki, T.; Yamashina, I., 1980. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 95(2):658-64.
- Kruse, C.; Rosgaard, A.; Steffensen, R.; Varming, K.; Jensenius, J.C; Christiansen, O.B., 2002. Low serum level of mannan-binding lectin is a determinant for pregnancy outcome in women with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *In press*.
- Kuhlman, M.F.; Joiner, K.F.; Ezekowitz, R.A., 1989. The human mannose binding protein functions as an opsonin. *J. Exp. Med.* 169: 1733-1745.

Kuipers, S.; Aerts, P.C.; van Dijk, H., 2003. Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* May 15; 36.

Laemmli, U.K., Favre, M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80: 575–599.

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

Laursen, I. 2003. Mannan-binding lectin (MBL) production from human plasma. *Biochemical Society Transactions.* 31: part 4.

Lee, S.G.; Yum, J.; Moon, S.H.; Kim, M.H.; Yang, J.Y.; Kim, J.H.; Yoon, L.Y.; Lee, S.; Song, K., 2005. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Mol. Immunol.* 42: 969–977.

Leon, M.A.; Yokohari, R., 1964. Conglutination: specific inhibition by carbohydrates. *Science* 143:1327–28.

Lipscombe, R. J.; Sumiya, M.; Hill, A. V.; Lau, Y. L.; Levinsky, R. J.; Summerfield, J. A.; Turner, M. W., 1992. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum. Mol. Genet.* 1: 709–715.

Lipscombe, R. J.; Sumiya, M.; Summerfield, J. A.; Turner, M. W., 1995. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 85: 660–667.

Madsen, H. O.; Garred, P.; Kurtzhals, J. A. L.; Lamm, L. U.; Ryder, L. P.; Thiel, S.; Svejgaard, A., 1994. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding lectin. *Immunogenet.* 40, 37–44.

Madsen, H.O.; Garred, P.; Thiel, S.; Kurtzhals, J.A.L.; Lamm, L.U.; Ryder, L.P.; Svejgaard, A., 1995. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J. Immunol.* 155: 3013–3020.

Madsen, H.O.; Satz, M.L.; Høgh, B.; Svejgaard, A.; Garred, P., 1998. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol.* 161: 3169–3175.

Malhotra, R.; Sim, R.B.; Reid, K.B., 1990. Interaction of C1q, and other proteins containing collagen-like domains, with the C1q receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 1145–1148.

Malhotra, R.; Sim, R.B., 1995. Collectins and viral infections. *Trends Microbiol.* 3: 240–244.

Matsushita, M.; Fujita, T., 1992. Activation of the classical component pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med.* 176:1497-502.

- Matsushita, M.; Ezekowitz, R.A.; Fujita, T., 1995. The Gly-54--Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. *Biochem. J.* 311: 1021–1023.
- Matsushita, M., Hijikata, M., Ohta, Y., 1998a. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene *MBL*. *Arch. Virol.* 143: 645–651.
- Matsushita, M., Hijikata, M., Matsushita, M., Ohta, Y., Mishiro, S., 1998b. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C infection in Japanese patients. *J Hepatol*; 29: 695–700.
- Matsushita, M.; Thiel, S.; Jensenius, J.C.; Terai, I.; Fujita, T., 2000. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J. Immunol.* 165: 2637–2642.
- Matsushita, M.; Fujita, T.; Daha, M. R., 2004. Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose binding lectin deficiency. *Eur. J. Immunol.* 34: 2589–2598.
- Medzhitov, R.; Janeway, Jr. C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 296: 298–300.
- Michielsen, P.P; Francque, S.M; van Dongen, J.L., 2005. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol.* 3:27.
- Miller, M.E.; Seals, J.; Kaye, R.; Levitsky, L.C., 1968. A familial, plasma-associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection. *Lancet* 2: 60–63.
- Minchinton, R.M.; Dean, M.M.; Clark, T.R.; Heatley, S.; Mullighan, C.G., 2002. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol.* 56 (6): 630-41.
- Mizuno, Y.; Kozutsumi, Y.; Kawasaki, T.; Yamashina, I., 1981. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rat liver. *J Biol Chem.* 10; 256 (9): 4247-52.
- Mogues, T.; Ota, T.; Tauber, A.I.; Sastry, K.N., 1996. Characterization of two mannose-binding protein cDNAs from rhesus monkey (*Macaca mulatta*), structure and evolutionary implications. *Glycobiology.* 6:543–550.
- Mullighan, C.G; Heatley, S; Doherty, K; Szabo, F; Grigg, A; Hughes, T.P; *et al.*, 2002. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 99: 3524–9.
- Neuberger, J., Davis, M., Williams, R., 1980. Long-term ingestion of paracetamol and liver disease. *J Roy Soc Med.* 73:701–7. (HCV): 2006 update.
- Ng, K.K.; Drickamer, K.; Weis, W.I., 1996. Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271: 663 –674.
- Nuytinck, L.; Shapiro, F., 2004. Mannose-binding lectin: laying the stepping stones from clinical research to personalized medicine. *Pers. Med.* 1, 35.

Obermayer-Straub, P., Strassburg, C.P, Manns, M.P., 2000. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 32:181–97.

Ochsenbein, A.F.; Zinkernagel, R.M., 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology Today.* 21: 624–630.

Ogden, C.A.; de Cathelineau, A.; Hoffmann, P.R.; Bratton, D.; Ghebrehiwet, B.; Fadok, V.A.; Henson, P.M., 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 194 (6):781-95.

Petersen, S.V.; Thiel, S.; Jensenius, J.C., 2001. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol. Immunol.* 38, 133.

Peterslund, N.A; Koch, C.; Jensenius, J.C; Thiel, S., 2001. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet.* 358(9282):598-9.

Presanis, J. S; Kojima, M.; Sim, R.B., 2003. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society Transactions*; Vol 31, part 4.

Purcell, R.H., 1994. Hepatitis viruses: changing patterns of human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2401–6.

Reid, K.B., 1989. Chemistry and molecular genetics of C1q. *Behring Inst Mitt.* 84: 8–19.

Reading, P. C.; Hartley, C. A.; Ezekowitz, R. A. B.; Anders, E. M., 1995. A serum mannose-binding lectin mediates complement-dependent lysis of influenza virus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 1128 –1136.

Robertson, B.; Myers, G.; Howards, C., 1998. Classification, nomenclature and development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization.international committee on virus taxonomy [news]. *Archive of Virology.* 143: 2493-2503.

Robinson, D.; Phillips, N.C.; Winchester, B., 1975. Affinity chromatography of human liver alpha-D-mannosidase. *FEBS Lett.* 53(1):110-2.

Roos, A.; Garred, P.; Wildenberg, M. E.; Lynch, N. J.; Munoz, J. R.; Zuiverloon, T. C.; Bouwman, L. H.; Schlagwein, N.; Fallaux van den Houten, F.C.; Faber-Krol, M. C.; Madsen, H.O.; Schwaeble, W.J.; Matsushita, M.; Fujita, T.; Daha, M. R., 2004. Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose binding lectin deficiency. *Eur. J. Immunol.* 34: 2589–2598.

Saevarsdottir, S.; Vikingsdottir, T.; Valdimarsson, H., 2004. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand J Immunol.* 60(1-2):23-9.

Saifuddin, M.; Hart, M.L; Gewurz, H.; Zhang, Y; Spear, G.T., 2000. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* 81(Pt 4):949-55.

- Sasaki, K., Tsutsumi, A., Wakamiya, N., 2000. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol*; 35:960–5.
- Sastry, K.; Herman, G.A.; Day, L.; Deignan, E.; Bruns, G.; Morton, C.C.; Ezekowitz R. A., 1989. The human mannose-binding protein gene. *J. Exp. Med.* 170:1175.
- Sastry, K, Zahedi, K, Lelias, J.M, Whitehead, A.S, Ezekowitz, R.A., 1991. Molecular characterization of the mouse mannose-binding proteins. The mannose-binding protein A but not C is an acute phase reactant. *J Immunol.* 147(2):692-7.
- Selander, B., Martensson, U., Weintraub, A., Holmstrom, E., Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C, Truedsson, L, Sjoholm, A.G., 2006. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest.* 116(5):1425-34.
- Shepard, C.W, Finelli, L, Alter, M.J., 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 5:558–67.
- Sim, R. B.; Arlaud, G. J; Colomb, M. G., 1979. C1 inhibitor-dependent dissociation of human complement component C1 bound to immune complexes. *Biochem J*, 179: 449-57.
- Simmonds P., 1997. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. *Gut.* 40:291–3.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N, Feinstone, S, et al., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 42:962–73.
- Soothill, J. F.; Harvey, B. A. 1976. Defective opsonization. A common immunity deficiency. *Arch Dis. Child.* 51(2): 91-9.
- Summerfield, J. A.; Ryder, S.; Sumiya, M.; Thursz, M.; Gorchein, A.; Monteil, M. A.; Turner, M. W., 1995. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 345: 886–889.
- Summerfield, J.A.; Sumiya, M.; Levin, M.; Turner, M. W., 1997. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 314: 1229–1232.
- Sumiya, M.; Super, M.; Tabona, P.; Levinsky, R. J.; Arai, T.; Turner, M. W.; Summerfield, J. A., 1991. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337: 1569–1570.
- Super, M.; Thiel, S.; Lu, J.; Levinsky, R. J.; Turner, M. W., 1989. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet.* 25; 2: 1236-9.
- Super, M.; Gillies, S. D.; Foley, S.; Sastry, K.; Scweinle, J. E.; Silverman, V. J.; Ezekowitz, R.A., 1992. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. *Nat. Genet.* 2: 50–55.
- Sy, T., Jamal, M.M., 2006. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 3:41–6.

Tan, S.M, Chung, M.C, Kon, O.L, Thiel, S., Lee, S.H, Lu, J., 1996. Improvements on the purification of mannan-binding lectin and demonstration of its $\text{Ca}(2+)$ -independent association with a C1s-like serine protease. *Biochem J.* 319 (Pt 2):329-32.

Teillet, F.; Dublet, B.; Andrieu, J.P.; Gaboriaud, C.; Arlaud, G.J.; Thielens, N.M., 2005. The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: chemical characterization, carbohydratebinding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases. *J. Immunol.* 174, 2870.

Tenner, A.J.; Robinson, S.L.; Ezekowitz, R.A., 1995. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. *Immunity.* 3:485–93.

Terai, I.; Kobayashi, K., 1993. Perinatal changes in serum mannose-binding protein (MBP) levels. *Immunol. Lett.* 38: 185– 187.

Terai, I.; Kobayashi, K.; Fujita, T.; Hagiwara, K., 1993. 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.* 50: 111–119.

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

Thiel, S; Holmskov, U; Hviid, L; Laursen, S.B; Jensenius, J.C., 1992. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol.* 90: 31–5.

Thiel, S.; Bjerke, T.; Hansen, D.; Poulsen, L.K.; Schiotz, P.O.; Jensenius, J.C., 1995. Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system. *Pediatr. Allergy Immunol.* 6, 20– 23.

Thiel, S., Moller-Kristensen, M., Jensen, L., Jensenius J.C., 2002. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Immunobiology.* 205(4-5):446-54.

Thiel, S., Frederiksen, P.D., Jensenius, J.C., 2006. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol. Immunol.* 43, 86.

Thomas, H.C; Lemon, S; Zuckerman, A.J, 2005. Viral hepatitis. Blackwell Publishing.

Thomson, B.J, Finch, R.G., 2005. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 11:86–94.

Turner M. W., 1991. Deficiency of mannan binding protein -- a new complement deficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol. Suppl.* 1: 53-6.

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

- Turner, M.W., 1998. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology*. 199(2):327-39.
- Turner, M. W., 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol.* 40: 423–429.
- Valdimarsson, H; Stefansson, M; Vikingsdottir, T; Arason, G.J; Koch, C; Thiel, S; *et al.*, 1998. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand J Immunol.* 48: 116–23.
- van de Wetering, J. K.; van Golde, L. M. G.; Batenburg, J. J, 2004. Collectins. Players of the innate immune system. *Eur. J. Biochem.* 271: 1229-1249.
- Yokota, Y.; Arai, T.; Kawasaki, T., 1995. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 117: 414–419.
- Yuen, M-F., Lau, C-S., Lau, Y-L., Wong, W-M., Cheng, C-C., Lai, C-L., 1999. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. *Hepatology*; 29:1248–51.
- Wallis, R., 2002. Dominant effects of mutations in the collagenous domain of mannose-binding protein. *J. Immunol.* 168: 4553–4558.
- Wallis, R.; Dodd., R. B., 2000. Interaction of mannose-binding protein with associated-serine proteases: effects of naturally occurring mutations. *J. Biol. Chem.* 275:30962.
- Walsh, K., Alexander, G., 2000. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J.* 76:280–6.
- Wild, J.; Robinson, D.; Winchester, B., 1983. Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver. *Biochem J.* 210(1):167-74.
- Williams R., 1996. Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 1996;16:343–8.
- Worthley, D. L.; Bardy, P. G.; Mullighan, C. G., 2005. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern. Med. J.* 35: 548.

8. ANEXOS

Resumos apresentados em congressos:

VIII Reunião Regional Nordeste da SBBq/ 3rd International Symposium in Biochemistry and Biotechnology. Hotel Praiamar, Natal, RN, 6 a 8 de Dezembro de 2006

CHARACTERIZATION OF MANNAN-BINDING LECTIN MOLECULAR PROFILE IN HEPATITIS C PATIENTS

**Albuquerque, D. A.^{1,2,3}, Moura, P.M.³; Beltrão, E.I.C.^{1,2};
Cavalcanti, I.T.^{1,2}**

¹ Depto. Bioquímica, CCB, UFPE, Brazil; ² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA – UFPE, Brazil; ³ Dept. Patologia, ICB - UPE, Brazil.

Mannan-binding lectin is a plasma glycoprotein member of the collectin family, a group of proteins characterized by interaction with more than one specific sugar residues expressed on many microbial surfaces. MBL gene polymorphism has been linked to decreased levels of MBL expression and/or different numerous oligomeric forms. This work aimed to evaluate the molecular profile of MBL in serum of 30 hepatitis C virus (HCV) patients from the Oswaldo Cruz University Hospital (HUOC - UPE) using lectin purification assay in microplates, dot-blot assay and reducing SDS-PAGE. All serum MBL purified samples were recognized by antibody anti-MBL (HYB-131) and individuals with AA/AO genotype for MBL showed mainly a band of 88 kDa. Some dimer forms (above 150 kDa) were also visualized. All individuals with OO genotype were characterized by a low weight band of 30 kDa besides a 88 kDa band. Results suggest a simple and low cost separation method for MBL in which it was possible to evaluate the profile of serum monomers forms of this lectin in HCV patients. This is an important step for the understanding of the structure/genotype of MBL in this pathology which would be associated to the treatment response.

Supported by: **CNPq**.

Key words: MBL, HCV, genotype, dot-blot.

10th IUBMB Conference & 36th Annual Meeting of SBBq - Salvador, Bahia, Brazil - 21-25 May 2007.

RELATIONSHIP BETWEEN MBL2 POLYMORPHISM AND THE MOLECULAR MASS PATTERN OF CIRCULATING MANNOSE-BINDING LECTIN IN SERA OF HCV INFECTED PATIENTS

Cavalcanti, I.T.^{1,2}, Albuquerque, D. A.^{1,2,3}, Moura, P.M.³; Beltrão, E.I.C.^{1,2}.

1 - Depto. Bioquímica, CCB, UFPE, Brazil; 2 - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA – UFPE, Brazil; 3 - Dept. Patologia, ICB - UPE, Brazil.

Mannose-binding lectin (MBL) is a C-type lectin that activates the complement system and its function seems to depend to the degree of oligomerization of final molecule. A deficiency in MBL due to mutations at exon 1 of the human MBL2 gene causes low levels of protein and vulnerability to infection. We studied sera from HCV patients of known MBL genotype and assessed the MBL using mannan immobilized to nitrocellulose membrane and through elution by mannose. The observed patterns using a reducing electrophoresis and immunoblot with a rabbit polyclonal antibody revealed a range of high-molecular-mass form thru lower-molecular-mass form related to the genotypes. Wild type (A/A) showed bands of 32, 55, 66, 95 and 180 KDa; a homozygous mutation (00) showed predominantly bands of 55 e 66 and a heterozygote (A/0) showed an intermediary pattern tending to lower-molecular-mass. An apparent MBL deficiency does not in fact represents deficiency in MBL molecules but rather the presence of circulating oligomeric MBL with impaired function.

Key words: MBL, oligomers, molecular mass

Supported by: CNPq