

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE HUMANO DA
MBL E SUA ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÕES POR
*Chlamydia trachomatis***

Fernanda Lourenço Alves

**Belo Horizonte
2010**

Fernanda Lourenço Alves

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE HUMANO DA
MBL E SUA ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÕES POR
*Chlamydia trachomatis***

**Trabalho apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
como exigência para obtenção do título de
Especialista em Microbiologia.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Fátima Soares Motta Noronha

Co-orientadora: Dra. Haleta Evangelista de Lima Lemos

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2010**

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre fiel e justo. Aos meus pais, e a vovó Lília, pelo amor e incentivo. Aos familiares e amigos. Ao meu querido Dé, pelo apoio e carinho.

Às minhas orientadoras, Professora Fátima Soares Motta Noronha e Pós-doutora Haleta Evangelista de Lima Lemos, por toda sua dedicação, pois tornaram possível a realização deste trabalho.

A todos aqueles profissionais do Centro de Treinamento em DST da Policlínica Centro-Sul da Secretaria Municipal de Saúde/Prefeitura Municipal de Belo Horizonte que vem contribuindo de forma significativa para o estudo das infecções por *Chlamydia trachomatis* em nossa região.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a construção desta monografia.

RESUMO

A família Chlamydiaceae é composta por bactérias intracelulares obrigatórias que parasitam células eucarióticas. *Chlamydia trachomatis* é um patógeno estritamente humano, sendo a principal espécie bacteriana transmitida por via sexual. Em mulheres pode causar uretrites, cervicites, doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e linfogranuloma venéreo. A lectina ligadora de manose (MBL), componente do sistema do complemento, é uma proteína chave do sistema imune inato, atuando na primeira linha de defesa contra os patógenos. A MBL possui a função de opsonina, ligando-se a carboidratos ricos em manose, fucose e glucosamina, encontrados na superfície celular de diversos micro-organismos. A MBL ligada a componentes glicoprotéicos na superfície celular de *C. trachomatis* são importantes na defesa do hospedeiro, pois inibem a ligação da bactéria às células alvo. O gene da MBL (*mbi2*) está localizado no cromossomo 10 e possui três polimorfismos funcionais, localizados no éxon 1. Estes pontos de mutação são conhecidos como variantes B, C e D, e o variante A corresponde ao tipo selvagem. A caracterização do perfil genético da MBL em pacientes com doenças sexualmente transmissíveis pode ser uma alternativa de grande relevância para a avaliação da susceptibilidade a estas infecções. O objetivo deste trabalho foi iniciar um estudo de polimorfismos neste gene para, futuramente, se estabelecer correlações entre a MBL e manifestações da infecção por *C. trachomatis*. Foram utilizadas cinco amostras endocervicais positivas e seis negativas para a infecção por *C. trachomatis*. O DNA purificado destas amostras foi utilizado para a amplificação de um fragmento do gene *mbi2*. O kit Wizard SV Genomic DNA se mostrou ser a melhor alternativa para a purificação do produto da PCR a ser utilizado para o sequenciamento do gene *mbi2*. As 11 amostras sequenciadas não mostraram nenhum polimorfismo em regiões de mutação já descritas, apresentando, assim, o alelo A, o tipo selvagem. Estudos com um maior número de amostras positivas e negativas serão necessários para se estabelecer uma correlação entre as várias manifestações da infecção pelos 19 diferentes genótipos de *C. trachomatis* e polimorfismos no gene *mbi2*, como já sugerido para outros patógenos.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, Lectina Ligadora de Manose, MBL, *mbi2*

ABSTRACT

Chlamydiaceae are intracellular bacteria that parasitize eukaryotic cells. *Chlamydia trachomatis* is a strictly human pathogen and is the main bacterial species transmitted by sexual contact. In women they can cause urethritis, cervicitis, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and lymphogranuloma venereum. Mannose binding lectin (MBL), a component of the complement system is a key protein of the innate immune system, acting in the first line of defense against pathogens. MBL has the function of opsonin, by binding to carbohydrate rich in mannose, fucose and glucosamine, found on the cell surface of various microorganisms. MBL attached to the cell surface glycoprotein of *C. trachomatis* are important in host defense, because they inhibit the binding of bacteria to target cells. MBL gene (*mbi2*) is located on chromosome 10 and has three functional polymorphisms located in exon 1. These mutation points are known as variant B, C and D, and the variant A corresponds to the wild type. The characterization of the genetic profile of MBL in patients with sexually transmitted diseases may be an alternative of great relevance for the assessment of susceptibility to these infections. The objective of this study was to initiate a study for the detection of polymorphisms in this gene to investigate any correlation between MBL and manifestations of *C. trachomatis* infection. We used five positive and six negative endocervical samples for *C. trachomatis* infection. The DNA purified from these samples was used for the amplification of a fragment of the *mbi2* gene. The kit Wizard SV Genomic DNA proved to be the best alternative for the purification of the PCR product to be used for the sequencing of the gene *mbi2*. All sequenced 11 samples showed no polymorphism in the mutation regions, showing to be allele A, the wild type. Studies with a larger number of positive and negative samples are needed to establish a correlation between the various manifestations of infections caused by each of the 19 different genotypes of *C. trachomatis* and polymorphisms in the *mbi2* gene, as suggested for other pathogens.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, mannose binding lectin, MBL, *mbi2*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de desenvolvimento da família Chlamydiaceae	11
FIGURA 2. MBL e C1q e as vias de ativação do sistema do complemento	15
FIGURA 3. Molécula da MBL	16
FIGURA 4. Semelhança estrutural entre C1q e MBL	17
FIGURA 5. Tetrâmero da MBL e moléculas de MASP-2 associadas	20
FIGURA 6. Estrutura do gene <i>mb12</i> humano	21
FIGURA 7. Amplificação do gene <i>mb12</i> humano de amostras positivas e negativas para <i>C. trachomatis</i>	30
FIGURA 8. Alinhamento das seqüências obtidas com a de referência para o gene <i>mb12</i>	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Alguns microrganismos clinicamente relevantes reconhecidos por MBL	18
TABELA 2. Quantidade de DNA ng/ μ l de acordo com as 3 metodologias de purificação utilizadas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- A – Adenina
- BSA – Soro Fetal Bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- C – Citosina
- cm – Centímetros
- COPD – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- CRD – *Carbohydrate-recognition domain*
- C1 – Componente 1 do sistema do complemento
- C1s – Componente 1 do sistema do complemento, subcomponente s
- C1q – Componente 1 do sistema do complemento, subcomponente q
- C3 – Componente 3 do sistema do complemento
- C3a – Componente 3 do sistema do complemento, cadeia α
- C4bC2a – C3 convertase
- C5a – Componente 5 do sistema do complemento 5, cadeia α
- dATP – *Deoxyadenosine triphosphate*
- dCTP – *Deoxycytosine triphosphate*
- dTTP – *Deoxythymine triphosphate*
- dGTP – *Deoxyguanine triphosphate*
- DIP – Doença inflamatória pélvica
- DNA – Ácido Deoxirribonucleico
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
- EB – Corpo Elementar
- EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
- G – Guanina
- Gly – Glicina
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HSP – *Heat Shock Protein*
- Ig – Imunoglobulina
- LGV – Linfgranuloma Venéreo
- μg – Micrograma
- μL – Microlitro
- mg – Miligrama

ml – Mili-litro
mM – Milimolar
MAC – Complexo de Ataque à Membrana
MASP – Serino-Protease Associada à Membrana
MBL – Lectina ligadora de Manose
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
min – Minutos
MOMP – Principal Proteína de Membrana Externa
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – Nanometro
NK – células *Natural killer*
PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patogenos
pb – Pares de Bases
PBS – *Phosphate Buffer Saline*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
seg – Segundos
pH – Potencial Hidrogeniônico
PRRs – *Pattern Recognition Receptors*
PSF – Programa Saúde da Família
pmol – Picomol
RB – Corpo reticular
T – Timina
TBE – Tris-Borato-EDTA
TLRs – Receptores do tipo *Toll*
Tris-HCL – *Trisaminomethane Hydrochloride*
U – Unidades
V – Volts
°C – Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. METODOLOGIA	27
3.1. Amostras utilizadas.....	27
3.2. PCR para o gene <i>mb12</i>	27
3.3. Purificação do DNA amplificado.....	27
3.3.1. Purificação do DNA com Acetato de Sódio.....	28
3.3.2. Purificação do DNA com Isopropanol e Etanol.....	28
3.3.3. Purificação do DNA com kit.....	29
3.4. Sequenciamento do gene <i>mb12</i>	28
3.5. Determinação e análise das seqüências obtidas.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1. PCR para o gene humano da <i>mb12</i>	30
4.2. Purificação do produto amplificado por PCR.....	31
4.3. Sequenciamento do gene <i>mb12</i>	31
4.4. Determinação e análise das sequências obtidas.....	32
5. DISCUSSÃO	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
7. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

As espécies pertencentes à família Chlamydiaceae são parasitas intracelulares obrigatórios que possuem ciclo de desenvolvimento bifásico (Figura 1). O corpo elementar (CE) é a forma extracelular e infecciosa enquanto o corpo reticulado (CR) constitui a forma intracelular vegetativa (ROAN; STARNBACH, 2008). O CE invade a célula hospedeira, modifica-se em CR e este se multiplica por divisão binária dentro de um compartimento especializado, conhecido como inclusão citoplasmática. Conforme a inclusão se expande, a bactéria adquire energia e precursores celulares produzidos pela célula hospedeira (VALDIVIA, 2008). Após um período de 48–72 horas (MPIGA; RAVAOARINORO, 2004) a inclusão aumenta de tamanho; CRs se diferenciam em CEs; há a lise da membrana plasmática da célula hospedeira e conseqüente liberação de CEs para o meio extracelular.

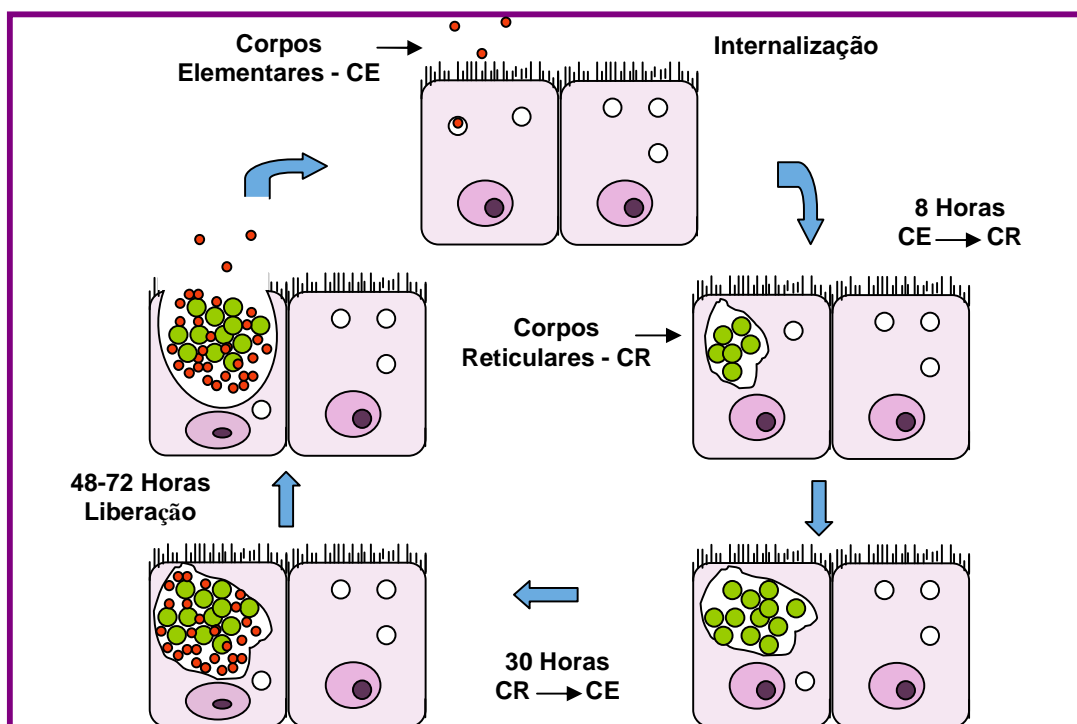


FIGURA 1: Ciclo de desenvolvimento da família Chlamydiaceae. O processo de infecção inicia-se quando o CE (em vermelho) se liga à célula alvo, permanecendo em vesículas

citoplasmáticas, após a endocitose, dando início à formação do corpúsculo de inclusão. De 6 a 8h após a endocitose observa-se a transformação de CE em CR (em verde) e inicia-se a síntese protéica. Os CRs se multiplicam por divisão binária, utilizando os recursos energéticos da célula hospedeira. Após aproximadamente 24-48h, o CR começa a se transformar novamente em CE, e de 48 a 72h a progênie é liberada por lise celular ou pela fusão da inclusão citoplasmática com a membrana da célula hospedeira.

Estudos recentes mostram que a liberação da bactéria pode ocorrer de duas formas distintas, por lise ou por um mecanismo denominado extrusão (HYBISKE; STEPHENS, 2007). Segundo estes autores, a via lítica é mediada por proteases e consiste na ruptura da inclusão citoplasmática e da membrana celular, resultando na morte da célula hospedeira. Em contraste, o mecanismo de extrusão não danifica a célula hospedeira, pois parte da inclusão é liberada dentro de um compartimento de membrana.

A família Chlamydiaceae está dividida em dois gêneros, *Chlamydia* e *Chlamydophila*, que contêm nove espécies: *Chlamydia trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, pertencentes ao gênero *Chlamydia*; *Chlamydophila psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. caviae* e *C. abortus* pertencentes ao gênero *Chlamydophila* (EVERETT *et al.*, 1999). As doenças causadas por *Chlamydia* spp. e *Chlamydophila* spp. têm como principais vias de infecção, os olhos, e os tratos genital e respiratório (ENTRICAN *et al.*, 2004). Ambos os gêneros possuem espécies que são patógenos humanos (CORSARO; GREUB, 2006). *Chlamydia trachomatis*, além de causar infecções urogenitais e em recém-nascidos, é o principal agente de tracoma, uma infecção na conjuntiva ocular de adultos. No gênero *Chlamydophila*, *C. pneumoniae* é a principal espécie por ser um importante agente associado a infecções no trato respiratório humano, muitas vezes assintomático, podendo apresentar sérias complicações como asma e aterosclerose. Neste gênero, deve-se ressaltar ainda, uma infecção respiratória causada por *C. psittaci*. Esta espécie é um parasita de aves, que em seres humanos pode causar uma zoonose, a psitacose ou a ornitose. Esta zoonose é uma infecção pulmonar que geralmente se apresenta com febre, calafrios e cefaléia e a bactéria é raramente transmitida de um ser

humano para outro. É normalmente disseminada pelo contato com as fezes e outras secreções de psitacídeos (no caso da psitacose) ou de outras aves, como pombos (no caso da ornitose).

As diferentes linhagens de *C. trachomatis* estão agrupadas em 19 sorotipos relacionados ao reconhecimento de epítomos antigênicos em sua principal proteína de superfície (*Major Outer Membrane Protein* - MOMP) por anticorpos monoclonais (MORRÉ *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2003) e apesar do genoma das diferentes linhagens de *C. trachomatis* terem sido seqüenciados, pouco se sabe sobre a estrutura genética desta bactéria (ALBRECHT *et al.*, 2009). Os sorotipos A, B, Ba e C causam o tracoma. Os sorotipos de D a K, L1, L2, L2a e L3 causam infecções sexualmente transmissíveis. Os sorotipos D a K estão relacionados com cervicites e uretrites. Os sorotipos L1 a L3, patológica e biologicamente distintos dos sorotipos D a K, causam o linfogranuloma venéreo (LGV) que se caracteriza pelo fato de, após sua transmissão por via sexual, afetar o sistema linfático da região cervical (LOOMIS; STARNBACH, 2002). As infecções por *C. trachomatis*, se não tratadas, podem ser responsáveis por gravidez ectópica, proctite, salpingite, epididimite que podem causar infertilidade em mulheres e homens (BÉBÉAR; BARBEYRAC, 2009).

O *habitat* intracelular de *Chamydia* e *Chlamydophila* sugere que a imunidade mediada por células tenha um papel mais importante em conferir proteção contra os quadros provocados pela infecção, quando comparada à imunidade humoral (ENTRICAN *et al.*, 2004). Embora as infecções por Chlamydiaceae possam alterar a função de células do sistema imune para promover a persistência da bactéria no hospedeiro (BEAGLEY *et al.*, 2009), a infecção por bactérias desta família depende, primariamente, de uma resposta imune adequada para a retirada do patogeno.

O sistema imune inato via receptores (PRRs - *Pattern-Recognition Receptors*), reconhece padrões moleculares de alta repetição (PAMPs) presentes em diversos microrganismos. Receptores do tipo Toll (TLRs) constituem um importante grupo de PRRs expresso por células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e NK (*natural*

killer) (WIRA *et al.*, 2005). TLR2 e TLR4, expressos por células do trato genital feminino, constituem, respectivamente, os PRRs para componentes peptidoglicano-*like*, LPS e para moléculas como a proteína citoplasmática hsp60 (*heat shock protein*) de *Chlamydia trachomatis* (HARTOG; MORRÉ; LAND, 2006). A ligação entre PRR e PAMP inicia uma resposta imune dependente de reações intracelulares para a produção de citocinas e recrutamento de células do sistema imune inato para o local da infecção (HARTOG; MORRÉ; LAND, 2006). A proteína hsp 60 é também uma das proteínas de *C. trachomatis* responsáveis pela indução da expressão de citocinas por células epiteliais (ENTRICAN *et al.*, 2004).

Como parte da imunidade inata, o sistema do complemento também constitui uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro contra Chlamydiaceae e seu mecanismo de ação é rapidamente ativado, antes do desenvolvimento da resposta imune adquirida. O sistema do complemento consiste de proteínas e receptores de superfície celular que interagem entre si e com outras células do sistema imune de modo altamente regulado (ABBAS *et al.*, 2007). As três vias de ativação do complemento são: a via clássica, que depende da deposição de anticorpos na superfície do patógeno; a via alternativa, que é ativada nas superfícies microbianas na ausência de anticorpo; a via das lectinas, que também é desencadeada na ausência de anticorpos pela ligação de polissacarídeos microbianos às lectinas circulantes, tais como a proteína ligadora de manose (SIM; TSIFTSOGLU, 2004).

O sistema do complemento é parte do sistema imune inato e consiste de muitas proteínas que agem em cascata, em que cada enzima atua como um catalisador da próxima (Figura 2). O C3 é o componente mais importante, presente na circulação. A ativação das vias principais do sistema do complemento, clássica e alternativa, leva à formação de uma convertase que cliva C3 em dois fragmentos, C3a e C3b. A convertase da via clássica é uma combinação de C4 com C2 (C4b2a), e a convertase da via alternativa é uma combinação de C3 com uma proteína denominada fator B (Bb) (C3bBb). A C3 convertase gerada por estas duas vias liga-se à membrana alvo e torna-se um

local para a produção de C3b (ROITT, 2003). Ambos os tipos de C3-convertase podem se transformar em C5-convertase pela adição de outra molécula de C3b: C4bC2aC3b (via clássica) e C3bBbC3b (via alternativa). A C5-convertase catalisa o primeiro passo da cascata que leva à produção de complexos de ataque à membrana (MAC).

O sistema complemento é um importante mecanismo efetor do sistema imune, pois pela ativação das três vias, são gerados fragmentos bioativos (C3a e C5a), responsáveis pelo início da formação do MAC (C5b-9) na superfície do patógeno (BOHLSON; FRASER; TENNER, 2006). Desta forma, uma vez que o sistema do complemento é ativado, uma cascata de reações resulta na amplificação da resposta imune ou na destruição do patógeno (HARTOG; MORRÉ; LAND, 2006).

O componente C1 do sistema do complemento, importante na ativação pela via clássica, é um grande complexo protéico multimerico composto pelas subunidades C1q, C1s, C1r (ABBAS *et al.*, 2007). C1q é a unidade responsável pela ligação ao anticorpo e C1s e C1r são proteases. A subunidade C1q é constituída por um conjunto radial semelhante a um guarda-chuva e composto de seis cadeias, cada uma das quais tem uma cabeça globular conectada por uma haste colágena (Mc GREAL; GASQUE, 2002).

A lectina ligadora de manose (MBL) está presente no plasma e é conhecida como uma proteína chave do sistema imune. É uma lectina tipo-C de mamíferos, que é sintetizada por hepatócitos e secretada em níveis baixos no soro circulante (SWANSON *et al.*, 1998). A MBL, dentre outras moléculas, tais como as proteínas surfactantes A e D, pertence à família das colectinas, proteínas que possuem estruturas moleculares apresentando uma região colágena N-terminal e um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (TSUTSUMI; TAKAHASHI; SUMIDA, 2005; GARRED *et al.*, 2009). O CRD é responsável pela interação da MBL com carboidratos presentes nas superfícies microbianas e esta ligação depende da presença de pelo menos dois íons cálcio, o que caracteriza a MBL como uma lectina tipo-C (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992 *apud* BROWN *et al.*, 2007).

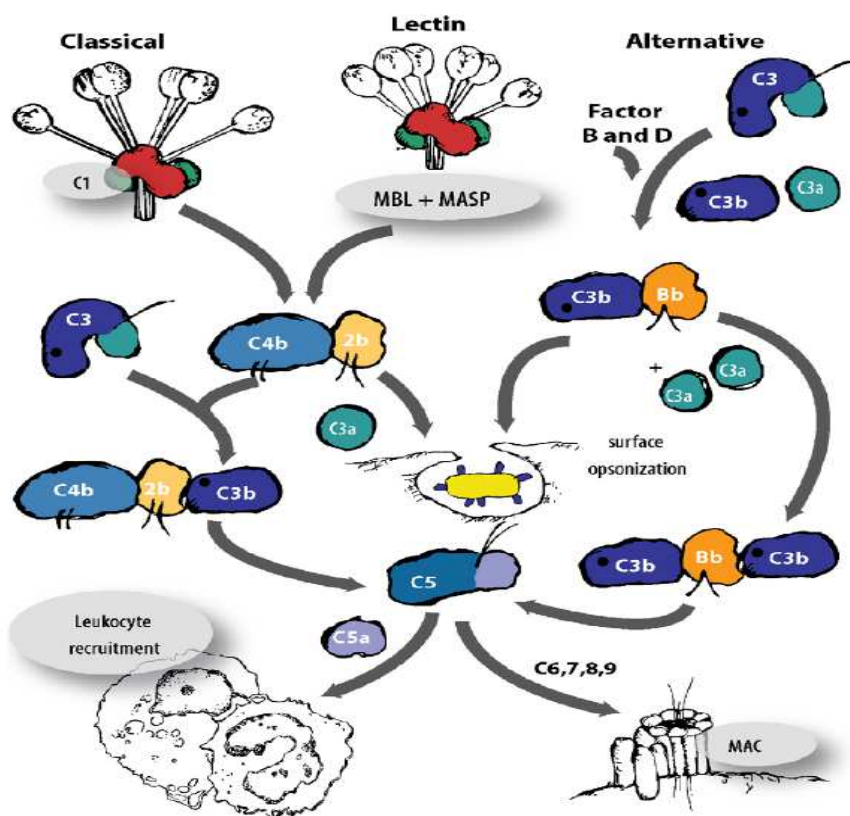


Figura 2: MBL e C1q e as vias de ativação do sistema do complemento. Os produtos que resultam da ativação das vias clássica, alternativa e das lectinas como o fragmento C3b, que pode se depositar na superfície de um patógeno (em amarelo) e os fragmentos C3a e C5a, medeiam a opsonização, fagocitose e lise do patógeno pela formação e inserção do complexo de ataque à membrana (MAC). Fonte: BOHLSON; FRASER; TENNER, 2007.

A estrutura básica da MBL se apresenta como um trimero formado de peptídeos que se unem formando uma tripla hélice colágena (FIGURA 3). Cada peptídeo possui o domínio C-terminal dependente de cálcio, responsável pela ligação aos carboidratos nas superfícies celulares (CRD). Uma região denominada *neck region* encontra-se próxima ao CRD e é responsável pela correta orientação espacial do CRD. O domínio colágeno de cada peptídeo que participa ativamente da formação da tripla hélice colágena (BROWN *et al.*, 2007), é formado por sequências repetitivas de aminoácidos Gly-X-Y, onde X e Y representam frequentemente, prolina ou hidroxiprolina (WETERING van de; GOLDE van de; BATENBURG, 2004; BOHLSON; FRASER; TENNER, 2007). A região N-terminal, rica em cisteína, facilita a formação de oligômeros e, segundo Wothley, Bardy e Mullighan (2005), formas multimericas da molécula MBL

(tetrameros, pentameros e hexameros) promovem uma maior interação da MBL com os oligossacarídeos microbianos.

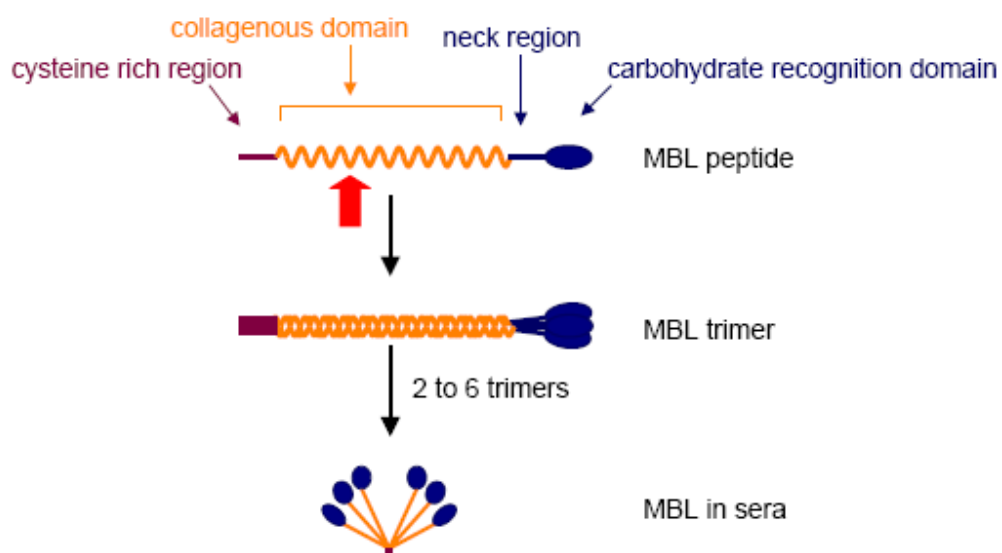


Figura 3: Molécula de MBL. A estrutura básica da MBL consiste em um peptídeo que apresenta quatro domínios: extremidade globular responsável pelo reconhecimento de carboidratos (CRD) presentes na superfície do patógeno; região denominada *neck* responsável pelo correto posicionamento do peptídeo; uma região colágena, composta por sequências repetitivas de aminoácidos em alfa hélice; região N-terminal rica em cisteína, importante na formação de oligômeros. Os peptídeos se unem formando trímeros, que por sua vez formam oligômeros (tetrameros, pentameros e hexameros). Fonte: TSUTSUMI; TAKAHASHI; SUMIDA, 2005.

A MBL é semelhante, em sua estrutura quaternária à C1q que se dispõe como um *buquê de tulipas*, com cabeças globulares e hastes colágenas (Figura 4) (MALHOTRA; LU; HOLMSKOV; SIM, 1994; SIM; TSIFTSOGLU, 2004).

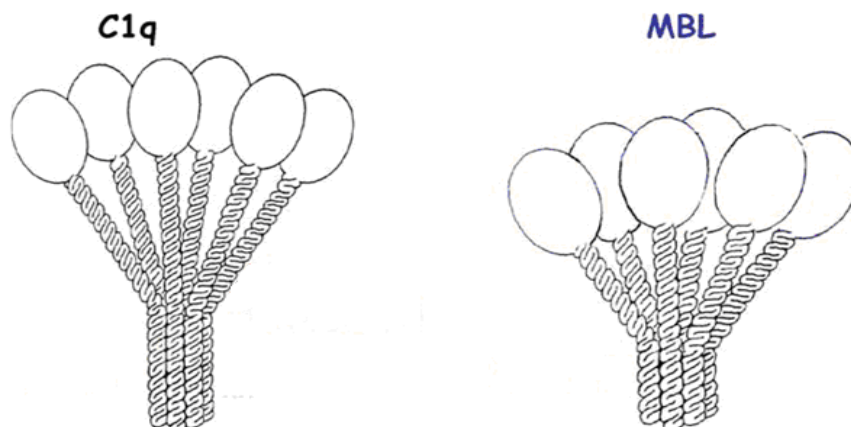


Figura 4: Semelhanças entre C1q e MBL. A MBL é estruturalmente semelhante à C1q, pois, ambas as moléculas possuem hastes colágenas e cabeças globulares. Além disso, C1q e MBL podem desencadear o sistema do complemento de uma maneira independente de anticorpos. Fonte: BOHLSON; FRASER; TENNER, 2007.

Ambas as moléculas possuem subunidades moleculares compostas por três cadeias polipeptídicas, e devido à suas sequências de aminoácidos, que são características, as três cadeias formam uma hélice colágena fazendo o reconhecimento de carboidratos, no caso da MBL, e de domínios em imunoglobulinas (Ig) por C1q (THIEL *et al.*, 2000). Assim como a MBL, a molécula C1q é um componente essencial do sistema do complemento, pois se liga a uma grande variedade de patógenos, de uma maneira independente de anticorpos (McGREAL; GASQUE, 2002).

A proteína MBL possui a função de opsonina, ligando-se a carboidratos ricos em manose, frutose e glucosamina, encontrados na superfície celular de diversos micro-organismos (Tabela 1). Vários receptores para a MBL tem sido associados à sua função de opsonina, como cC1qR/calreticulina (ou receptor de C1q), C1qRp e CR1 (*Colectin Receptor*). Além disso, CR1 e CD35 são receptores do complemento que também agem como receptores celulares para a MBL (GHIRAN *et al.*, 2000 e TENNER *et al.*, 1995 apud GULATI *et al.*, 2002). De acordo com GHIRAN *et al.* (2000), a MBL possui grande eficiência no reconhecimento de superfícies microbianas em *Candida albicans*, *Neisseria*

gonorrhoeae, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella montevideo* e *S. typhimurium*.

Bactérias	Vírus	Fungos	Protozoários
<i>Staphylococcus aureus</i>	HIV-1 e -2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Herpes simplex 2	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Influenza A	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Mycobacterium avium</i>			
<i>Listeria monocytogenes</i>			
<i>Haemophilus influenzae</i>			
<i>Neisseria meningitidis</i>			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Klebsiella spp.</i>			
<i>Salmonella montevideo</i>			
<i>Salmonella typhimurium</i>			
<i>Enterococcus spp.</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Propionibacterium acnes</i>			
<i>Chlamydia trachomatis</i>			
<i>Chlamydia pneumonia</i>			

Tabela 1: Alguns micro-organismos clinicamente relevantes reconhecidos por MBL.
Fonte: Modificado de WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005.

Swanson e Kuo (1991) apontam que componentes glicoprotéicos na superfície celular de *C. trachomatis* são ricos em manose, frutose e N-acetilglicosamina e, portanto, são conhecidos como moléculas que medeiam a ligação da MBL ao patógeno e sua infecciosidade. Além disso, a ligação da MBL à glicoproteína de superfície MOMP constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, pois inibe a ligação de *C. trachomatis* às células alvo (SWANSON *et al.*, 1998; SZILLER *et al.*, 2007). É importante ressaltar que estudos feitos por

Swanson *et al.* (1998) mostraram que a MBL inibe a infecção de células HeLa por diferentes espécies de Chlamydiaceae, indicando que esta molécula participa na proteção contra a infecção por *C. pneumoniae* e *C. trachomatis*.

A proteína MBL, por reconhecer carboidratos bacterianos específicos, possibilita a distinção do próprio e não-próprio, uma vez que as glicoproteínas e glicolipídeos presentes em mamíferos contêm ácido siálico ou N-acetilglicosamina terminais (GULATI *et al.*, 2002; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006). Além disso, muitos autores sugerem que a MBL possui importante papel como moduladora imunológica e relacionam seu papel a susceptibilidade e severidade da infecção (MATSUSHITA *et al.*, 1998; CHONG *et al.*, 2005; THIO *et al.*, 2005). Entretanto, como um componente do sistema do complemento, a estrutura e função da MBL podem não ser vantajosas, uma vez que esta proteína pode desencadear doenças auto-imunes (DAVIES *et al.*, 1997; GARRED *et al.*, 2001; OHLENSCHLAEGER *et al.*, 2004; TSUTSUMI; TAKAHASHI; SUMIDA, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2005) ou resultar em inúmeras imunopatologias. Desta forma, mecanismos que levem à redução da ativação do complemento podem ser benéficos ao hospedeiro (LIPSCOMBE *et al.*, 1992) como é o caso das mutações e seus conseqüentes alelos variantes.

Devido à sua semelhança estrutural com o componente C1q, a MBL participa da ativação do complemento e é capaz de se ligar a proteínas e receptores da superfície celular de macrófagos e de células dendríticas, facilitando a opsonização (BABULA *et al.*, 2003; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006). A MBL também pode circular em associação com serino-proteases (MASPs) e desencadear a via das lectinas, que é independente do C1 e de anticorpos (Figura 5). As MASPs são análogas aos fatores C1s e C1r da via clássica do sistema do complemento que circulam associadas a moléculas de MBL na forma de pró-enzimas (KRARUP *et al.*, 2005; SWIERZKO *et al.*, 2007). Quando o complexo MBL-MASPs interage com uma célula alvo, as MASPs são clivadas para se tornarem enzimas ativas. Dentre as três MASPs existentes, a MASP-1 é conhecida por clivar a C3 convertase (C4bC2a) diretamente (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; DOMMETT; KLEIN; TURNER,

2006). Segundo Iwaki *et al.* (2006) a via das lectinas envolve o reconhecimento de carboidratos pelo complexo MBL-MASPs, contribuindo para a ativação do complemento. Assim, quando a MBL se liga a um carboidrato da superfície microbiana, a MASP adquire atividade proteolítica contra componentes do sistema do complemento. Evidências mostram que MASP-2 é essencial para a clivagem de C4 e C2 (MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2000; TURNER, 2003), resultando na formação de C3 convertase (C4bC2a). A região colágena da MBL está envolvida na associação com MASPs e mutações neste domínio podem reduzir a ligação da MBL a seguimentos de MASP-1 e MASP-2 (IWAKI *et al.*, 2006; THIEL *et al.*, 2009).

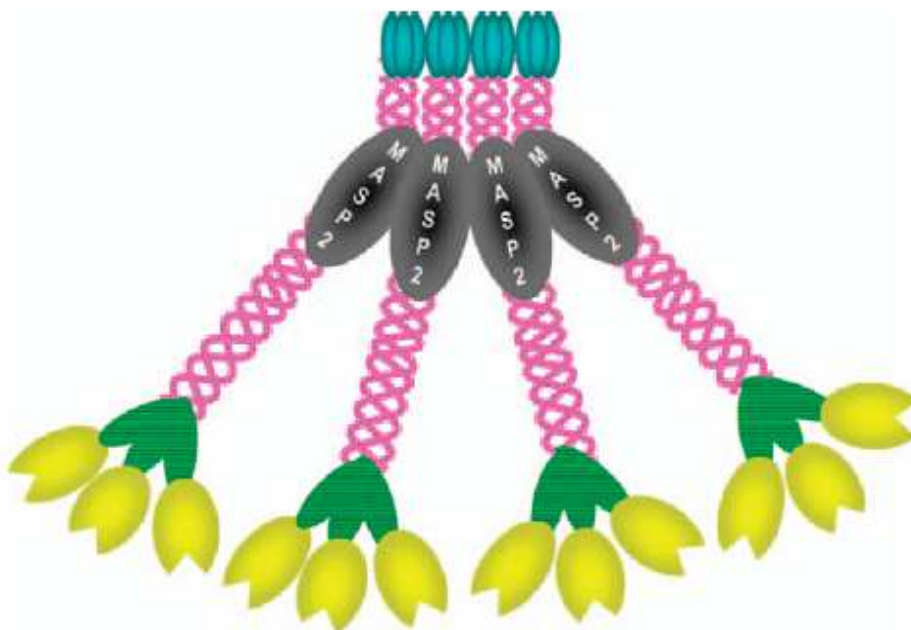


Figura 5 Tetrâmero da MBL e moléculas de MASP-2 associadas. O sítio de ligação para a MASP se localiza no domínio colágeno da MBL (em rosa), que corresponde à sequência repetitiva de aminoácidos Gly-X-Y. Mutações na região colágena prejudicam a afinidade da ligação entre a MBL e as MASPs, resultando em uma deficiência funcional da proteína. Fonte: DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006.

Apesar de existirem dois genes da MBL humana, *mb1* e *mb2*, somente *mb2* codifica proteínas, enquanto *mb1* é um pseudogene (DOMMETT; KLEIN;

TURNER, 2006). O gene funcional está localizado no cromossomo 10 e possui quatro regiões codificadoras em diferentes éxons (Figura 6). O éxon 1 codifica o sinal peptídico e parte da região colágena, que contém a sequência Gly-X-Y; o éxon 2 codifica o remanescente da região colágena; o éxon 3 constitui a região de alfa hélice ou *neck region* enquanto o éxon 4 codifica a região carboidrato terminal dependente de cálcio (CRD).

O gene *mb2* possui três polimorfismos funcionais, localizados no éxon 1. No códon 52 pode haver substituição de arginina por cisteína; no códon 54 de glicina por ácido aspártico e no códon 57, de glicina por glutamina. Estes pontos de mutação são conhecidos como variantes D, B e C respectivamente, sendo o tipo selvagem denominado de variante A. Os alelos mutantes são coletivamente referidos como alelo O.

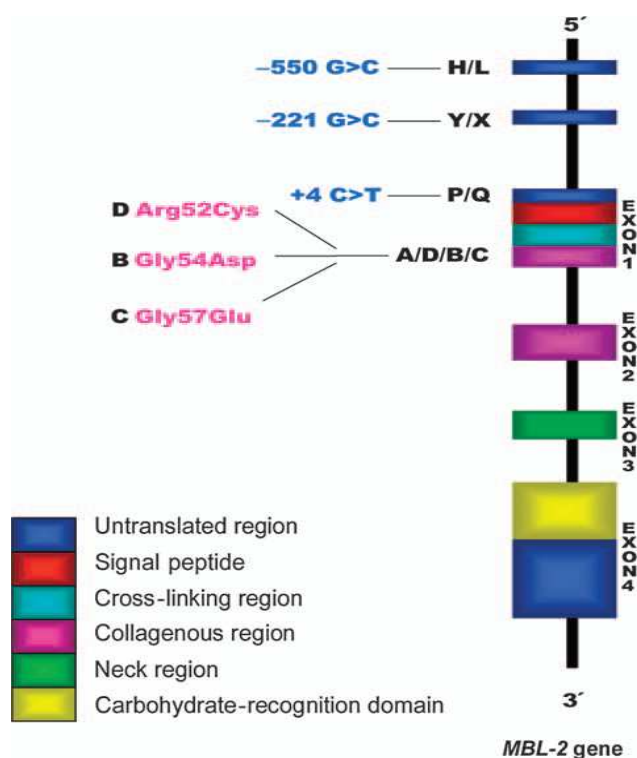


Figura 6: Estrutura do gene *mb2* humano. As regiões do polipeptídeo são codificadas por diferentes éxons do gene *mb2*. O éxon 1 contém os três polimorfismos funcionais, conhecidos como os alelos variantes B, C e D. Fonte: DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006.

Mutações na região promotora do gene ocorrem nas regiões -550 (G → C, variantes H e L), -221 (G → C, variantes X e Y) e no nucleotídeo + 4 da região 5' não-traduzida (C → T, variantes P e Q). Na população humana, são conhecidos sete haplotipos: HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, HYPD, LYQC e LYPB. Dentre os que carregam o alelo A, o haplotipo HYPA resulta na produção de altas concentrações de MBL e o LXPA está associado a uma deficiência na produção de MBL (GARRED *et al.*, 2003; CASANOVA; ABEL, 2004). Estudos recentes mostram que os efeitos das mutações no éxon 1 e na região promotora são prejudiciais para a oligomerização e levam à deficiência funcional do gene (CEDZYNSKI *et al.*, 2004; AITTONIEMI *et al.*, 2005; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; BOHLSON; FRASER; TENNER, 2007; SWIERZKO *et al.*, 2007).

De maneira geral, os polimorfismos têm como consequência a produção de uma molécula polimérica instável que é rapidamente degradada, o que resulta em uma menor concentração de MBL circulante (MADSEN *et al.*, 1994; BABOVIC-VUKSANOIC; SNOW; TEN, 1999; BABULA *et al.*, 2004; CEDZYNSKI *et al.*, 2004) e no fluido vaginal (BABULA *et al.* 2003; 2004). A deficiência e baixos níveis de MBL no plasma estão fortemente associados com a presença de genes MBL variantes (NAGY *et al.*, 2005). Indivíduos heterozigotos ou homozigotos para mutações no gene MBL parecem ser incapazes de atingir os mesmos níveis da proteína se comparados aos que possuem o genotipo selvagem (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

Deficiências no nível de MBL, consequência de um genotipo variável, estão associadas com o aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas e a presença de concentrações reduzidas de MBL está relacionada a doenças mais severas (EISEN; MINCHITON, 2003; RANTALA *et al.*, 2009). Por outro lado, a deficiência na produção destas moléculas, decorrente de polimorfismos no códon 54, parece também estar associada à recorrência de algumas infecções, como observado na candidíase e na vaginose bacteriana (GIRALDO *et al.*, 2007).

Estudos recentes sugerem a possibilidade de associação entre infecções por *C. pneumoniae* e exacerbações de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (MIYASHITA, 2006). A asma é uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada por constrição dos brônquios e vários sintomas, tais como tosse e dificuldades respiratórias. Resultados obtidos por Nagy *et al.* (2003) mostraram que a homozigose para o alelo normal (A/A) tem efeito protetor contra a asma em crianças infectadas por *C. pneumoniae* e que a presença de alelos variáveis para a MBL pode ser uma predisposição genética para o desenvolvimento de asma em crianças.

Sziller e colaboradores também encontraram uma associação entre infecções por bactérias da família Chlamydiaceae apresentando o alelo A do tipo selvagem ou seu variante alelo B e a ocorrência de oclusão da tuba uterina em mulheres soropositivas ou não para *C. trachomatis* (SZILLER *et al.*, 2006). Estes autores sugerem que a presença de outros patógenos que afetem o trato genital feminino, causando oclusão das tubas uterinas, são também susceptíveis à ação da MBL. Portanto, a ocorrência da oclusão em mulheres soronegativas para *C. trachomatis* poderia estar associada à deficiência da MBL, causada pelo polimorfismo do gene.

Sendo assim, a genotipagem de indivíduos com polimorfismos para o gene do MBL pode ser útil na predição de fatores de risco à infecção por bactérias da família Chlamydiaceae como mostram estudos realizados para infecções por *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia trachomatis*. Além disso, pacientes infectados podem ser beneficiados pelo teste de polimorfismo do MBL e aqueles que são positivos para os alelos variantes podem ter tratamento mais longo para compensar a deficiência em seu sistema imune (NAGY *et al.*, 2003). Estudos imunogenéticos sobre o papel das variações genéticas da MBL e suas consequências para a imunidade do paciente auxiliam na determinação da susceptibilidade, curso e consequências das infecções.

1.1 Justificativa

Vários estudos realizados em diferentes países mostram que *Chlamydia trachomatis* constitui a bactéria de maior prevalência entre as responsáveis por infecções sexualmente transmissíveis. Um aspecto importante das infecções por esta bactéria é o fato de serem, em sua maioria, assintomáticas. Este dado é preocupante, uma vez que, além de sua manutenção na população, estas infecções, se não tratadas, podem apresentar graves seqüelas como a infertilidade e a transmissão a recém-nascidos.

Os fatores associados à evasão de Chlamydiaceae aos mecanismos de defesa do sistema imune e migração pelo trato genital baixo e alto são indeterminados (NEUER *et al.*, 2000; DEBATTISTA *et al.*, 2003; De Seta *et al.*, 2007). Desta forma, o conhecimento sobre fatores predisponentes a esta infecção se torna uma importante ferramenta para o combate à infecção por *C. trachomatis*, que é, muitas vezes, persistente.

Uma vez que fatores genéticos podem exercer um papel importante na susceptibilidade a doenças e influenciar a resposta à infecção por *C. trachomatis*, a determinação do padrão genotípico do *mb1* pode auxiliar na condução de medidas de prevenção, controle e tratamento desta infecção. Associado a isto o controle desta infecção é extremamente benéfico à diminuição dos impactos individuais, sejam eles, econômicos ou sociais.

No Brasil, não existem estudos que relacionem estas infecções a variantes do gene *mb1* humano. Desta forma, este estudo pretende ser uma primeira etapa no sentido de contribuir para o aumento no conhecimento sobre os fatores associados à infecção por *C. trachomatis* e sua relação com a presença de polimorfismos no gene MBL em nossa população.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a associação da infecção por *Chlamydia trachomatis* com polimorfismos no gene *mb12* da lectina ligadora de manose (MBL) em mulheres atendidas no Centro de Treinamento em DST da Policlínica Centro-Sul da SMS/PBH.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Amplificar por PCR, a região do éxon 1 do gene *mb12* a partir de amostras endocervicais positivas e negativas para a infecção por *C. trachomatis*;

2.2.2 Padronizar uma técnica para a purificação do fragmento de DNA amplificado a partir da PCR para o gene *mb12*;

2.2.3 Determinar, por sequenciamento de DNA, os polimorfismos do gene *mb12* em mulheres infectadas ou não por *C. trachomatis*;

2.2.4 Iniciar o estudo de uma possível relação entre polimorfismos do gene *mb12* e a infecção por *C. trachomatis* em mulheres.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostras utilizadas

Foram utilizadas cinco amostras positivas e seis negativas para a infecção por *C. trachomatis*, coletadas de mulheres atendidas no Centro de Treinamento em DST da Policlínica Centro-Sul da SMS/PBH, Belo Horizonte, Minas Gerais, mantidas em *freezer* -20°C. O DNA utilizado foi previamente amplificado a partir da sequência do gene *ompA*, a principal proteína de superfície da bactéria *C. trachomatis* (Lima *et al.*, 2007). Quando necessário, o DNA foi novamente purificado. As amostras foram então utilizadas para PCR de um fragmento de 349 pb do gene da *mbI2*.

3.2 PCR para o gene *mbI2*

A reação de amplificação do éxon 1 do gene *mbI2* foi realizada utilizando-se o par de iniciadores (mbIE01) 5' AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG 3' e (mbIE02) 5' AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG 3', que amplificam uma região de aproximadamente 349 pb (ALVES *et al.*, 2004). A PCR foi realizada com 200 µM de cada desoxinucleotídeo tri-fosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP, GibcoBRL), 5 pmol de cada iniciador (Invitrogen), 3,5 mM de MgCl₂, 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão 10x de enzima concentrado (Invitrogen) e 2 µL de DNA em um volume final de 20 µL.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Research, MA, USA), seguindo um programa de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificação de 30 seg a 94°C, 60 seg a 58°C e 2 min a 72°C.

Os produtos da amplificação foram analisados após eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio incorporado, para visualização das bandas. O DNA foi então visualizado e o gel fotografado sobre um

transiluminador de luz ultravioleta (320 nm) (UVGL-25, UVP, Inc.). O tamanho do fragmento foi estimado pela comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

3.3 Purificação do DNA amplificado

Após a reação de amplificação do fragmento de 349 pb do gene *mbf2*, o produto de PCR foi purificado por três metodologias diferentes, com o objetivo de padronizar esta etapa para posterior sequenciamento. Para cada metodologia, foram utilizados 10 µl do produto de PCR para eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio incorporado, para visualização da banda de 349 pb. O restante do produto de PCR foi utilizado para purificação, de acordo com cada metodologia testada.

3.3.1 Purificação do DNA com Acetato de Sódio

Após eletroforese em gel de agarose, a banda de 349 pb foi recortada e foram acrescentados 50 µL de etanol e 2 µL de acetato de sódio 3M de pH 5,8. As amostras foram congeladas em freezer – 20°C *overnight*. Após centrifugação por 30 min a 13.000 RPM, a 4°C, e descarte do sobrenadante, foram acrescentados 500 µL de etanol 70%. Novamente as amostras foram centrifugadas a 13.000 RPM, 4°C por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA foi invertido para que o resto de álcool evaporasse. O DNA foi, então, diluído em 20 µL de H₂O milli-Q estéril. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 5 a 10 min.

3.3.2 Purificação com Isopropanol e Etanol

Após a adição de 50 µL de isopropanol ao produto de PCR, as amostras foram centrifugadas a 13.000 RPM, 4°C por 15 min. Após o descarte do

sobrenadante, foi adicionado 1 ml de etanol 70%, seguido de centrifugação a 13.000 RPM, 4°C por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA foi invertido para que o resto de álcool evaporasse. O DNA foi, então, diluído em 20 µL de H₂O milli-Q estéril.

3.3.3 Purificação com *kit Wizard SV Genomic DNA*

Diretamente após a reação de amplificação do gene *mb12*, o produto de PCR foi purificado por centrifugação, utilizando-se o *kit Wizard SV Genomic DNA* (Promega).

3.4 Sequenciamento do gene *mb12*

Após a purificação do produto de PCR, as amostras foram utilizadas para detecção de polimorfismos do gene *mb12* por sequenciamento de DNA utilizando o par de iniciadores citados para a amplificação do gene *mb12*. Para isso foi utilizado o *kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing for MegaBACE* (GE-Healthcare/Biosciences) disponível para o seqüenciamento automático no sequenciador MegaBACE 1000 (GE-Healthcare/Biosciences). Para a reação de sequenciamento foram utilizados 2,5 e 5,0 µL do produto de PCR, 1 µL do par de iniciadores a 5 pmol, 4 µL de *ET Dye* e água Mili-Q estéril para completar um volume final de 10 µL. Para cada amostra, foram feitas duas reações com 2,5 µl e duas reações com 5,0 µl do produto de PCR para cada *primer*. As reações de sequenciamento e precipitação foram feitas pelo Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.5 Determinação e análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas para a pesquisa de homologia com o gene *mb12*, utilizando o programa *Blast N*, disponível no endereço

eletrônico do *National Institute of Health*. Todas as seqüências foram alinhadas com a seqüência de referência NM 000242.2. O alinhamento e análise das seqüências foram feitos pela utilização do programa MEGA4 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*.

4 RESULTADOS

Para a investigação de polimorfismos no gene da lectina ligadora de manose humano (*mb12*) nas mulheres avaliadas foi realizada, inicialmente, a padronização de técnicas de purificação do DNA amplificado após PCR direcionada a uma região do *mb12*.

4.1 PCR para o gene *mb12* humano

A PCR realizada permitiu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 349 pb do gene *mb12* humano correspondente à região de polimorfismos do éxon 1, a partir de amostras clínicas femininas. Foram utilizadas amostras positivas e negativas para a infecção por *C. trachomatis*. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio incorporado, para visualização das bandas (Figura 7).

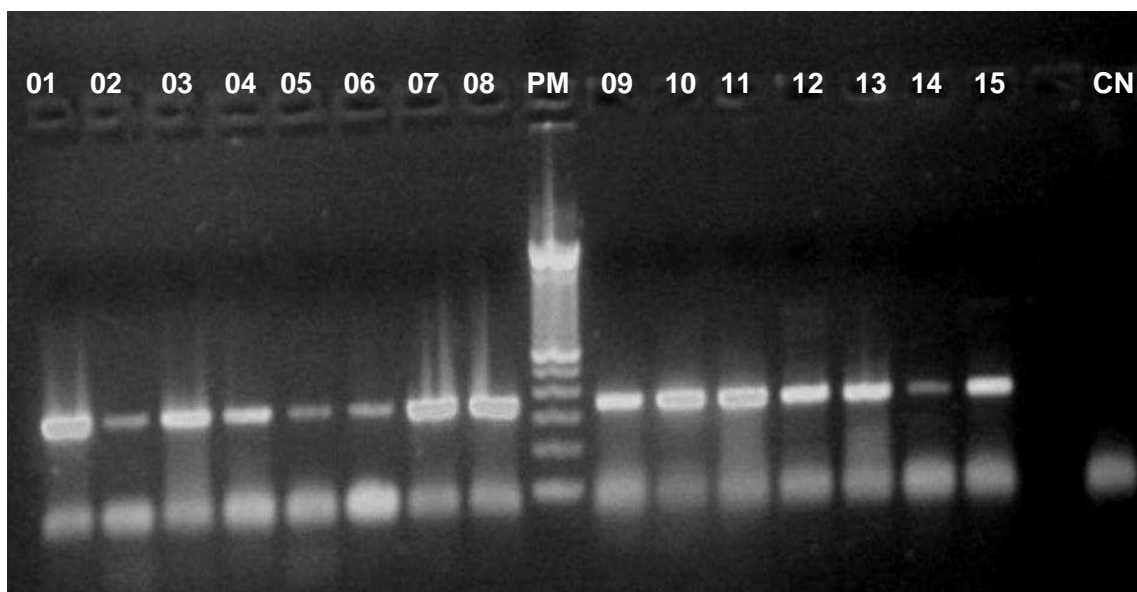


Figura 7: Amplificação do gene *mb12* humano de amostras positivas e negativas para *C. trachomatis*. As amostras mostram um fragmento de 349 pb como resultado da amplificação do gene *mb12* pela utilização de iniciadores específicos. Os números de 1 a 15 representam a identificação das amostras clínicas usadas. Os números de 1 a 8 representam amostras positivas para a infecção por *C. trachomatis* e os números de 9 a 15 representam amostras clínicas negativas. **CN:** Controle negativo; **PM:** Padrão de peso molecular (100 pb *Ladder*, Invitrogen).

4.2 Purificação do produto amplificado por PCR

Após reação de amplificação de um fragmento de 349 pb do gene *mbI2*, o produto de PCR foi purificado por três diferentes metodologias. O DNA purificado das amostras testadas foi dosado com o objetivo de avaliar a quantidade de material purificado a partir das diferentes metodologias. Através da purificação utilizando o *kit Wizard SV Genomic DNA* (Promega) foi recuperada uma maior quantidade de DNA, se comparado com a purificação por acetato de sódio e isopropanol/etanol (Tabela 2).

Tabela 2: Quantidade de DNA ng/μl de acordo com as 3 metodologias de purificação utilizadas.

Amostra	Isopropanol e Etanol	Kit Promega	Acetato de Sódio
01	10,4	44,7	1,3
02	6,9	41,8	-4,1
03	9,1	49,4	-3,9
04	6,5	34,2	5,3
05	3,6	37,0	4,2
06	16,4	54,2	-5,5
07	4,1	45,3	3,6
08	9,6	36,8	-4,0
09	11,4	43,0	5,6
10	12,6	50,1	2,7
11	8,9	41,8	1,7

4.3 Sequenciamento do gene *mbI2*

Para investigar a hipótese de uma associação de polimorfismos do gene às manifestações da infecção por *C. trachomatis* foi realizado o sequenciamento do fragmento de 349 pb do gene *mbI2* com o objetivo de identificar alelos variantes, A, B, C e D presentes no material genético das mulheres pesquisadas.

Os polimorfismos no gene *mb12* foram investigados pelo sequenciamento do fragmento de 349 pb amplificado a partir de amostras clínicas endocervicais das mulheres envolvidas neste estudo. Foram utilizados 2,5 e 5,0 µL do produto de PCR purificado pelo *kit Wizard SV Genomic DNA* (Promega).

4.4 Determinação e análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas para a pesquisa de homologia em relação ao gene *mb12*, utilizando os programas *Blast N* e *MEGA4 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, onde todas as amostras sequenciadas apresentaram alinhamento com a sequência de referência NM 000242.2 (Figura 8). Todas as amostras avaliadas não apresentam mutação e por isso pertencem ao alelo A. Entretanto, em duas amostras, não foi possível sequenciar a região de polimorfismo.

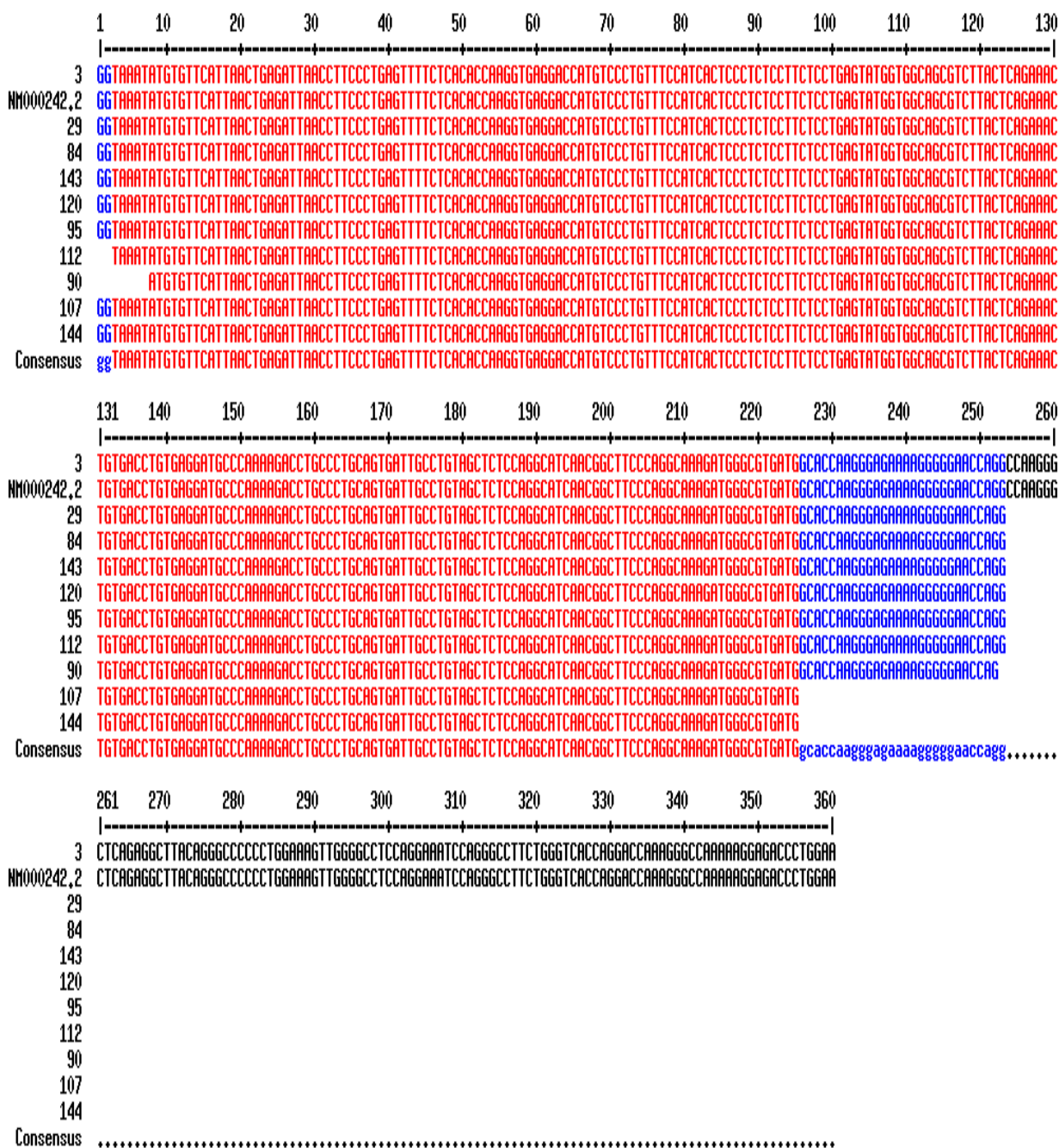


Figura 8: Alinhamento das sequências obtidas com a de referência para o gene *mbi2*. O alinhamento e análise das sequências foram feitos pela utilização do programa MEGA4 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Os números 3, 14, 29, 143 e 144 representam as amostras positivas e os números 84, 90, 95, 107, 112 e 120 as amostras negativas para a infecção por *C. trachomatis*. **NM000242.2:** sequência de referência.

5 DISCUSSÃO

Chlamydia trachomatis é o principal patógeno bacteriano de transmissão sexual, responsável por infecções que podem ter consequências graves, como infertilidade, gravidez ectópica e doença inflamatória pélvica (DIP). Um aspecto importante e comum da infecção por *C. trachomatis* no trato reprodutivo feminino é a ausência de sintomas clínicos identificáveis (SZILLER *et al.*, 2007). A prevalência dos casos assintomáticos é de 1,6 a 19,0% (LAN *et al.*, 1995) e variam com a população avaliada e a técnica de diagnóstico (KOURI *et al.*, 2002). Entretanto, existem estudos indicando que até 70% das mulheres infectadas podem permanecer assintomáticas (NELSON *et al.*, 2001).

No Brasil estas infecções são pouco estudadas e avaliadas, mas sabe-se que a sua prevalência pode alcançar 20% em populações atendidas em postos de referência para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (LIMA *et al.*, 2007). Apesar desta alta prevalência a interação da bactéria com o sistema imune é pouco investigada, especialmente sua interação com o sistema do complemento, um importante componente do sistema imune inato.

A presença de um sistema imune efetivo é primariamente importante para evitar e minimizar os efeitos decorrentes das infecções por *C. trachomatis*, bem como de outros patógenos parasitas do trato genital feminino. A presença de infecções assintomáticas e infecções recorrentes, comuns também a outros patógenos, como *Candida albicans* (GIRALDO *et al.*, 2007), no trato genital feminino, representa um sério problema de saúde pública (BRUNHAM; REYLADINO, 2005), sendo importante compreender os mecanismos de defesa envolvidos na interação parasita-hospedeiro.

Durante a infecção por *C. trachomatis*, a barreira mucosa do trato genital provê a primeira linha de defesa do hospedeiro (ROAN; STARNBACH, 2008). Células epiteliais e células do sistema imune inato, tais como macrófagos, neutrófilos e células NK, possuem PRRs (*Pattern recognition receptors*) capazes

de reconhecer e se ligar a padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) encontradas em *C. trachomatis* (HARTOG; MORRÉ; LAND, 2006), e de iniciar uma resposta imune.

As moléculas do sistema do complemento são um dos principais componentes da resposta imune inata. A lectina ligadora de manose, um dos componentes do sistema do complemento e parte do sistema imune inato, constitui, também, uma importante linha de defesa contra micro-organismos. A MBL, ao se ligar à principal proteína de membrana externa (MOMP) de *C. trachomatis* é capaz de ativar o sistema do complemento e de impedir a entrada da bactéria nas células hospedeiras (SWANSON *et al.*, 1998; SZILLER *et al.*, 2007; ROAN; STARNBACH, 2008).

Alguns autores sugerem que o desencadeamento da via das lectinas possa ter grande importância nas infecções por Chlamydiaceae uma vez que esta proteína é a principal responsável pela resposta imune nas primeiras horas e primeiros dias após a infecção, antes que a bactéria se instale no interior das células hospedeiras (TURNER, 2003; HARTOG; MORRÉ; LAND, 2006; ROAN; STARNBACH, 2008).

Uma vez que as bactérias da família Chlamydiaceae apresentam resíduos de manose em sua parede celular considerou-se a hipótese de os diferentes quadros clínicos decorrentes da infecção pela bactéria estarem relacionados a polimorfismos do gene da lectina ligadora de manose.

Mulheres positivas e negativas para a infecção por *C. trachomatis*, após PCR para a amplificação de sequência do gene *ompA*, sua principal proteína de superfície (WIEDBRAUK; WERNER; DREVON, 1995; VERKOOYEN *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2007), foram utilizadas neste estudo. Amostras endocervicais de 11 mulheres, foram submetidas à PCR direcionada à amplificação de um fragmento de 349 pb do gene da *mbI2* humano para a pesquisa de polimorfismos neste gene (Figura 7). Em todas as amostras testadas, a PCR para *mbI2*, nas condições descritas, amplificou um fragmento de 349 pb, que pôde ser posteriormente utilizado para sequenciamento.

Para a verificação de uma melhor metodologia de obtenção de produto de DNA amplificado por PCR, três diferentes técnicas foram utilizadas. Estas metodologias de purificação apresentaram diferenças na concentração final do DNA obtido (Tabela 2). Na técnica de purificação utilizando o acetato de sódio, não foi possível dissolver o gel de agarose em banho-maria, inviabilizando o uso desta metodologia. A purificação com isopropanol e etanol consiste em uma metodologia rápida e barata, mas não muito eficaz se comparada à purificação com o *kit Wizard SV Genomic DNA*. Neste, o DNA purificado em solução é concentrado e precipitado com isopropanol. O DNA purificado com este sistema é adequado para uma variedade de aplicações, e apesar de ter um custo mais elevado, o seu uso proporcionou obtenção de cerca de 50 ng/ μ L do produto amplificado por PCR.

Com o objetivo de padronizar a quantidade de DNA purificado a ser utilizado na reação de sequenciamento, foram feitas reações com 2,5 e 5,0 μ L para todas as amostras testadas. Após sequenciamento e análise das seqüências, foi possível observar que o sequenciamento realizado com 2,5 μ L de DNA apresentou maior qualidade, sendo possível obter seqüências maiores, se comparado às reações feitas com 5,0 μ L. Uma grande quantidade de DNA na amostra a ser sequenciada pode inviabilizar a passagem do DNA pelos capilares no sequenciador automático, prejudicando a leitura das bases.

O objetivo de nosso trabalho é a investigação de uma relação entre os polimorfismos do gene *mb12* associados às diferentes formas de manifestação da infecção por *C. trachomatis*. Esta bactéria possui 19 genótipos e a manifestação da infecção em mulheres pode permanecer assintomática – na maioria dos casos – ou variar de infecções endocervicais leves a quadros clínicos graves como doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e a infertilidade.

Desde 1989, quando o primeiro estudo feito por Super e colaboradores demonstrou que existia uma associação entre baixos níveis de MBL e infecções por diversos patógenos, vários trabalhos têm sido publicados sobre a relação entre a deficiência da MBL, gerada por polimorfismos no gene, e o aumento da

susceptibilidade a diferentes infecções. Estes trabalhos chamam a atenção para uma possível influência da lectina ligadora de manose na ausência de sinais e sintomas (as infecções assintomáticas) e na recorrência de infecções no trato reprodutivo feminino. Como exemplo, citamos a recorrência de vaginoses bacterianas, causadas por *Gardnella vaginalis* e de candidíase vulvovaginal já demonstradas estarem diretamente associadas ao polimorfismo no códon 54 do gene *mbI2*, de acordo com o estudo feito por GIRALDO *et al.* (2007) em mulheres brasileiras. Da mesma forma, BABULA *et al.* (2003) e LIU, LIAO e LIU (2006), apontam a possível relação da presença do alelo B em mulheres com infecção recorrente por *C. albicans*.

Em nosso trabalho, a determinação de polimorfismos no gene *mbI2* foi realizada após o sequenciamento do fragmento amplificado. A investigação da existência de alelos A, B, C e D foi realizada pelo alinhamento das sequências obtidas com a sequência de referência NM000242.2 (Figura 8). O sequenciamento do gene *mbI2* de mulheres infectadas e não infectadas por *C. trachomatis* revelou que cerca de 100% das amostras testadas não possuem nenhuma mutação (Figura 8). Assim, nestas amostras, não foram observados polimorfismos nos códons 54, 52 e 57 do gene. Entretanto, em duas amostras, não foi possível sequenciar a região do gene responsável pelo polimorfismo. Um novo sequenciamento destas duas amostras deve ser feito. Ressalta-se que o número de amostras testadas é baixo, não apresentando significância do ponto de vista estatístico para uma correlação entre a presença de polimorfismos em mulheres infectadas ou não por *C. trachomatis*. Desta forma, o posterior aumento do número de amostras testadas pode ajudar em um prognóstico para uma maior ou menor susceptibilidade e para uma evolução da infecção por *C. trachomatis*, uma vez que a presença das mutações, principalmente no códon 54, pode estar relacionada à cronicidade e recorrência de infecções no trato reprodutivo feminino (BABULA *et al.*, 2003; GIRALDO *et al.*, 2007; SZILLER *et al.*, 2007). Além disso, como a função da MBL está diretamente associada a sua concentração sérica, a pesquisa desta concentração, nas amostras testadas para a pesquisa do gene *mbI2* também seria representativa, uma vez que uma

maior concentração da proteína está diretamente relacionada ao alelo selvagem (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

O alelo selvagem A, de acordo com o estudo de De Seta e colaboradores (2007) esteve presente respectivamente, em 78% das pacientes com vaginose bacteriana e 77% do grupo controle. Milanese e colaboradores (2008), utilizando a técnica de sequenciamento do éxon 1 do gene *mbi2*, obteve maior porcentagem do genótipo A/A nas pacientes pesquisadas. Vallinoto *et al.* (2009) demonstra que a maioria dos pacientes infectados ou não pelo HCV na região Amazônica brasileira são homozigotos para o alelo A do gene da *mbi2*.

Com relação à interação com outros agentes agressores, vários estudos mostram que, além de *C. trachomatis*, polimorfismos no gene *mbi2* parecem apresentar relação com infecções por diferentes micro-organismos, como *Chlamydomphila pneumoniae*, *C. albicans*, HBV, HCV e HIV-1. Estudos feitos por NAGY *et al.* (2003) e WANG *et al.* (2007) indicam o papel dos alelos variantes do gene *mbi2* na susceptibilidade à asma em crianças e em adultos infectados por *C. pneumoniae*. A maioria dos estudos que envolvem o vírus da hepatite B (HBV) propõe uma relação entre a presença de polimorfismos, que conferem um menor nível da proteína MBL, e uma maior susceptibilidade à aquisição e persistência do vírus HBV no hospedeiro (BROWN *et al.*, 2007). Também na hepatite C resultados obtidos por Segat *et al.* (2007) demonstram a importância da MBL como uma molécula antiviral que confere proteção contra a infecção pelo HCV, uma vez que o alelo O foi mais freqüente nos pacientes infectados pelo vírus. A presença do alelo B, em pacientes infectados pelo vírus HIV-1, foi associada a um maior nível de carga viral plasmática, sugerindo a importância do polimorfismo no gene *mbi2* na evolução clínica do indivíduo infectado (ALVES *et al.*, 2004).

A deficiência no MBL, devido aos polimorfismos no gene, está presente em 20 a 40% da população mundial (TILL *et al.*, 2008) sendo que a freqüência de alelos mutantes é variável entre as diferentes etnias variando de 1 a 30% (TSUTSUMI; TAKAHASHI; SUMIDA, 2005). O alelo B ocorre em uma freqüência

de aproximadamente 25% em populações europeias, e o alelo C é raro nesta mesma população, mas em contrapartida, é comum em populações africanas (50-60%) (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; BROWN *et al.*, 2007). O alelo D possui uma frequência de aproximadamente 14% em europeus, mas pode ser ainda menos frequente em outros grupos.

Nosso objetivo é, em um prazo mais longo, investigar qualquer relação entre a infecção pelos 19 genótipos da bactéria e sua manifestação em diferentes quadros clínicos, inclusive em uma forma assintomática, importante fator de disseminação da bactéria. Análises futuras, que relacionem os polimorfismos e a presença de infecções por *C. trachomatis* são importantes no ponto de vista clínico, pois pode haver uma associação entre os alelos variantes e uma maior susceptibilidade e gravidade das infecções. Este conhecimento poderia ajudar no controle da infecção por esta bactéria.

A padronização da reação de purificação do produto amplificado do gene *mb12* humano e da técnica de sequenciamento das amostras clínicas testadas são, assim, etapas importantes neste processo de escolha de técnicas eficazes e confiáveis para a identificação de possíveis polimorfismos do gene.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização da reação de purificação do produto amplificado de um fragmento do gene do *mb12* humano para posterior sequenciamento constituiu a primeira etapa deste trabalho. A reação de purificação do produto de DNA pelo *kit Wizard SV Genomic DNA* (Promega) mostrou-se viável para o sequenciamento do gene *mb12* nas amostras testadas.

A técnica de sequenciamento mostrou-se eficaz para determinar a seqüência do gene *mb12* e suas três regiões que apresentam polimorfismo nas amostras testadas. Entretanto, tendo em vista o pequeno número de amostras, não foi possível estabelecer uma correlação entre os polimorfismos e a presença ou ausência da infecção por *C. trachomatis* na população estudada. Portanto, a continuação deste estudo é de extrema importância para a análise da relação entre a infecção por *C. trachomatis* e a presença de alelos variantes para o gene *mb12* humano.

Futuramente, dando continuidade a este trabalho, será pesquisada a presença de alelos variantes em indivíduos portadores de infecções causadas tanto por *C. trachomatis* quanto por *C. pneumoniae* em outras populações.

REFERENCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 566 p.

ALBRECHT, M.; SHARMA, C.M.; REINHARDT, R.; VOGEL, J.; RUDEL, T. Deep sequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome. **Nucleic Acids Research Advance Access published**, v.18,p.1-10, Nov. 2009.

ALVES, A.E.M.; da COSTA, M.R.M.; LOBATO, L.; FERNANDES, L.M.; AZEVEDO, V.N.; MOREIRA, M.R.C.; MACHADO, L.F.A.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A.C.R. O impacto do polimorfismo no gene mbl (*mannose-binding lectin*) na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). **Revista Científica da UFPA**, v.4, Abr. de 2005.

BABOVIC-VUKSANOVIC, D.; SNOW, K.; TEN, R.M. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency. Variant alleles in a midwestern population of the United States. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 2, n. 82, p. 134-138, Feb. 1999.

BABULA, O.; DANIELSSON, I.; SJOBERG, I.; LEDGER, W.J.; WITKIN, S.S. Altered distribution of mannose-binding lectin alleles at exon I codon 54 in women with vulvar vestibulitis syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 3, n. 191, p. 762-766, Sep. 2004.

BABULA, O.; LAZDANE, G.; KROICA, J.; LEDGER, W.J.; WITKIN, S.S. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. Brief Report, **Clinical Infectious Diseases**, n. 37, p. 733-737, Aug. 2003.

BEAGLEY, K.W.; HUSTON, W.M.; HANSBRO, P.M.; TIMMS, P. Chlamydial infection of immune cells: altered function and implications for disease. **Clinical Microbiological Infection**, v.15, p. 29-35. Jan.2009.

BÉBÉAR, C.; BARBEYRAC, B. Genital Chlamydia trachomatis infections. **FEMS Immunological Medical Microbiology**. v.55, p.162-166. Dec 2009.

BOHLSON, S.; FRASER, D.A.; TENNER, A.J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. **Molecular Immunology**, n. 44, p. 33-43, 2007.

BROWN, K.S.; RYDER, S.D.; IRVING, W.L.; SIM, R.B.; HICKLING, T.P. Mannan-binding lectin and viral hepatitis. **Immunology Letters**, n. 108, p. 34-44, Oct. 2006.

BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature Reviews, Immunology*, v. 5, n. 2, p. 149-161. Feb. 2005.

CASANOVA, J.L.; ABEL, L. Human Mannose-binding Lectin in Immunity: Friend, Foe, or Both? *Journal of Experimental Medicine*, n. 10, vol. 199, p. 1295-1299, May. 2004.

CHONG, W.P.; TO, Y.F.; Ip, W.K.; YUEN, M.F.; POON, T.P.; WONG, W.H.; LAI, C.L.; LAU, Y.L. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, v. 5, n.42, p. 1037-1045, Nov. 2005.

CORSARO, D.; GREUB, G. Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 2, p. 283-297, Apr. 2006.

COUtlÉE, F.; de LADURANTAVE, M.; TREMBLAY, C.; VINCELETTE, C.; LABRECQUE, J.; ROGER, M. An important proportion of genital samples submitted for *Chlamydia trachomatis* detection by PCR contain small amounts of cellular DNA as measured by beta-globin gene amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 7, p. 2512-1515, Jul. 2000.

DEBATISTA, J.; TIMMS, P.; ALLAN, J.; ALLAN, J. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Fertility and Esterility*, v. 79, n. 6, p. 1273-1287, Jun. 2003.

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

EISEN, D.P.; MINCHINTON, R.M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases, *Clinical Infectious Diseases*, v. 11, n. 37, p. 1496-1505, Dec. 2003.

ENTRICAN, G.; WATTEGEDERA, S.; ROCCHI, M.; FLEMING, D.C.; KELLY, R.W.; WATHNE, G.; MAGDALENIC, V.; HOWIE, S.E.M. Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera *Chlamydia/Chlamydophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n. 100, p. 179-186, 2004.

EVERETT, K.D.E; BUSH, R.M.; ANDERSEN, A.A. Emended description of the order chlamydiales, proposal of parachlamydiaceae fam.nov. and simkaniaceae fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, n. 49, p. 415-440, Apr. 1999.

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H. O.; KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Molecular Immunology**, n. 40, p. 73-84, 2003.

GARRED, P.; VOSS, A.; MADSEN, H.O.; JUNKER, P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Genes and Immunity**, v. 2, n. 8, p. 442-450, Dec. 2001.

GARRED, P.; MA, C.H.Y.; MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHOJ, T. *MBL2*, *FCN1*, *FCN2* and *FCN3*—The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 46, p.2737–2744. Jun, 2009.

GIRALDO, P. C.; BABULA, O.; GONÇALVES, A.K.S.; LINHARES, I.M.; AMARAL, R.L.; LEDGER, W.J.; WITKIN, S.S. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 109, n.5, p. 1123-1127, May. 2007.

GULATI, S.; SASTRY, K.; JENSENIUS, J. C.; RICE, P.A.; RAM, S. Regulation of the mannan-binding lectin pathway of complement on *Neisseria gonorrhoeae* by C1-inhibitor and α_2 -macroglobulin. **The Journal of Immunology**, n.168, p. 4078-4086, Feb. 2002.

HARTOG, J.E. den; MORRÉ, S.A.; LAND, J.A. *Chlamydia trachomatis* – associated tubal factor subfertility: immunogenetic aspects and serological screening. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 719-730, Jul. 2006.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. Collectins and Ficolins: Humoral Lectins of the Innate Immune Defense. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 547-578, Jan. 2003.

HORNE, A.W.; STOCK, S.; KING, A.E. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. **Reproduction**, n. 135, p. 739-749, Mar. 2008.

HYBISKE, K.; STEPHENS, R. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11430-11435, Apr. 2007.

IWAKI, D.; KANNO, K.; TAKAHASHI, M.; ENDO, Y.; LYNCH, N.J.; SCHWAEBLE, W.J.; MATSUSHITA, M.; OKABE, M.; FUJITA, T. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. **The Journal of Immunology**, n. 177, p. 8626-8632, Sep. 2006.

JACK, D.L.; READ, R.C.; TENNER, A.J.; FROSCHE, M.; TURNER, M.W.; KLEIN, N.J. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B, **Journal of Infectious Diseases**, n. 184, p. 1152-1162, 2001.

LIU, F.; LIAO, Q.; LIU, Z. Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 92, p. 43-47. 2006.

KLEIN, N.J. Mannose-binding lectin: do we need it? **Molecular Immunology**, n. 42, p. 919-924, Jan. 2005.

KOURI, V.; CARTAYA, J.; RODRÍGUEZ, M.E.; MUNÉ, M.; SOTO, Y.; RESIK, S.; BRAVO, J.; Llop, A. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in human immunodeficiency virus-infected women in Cuba. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1073-1077, Dec. 2003.

KRARUP, A.; SKOV SØRENSEN, U.B.; MATSUSHITA, M.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin and H-ficolin. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 02, p. 1052-1060, Feb., 2005.

LAN, J.; MELGERS, I.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M.; ROOSENDAAL, R.R.; BURGUER, C.; BLEKER, O.P.; BRULE, A.J.C. Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n. 12, p. 3194-3197, Dec. 1995.

LEMANSKE, R.F. Jr. Is asthma an infectious disease? Thomas A. Neff lecture. **Chest**, n. 123, 385S-390S, Mar. 2003.

LIMA, H.E; OLIVEIRA, M.B.; VALENTE, B.G.; AFONSO, D.A.F.; DaROCHA, W.D; SOUZA, MCM.; ALVIM, T.C.; STANCIOLI-BARBOSA ,E.F.; NORONHA, F.S.M. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 9, n. 34, p. 709-717, Sep. 2007.

LISCOMBE, R.J.; SUMIYA, M.; HILL, A.V.; LEVINSKY, R.J.; SUMMERFIELD, J.A.; TURNER, M.W. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Human Molecular Genetics**, v. 1, n. 9, p. 709-715, Dec. 1992.

LOOMIS, W.P.; STARNBACH, M.N. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. **Current Opinion in Microbiology**, n. 5, p. 87-91, 2002.

MADICO, G., QUINN, T.C., BOMAN, J., GAYDOS, C.A. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, C.

pneumoniae, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 38, p. 1085-1093, Mar. 2000.

MADSEN, H.O.; GARRED, P.; KURTZAHALS J.A.L.; LAMM, L.U.; RYDER, L.P.; THIEL, S. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, n. 40, p. 37-44, 1994.

MAHONY, J.; CHONG, S.; JANG, D.; LUINSTRA, K.; FAUGHT, M.; DALBY, D.; SELLORS, J. CHERNESKY, M. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3122-3126. Nov. 1998.

MALHOTRA, R.; LU, J.; HOLMSKOV, U.; SIM, R.B. Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. In: 5th European Meeting on Complement in Human Disease, **Les Diablerets**, Switzerland, 9-12 Sep. 1994.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. **Journal of Immunology**, n. 164, p. 2281-2284, Mar. 2000.

MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; OHTA, Y.; IWATA, K.; MATSUMOTO, M.; NAKAO, K.; KANAI, K.; YOSHIDA, N.; BABA, K.; MISHIRO, S. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. **Archives of Virology**, v. 4, n. 143, p.645-651, 1998.

McGREAL, E.; GASQUE, P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. **Biochemical Society Transaction**, v. 30, parte 6, p.1010-1014, Jun. 2002.

MPIGA, P.; RAVAOARINORO, M. *Chlamydia trachomatis* persistence: an update. **Microbiological Research**, n. 161, p. 9-19, Apr. 2005.

MILANESE, M.; SEGAT, L.; SETA, F.; PIRULLI, D.; FABRIS, A.; MORGUTTI, M.; CROVELLA, S. MBL2 Genetic Screening in Patients with Recurrent Vaginal Infections. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 146-151, 2008.

MIYASHITA, N. *Chlamydia pneumoniae* infections. **Kekkaku**, v. 9, n. 81, p. 581-588, Sep. 2006.

MORRÉ, S.A., ROOZENDAAL L., van VALKENGOED, I.G.M., Boeke, A.J.P., van VOORST Vader, P.C. & van de BRULE, A.J.C. Urogenital *Chlamydia*

trachomatis serovars in men and women with symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestation? **Journal of Clinical Microbiology**, n. 38, p. 2292-2296, 2000.

NAGY, A.; KOZMA, G.T.; KESZEI, M.; TRESZLI, A.; FALUS, A.; SZALAI, C. The development of asthma in children infected with *Chlamydia pneumoniae* is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, n. 112, p. 729-734. Out. 2003.

NELSON, H.D.; HELFAND, M. Screening for chlamydial infection. **American journal of preventive medicine**, v. 3, p. 95-107. Apr. 2001.

NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S.S. The role of heat proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149-159. Apr. 2000.

OHLENSCHLAEGER, T.; GARRED, P.; MADESEN, H.O.; JACOBSEN, S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, v. 3, n. 351, p. 260-267, Jul. 2004.

RANTALA, A.; LAJUNEN, T.; JUVONEN, R.; BLOIGU, A.; SILVENNOINEN-KASSINEN, S.; PEITSO, A.; SAIKKU, P.; VAINIO, O.; LEINONEN, M. Mannose-binding lectin concentrations, MBL2 polymorphisms, and susceptibility to respiratory tract infections in young men. **The Journal of Infectious Diseases**, v.15, p. 1247-1253. Oct. 2008.

ROAN, N.R.; STARNBACH, M.N. Immune-mediated control of Chlamydia infection. **Cellular Microbiology**, n. 10, p. 9-19, 2008.

ROITT, I.M. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 182 p.

RUGONFALVI-KISS, S.; ENDRÉSZ, V.; MADSEN, H.O.; BURIÁN, K.; DUBA, J.; PROHÁSZKA, Z.; KARÁDI, I.; ROMICS, L.; GÖNCZÖL, E.; FÜST, G.; GARRED, P. Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. **Circulation**, n. 106, p. 1071-1076, Jun. 2002.

SEGAT, L.; VASCONCELOS, L.R.S.; MELO, F.M.; SILVA, B.S; ARRAES, L.C.; MOURA, P.; CROVELLA, S. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. **Clinical Immunology**, v. 124, p. 13-17. Apr. 2007.

SIM, R.B.; TSIFTSOGLU, S.A. Proteases of the complement system. **Biochemical Society Transactions**, v. 12, parte 1, 2004.

SINGH, V., SALHAN, S., das, B.C.; MITTAL, A. Predominance of *Chlamydia trachomatis* serovars associated with urogenital infections in female in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 41, p. 2700-2702, 2003.

SRIAM, S., YAO, S.Y., STRATTON, C., CALABRESI, P., MITCHELL, W., IKEJIMA, H., YAMAMOTO, Y. Comparative study of the presence of *Chlamydia pneumoniae* in cerebrospinal fluid of Patients with clinically definite and monosymptomatic multiple sclerosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 9, p. 1332-1337, Nov. 2002.

STEVENS, M.P.; TAN, S.E.; HORVATH, L.; FAIRLEY, C.K.; GARLAND, S.M.; TABRIZI, S.N. Absence of a *Chlamydia trachomatis* variant, harbouring a deletion in the cryptic plasmid, in clients of a sexually transmissible infection clinic and antenatal patients in Melbourne. **Communicable Diseases Intelligence**, v.32, n.1, p. 77-81. Mar. 2008.

STOTHARD, D.R.; WILLIAMS, J.A.; VAN DER POL, B.; JONES, R.B. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 6010-6013. Dec. 1998.

SZILLER, I.; BABULA, O.; UJHÁZY, A., NAGY, B.; HUPUCZI, P.; PAPP, Z.; LINHARES, I.M.; LEDGER, W.J.; WITKIN, S.S. *Chlamydia trachomatis* infection, Fallopian tube damage and a mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism. **Human Reproduction**, v. 22, n. 7, p. 1861-1865, May. 2007.

SWANSON, A.F.; EZEKOVITZ, R.A.B.; LEE, A.; KUO, C. Human mannose-binding protein inhibits infection of HeLa cells by *Chlamydia trachomatis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1607-1612, Apr. 1998.

SWANSON, A.F.; KUO, C.C. Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 59, p. 2120-2125, Jun. 1991.

SWIERZKO, A. St.; FLOREZAK, K.; CEDIZYNSKI, M.; SZEMRAJ, J.; WYDRA, D; ROMANISZYN, L. Bak; EMERICH, J.; SUTOWSKA, Z. Mannan-binding lectin (MBL) in women with tumors of the reproductive system. **Cancer Immunology Immunother**, n. 56, p. 959-971, Nov. 2006.

TAKAHASHI, R.; TSUTSUMI, A.; OHTANI, K.; MURAKI, Y.; GOTO, D.; MATSUMOTO, I.; WAKAMIYA, N.; SUMIDA, T. Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 2, n. 64, p. 311-314, Feb. 2005.

THIEL, S.; PETERSEN, S.V.; VORUP-JENSEN, T.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T.; STOVER, C.M.; SCHWAEBLE, W.J.; JENSENIUS, J.C. Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein Map19. **The Journal of Immunology**, n. 165, p. 878-887, May. 2000.

THIEL, S.; KOLEV, M.; DEGU, S.; STEFFENSEN, R.; HANSEN, AG.; RUSEVA, M.; JENSENIUS, J.C. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. **Journal of Immunology**, v.5, p. 2939-2947. Mar. 2009.

THIO, C.L.; MOSBRUGER, T.; ASTEMBORSKI, J.; GREER, S.; KIRK, G.D.; O'BRIEN, S.J.; THOMAS, D.L. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. **Journal of Virology**, v. 14, n. 79, p. 9192-9196, Jul. 2005.

TILL, J.W. van O.; MODDERMAN, P.W.; de BOER, M.; HART, M.H.L.; BELD, M.G.H.M.; BOERMESTER, M.A. Mannose – binding lectin deficiency facilitates abdominal *Candida* infections in patients with secondary peritonitis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n.1, Jan. 2008.

TSUTSUMI, A.; TAKAHASHI, R.; SUMIDA, T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. **Autoimmunity reviews**, n. 4, p. 364-372, Feb. 2005.

TURNER, M.W. The role of mannan-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, n.40, p. 423-429, Apr. 2003.

VALDIVIA, R.H. Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 53-59, Mar. 2008.

VALLINOTO, A.C.R.; SILVA, R.F.P.; HERMES, R.B.; AMARAL, I.S.A.; MIRANDA, E.C.B.M.; BARBOSA, M.S.B.; MOIA, L.J.P.; CONDE, S.R.S.; SOARES, M.C.P.; LEMOS, J.A.R.; MACHADO, L.F.A.; ISHAK, M.O.G. ISHAK, R. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are not associated with susceptibility to hepatitis C virus infection in the Brazilian Amazon region. **Human Immunology**, v. 70, p.754–757. Jun.2009.

VERKOOYEN, R.P.; NOORDHOEK, G.T.; KLAPPER, P.E.; REID, J.; SCHIRM, J.; CLEATOR, G.M.; IEVEN, M.; HODDEVIK, G. Reliability of nucleic acid amplification methods for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine: results of the first international collaborative quality control study among 96 laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p. 3013-3016. Jul. 2003.

WALLIS, Russell. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway, **Immunobiology**, n. 212, p. 289-299, Nov. 2006.

WIEDBRAUK, D.L.; WERNER, J.C.; DREVON, A.M. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2643-2646. Oct. 1995.

WIRA, C.R.; FAHEY, J.V.; SENTMAN, C.L.; PIOLI, P.A.; SHEN, L. Innate and adaptative immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 306-335, 2005.

WETERING, J.K. van de; GOLDE, L.M.G. van; BATENBURG, J.J. Collectins Players of the innate immune system, **European Journal of Biochemistry**, n. 271, p. 12229-1249, Feb. 2004.

WORTHLEY, D.L.; BARDY, P.G.; MULLIGHAN, C.G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Internal Medicine Journal**, n. 35, p. 548-555, May, 2005.