

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

MARÍLIA DE ALBUQUERQUE SENA

NÍVEIS DE MBL (LECTINA LIGANTE DE MANOSE) E POLIMORFISMOS NO
GENE *MBL2* E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE EM
LACTENTES

RECIFE

2021

MARÍLIA DE ALBUQUERQUE SENA

**NÍVEIS DE MBL (LECTINA LIGANTE DE MANOSE) E POLIMORFISMOS NO
GENE *MBL2* E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE EM
LACTENTES**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Coorientadora:

Dra. Priscila Mayrelle da Silva Castanha

Recife

2021

S474n Sena, Marília de Albuquerque.
Níveis de MBL (lectina ligante de manose) e polimorfismos no gene MBL2 e sua relação com a infecção pelo vírus dengue em lactentes / Marília de Albuquerque Sena. — Recife: [s.n.], 2021.
70 p. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientador: Luydson Richardson Silva Vasconcelos; coorientadora: Priscila Mayrelle da Silva Castanha.

1. Dengue. 2. Lactente. 3. Lectina Ligante de Manose. 4. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 5. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - métodos. 6. Reação em Cadeia da Polimerase - métodos. I. I. Vasconcelos, Luydson Richardson Silva. II. Castanha, Priscila Mayrelle da Silva. III. Título.

MARÍLIA DE ALBUQUERQUE SENA

**NÍVEIS DE MBL (LECTINA LIGANTE DE MANOSE) E POLIMORFISMOS NO
GENE *MBL2* E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE EM
LACTENTES**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 17/06/2021

BANCA EXAMINADORA



Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Rafael Dhalia

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão primeiramente à minha família: meus pais, Glória e Marinaldo, pelo amor e suporte incondicional. Por sempre entenderem minhas ausências e por sempre acharem que sou a melhor naquilo que eu faço – mesmo que eu definitivamente esteja longe de ser. Minhas irmãs – em especial ao amor da minha vida, minha pequena Maysa, que já nem é tão pequena assim. Às minhas tias, tios, primas e primos, por sempre demonstrarem sentir orgulho, mesmo que não entendam muito bem o que faço.

Aos meus amigos. Os biomédicos: as memórias dos nossos dias estão bem guardadas e são uma dose de alegria, quando lembro da fase boa que vivemos e que contribuiu tanto para meu crescimento.

Àqueles da vida, especialmente minhas duas companheiras de jornada Stela e Letícia, nossas perdas e nossas conquistas são compartilhadas, então compartilho esta aqui com vocês.

Àqueles do mestrado: foi um ano difícil para todos nós, mas poder contar com vocês fez toda a diferença. Vou sentir falta até de assistir aula e apresentar seminário com vocês, mas em breve nos encontraremos novamente em um novo caminho.

Àqueles do Lavite e além dele: eu nem sei o que seria de mim sem vocês! Não só durante o mestrado, mas desde que entrei como estudante de iniciação científica. Bia, meu braço direito e esquerdo, meu ouvido, e às vezes até meu cérebro também. Sou muito grata por poder compartilhar as alegrias e dores contigo. Bruno e Catarina, que trazem luz e leveza para os meus dias, mesmo que agora distantes. Elisa, Morganna e Armando, desde o início até aqui, vocês me ensinaram e ensinam muita coisa. Eu tenho muito orgulho de vocês e agradeço imensamente por tudo!

Também aos queridos Paulo, Thaíse, Renata, Diégina, Verônica, Dra. Marli e os demais integrantes do LaVite, mesmo os que já seguiram outro caminho: obrigada por todos os momentos compartilhados, seja naqueles momentos de café da manhã; seja no rodízio do almoço na copa seguido de um cafezinho que rendia conversa e um pouco de descontração no dia; seja em suporte técnico e ajuda para algum experimento. Eu sempre me senti acolhida e isso fez total diferença. Também ao Dr. Rafael França, por ter intercedido por mim nesse momento de pandemia.

Às minhas mentoras Dra. Cynthia Braga e Dra. Priscila Castanha, por me ensinarem tanto e acreditarem no meu potencial, e também por conduzirem tão bem nosso grupo, que a cada dia cresce mais. Ao meu orientador, Dr. Luydson Vasconcelos, por ser sempre tão generoso e ter aceitado embarcar nessa empreitada comigo.

Aos demais integrantes do grupo, em especial Iracema, Paula, Almerice e Yasmim, por sempre darem suporte e incentivo. Adoro trabalhar com vocês, espero que ainda venha muito trabalho pela frente!

Ao Instituto Aggeu Magalhães, por todo o suporte para que tivéssemos a melhor experiência acadêmica possível – mesmo em tempos de pandemia.

“Todas as coisas encontram o seu lugar quando encontramos o nosso.”

Santo Agostinho

SENA, Marília de Albuquerque. **Níveis de MBL (lectina ligante de manose) e polimorfismos no gene *MBL2* e sua relação com a infecção pelo vírus dengue em lactentes.** 2021. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

A dengue é uma infecção arboviral causada por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV1-4) e resulta em um amplo espectro clínico, que vai desde um quadro febril auto-limitante até as formas mais severas da doença. Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas da dengue são multifatoriais e não mutuamente exclusivos. Em lactentes, a imunidade inata desempenha um papel central no controle das infecções virais, antes do estabelecimento da imunidade adaptativa. A lectina ligante de manose (MBL), uma proteína essencial da imunidade inata, parece ter um papel crucial nas infecções por DENV. Polimorfismos de base única (SNPs) no gene *MBL2*, que estão associados a níveis reduzidos da MBL, podem influenciar na susceptibilidade e severidade da dengue. Estudos recentes têm explorado o papel desses SNPs e dos níveis de MBL nas infecções por dengue, mas tais estudos ainda são escassos e controversos, especialmente na população pediátrica. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de SNPs no *MBL2* e níveis da MBL nas infecções por dengue em lactentes. O estudo incluiu lactentes com dengue sintomática (n=29), assintomática (n=17) e controles *naïves* (n=84). A dosagem de MBL foi realizada através de ELISA *in house* e os polimorfismos no gene *MBL2* foram determinados através de PCR em tempo real. Os níveis basais e capacidade de ligação da MBL foram menores nos lactentes infectados pelo DENV do que nos controles ($p < 0,0001$). Encontramos associação entre o alelo X (OR: 2,16; 95% IC: 1,12-4,19; $p=0,019$) e genótipo YX (OR: 2,70; 95% IC: 1,20-5,71; $p=0,015$) com o risco de dengue nos lactentes. Em contraste, o alelo O (OR: 0,41; 95% IC: 0,21-0,77; $p=0,006$) e genótipo AO (OR: 0,45; 95% IC: 0,23-0,91; $p=0,021$) foram mais frequentes no controle e associados à proteção. Juntos, esses dados sugerem que níveis altos a intermediários de MBL parecem ser protetores contra a infecção por DENV em lactentes até os dois anos de idade.

Palavras-chave: Dengue; Lactente; Lectina Ligante de Manose; Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

SENA, Marília de Albuquerque. **MBL (mannose-binding lectin) levels and polymorphisms in the *MBL2* gene and their relationship with dengue virus infection in infants.** 2021. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology and Biosciences in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

ABSTRACT

Dengue is an arboviral infection caused by one of the four serotypes of the dengue virus (DENV1-4) and results in a broad clinical spectrum, ranging from a self-limiting febrile condition to more severe forms of the disease. The immunopathogenic mechanisms involved in the development of the clinical manifestations of dengue are multifactorial and not mutually exclusive. In infants, innate immunity plays a central role in limiting viral infections before the establishment of adaptive immunity. Mannose-binding lectin (MBL), an essential protein of the innate immune system, appears to play a crucial role in DENV infections. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *MBL2* gene, which are associated with reduced serum levels of MBL, can influence dengue susceptibility and severity. Recent studies have explored the role of these SNPs and MBL levels in dengue infections, but such studies are still scarce and controversial, especially in the pediatric population. This work aimed to evaluate the influence of MBL SNPs and serum levels on dengue infections in infants. The study included infants with symptomatic (n=29) and asymptomatic (n=17) dengue infection and *naïve*-control infants (n=84). Measurement of MBL levels was carried out by ELISA *in house* assays and the polymorphisms in the *MBL2* gene were determined through real-time PCR. MBL basal levels and binding capacity were lower in infants infected with DENV than in controls (p<0.0001). We found an association between the X allele (OR: 2.16; 95% CI: 1,12-4,19; p=0.019) and YX genotype (OR: 2.70; 95% CI: 1,20-5,71; p=0.015) with risk of dengue in infants. In contrast, the O allele (OR: 0.41; 95% CI: 0,21-0,77; p=0.006) and the AO genotype (OR: 0.45; 95% IC: 0,23-0,91; p=0.021) were more frequent in the control group and associated with protection. Together, these data suggest that high to intermediate levels of MBL seems to be protective against DENV infection in infants up to two years of age.

Key-words: Dengue; Infant; Mannose-Binding Lectin; Single Nucleotide Polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Padrão endêmico da dengue.....	17
Figura 2 – Genoma do vírus dengue	18
Figura 3 – Mecanismos imunológicos envolvidos na imunopatogênese da dengue	24
Figura 4 – Estrutura da MBL	29
Figura 5 – Organização do gene <i>MBL2</i> e suas variantes.....	31
Gráfico 1 – Comparação dos níveis de MBL entre lactentes infectados por DENV e lactentes não-infectados.....	47
Gráfico 2 – Correlação entre idade e níveis séricos de MBL dos lactentes incluídos no estudo	48
Gráfico 3 – Níveis de MBL sérica e capacidade de ligação nas amostras pareadas	49
Gráfico 4 – Níveis de MBL sérica e capacidade de ligação de MBL de acordo com a classificação dos haplótipos do gene <i>MBL2</i>	50
Gráfico 5 – Níveis de MBL sérica e capacidade de ligação da MBL de acordo com os haplótipos, estratificado por casos e controles	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	<i>Antibody-dependent Enhancement</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CRD	Domínio C-terminal de ligação a carboidrato
DENV	Vírus dengue
DF	Febre da dengue
DHF	Febre hemorrágica da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Síndrome do choque da dengue
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fc γ R	Receptor Fc gamma
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMIP	Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira
JEV	Vírus da encefalite japonesa
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i>
MBL	Lectina ligante de manose
<i>MBL2</i>	Gene que codifica a MBL
NS1	Proteína não-estrutural 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas
RNA	Ácido ribonucleico
RRP	Receptor de reconhecimento padrão
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SNP	Polimorfismo de base única
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Epidemiologia da dengue no brasil	16
2.2	Transmissão e biologia do vírus dengue	18
2.3	Manifestações clínicas da dengue em crianças e lactentes	20
2.4	Resposta imune ao DENV e patogênese	21
2.5	O sistema complemento nas infecções por DENV	26
2.6	Lectina ligante de manose (MBL)	28
2.6.1	Estrutura molecular e função da MBL	28
2.6.2	Genética da MBL e níveis séricos da proteína	30
2.6.3	Papel da MBL nas infecções por DENV	33
3	JUSTIFICATIVA	36
4	OBJETIVO GERAL	37
4.1	Objetivos objetivos	37
5	METODOLOGIA	38
5.1	População de estudo	38
5.2	Desenho do estudo	38
5.3	Procedimentos laboratoriais	39
5.3.1	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	39
5.3.1.1	<i>MBL sérica</i>	40
5.3.1.2	<i>Capacidade de ligação</i>	40
5.3.2	Extração de DNA e ensaios de genotipagem	41
5.4	Análises estatísticas	41
5.5	Considerações éticas	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Características clínicas dos lactentes incluídos no estudo	43
6.2	Dosagem sérica e capacidade de ligação da MBL	44
6.3	Determinação dos polimorfismos no gene <i>MBL2</i> e sua associação com a infecção por dengue em lactentes	46
6.4	Correlação entre os haplótipos do <i>MBL2</i> , níveis séricos e capacidade de ligação da MBL com a infecção por dengue nos lactentes	49
7	DISCUSSÃO	53

8 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IAM/FIOCRUZ	70

1 INTRODUÇÃO

O vírus dengue (DENV) é um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, que inclui diversos arbovírus emergentes tais como os vírus Zika (ZIKV), Febre Amarela (YFV), Oeste do Nilo (WNV) e Encefalite Japonesa (JEV) (PIERSON; DIAMOND, 2020). A dengue é uma doença infecciosa de grande relevância para a saúde pública e está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. É transmitida a humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes Aegypti* (FARES et al., 2015; NUNES et al., 2019; WILDER-SMITH et al., 2019).

O DENV possui quatro sorotipos (DENV1-4) que são antigenicamente similares, mas que resultam em uma resposta imunológica heterotípica (GUZMAN; HARRIS, 2015; HALSTEAD, 2019). As infecções pelo DENV apresentam um amplo espectro clínico. A maior parte dos casos são assintomáticas ou cursam com quadro febril agudo auto-limitante, enquanto uma pequena parcela dos infectados evoluem para as formas mais severas. A dengue grave constitui uma importante causa de mortalidade e morbidade em crianças e adultos, especialmente em países da Ásia e América Latina (CLAPHAM et al., 2015; L'AZOU et al., 2016; WANG et al., 2020).

Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos no desenvolvimento das formas mais severas da dengue são multifatoriais e envolvem fatores relacionados à virulência da cepa viral, fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro (COSTA et al., 2013; GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013; SUWANMANEE; LUPLERTLOP, 2017). Um desses fatores é a presença de imunidade prévia a um dos sorotipos do DENV, que está diretamente relacionada a um mecanismo imunológico conhecido como *Antibody dependent-enhancement* (ADE) (HALSTEAD, 1979, 2014; KATZELNICK et al., 2017). O fenômeno do ADE ocorre pela presença de anticorpos anti-DENV que reconhecem a partícula viral e facilitam sua entrada na célula hospedeira, propiciando um aumento no número de células infectadas (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013).

Estudos recentes demonstram evidências do papel do ADE no desenvolvimento de dengue grave em infantes durante uma infecção primária. Postula-se que anticorpos antidengue materno-transferidos desempenhem um papel imunoprotetor durante os primeiros meses de vida do infante, mas que declinam a níveis subneutralizantes capazes de mediar o ADE do DENV (CHAU et al., 2009; KLIKS et al., 1988; SIMMONS et al., 2007; YAMANAKA et al., 2012). Porém, diferentemente do que ocorre nos países asiáticos, no Brasil a frequência de dengue grave em infantes nascidos de mães imunes a dengue é baixa nos primeiros anos de

vida (CASTANHA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2013). Essas diferenças sugerem que outros mecanismos possam estar envolvidos na determinação da dengue grave em infantes e que fatores imunológicos, tais como os componentes do sistema imune inato, devem ser considerados.

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro e desempenha um papel fundamental no curso de diversas doenças infecciosas, incluindo a dengue (COSTA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2009). Um dos seus principais componentes é o sistema complemento, formado por um conjunto de proteínas, que pode ser ativado por três vias: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. Esta última é iniciada através do reconhecimento de polissacarídeos presentes na superfície de patógenos por proteínas lectinas, especialmente a proteína ligante de manose (MBL) (CONDE et al., 2017; SHRESTA, 2012).

A MBL é uma proteína sérica que atua no reconhecimento e opsonização de patógenos, facilitando a sua fagocitose. Igualmente, a MBL ativa o sistema complemento pela via da lectinas de uma maneira independente de anticorpos (PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; TAKAHASHI; EZEKOWITZ, 2005). Dessa forma, em crianças, a MBL desempenha um papel central na proteção contra patógenos antes do estabelecimento da imunidade adaptativa (EISEN; MINCHINTON, 2003).

A deficiência de MBL é relativamente comum em várias populações e está associada a uma maior susceptibilidade à doenças infecciosas, especialmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos (EISEN; MINCHINTON, 2003; SUMMERFIELD et al., 1995; THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006; VEKEMANS et al., 2007). Os níveis de MBL são heterogêneos entre indivíduos e tendem a diminuir conforme se atinge a idade adulta. Essa heterogeneidade é parcialmente explicada pela presença de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) no gene *MBL2*, que codifica a MBL (GARRED et al., 2006). Polimorfismos no éxon 1, correspondentes às variantes D, B e C (códon 52, 54 e 57, respectivamente), têm sido associados com a redução dos níveis séricos e na atividade da MBL. Da mesma forma, polimorfismos na região promotora, que compreendem as substituições nas posições -550, -221 e +4, também podem levar à expressão diminuída da proteína (GARRED et al., 2006; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Estudos demonstram que a redução dos níveis de MBL, associada ao polimorfismos no *MBL2*, pode estar relacionada ao desenvolvimento de febre hemorrágica da dengue, sugerindo que níveis maiores de MBL constituem um fator de proteção à ocorrência de dengue grave (AVIRUTNAN et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2016; ORNELAS et al., 2019). No entanto,

os estudos acerca da influência dos polimorfismos e níveis de MBL na susceptibilidade a dengue, especialmente na população pediátrica, ainda são escassos e controversos.

Entre 2011 e 2014, Braga *et al.* (2016) realizaram um estudo prospectivo em uma área hiperendêmica para transmissão de dengue no Nordeste do Brasil, para investigar a incidência, os fatores de risco e a cinética de anticorpos anti-DENV materno-transferidos em crianças nos primeiros dois anos de vida. Embora tenha sido detectado uma alta incidência de infecção por dengue entre os lactentes da coorte, nenhum progrediu para dengue grave, ao contrário do que é observado em populações asiáticas (CASTANHA *et al.*, 2017). Posteriormente, o mesmo grupo, analisando estes lactentes, relataram que o fenômeno de ADE ocorria mais precocemente do que o observado na mesma faixa etária em populações asiáticas, através de ensaios *in vitro* (CASTANHA *et al.*, 2016).

Além disso, componentes da imunidade inata e a diversidade genética do indivíduo podem contribuir diretamente na suscetibilidade e gravidade da dengue nos lactentes. Dessa forma, a proposta deste estudo foi investigar a influência de polimorfismos no gene *MBL2* e níveis séricos da MBL e sua relação com infecção por DENV, em lactentes com diferentes formas clínicas da dengue, arrolados em uma coorte de nascimento e acompanhadas durante os primeiros dois anos de vida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

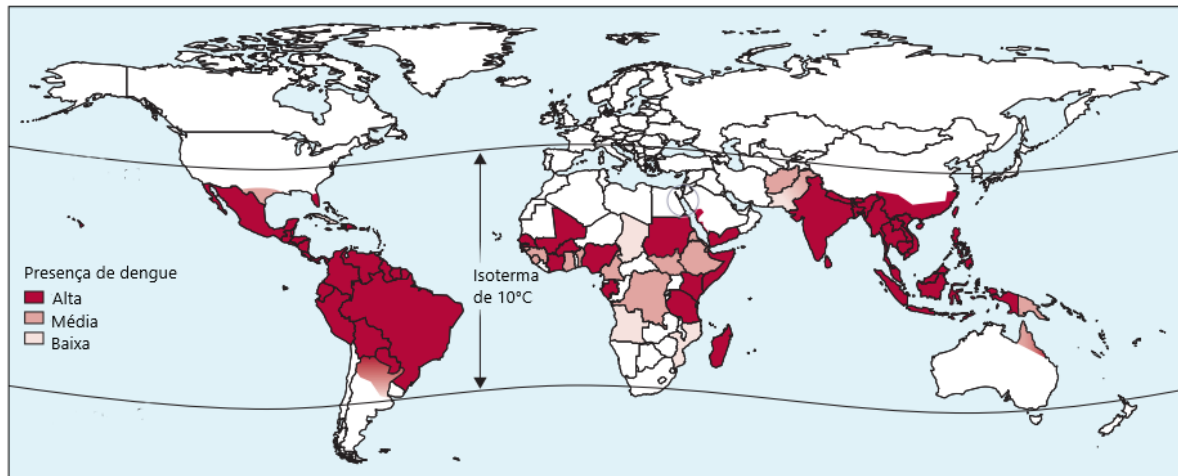
Os tópicos a seguir abordam aspectos relacionados a epidemiologia da dengue, do vírus e seus mecanismos de infecção. Também discorre sobre a resposta imune do hospedeiro frente à infecção, com foco no papel da MBL durante as infecções por dengue.

2.1 Epidemiologia da dengue no Brasil

A dengue está amplamente distribuída no mundo e é endêmica em mais de 100 países, com surtos já declarados em todos os continentes, incluindo Europa e América do Norte. Isso é um reflexo da rápida expansão do vetor *Aedes aegypti*, das condições climáticas e ambientais, bem como da elevada mobilidade urbana (DICK et al., 2012; FARES et al., 2015; WILDER-SMITH et al., 2019). A incidência de dengue foi estimada em cerca de 400 milhões por ano, dos quais apenas 25% dos casos foram infecções clinicamente aparentes (BHATT et al., 2013). Além disso, estima-se que aproximadamente 3.9 bilhões de pessoas estão em risco de contraírem infecção por dengue no mundo todo anualmente (DE AZEVEDO; LORENZ; CHIARAVALLI-NETO, 2020; MESSINA et al., 2019). Nas Américas, a dengue tem um padrão endêmico, como novos surtos ocorrendo em cada 3 a 5 anos (Figura 1) (DICK et al., 2012). Em locais não-endêmicos, viajantes infectados constituem um importante meio para transmissão autóctone, sendo a dengue uma das maiores causas de doença febril de caráter infectocontagioso em viajantes (WILDER-SMITH et al., 2019).

A introdução do DENV no Brasil data de 1845, quando o primeiro surto de dengue foi reportado no estado do Rio de Janeiro. Após campanhas de erradicação do mosquito *Aedes aegypti* para conter a epidemia de febre amarela, a epidemia de dengue foi contida, de forma que o vírus passou a circular novamente somente no final da década de 1970 (FARES et al., 2015). Em 1990, houve a introdução do DENV-2, no Rio de Janeiro, período em que ocorreram os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue (DHF) (FARES et al., 2015; HERINGER et al., 2017). Nos anos seguintes, DENV-1 e DENV-2 circularam concomitantemente, até que no final do ano 2000, o DENV-3 foi introduzido no país, ocasionando uma das mais severas epidemias de dengue, em 2002. Em Pernambuco, 120.000 casos foram reportados e uma incidência de 1.457 casos/100.000 habitantes (CORDEIRO et al., 2007). Com a circulação de todos os sorotipos do DENV, do ano 2000 até 2007, o Brasil sozinho foi responsável por mais de 60% dos casos de dengue reportados mundialmente (FARES et al., 2015).

Figura 1 – Padrão endêmico da dengue



Fonte: Guzman e Harris (2015, tradução nossa).

Em 2007-2008, o Brasil vivenciou a mais severa epidemia de dengue em questão de morbidade e mortalidade, além dos casos mais severos em crianças, devido a reemergência do DENV-2 (HERINGER et al., 2017). Em 2008, foram reportados de 632.680 casos de dengue, com um elevado número de hospitalizações e o maior número de casos de DHF até então registrados (FARES et al., 2015). Desde 2006 ocorria uma mudança do padrão epidemiológico da dengue e um aumento na incidência e gravidade dos casos da doença foi observado em crianças e adolescentes. Em 2008, a incidência de DHF entre crianças de 5-9 anos foi duas vezes maior do que o observado entre pessoas de 10–19 e 20–59 anos e mais de três vezes maior do que o observado entre pessoas com mais de 60 anos (CAVALCANTI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013).

Nos anos seguintes, o Brasil reportou importantes surtos de dengue, em 2010, 2013 e 2015. A última epidemia de grande importância no país ocorreu no ano de 2015, com mais de 1,6 milhões de prováveis casos e 986 mortes. Nesse período, todos os sorotipos circulavam no país, com a predominância de DENV-4 (FARES et al., 2015; NUNES et al., 2019). Todo o cenário da dengue no Brasil acumulou, em 30 anos de epidemias, mais de 11 milhões de casos suspeitos de dengue e mais de 5000 mortes confirmadas (NUNES et al., 2019). Nos últimos anos, a região Nordeste tem se destacado como uma das regiões com os maiores índices de casos e mortes por dengue no país. Entre 2013 e 2018, o Nordeste foi responsável por 18,1% do total de casos e 22,3% de mortes, sendo Pernambuco responsável por cerca de 20,1% e

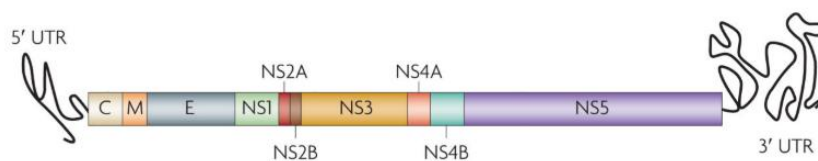
19,4% do total de casos prováveis e mortes registradas nesta região (DO NASCIMENTO et al., 2020).

2.2 Transmissão e biologia do vírus dengue

O vírus dengue está inserido na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui vírus de grande relevância para a saúde pública, como o vírus Zika (ZIKV), vírus da febre amarela (YFV), Oeste do Nilo (WNV) e encefalite japonesa (JEV) (PIERSON; DIAMOND, 2020). É transmitido a humanos principalmente através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes Aegypti* o principal vetor. A transmissão não-vetorial, apesar de menos comum, também pode ocorrer, como por exemplo, através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos (FARES et al., 2015; NUNES et al., 2019; WILDER-SMITH et al., 2019).

O DENV possui quatro sorotipos (DENV1-4) que são sorologicamente e antigenicamente distintos. É um vírus envelopado, de morfologia icosaédrica, com aproximadamente 50nm de diâmetro. Seu genoma é composto por RNA de fita simples, polaridade positiva, de ~11 kilobases (kb), que corresponde a uma fase de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) que codifica uma única poliproteína. A ORF é flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' UTR e 3' UTR) altamente conservadas entre os sorotipos do DENV que são fundamentais para tradução e replicação eficientes (TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). A poliproteína sofre um processo de clivagem por proteases virais e do hospedeiro, resultando em três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E); e sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 2) (GUZMAN; HARRIS, 2015; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; SIMMONS et al., 2012; WILDER-SMITH et al., 2019).

Figura 2 – Genoma do vírus dengue



Fonte: Guzman *et al.* (2010)

As proteínas não-estruturais são responsáveis por regular a transcrição e replicação viral, além de participarem da evasão à resposta imune do hospedeiro, enquanto as proteínas estruturais participam da montagem da partícula viral madura e do reconhecimento pela célula hospedeira. A proteína do capsídeo envolve o RNA viral formando o nucleocapsídeo, que está envolto por uma bicamada lipídica onde se depositam as proteínas E e M (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; WILDER-SMITH et al., 2019). A prM é clivada na rede trans de Golgi, promovendo a dissociação dos heterodímeros de prM/E na partícula viral imatura. Essa proteína atua como chaperona para a proteína E clivada, estabilizando-a e regulando a fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A proteína do envelope é bastante similar entre os flavivírus e possui 3 domínios (I, II e III) que estão interconectados. O domínio II está envolvido com a fusão do vírus com a célula e o III é um domínio semelhante à imunoglobulina, que contém os sítios de ligação aos receptores celulares e múltiplos determinantes antigênicos (CRILL; ROEHRIG, 2001; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Dessa forma, a proteína E tem um papel crucial tanto no reconhecimento e entrada do vírus na célula, quanto em elicitar a resposta imune do hospedeiro contra o vírus (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; WAHALA; SILVA, 2011).

Dentre as proteínas não-estruturais, destacam-se a proteína NS3 que atua, junto com seu cofator NS2B, como uma protease necessária para o processamento da poliproteína. A NS5 é a maior e mais conservada proteína entre as proteínas dos flavivírus e atua junto à NS3 na replicação, como uma polimerase e metiltransferase (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). A função da NS1 na replicação viral não está completamente elucidada, mas seu papel na evasão da resposta imune e, principalmente, na patogênese está bem caracterizada. A NS1 está expressa na superfície de células infectadas e também é secretada na sua forma solúvel no citoplasma (PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016a). Além disso, as proteínas não-estruturais têm um papel fundamental na inibição da resposta antiviral inata mediada por $IFN\alpha$, particularmente as proteínas NS2A, NS4A, NS4B e NS5 (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

2.3 Manifestações clínicas da dengue em crianças e lactentes

A inoculação do DENV no hospedeiro é seguida do período de incubação do vírus, que antecede o início dos sintomas e tem duração de aproximadamente de 4-7 dias (WILDER-SMITH et al., 2019). Após esse período, o indivíduo infectado pode vir a desenvolver os sinais e sintomas, que coincide com a fase virêmica da doença, ou seja, período em que o RNA do vírus pode ser detectado na amostra do paciente. A infecção pelo DENV apresenta um amplo espectro clínico, porém a maior parte das infecções são assintomáticas ou subclínicas. A dengue clássica caracteriza-se como uma doença febril autolimitante, podendo, em alguns casos, evoluir para formas mais graves (WHITEHORN; SIMMONS, 2011; WILDER-SMITH et al., 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu em 2009 uma nova classificação para a dengue, substituindo a tradicional febre da dengue (DF) e febre hemorrágica da dengue (DHF)/síndrome do choque da dengue (DSS) por dengue sem ou com sinais de alarme e dengue grave, a fim de facilitar a triagem e o manejo clínico desses pacientes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

A dengue sintomática é constituída por três fases: fase febril, fase crítica e a fase de recuperação. Na fase febril ocorre o início abrupto dos sintomas, que incluem febre alta, dores de cabeça e articulações, náusea, vômito e exantema. A maioria dos pacientes se recuperam após a fase febril, enquanto outros podem evoluir para a fase crítica durante a defervescência. Essa progressão da doença é marcada pelo aumento da permeabilidade vascular, com extravasamento de plasma que pode progredir para um quadro de choque, com ou sem sangramento (GUZMAN; HARRIS, 2015; WILDER-SMITH et al., 2019)

As manifestações clínicas da dengue normalmente diferem entre lactentes, crianças e adultos, especialmente na fase crítica da doença. Enquanto a frequência de dor de cabeça e mialgia é mais frequente em adultos, sintomas como coriza, náusea/vômito, dor abdominal e exantema são mais frequentes em crianças (HANAFUSA et al., 2008; KITTIGUL et al., 2007). De maneira geral, enquanto as manifestações hemorrágicas e a severidade do acometimento sistêmico são mais observadas na população adulta, o extravasamento plasmático e choque são mais frequentes e mais severos em crianças (HAMMOND et al., 2005; VERHAGEN; DE GROOT, 2014).

Em locais hiperendêmicos para a dengue, onde há maior força de transmissão, a dengue sintomática ocorre com maior intensidade na população pediátrica. Lactentes estão em risco de virem a desenvolver infecções secundárias ou terciárias, apesar da incidência de infecções sequenciais aumentar conforme a idade (ALERA et al., 2016; CASTANHA et al., 2013;

GORDON et al., 2013). Igualmente, a gravidade dos sintomas tem relação com a idade, de forma que lactentes estão mais propensos a desenvolverem manifestações graves como convulsões, disfunção hepática e extravasamento plasmático do que crianças, o que resulta em uma taxa de mortalidade cerca de quatro vezes maior nos lactentes (HAMMOND et al., 2005; JAIN; CHATURVEDI, 2010; KALAYANAROOJ; NIMMANNITYA, 2003).

Além disso, algumas diferenças nos achados clínicos e laboratoriais podem ser observadas entre lactentes e crianças. Por exemplo, manifestações hemorrágicas como níveis de hematócrito abaixo de 30%, plaquetopenia e petéquias são frequentemente mais observados em lactentes quando comparados à crianças. É importante salientar que o diagnóstico precoce é um fator que influencia diretamente na sobrevida desses pacientes. Dessa forma, certos indicadores, como parâmetros hematológicos observados no início da infecção, podem prever o desfecho clínico de crianças infectadas e orientar o manejo adequado, além de alocar apropriadamente os recursos necessários para estes pacientes. (JAYARAJAH et al., 2020; KALAYANAROOJ; NIMMANNITYA, 2003; NANDWANI et al., 2021; WITAYATHAWORNWONG, 2005)

2.4 Resposta imune ao DENV e patogênese

A resposta imune ao DENV é um processo dinâmico, que se inicia com a inoculação do vírus através da pele. Células presentes na pele, que são permissivas ao DENV, participam do processo de reconhecimento e apresentação de antígenos, elicitando a resposta imune. Após a inoculação, o vírus infecta células presentes na epiderme, como os fibroblastos, queratinócitos e células de Langerhans (GARCIA et al., 2017). Outras células do sistema imune (células dendríticas, macrófagos, monócitos e mastócitos) são recrutadas ao sítio de infecção e desencadeiam um processo inflamatório que induz o estado antiviral (GARCIA et al., 2017; UNO; ROSS, 2018). A resposta inicial mediada por interferons tipo I (α ; β) e tipo II (γ) induzida principalmente por células *natural killers* (NK) e células dendríticas, respectivamente, é crucial para a proteção contra o DENV ainda no início da infecção.

O sistema interferon é um dos principais mecanismos de defesa do sistema imune inato contra infecções virais. A resposta do IFN tipo I promove um estado antiviral, desencadeado após o reconhecimento do RNA viral por receptores de reconhecimento padrão (RRP), como os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), MDA5 (proteína do gene associado a diferenciação do melanoma 5) e RIG-I (gene I induzível por ácido retinóico) (COSTA et al.,

2013; DIAMOND; PIERSON, 2015). A secreção de IFN- α e β pelas células infectadas resulta na liberação de sinais de alerta para células adjacentes e uma indução autócrina da resposta antiviral, através da ativação de vias de sinalização para produção de proteínas antivirais e citocinas pró-inflamatórias (GREEN et al., 2014; NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÈS; CEDILLO-BARRÓN, 2005; SILVA CEZAR et al., 2020).

A resposta imune humoral ao DENV normalmente se inicia dentro de 4-5 dias após o início dos sintomas, com a produção de anticorpos IgM, seguida da produção de IgG sorotipo-específicos (predominantemente as subclasses IgG1 e IgG3) (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; WAHALA; SILVA, 2011). Os anticorpos IgG se mantêm em picos elevados durante alguns meses e decaem para níveis basais, persistindo por décadas. A produção de anticorpos anti-dengue difere em tempo e magnitude durante infecções primárias e secundárias. Em infecções secundárias, a estimulação de células B de memória leva a uma rápida produção de IgG, em níveis mais elevados do que o observado em infecções primárias, enquanto que os níveis de IgM normalmente são baixos ou até mesmo indetectáveis (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; WAHALA; SILVA, 2011). Os anticorpos produzidos após a infecção por DENV são voltados principalmente contra a NS1 e as glicoproteínas E e prM, presentes na superfície do vírus. (LIBRATY et al., 2002; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

Os processos patogênicos da dengue são multifatoriais e permanecem parcialmente compreendidos. Envolvem fatores relacionados ao vírus e fatores inerentes ao hospedeiro (genéticos, imunológicos, fisiológicos), que em conjunto determinam o curso clínico da infecção (SIMMONS et al., 2015). Estudos prospectivos mostram que o sorotipo do DENV pode influenciar na gravidade da infecção. Um estudo com crianças Vietnamitas demonstrou que a cinética da viremia e antigenemia da NS1 é maior em infecções por DENV-1 do que em infecções por DENV-2 (DUYEN et al., 2011; WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Outro estudo, conduzido por Fried *et al.*, sugeriu que infecções por DENV-2 e DENV-3 são mais prováveis de resultar em DHF do que infecções por DENV-4 (FRIED et al., 2010). Além disso, estudos epidemiológicos têm fornecido evidências de que alguns genótipos do DENV possuem maior virulência e potencial de se tornarem pandêmicos do que outros (PANG; ZHANG; CHENG, 2017). Esse fenômeno foi observado, por exemplo, na epidemia de DENV-2 que atingiu as Américas em 1981 (RICO-HESSE et al., 1997). Além disso, os vírus podem adquirir maior virulência através de passagens durante epidemias, tipicamente aumentando as taxas de fatalidade da doença (CHEN et al., 2008; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Proteínas virais também desempenham um importante papel na patogênese da dengue, notavelmente a proteína não-estrutural NS1. Altos níveis dessa proteína circulante em soro de

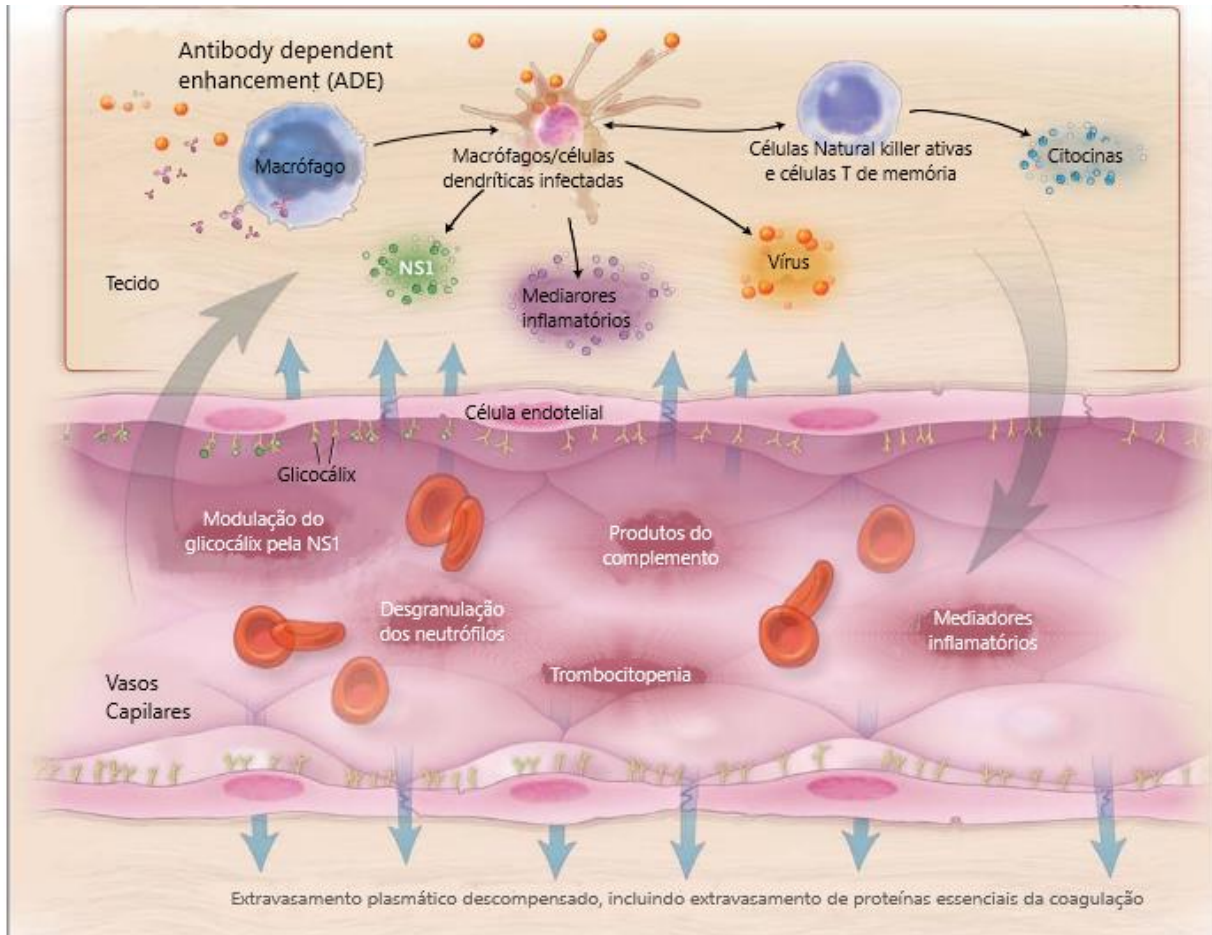
pacientes no início da infecção por DENV estão correlacionados com a progressão da doença para formas mais graves. Dessa forma, a NS1 pode ser identificada como um marcador de severidade e auxiliar no manejo clínico desses pacientes (AVIRUTNAN et al., 2006; LIBRATY et al., 2002). A NS1 presente em células infectadas pode proteger o DENV da neutralização mediada pela via das lectinas do sistema complemento (THIEMMECA et al., 2016), ao passo que a ativação do complemento mediada pela NS1 leva à produção de anafilotoxinas que podem contribuir para a patogênese da dengue (AVIRUTNAN et al., 2006).

Igualmente, a NS1 induz hipermeabilidade do endotélio através da ruptura do glicocálix, além de induzir a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, através da ativação do TLR4. (GLASNER et al., 2017; PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016b). A interação com o TLR4 também presente em plaquetas pode estar envolvida na sua ativação e fagocitose, contribuindo para o quadro de trombocitopenia e hemorragia. Além disso, autoanticorpos produzidos contra a NS1 também podem reagir com plaquetas, células endoteliais e trombina, promovendo mais dano ao endotélio.

Fatores relacionados a resposta imune do hospedeiro propiciam o estabelecimento de um ambiente inflamatório nos tecidos e parecem ser determinantes na severidade da dengue (Figura 3). Esses fatores incluem a interação entre a proteína NS1 e o endotélio, a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios por células infectadas e através da ativação de células da imunidade adaptativa, bem como a geração de imunocomplexos que participam da ativação do complemento e de outros mecanismos imunológicos associados à imunopatogênese da dengue (SIMMONS et al., 2012).

Após o primeiro contato com o DENV, é montada uma resposta imune celular e humoral robusta e específica. A importância de células T em infecções por DENV tem sido intensamente explorada. As células T com fenótipo CD8⁺ contribuem diretamente na resposta antiviral, por induzir a apoptose de células infectadas e através da secreção de citocinas inflamatórias (IFN γ e TNF α) (ST. JOHN; RATHORE, 2019; YAUCH et al., 2009). No entanto, essas células podem também contribuir para a patogênese da dengue, especialmente células de memória que são recrutadas durante infecções secundárias (DUANGCHINDA et al., 2010; SIMMONS et al., 2015).

Figura 3 – Mecanismos imunológicos envolvidos na imunopatogênese da dengue



Fonte: Simmons *et al.* (2012, tradução nossa)

A presença de reação cruzada em infecções por DENV possibilita que células T e B de memória reconheçam e respondam mais rapidamente à infecção por um diferente sorotipo do vírus, diferente daquele da infecção primária. No entanto, devido às diferenças nas sequências de cada um dos quatro sorotipos do DENV, essas células de memória podem não apresentar alta avidéz aos diferentes epítomos (ROTHMAN, 2011). Essa resposta seletiva das células T ao sorotipo da infecção primária, que está associada à falta de atividade citotóxica, mas sem redução da resposta inflamatória, é definida como *antigenic sin* ou “pecado antigênico original”. A consequência é uma liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, também chamado de “tempestade de citocinas”, diretamente relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular observada nos casos graves de dengue em crianças e adultos (HALSTEAD, 2015; MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003; ROTHMAN, 2011).

Em contrapartida, esses mecanismos – tempestade de citocinas e pecado antigênico original – sozinhos não explicam a ocorrência de dengue grave durante infecção primária, especialmente em lactentes (HALSTEAD, 2019; SIMMONS et al., 2015). Nesse contexto, a ocorrência de dengue grave também pode ser atribuída à presença de anticorpos de infecção prévia, que apresentam um papel dual nas infecções por DENV. Os anticorpos gerados após infecção pelo DENV são mediadores críticos da resolução da infecção e conferem proteção duradoura sorotipo-específica, além de proteção cruzada contra infecção heteróloga, por um curto período de tempo (SIMMONS et al., 2015). No entanto, em adultos e crianças infectadas pelo DENV, esses mesmos anticorpos podem ser um fator predisponente à dengue grave durante infecções secundárias, o que pode ser explicado pelo mecanismo de *Antibody-dependent enhancement* (ADE).

O fenômeno de ADE tem sido descrito desde 1964 e confirmado por estudos epidemiológicos recentes (KATZELNICK et al., 2017; NG et al., 2014). Postula-se que anticorpos antidengue de reação cruzada – provenientes de uma infecção primária por DENV – se ligam à partícula viral durante uma infecção subsequente por outro sorotipo, mas não possuem a capacidade de neutralizar o vírus. Pelo contrário, o imunocomplexo formado por vírus e anticorpo liga-se a receptores para a porção Fc das IgGs (FcγR) presentes em células monocíticas e tem sua entrada facilitada nas células, resultando em um aumento do número de células infectadas (ADE extrínseco) ou aumento da produção intracelular do DENV (ADE intrínseco) (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013; HALSTEAD, 2019, 2014).

O ADE tem sido apontado como o principal mecanismo relacionado à ocorrência de dengue grave durante infecções primárias, em lactentes nascidos de mães imunes ao DENV (HALSTEAD, 2019). Anticorpos IgG maternos transferidos durante a gestação conferem proteção à dengue, aproximadamente até os primeiros 6 meses de vida do lactente. Posteriormente, entre os 6 e 12 meses de idade, esses anticorpos decaem a níveis abaixo do necessário para promover neutralização, período em que os lactentes provavelmente estão mais sujeitos a desenvolverem a dengue grave através do ADE (CHAU et al., 2009; PENGSA et al., 2006). Essa hipótese tem sido confirmada através de estudos com crianças asiáticas, que demonstram que a atividade de exacerbação da infecção por anticorpos maternos *in vitro* ocorre durante os primeiros meses de vida (<1 ano) do lactente, consistente com a cinética de declínio desses anticorpos (CHAU et al., 2009; HALSTEAD et al., 2002; KLIKIS et al., 1988; SIMMONS et al., 2007).

No entanto, diferentemente do perfil observado em crianças asiáticas, no Brasil a incidência de dengue grave em lactentes é baixa e o pico de atividade ADE ocorre mais

precocemente (2-4 meses) (CASTANHA et al., 2016). O que sugere que outros mecanismos, não mutuamente exclusivos, podem estar relacionados à dengue grave na população pediátrica, como componentes do sistema imune inato e o perfil genético do hospedeiro.

Diferente da população de adultos e crianças que já experimentaram infecção primária por DENV, os lactentes são um grupo específico que permite estudar tanto a influência da imunidade humoral (anticorpos maternos), quanto a influência da imunidade inata durante as infecções por dengue (SIMMONS et al., 2007). Pelo fato de a resposta celular ao DENV não estar desenvolvida nos lactentes, em decorrência da ausência de contato prévio com o vírus, a imunidade inata desempenha um papel fundamental na proteção dos lactentes antes do estabelecimento da imunidade adaptativa. Enquanto a influência da imunidade celular no desenvolvimento da dengue grave em lactentes ainda não está devidamente estabelecida, evidências recentes tem demonstrado que um perfil desregulado da imunidade inata pode também contribuir para a patogênese da dengue grave (MALAVIGE; JEEWANDARA; OGG, 2020). Nesse contexto, tem sido evidenciada a influência dos diversos componentes do sistema complemento na imunopatogênese da dengue e os mecanismos associados ao desenvolvimento das formas graves da doença.

2.5 O sistema complemento nas infecções por DENV

O sistema complemento é um importante componente da imunidade inata que atua como primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos. É composto por um conjunto de mais de 30 proteínas extracelulares e receptores de membrana, que em sua grande maioria encontram-se na corrente sanguínea como pró-enzimas (zimogênios), ou seja, requerem clivagem proteolítica para sua ativação (CONDE et al., 2017; MELLORS et al., 2020). Esses componentes são ativados em resposta a diversos estímulos, como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e outros antígenos não-próprios. Essa ativação ocorre por três diferentes vias – clássica, alternativa e via das lectinas.

A via clássica é ativada a partir da ligação de imunocomplexos antígeno-anticorpo (IgM/IgG) à proteína C1q. Na ausência de anticorpos, C1q pode reconhecer e se ligar diretamente a moléculas como a proteína C reativa, células apoptóticas e proteínas virais (NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012). A via das lectinas ocorre através da ligação de carboidratos presentes na superfície de patógenos à MBL ou à Ficolina (SARMA; WARD, 2011). Ambas as vias convergem ao ponto de clivagem da proteína C3 em C3a e C3b. A

subunidade C3b contribui para a formação do complexo C5 convertase, que cliva C5 em C5a e C5b. Os componentes C3a e C5a são anafilotoxinas e participam do recrutamento de monócitos e granulócitos, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (MELLORS et al., 2020; SARMA; WARD, 2011). Por outro lado, diferentemente das vias clássica e das lectinas, a via alternativa não requer interação específica entre moléculas, visto que está constantemente ativada sob condições fisiológicas devido a hidrólise espontânea de C3. Dessa forma, atua como um mecanismo de amplificação da ativação das vias clássica e das lectinas (CONDE et al., 2017; MERLE et al., 2015).

O resultado global da ativação da cascata do complemento inclui a liberação de citocinas e quimiocinas, opsonização de patógenos e lise de células infectadas através da formação do complexo de ataque à membrana (CAM) (CONDE et al., 2017). Além disso, o sistema complemento tem um papel na regulação da resposta inflamatória, pois atua como modulador da imunidade adaptativa e participa da remoção de imunocomplexos (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÈS; CEDILLO-BARRÓN, 2005).

O sistema complemento tem um papel bem estabelecido na proteção contra infecções virais através de diversos mecanismos, dentre eles: inativação direta do vírus pela MBL, recrutamento e ativação de monócitos e granulócitos, opsonização e lise de partículas virais envelopadas e células infectadas (CONDE et al., 2017; MELLORS et al., 2020). Estudos recentes demonstram um efeito protetor do complemento em infecções por flavivírus. Através de ensaios *in vitro* foi demonstrado que a presença de proteínas do complemento no soro de indivíduos infectados por DENV é capaz de extinguir o ADE, sendo essa atividade dependente de C1q e IgG-específica (MEHLHOP et al., 2007; YAMANAKA; KOSUGI; KONISHI, 2008). A C1q também pode se ligar diretamente à partícula viral e proteína E de DENV, promovendo redução da infectividade viral em células THP-1 (DOURADINHA et al., 2014).

Apesar da sua importância na proteção, o sistema complemento possui um papel antagonista nas infecções por flavivírus e está envolvido na patogênese da dengue, contribuindo particularmente para o processo de extravasamento vascular (AVIRUTNAN et al., 2006; CABEZAS et al., 2018). A ativação exacerbada do complemento pode levar a uma resposta inflamatória descompensada, frequentemente associada com a dengue grave (MELLORS et al., 2020). Foi demonstrado em um estudo conduzido por Nascimento *et al.*, que pacientes com dengue grave apresentaram um consumo maior de C3 e níveis aumentados dos produtos da sua ativação (C3a e C5a), os quais contribuem para o aumento da permeabilidade vascular observado nas infecções por DENV (NASCIMENTO et al., 2009). Um outro estudo demonstrou que a proteína NS1 e os produtos C3a, C5a e C5b-9 solúvel, estavam presentes em

maiores concentrações em plasma de pacientes com DHF que apresentaram extravasamento plasmático, o que suporta a hipótese de que a ativação exacerbada do complemento influencia a severidade da dengue (AVIRUTNAN et al., 2006; CONDE et al., 2017).

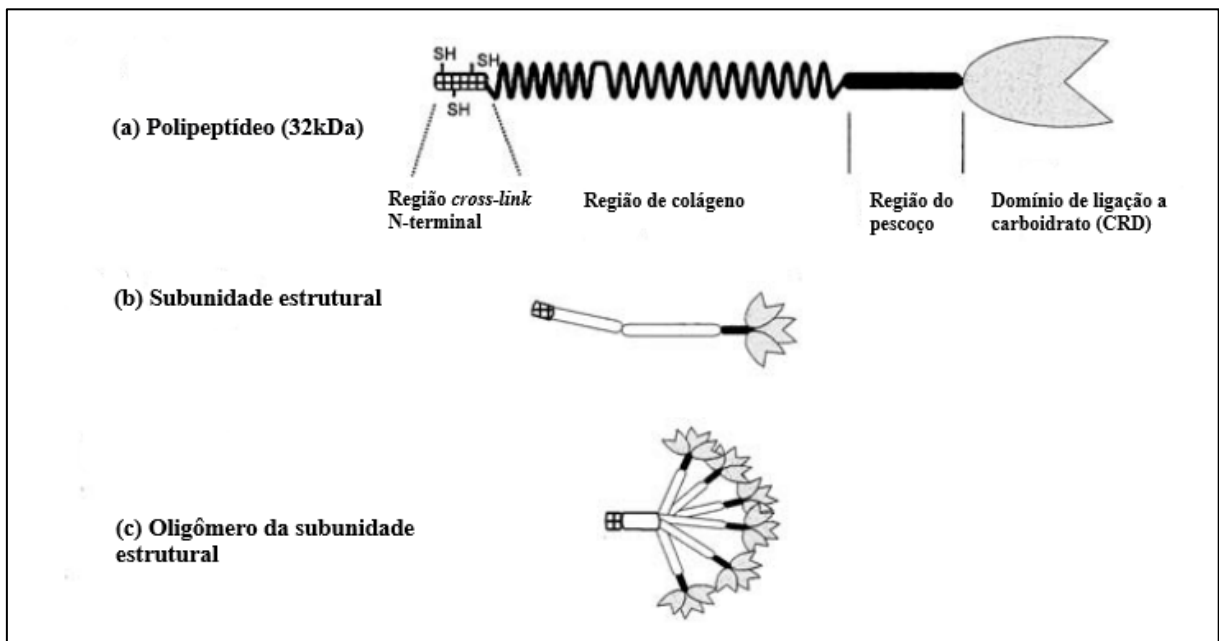
2.6 Lectina ligante de manose (MBL)

A MBL é uma proteína de fase aguda que desempenha um papel fundamental na imunidade inata. Sua função tem sido extensamente explorada devido ao seu papel protetor contra diversos patógenos e a possível associação dos seus níveis com doenças infecciosas e inflamatórias (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001). A suposição de que a deficiência de MBL poderia predispor à infecções foi baseada na descrição de defeitos na opsonização e fagocitose em soro humano, correlacionado com um fenótipo de infecção recorrente (GARRED et al., 2003; TAKAHASHI; EZEKOWITZ, 2005). A MBL atua como um receptor de reconhecimento padrão, interagindo com um vasto repertório de microorganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas. Suas principais funções estão relacionadas à ativação da via das lectinas do sistema complemento; indução da fagocitose; e indiretamente, modula a inflamação (SCORZA et al., 2015).

2.6.1 Estrutura molecular e função da MBL

A MBL pertence à família das colectinas, ou lectinas do tipo C, que são lectinas cuja ativação é dependente de cálcio. É produzida no fígado e circula na corrente sanguínea em várias formas oligoméricas, que vão desde dímeros até os altos oligômeros, que são estruturas formadas por tetrâmeros a hexâmeros da subunidade estrutural (TAKAHASHI; EZEKOWITZ, 2005). A subunidade estrutural da MBL é formada por trímeros da cadeia polipeptídica de 32 kDa, que contém quatro domínios: uma região N-terminal rica em cisteína (região *cross-link*); a região semelhante ao colágeno; a região do “pescoço” (*neck*); e o domínio C-terminal de ligação a carboidrato (CRD), ou domínio de lectina (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003) (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura da MBL



Fonte: Presanis *et al.* (2003, tradução nossa)

A região N-terminal apresenta de 2 a 3 resíduos de cisteína e está envolvida na oligomerização da MBL, mantendo as moléculas estabilizadas através de interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto. A região do colágeno é a mais extensa da proteína e consiste em 19 sequências repetidas (em tandem) de Glicina-Xaa-Yaa (sendo X e Y qualquer outro aminoácido). A região do pescoço é formada por uma estrutura α -helicoidal que possibilita a trimerização dos polipeptídeos para formar a subunidade estrutural. E por fim, há o domínio CRD, que permite que a MBL se ligue seletivamente a carboidratos complexos específicos, na presença de cálcio (GARRED *et al.*, 2006; PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003).

A MBL encontra-se associada a serinas proteases (*MBL-associated serine protease*) denominadas MASP-1, -2 e -3. As MASP estão presentes na forma de zimogênios e possuem domínios idênticos à C1r e C1s da via clássica. A interação entre os carboidratos presentes na superfície dos patógenos com o domínio CRD da MBL promove mudanças conformacionais nos multímeros de alto peso molecular da MBL, o que resulta na ativação das proteínas associadas MASP-2. A MASP-2 pode então ativar seus próprios zimógenos e iniciar a cascata do complemento de forma autônoma, através da clivagem de componentes do complexo C3-convertase. Dessa forma, a MBL é capaz de ativar a cascata do complemento de maneira

independente de anticorpos (HÉJA et al., 2012; PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

A MBL atua como uma importante molécula de reconhecimento padrão na imunidade inata. Ela se liga a grupamentos específicos de carboidratos, como N-acetil-D-glucosamina, manose, N-acetilmanosamina, L-fucose e glicose (PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003). Esses açúcares são encontrados como sequências repetidas na superfície de patógenos (PAMPs) e se ligam com alta avidéz ao domínio CRD. Do contrário, em células de mamíferos, a ausência desses resíduos de açúcares e presença de estruturas como o ácido siálico impedem que a MBL se ligue sob condições fisiológicas (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003).

Outra função da MBL, bem como do componente C1q, é a de reconhecer e induzir a fagocitose de células apoptóticas. A MBL se liga diretamente à células apoptóticas que expressam açúcares terminais de proteínas do citoesqueleto, permitindo sua opsonização e facilitando a fagocitose pelos macrófagos (OGDEN et al., 2001). A remoção de células apoptóticas é extremamente regulada e essencial para manter a homeostase de diversos processos fisiológicos. Defeitos nesse mecanismo tem sido implicados na patogênese de doenças autoimunes e câncer, no entanto a contribuição exata da MBL nesses eventos necessita de maior investigação (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; TAKAHASHI; EZEKOWITZ, 2005).

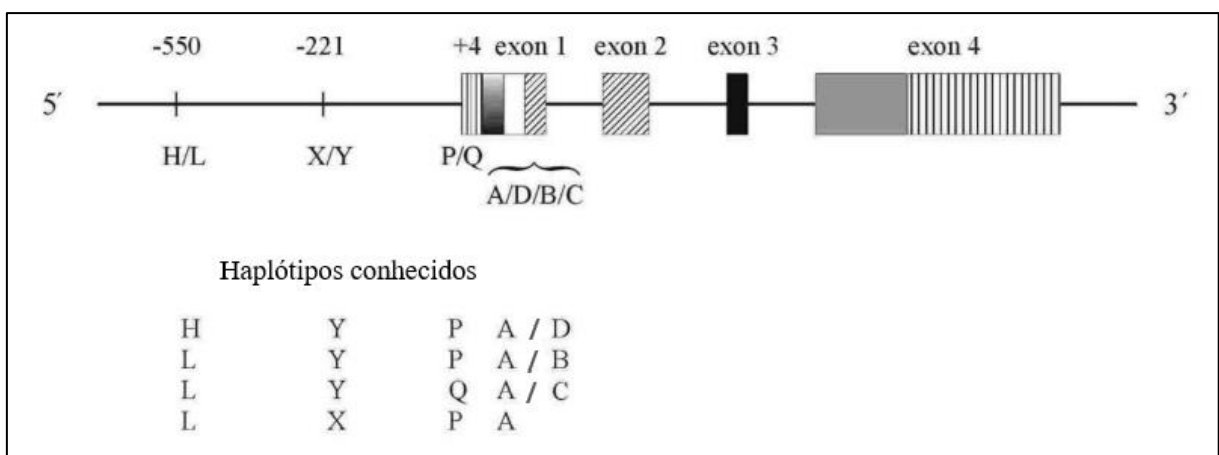
2.6.2 Genética da MBL e níveis séricos da proteína

Os níveis basais da MBL normalmente são estáveis e variam de menos de 50 ng/ml a mais de 3 µg/ml. Essa variação interindividual está diretamente relacionada a presença de mutações no gene que codifica a MBL. O gene *MBL2* está localizado no cromossomo 10q11.2-q21 e contém quatro éxons. Os éxons 1 e 2 codificam a região rica em cisteína e a região do tipo colágeno, enquanto os éxons 3 e 4 codificam o domínio α -helicoidal e o domínio CRD, respectivamente. A região promotora contém elementos regulatórios, os quais afetam a transcrição e conseqüentemente a expressão proteica (GARRED et al., 2006; THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006). Variações no gene *MBL2* podem perturbar a estrutura da proteína, bem como sua atividade biológica. Alguns polimorfismos de base única (SNPs) estão implicados com níveis reduzidos da MBL funcional, bem como na diminuição da sua expressão (Figura 5).

Três SNPs localizados no éxon 1 são variantes do tipo *missense* (ou sentido trocado) que levam à substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica da MBL, sendo elas: substituição de glicina por asparagina no códon 54 (variante B), glicina por ácido glutâmico no códon 57 (variante C) e arginina por cisteína no códon 52 (variante D). Essas variantes estruturais modificam a sequência em tandem da região de colágeno e as interações entre as cadeias polipeptídicas na região N-terminal, interferindo com a formação da estrutura helicoidal e oligomerização das subunidades da MBL (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003). Por convenção, a presença de uma dessas três mutações é referida como variante ‘O’ enquanto o alelo selvagem é definido como ‘A’ (GARRED et al., 2006).

Alguns polimorfismos também têm sido identificados na região promotora, os quais modulam os níveis de MBL a nível transcricional. Estudos conduzidos por Madsen *et al.* identificaram as variantes -550 (variante H/L), -221 (variante Y/X) e +4 (variante P/Q) e estabeleceram quatro haplótipos, denominados LXP, LYP, LYQ e HYP (MADSEN et al., 1998). Desses, os mais importantes parecem ser o HYP, associado a níveis altos e intermediários de MBL e LXP, associado a níveis baixos de MBL (MADSEN et al., 1995, 1998). Devido ao desequilíbrio de ligação entre as variantes da região promotora e do éxon 1, normalmente apenas sete haplótipos são encontrados (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD), gerando um total de 28 possíveis genótipos (PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Figura 5 – Organização do gene *MBL2* e suas variantes



Fonte: Petersen *et al.* (2001, tradução nossa)

A combinação entre polimorfismos no éxon 1 e promotor resulta em variações extremas na concentração de MBL. Indivíduos homocigotos para o alelo A apresentam níveis altos de MBL, acima de 1µg/ml. Os heterocigotos que possuem o alelo A e uma das variantes B, C ou D normalmente possuem níveis intermediários, entre 0.5 e 1µg/ml. Já os indivíduos que possuem a variante estrutural em ambos os genes apresentam níveis baixos de MBL, normalmente abaixo de 50ng/ml. Dessa maneira, indivíduos homocigotos para os alelos variantes aparentemente não são capazes de atingir os mesmos níveis plasmáticos de proteína daqueles que possuem o alelo selvagem (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006). Um estudo conduzido por Garred *et al.* (2003), em que analisaram a MBL do soro de 1183 indivíduos e seus respectivos genótipos, foi demonstrado que os efeitos mais profundos eram vistos para os alelos B e C, enquanto o alelo D não resultou em diminuição da concentração de proteína na mesma extensão (GARRED *et al.*, 2003).

A frequência desses haplótipos na população variam entre os diferentes grupos étnicos. Em caucasianos dinamarqueses, os alelos B, C e D são encontrados em 13, 2 e 5% da população, respectivamente (THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006). Em outro estudo Australiano com 236 voluntários, a prevalência do genótipo selvagem foi de 57.6%, enquanto os alelos variantes B, C e D foram encontrados em 19.9, 3.8 e 11%, respectivamente (MINCHINTON *et al.*, 2002). Por exemplo, o haplótipo variante LYPB é o mais comum em populações caucasianas (12%) e asiática (22%), mas rara na população africana, na qual o haplótipo variante mais comum é o LYQC (24%). Na população caucasiana, a presença do haplótipo LXPA é a causa mais comum de deficiência de MBL, seja estando apresentado em heterocigose ou associada a um haplótipo variante (THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006).

As razões pelas quais esses alelos variantes estão presentes em uma frequência alta não foram completamente elucidadas. No entanto, estudos apontam que a deficiência de MBL em determinadas populações pode conferir certa vantagem seletiva, tornando-se um fator de proteção para algumas doenças infecciosas (EISEN; MINCHINTON, 2003). Nesse contexto, alguns parasitas intracelulares obrigatoriamente dependem do processo de opsonização e fagocitose, de forma que uma redução na atividade do sistema complemento poderia reduzir a probabilidade de parasitismo. Esse possível efeito protetor da deficiência de MBL encontra respaldo em alguns estudos que demonstraram que os níveis de MBL eram mais altos em pacientes infectados com *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis* e pacientes com leishmaniose visceral, do que em indivíduos saudáveis (DE MESSIAS REASON *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2001; GARRED *et al.*, 1994).

Apesar do papel protetor contra alguns patógenos, a deficiência de MBL tem sido associada com maior risco de infecção em diferentes situações clínicas. Visto que a estrutura do sistema imune humano é redundante, isso explica por que em muitos casos a presença de polimorfismos no gene *MBL2* não influencia na susceptibilidade a infecções. Nesse caso, o papel da MBL parece ser mais relevante em situações em que a resposta imune está imatura ou comprometida (DE PASCALE et al., 2013). Durante a primeira infância, baixos níveis séricos de MBL e polimorfismos no *MBL2* estão associados a maior susceptibilidade a infecções e maior risco de desenvolvimento de sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em crianças (FIDLER et al., 2004; KOCH et al., 2001). Em adultos imunocomprometidos a deficiência de MBL também tem sido associada a uma maior predisposição ao desenvolvimento de infecções graves ou recorrentes, como é o caso de pacientes oncológicos submetidos a quimioterapia (KAKKANAIH et al., 1998; VEKEMANS et al., 2007).

Estudos recentes têm demonstrado que a presença de polimorfismos associados a níveis mais baixos de MBL estão relacionados à maior susceptibilidade a infecções virais, como os vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e da Hepatite C (HALLA et al., 2010; IP et al., 2005; SHENG et al., 2010). A deficiência de MBL também parece ser um fator de risco para infecções por flavivírus, incluindo os vírus dengue e Oeste do Nilo, visto que parece ter importância na neutralização e resolução da infecção *in vivo* (FUCHS et al., 2010).

2.6.3 Papel da MBL nas infecções por DENV

A influência dos níveis séricos da MBL e polimorfismos no *MBL2* na susceptibilidade à infecção por DENV e progressão para formas mais severas da doença tornou-se alvo recente de estudo. A MBL exerce um papel ambíguo nas infecções por DENV e sua importância na imunopatogênese da dengue tem sido demonstrada experimentalmente através de estudos *in vitro* e *in vivo* (Quadro 1).

A MBL parece ter um papel central na eficácia da neutralização viral através de mecanismos dependentes ou independentes de complemento. Um estudo recente demonstrou que a via da MBL é crítica para neutralização *in vitro* do DENV-2 derivado de cultura de células de inseto e mamífero. Além disso, demonstrou que a atividade de neutralização está correlacionada com a concentração de MBL presente no soro, sugerindo que variações genéticas que promovem diminuição dos níveis ou função da MBL podem ter um impacto na susceptibilidade e severidade das infecções por DENV (AVIRUTNAN et al., 2011).

Quadro 1 – Estudos de correlação entre níveis de MBL e *SNPs* do *MBL2* com a dengue

Referências	Classificação clínica da dengue	SNPs (<i>MBL2</i>) avaliados	Associação dos SNPs com dengue grave	Principais achados
AVIRUTNAN et al. (2011)	N/A	rs11003125, rs11003125, rs7095891, rs1800450, rs1800451 e rs5030737	N/A	Correlação positiva entre níveis de MBL e neutralização do DENV, indicando que polimorfismos no <i>MBL2</i> relacionados a baixos níveis de MBL podem ser um fator de risco independente na susceptibilidade à infecção por DENV e progressão da doença.
ALAGARASU et al. (2012)	DF/DHF	N/A	N/A	Níveis séricos de MBL foram menores entre indivíduos com DHF quando comparado com casos de DF, sugerindo que a deficiência de MBL está associada à severidade da doença.
ACIOLI-SANTOS et al. (2008)	DF/DHF	rs5030737, rs1800450 e rs1800451	Correlação negativa	Correlação entre o genótipo selvagem da região do éxon 1 do <i>MBL2</i> (AA) e idade como fatores de risco associados ao desenvolvimento de trombocitopenia.
GIANG et al. (2020)	DF/DWS	rs11003125, rs11003125, rs7095891, rs1800450, rs1800451 e rs5030737	Variável	Associação entre genótipo (- 550L/H), diplótipo (XA/XO, YA/XO) e haplótipos (LXPB, HXPA, XO) do <i>MBL2</i> com a dengue.
PROMMALIKIT et al. (2015)	DF/DHF/DSS	rs11003125 e rs1800450	Sem correlação	Associação do haplótipo YB com baixos níveis séricos de MBL. No entanto, não foi observada associação entre polimorfismos no gene <i>MBL2</i> e susceptibilidade à infecção por DENV.
ORNELAS et al. (2019)	DHF/DSS	rs7095891, rs1800450 e rs1800451	Correlação positiva	Primeiro estudo a demonstrar associação entre dois haplótipos do gene <i>MBL2</i> e dengue grave na população brasileira, considerando ajuste genético de ancestralidade.
FIGUEIREDO et al. (2016)	DF/DHF	rs11003125, rs11003125, rs1800450, rs1800451 e rs5030737	Correlação positiva	Associação entre haplótipos relacionados a baixos níveis de MBL com DHF, sugerindo que a presença desses haplótipos constitui um fator de risco para desenvolvimento de dengue grave.
NASCIMENTO et al. (2009)	DF/DHF	N/A	N/A	Diferenças nos níveis de MBL, fator D e H entre pacientes com DF e DHF, sugerindo que o desbalanço destes fatores está relacionado com ativação anormal do complemento e contribuindo para a severidade da dengue.

Fonte: A autora

Legenda: DF= Febre do vírus dengue; DHF= Febre hemorrágica do vírus dengue; DWS= dengue com sinais de alarme; DSS= Síndrome do choque da dengue; N/A= não apresentado; SNPs: rs11003125= -550 (L/H); rs7096206= -221 (Y/X); rs7095891= +4 (P/Q); rs1800450= 54 (A/B); rs1800451= 57 (A/C); rs5030737= 52 (A/D).

No estudo conduzido por Alagarasu *et al.* (2012) não foram encontradas diferenças significativas na concentração de MBL circulante no soro de pacientes adultos com dengue em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, indivíduos com DHF apresentaram níveis de MBL significativamente mais baixos do que pacientes com DF, sugerindo que a redução da ativação da via da lectinas poderia estar associada com a progressão da doença (ALAGARASU *et al.*, 2012). Recentemente, Giang *et al.* (2020) avaliaram a influência dos polimorfismos no éxon 1 e região promotora do *MBL2* na dengue, em uma população Vietnamita. Apesar dos níveis de MBL entre os indivíduos com dengue e indivíduos saudáveis não variarem significativamente, foi observada diferença de alguns haplótipos/genótipos entre os grupos, o que sugere relação das variantes genéticas com a dengue (GIANG *et al.*, 2020). Além disso, em trabalho realizado por Figueiredo *et al.* (2016), haplótipos relacionados a baixos níveis de MBL estiveram associados a dengue grave em uma população de adultos e crianças admitidos em unidade de saúde na cidade do Recife, região endêmica para dengue. Igualmente, um outro estudo recente conduzido no Brasil, demonstrou associação de risco entre haplótipos do *MBL2* e desenvolvimento de dengue grave em crianças (ORNELAS *et al.*, 2019).

Em contrapartida, um estudo conduzido por Acioli-Santos *et al.* (2008) sugere que a presença de polimorfismos no éxon 1 pode conferir proteção contra trombocitopenia nas infecções por dengue (ACIOLI-SANTOS *et al.*, 2008). Além disso, Nascimento *et al.* (2009) observaram que altos níveis de MBL parecem estar correlacionados com a severidade doença, visto que pacientes com DHF apresentavam maiores níveis da proteína do que pacientes com DF (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Ademais, em outro estudo não foi encontrada associação entre os SNPs no promotor (-221 X/Y) e éxon 1 (códon 54 A/B) e susceptibilidade a dengue. No entanto, a frequência do genótipo YB, relacionado à baixos níveis de MBL, foi maior entre os casos em comparação aos controles saudáveis, o que pode sugerir uma tendência de associação desse genótipo com a dengue (PROMMALIKIT; THISYAKORN, 2015).

Em conjunto, esses estudos salientam a importância da MBL na resposta imune inata contra o DENV. Entretanto, os dados acerca do papel da MBL na proteção e patogênese da dengue ainda são escassos e controversos, o que pode ser atribuído à alta variabilidade genética do *MBL2* que resulta em variações dos níveis séricos da MBL entre populações. Por isso, há a necessidade de melhor compreender o papel desses polimorfismos e dos níveis de MBL na susceptibilidade e progressão para formas mais severas da dengue, especialmente em populações heterogêneas, bem como na população pediátrica, que se apresenta como um modelo apropriado para avaliação da imunidade inata nas infecções primárias por DENV.

3 JUSTIFICATIVA

A dengue é uma arbovirose de grande relevância para a saúde pública e constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade infantil, especialmente em países da Ásia e América Latina. Os mecanismos imunopatogênicos que determinam a gravidade da doença são multifatoriais e estão relacionados a fatores inerentes a cepa viral, fatores genéticos e imunológicos do indivíduo.

Um dos principais mecanismos relacionados ao desenvolvimento do perfil adverso observado nas infecções por dengue em lactentes é o ADE. As implicações do ADE na imunopatogênese da dengue são extremamente relevantes, particularmente em crianças asiáticas que desenvolvem dengue grave durante infecção primária. No entanto, no Brasil, um local igualmente endêmico, a frequência de dengue grave em lactentes e crianças nos primeiros anos de vida é baixa, indicando que outros fatores imunológicos, tais como componentes do sistema imune inato, podem estar envolvidos na determinação da gravidade da doença nessa população.

Uma vez que em lactentes a imunidade adaptativa ainda está em desenvolvimento, o sistema imune inato desempenha um importante papel na defesa contra o DENV. Um dos componentes da imunidade inata que tem um papel central na proteção contra agentes infecciosos durante a primeira infância é a MBL. A deficiência de MBL é comum e está relacionada a presença de polimorfismos no gene que codifica a MBL.

Estudos recentes têm explorado a influência dos diferentes polimorfismos nos níveis séricos da MBL e a relação desses níveis com a proteção/patogênese da dengue. No entanto, esses estudos ainda são escassos e pouco representativos da nossa população. Portanto, torna-se importante avaliar a influência dos níveis de MBL sobre a infecção por dengue, especialmente em lactentes, que representam um excelente modelo para avaliar o papel da imunidade inata frente à infecção pelo DENV.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos níveis séricos de MBL e dos polimorfismos no gene *MBL2* na infecção pelo vírus dengue em lactentes.

4.1 Objetivos específicos

- a) Caracterizar clinicamente os lactentes incluídos no estudo;
- b) Determinar os níveis séricos e capacidade de ligação da MBL nos lactentes com diferentes formas clínicas da dengue (assintomática/sintomática) e lactentes naïves;
- c) Determinar os polimorfismos 52 (D), 54 (B) e 57 (C) do éxon 1 e -550, -221, +4 da região promotora do gene *MBL2* nos grupos de estudo;
- d) Determinar a correlação entre os níveis séricos de MBL e polimorfismos no gene *MBL2*;
- e) Avaliar a correlação dos níveis séricos e polimorfismos no *MBL2* com as diferentes formas clínicas da dengue;

5 METODOLOGIA

Os tópicos a seguir abordam os processos metodológicos aplicados na construção deste trabalho, que incluem a definição da população de estudo, os procedimentos laboratoriais, análises estatísticas e considerações éticas.

5.1 População do estudo

O estudo foi conduzido em amostras biológicas bem caracterizadas oriundas de uma coorte de nascimento estabelecida na cidade do Recife, entre 2010-2014, para investigar incidência, fatores de risco e cinética de anticorpos maternos. O desenho do estudo, critérios de inclusão e exclusão, e a coleta de dados foram previamente descritos em detalhes (BRAGA et al., 2016; CASTANHA et al., 2016, 2017). Resumidamente, foram incluídas mães com gestação de baixo risco, residentes na cidade do Recife, recrutadas durante o pré-natal ou parto no Ambulatório ou na Maternidade da mulher do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira (IMIP), que concordassem em ter seus filhos acompanhados por no mínimo um ano pela equipe do estudo. As crianças foram alocadas aleatoriamente em dois grupos e avaliadas pelos pediatras em momentos distintos durante os primeiros dois anos de vida: grupo 1 nos meses 2, 6, 10 e 18, e grupo 2 nos meses 4, 8, 12 e 24. Durante as avaliações programadas, foram coletados dados clínicos das crianças, com ênfase no histórico de quadros febris agudos no período entre as avaliações. Foram coletadas amostras de sangue venoso das mães, no período da admissão para o parto, e das crianças, ao nascimento (cordão umbilical) e durante os períodos de cada avaliação no seguimento da coorte. A infecção sintomática por DENV foi definida como um resultado positivo para os marcadores sorológico (IgM) ou molecular (RT-PCR), juntamente com o relato de síndrome febril aguda entre o momento do nascimento e as avaliações de acompanhamento. A infecção assintomática da dengue foi definida pela detecção de anticorpos IgM e nenhum relato de episódio de síndrome febril aguda.

5.2 Desenho do estudo

No presente estudo foram incluídas 130 amostras de lactentes recrutados na coorte. Os grupos de estudo foram classificados em três categorias: (i) lactentes que apresentaram infecção sintomática por DENV (n=29); (ii) lactentes que apresentaram infecção assintomática por DENV (n=17); e (iii) lactentes que não apresentaram infecção por DENV (grupo controle)

(n=84). Todas as amostras utilizadas foram confirmadas laboratorialmente como positivas ou negativas para DENV por RT-PCR, sorologia IgM/IgG e teste de neutralização por redução de placa (PRNT).

As dosagens de MBL foram realizadas em todas as amostras de soro dos lactentes disponíveis no biorrepositório, mas apenas as amostras coletadas no período anterior ao diagnóstico de infecção por dengue foram utilizadas como representativas dos níveis basais de MBL e capacidade de ligação. Para fins de comparação, foram utilizadas amostras dos lactentes *naïves* para dengue, com a mesma idade que os casos. Amostras agudas (infecção vigente) foram excluídas das análises, visto que a infecção por DENV pode alterar a concentração de MBL no soro.

5.3 Procedimentos laboratoriais

Os subtópicos a seguir detalham os ensaios laboratoriais para determinação dos níveis séricos e atividade da MBL nas amostras de soro da coorte, bem como para a determinação dos polimorfismos no gene *MBL2*.

5.3.1 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

A concentração sérica e a capacidade de ligação de MBL foram determinadas por meio de ensaios de ELISA com metodologia *in house*. O ensaio de MBL sérica quantifica as moléculas de MBL circulantes, independentemente da sua forma oligomérica, enquanto o ensaio de capacidade de ligação de MBL quantifica moléculas de MBL oligomerizadas, que são as formas ativas de MBL capazes de reconhecer e se ligar aos carboidratos.

Foi utilizada MBL padrão humana (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca) para estabelecer uma curva padrão para ambos os ensaios. As concentrações séricas de MBL sérica e MBL ativa (capacidade de ligação da MBL), em ng/mL, foram determinadas através de regressão não-linear, interpolando os valores de densidade ótica (OD) obtidos (subtraídos do branco) com a curva padrão construída usando o soro de referência. Os valores obtidos foram então multiplicados pelo fator de diluição da amostra. O intervalo de detecção da curva padrão foi de 1,9 a 500 ng/mL.

5.3.1.1 MBL sérica

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de alta ligação de proteínas (Nunc MaxiSorp™), sensibilizadas *overnight* a 4° com 5µg/mL de anti-MBL humana (#HYB 131-01-02; Invitrogen) diluída em PBS 1X (*phosphate buffered saline*). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 10% BSA (*bovine serum albumin*) diluída em PBS 1X por 1h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-t (PBS 1X; 0.5% tween 20) e incubadas com 50µL/poço da MBL padrão diluída serialmente (2-fold; 10 pontos) e das amostras de soro diluídas a 1:100 em 5% BSA/PBS-t por 2h a 37°C.

Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com 50µL/poço do anticorpo MBL2 Biotin (#HYB 131-01B-005; Invitrogen) diluído a 1:20,000 em 5% BSA/PBS-t por 1h à TA. Este anticorpo tem alta especificidade por MBL humana presente no soro. Após três lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo Avidina conjugado com HRP (#18-4100-51; eBioscience, Invitrogen), o qual tem alta afinidade pela biotina, diluído a 1:500 por 1h à TA. Após lavagem, as placas foram incubadas com substrato TMB por 15 minutos e a reação interrompida pela adição de 2N H₂SO₄ (ácido sulfúrico). A absorbância foi determinada com o filtro de 450nm, utilizando leitor de ELISA.

5.3.1.2 Capacidade de ligação

Para avaliar a capacidade de ligação da MBL, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com Manana, polissacarídeo purificado de *Saccharomyces cerevisiae*, a 100µg/mL durante 3h a 37°C. Após 3 lavagens com TBS-t (TBS 1X; 0.5% tween 20), as placas foram bloqueadas com 1% BSA em TBS 1X por 1h a TA. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com 50µL/poço da MBL padrão diluída serialmente (2-fold; 10 pontos) e das amostras de soro diluídas a 1:50 em tampão de diluição (TBS 1x; 0.5% BSA; 0.005M CaCl₂) por 2h a TA.

Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com 50µL/poço do anticorpo MBL2 Biotin (#HYB 131-01B-005; Invitrogen) diluído a 1:5,000 em tampão de diluição por 1h a TA. Após três lavagens as placas foram incubadas com o anticorpo Avidina conjugado com HRP (#18-4100-51; eBioscience, Invitrogen) diluído a 1:500 por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram incubadas com substrato TMB por 15 minutos e a reação interrompida pela adição de 2N H₂SO₄ (ácido sulfúrico). A densidade ótica foi determinada através da leitura da absorbância com o filtro de 450nm, utilizando leitor de ELISA.

5.3.2 Extração de DNA e ensaios de genotipagem

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de coágulos, que estavam armazenados a -80°C . Para obtenção das amostras de coágulo que estavam armazenados nos tubos de coleta, estes foram centrifugados invertidos dentro de um tubo cônico de 50mL, a 2000g durante 10 minutos à TA para deslocar o gel do tubo e liberar o coágulo (WONG et al., 2007). A extração foi realizada através do kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), seguindo as instruções do fabricante, com uma modificação. O tempo de incubação com a proteinase, para a lise completa do coágulo, passou de 10 minutos para *overnight* (~12h), devido à dificuldade de se obter uma solução homogênea utilizando amostras de coágulo. Em seguida, o DNA extraído teve sua concentração e pureza quantificados através de espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific).

A genotipagem do gene *MBL2* para detecção das variantes foi realizada por PCR em tempo real, utilizando primers e sondas específicas, através do sistema TaqMan com a plataforma QuantStudio 5 (Thermo Scientific®). Os seguintes ensaios de genotipagem SNP (Applied Biosystems) foram utilizados: C__11876879_10 (rs11003125), C__27858274_10 (rs7096206), C__26813436_10 (rs7095891), C__2336610_10 (rs5030737), C__2336609_20 (rs1800450), e C__2336608_20 (rs1800451).

Um total de seis SNPs no *MBL2* foram analisados: três na região promotora correspondendo às variantes -550 (H/L; rs11003125), -221 (X/Y; rs7096206) e +4 (P/Q; rs7095891); e três na região estrutural (éxon 1) correspondendo às variantes 52 (A/D; rs5030737), 54 (A/B; rs1800450) e 57 (A/C; rs1800451). As variantes polimórficas no éxon 1 foram designadas como “O” enquanto o alelo selvagem foi designado como “A”.

5.4 Análises estatísticas

Os alelos foram combinados para formação haplótipos/genótipos e estes correlacionados com a concentração sérica de MBL, para categorizá-los como alto (HYPA/HYPA; HYPA/LYPA; HYPA/LYQA; LYPA/LYQA; LYQA/LYQA), intermediário (HYPA/HYPO; HYPA/LXPA; HYPA/LYPO; HYPA/LYQO; HYPO/LYQA; LXPA/LXPA; LYPA/LXPA; LYPA/LXQA; LYPA/LYPO; LYPA/LYQO; LYQA/LYQO; LYQO/LXPA) e baixo (HYPO/LXPA; LXPA/LYPO; LYPO/LYPO; LYQO/LXPA) produtores de MBL, como descrito anteriormente (GARRED et al., 2003). O software PLINK (versão 1.07) foi utilizado para construir os haplótipos, descrever suas frequências e verificar se a população se encontrava

em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A associação entre as variantes do *MBL2* e a infecção por dengue foi analisada através da razão de chances (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e pelo teste exato de Fisher.

Para verificar se havia influência da idade nos níveis de MBL foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Para determinar as diferenças nos níveis séricos e capacidade de ligação entre os diferentes grupos analisados (sintomáticos, assintomáticos e controle) foram utilizados os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de p foram <0.05 . As análises estatísticas e montagem dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0).

5.5 Considerações éticas

Essa pesquisa encontra-se aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) sob o CAAE 43051521.2.0000.5190 (Anexo A) e está inserida em um projeto âncora intitulado: “Incidência da infecção pelo vírus dengue, Imunidade Materna e Cinética de anticorpos antidengue em crianças no primeiro ano de vida” que também possui aprovação pelo CEP do IAM (CAAE-0061.0.095.000-10).

6 RESULTADOS

Os tópicos a seguir descrevem os resultados obtidos a partir dos experimentos descritos anteriormente, contemplando todos os objetivos propostos para este estudo.

6.1 Características clínicas dos lactentes incluídos no estudo

As características clínicas e demográficas dos 130 lactentes incluídos no estudo estão sumarizadas na tabela 1. Não foram observadas diferenças na distribuição de sexo ($p=0,066$); idade ($p=0,770$); peso ao nascimento ($p=0,061$), tipo de parto ($p= 0,897$) e presença de anticorpos IgG anti-DENV no cordão umbilical ($p=0,1917$) entre os grupos. Dos 46 casos incluídos neste estudo 17 foram assintomáticos, enquanto os 29 assintomáticos apresentaram quadro leve da infecção, sem progressão para formas mais graves da dengue.

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos lactentes incluídos no estudo

Características	Casos (n=46)	Controles (n=84)	<i>p</i> -value*
Sexo, n (%)			
Feminino	18 (39.1)	47 (56.0)	0,066
Masculino	28 (60.9)	37 (44.0)	
Idade em meses (média \pm SD)	5 \pm 2.8	4.9 \pm 2.9	0,770
Peso ao nascer, g (média \pm SD)	3,430 (419.2)	3,304 (329.0)	0,061
Tipo de parto			
Vaginal	43 (93.5)	79 (94.1)	0,897
Cesário	3 (6.5)	5 (5.9)	
Infecção por dengue, n (%)			
Sintomática	29 (63.1)	-	
Assintomática	17 (36.9)	-	
IgG anti-DENV no cordão umbilical, n (%)			
Positivo	38 (82.6)	76 (90.5)	0,1917
Negativo	8 (17.4)	8 (9.5)	

Fonte: A autora.

Nota: *Teste de qui-quadrado.

6.2 Determinação dos polimorfismos no gene *MBL2* e sua associação com a infecção por dengue em lactentes

As frequências das variantes alélicas e genotípicas no gene *MBL2* e sua associação a infecção por dengue nos lactentes incluídas no estudo estão apresentadas na tabela 2. Os grupos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências dos alelos variantes na região promotora foram 28,5% (L/H), 18,8% (Y/X) e 31,5% (P/Q) para as posições -550, -221 e +4, respectivamente.

Em relação à região -550, não houve diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles. Na região -221, as frequências do alelo Y (85,6%) e do genótipo YY (73,8%) foram significativamente maiores nos controles do que nos casos. Ao passo que a presença do alelo X (OR: 2,16; 95% IC: 1,12-4,19; $p=0,019$) e genótipo YX (OR: 2,70; 95% IC: 1,20-5,71; $p=0,015$) estiveram associados a maior risco de infecção por dengue nos casos.

Na região +4, não houve diferenças nas frequências genotípicas entre casos e controles. No entanto, a presença do alelo P foi significativamente maior nos casos (77,3%) e o alelo Q foi associado a menor risco ao desenvolvimento de dengue na população pediátrica (OR: 0,50; 95% IC: 0,27-0,90; $p=0,02$).

Em relação ao éxon 1, as frequências dos alelos variantes foram de 4,4% (A/D), 12,6% (A/B) e 6,8% (A/C) para os códonos 52, 54 e 57, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas quando as variantes D, B e C foram analisadas individualmente. Quando analisadas em conjunto, foi observado que o genótipo AO (OR: 0,45; 95% IC: 0,23-0,91; $p=0,021$) e o alelo variante O (OR: 0,41; 95% IC: 0,21-0,77; $p=0,006$) foram associados a proteção contra o desenvolvimento de dengue.

Tabela 2 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos no gene *MBL2* e sua associação com a infecção por dengue nos lactentes.

(continua)

Variantes do <i>MBL2</i>	População de estudo, n (%)			OR (IC 95%)*	p-value**
	Total (n=130)	Casos (n=46)	Controles (n=84)		
<i>Variantes promotor</i>					
-550					
LL	66 (53.6)	25 (54.0)	41 (53.2)	Referência	Referência
LH	44 (35.8)	15 (33.0)	29 (37.7)	0.84 (0.38-1.90)	0.839
HH	13 (10.6)	6 (13.0)	7 (9.1)	1.40 (0.39-4.47)	0.757
Total	123 ^a	46	77		
L	176 (71.5)	65 (71.0)	111 (72.0)	Referência	Referência
H	70 (28.5)	27 (29.0)	43 (28.0)	1.07 (0.60-1.91)	0.884
Total	246	92	154		
-221					
YY	82 (65.6)	23 (51.1)	59 (73.8)	Referência	Referência
YX	39 (31.2)	20 (44.5)	19 (23.7)	2.70 (1.20-5.71)	0.015
XX	4 (3.2)	2 (4.4)	2 (2.5)	2.56 (0.37-16.94)	0.576
Total	125 ^b	45	80		
Y	203 (81.2)	66 (73.3)	137 (85.6)	Referência	Referência
X	47 (18.8)	24 (26.7)	23 (14.4)	2.16 (1.12-4.19)	0.019
Total	250	90	160		
+4					
PP	51 (44.0)	25 (56.8)	26 (36.1)	Referência	Referência
PQ	57 (49.1)	18 (40.9)	39 (54.2)	0.48 (0.22-1.04)	0.078
QQ	8 (6.9)	1 (2.3)	7 (9.7)	0.14 (0.012-0.98)	0.066
Total	116 ^c	44	72		
P	159 (68.5)	68 (77.3)	91 (63.2)	Referência	Referência
Q	73 (31.5)	20 (22.7)	53 (36.8)	0.50 (0.27-0.90)	0.020
Total	232	88	144		
<i>Variantes do Éxon 1</i>					
52 (D)					
AA	115 (91.3)	43 (93.5)	72 (90.0)	Referência	Referência
AO	11 (8.7)	3 (6.5)	8 (10.0)	0.62 (0.17-2.24)	0.744
OO	0	0	0	-	-
Total	126 ^d	46	80		
A	241 (95.6)	89 (96.7)	152 (95.0)	Referência	Referência
O	11 (4.4)	3 (3.3)	8 (5.0)	0.64 (0.18-2.15)	0.750
Total	252	92	160		
54 (B)					
AA	93 (75.6)	37 (80.4)	56 (72.7)	Referência	Referência
AO	29 (23.6)	9 (19.6)	20 (26.0)	1.46 (0.61-3.43)	0.511
OO	1 (0.8)	0	1 (1.3)		
Total	123 ^e	46	77		
A	215 (87.4)	83 (90.2)	132 (85.7)	Referência	Referência
O	31 (12.6)	9 (9.8)	22 (14.3)	0.65 (0.27-1.44)	0.329
Total	246	92	154		

Tabela 2 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos no gene *MBL2* e sua associação com a infecção por dengue nos lactentes

(conclusão)

Variantes do <i>MBL2</i>	População de estudo, n (%)			OR (IC 95%)*	p-value**
	Total (n=130)	Casos (n=46)	Controles (n=84)		
57(C)					
AA	104 (88.1)	44 (100.0)	60 (81.1)	-	-
AO	12 (10.2)	0	12 (16.2)	-	-
OO	2 (1.7)	0	2 (2.7)	-	-
Total	118 ^f	44	74		
A	220 (93.2)	88 (100.0)	132 (89.2)	-	-
O	16 (6.8)	0	16 (10.8)	-	-
Total	236	88	148		
52+54+57					
AA	312 (85.0)	124 (91.2)	188 (81.4)	Referência	Referência
AO	52 (14.2)	12 (8.8)	40 (17.3)	0.45 (0.23-0.91)	0.021
OO	3 (0.8)	0	3 (1.3)	-	-
Total	367	136	231		
A	676 (92.1)	260 (95.6)	416 (90.0)	Referência	Referência
O	58 (7.9)	12 (4.4)	46 (10.0)	0.41 (0.21-0.77)	0.006
Total	734	272	462		

Fonte: A autora.

Nota: *Casos (sintomáticos e assintomáticos) *versus* controles; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança. A discriminação alélica não foi viável em ^a7, ^b5, ^c14, ^d4, ^e7 e ^f12 amostras. Valores estatisticamente significantes estão destacados em negrito; **Teste exato de Fisher.

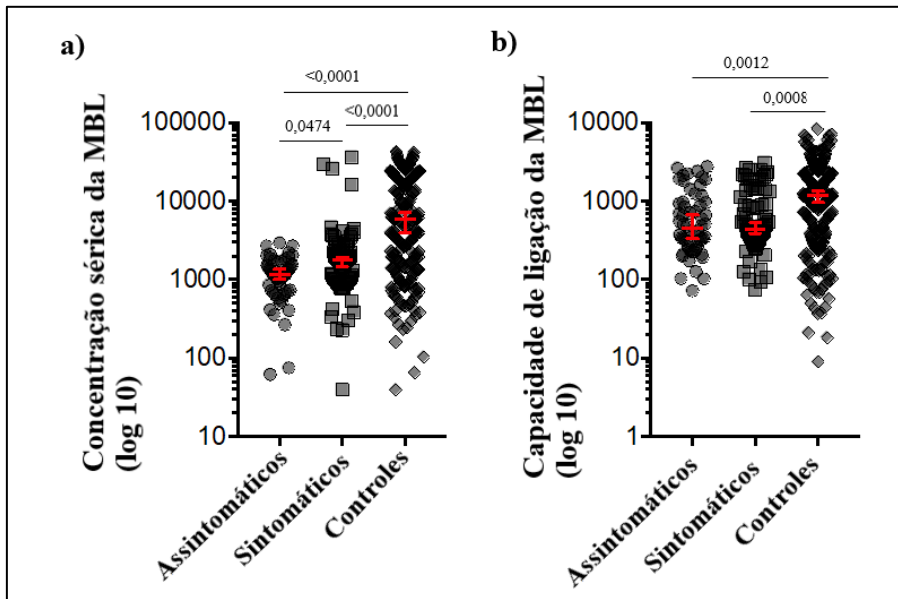
6.3 Dosagem sérica e capacidade de ligação da MBL

Os níveis séricos e capacidade de ligação da MBL foram quantificados em todas as amostras de soro dos casos de dengue e controles *naïve* para dengue, disponíveis no biorrepositório, com exceção das amostras agudas. De maneira geral, lactentes infectados pelo DENV apresentaram níveis séricos basais menores do que os *naïves* ($p < 0,0001$; gráfico 1a). Da mesma forma, a capacidade de ligação da MBL foi menor no grupo dos casos, ambos sintomático e assintomático ($p = 0,0008$ e $p = 0,0012$, respectivamente; gráfico 1b), do que no grupo controle.

A concentração média da MBL sérica foi de 2980ng/mL (mediana 1772ng/ml; 39,77 – 36519ng/ml) para os casos sintomáticos, 1219ng/mL (mediana 1162ng/ml; 62,18 – 2939ng/ml) para os casos assintomáticos e 10760ng/mL (mediana 5852ng/ml; 39,77 – 42800ng/ml) para os controles. Em relação a capacidade de ligação da MBL, a concentração média foi de 780.5ng/ml (mediana 446.6; 74.66 – 3112ng/ml) para os casos sintomáticos, 761.3ng/mL (mediana 450.4;

72.04 – 2754ng/mL) para os casos assintomáticos e 1544ng/ml (mediana 1179ng/ml; 9.004 – 8306ng/ml) para os controles.

Gráfico 1- Comparação dos níveis de MBL entre lactentes infectados por DENV e lactentes não-infectados

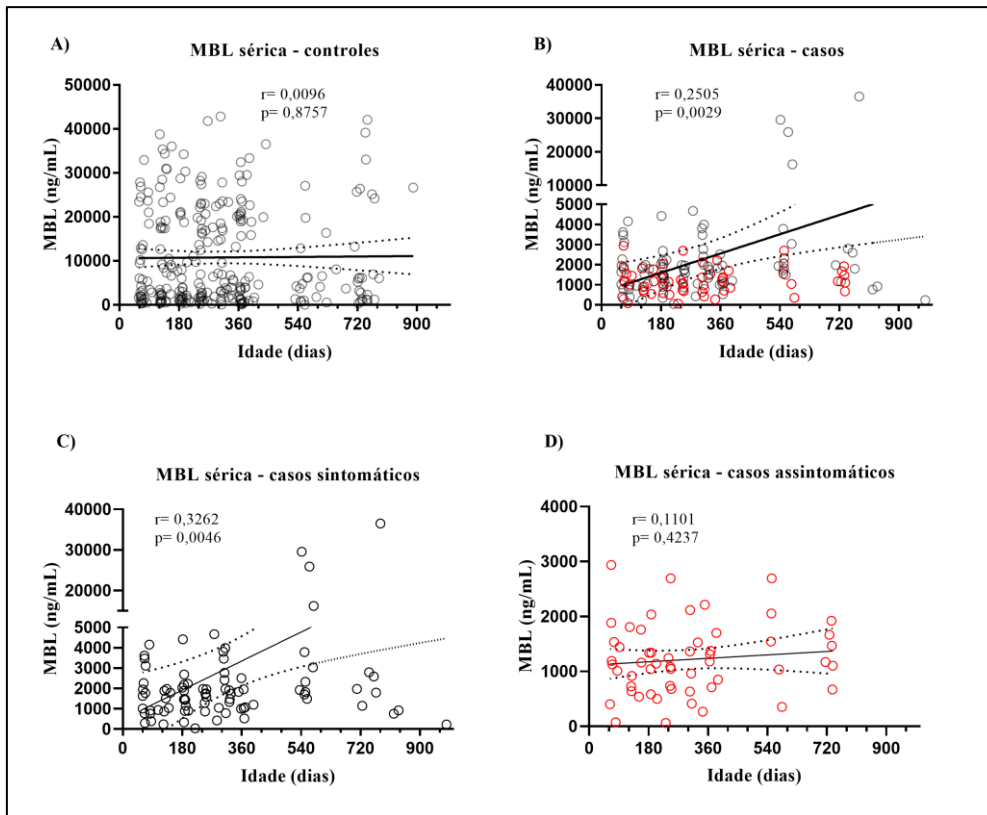


Fonte: A autora

Legenda: O gráfico demonstra os níveis de MBL sérica (a) e capacidade de ligação da MBL (b) entre os grupos de casos assintomáticos, casos sintomáticos e controles. Os níveis séricos e de capacidade de ligação da MBL foram estatisticamente significativos entre os grupos ($p < 0,0001$; Teste de Kruskal-Wallis).

Em seguida, foi avaliado a influência da idade nos níveis de MBL. Apenas foi observada correlação entre a idade e os níveis de MBL sérica entre os casos ($r = 0,2505$; $p = 0,0029$; gráfico 2B). Quando estratificado entre casos sintomáticos e assintomáticos, foi observada relação apenas nos casos sintomáticos ($r = 0,3262$; $p = 0,0046$; gráfico 2C). Assim, a análise subsequente foi realizada considerando pareamento por idade. Foi verificado se a infecção por dengue poderia modificar a produção de MBL antes ou após a infecção. Dessa forma, foi selecionado um pool de amostras coletadas no momento anterior à infecção (amostra pré-infecção) e imediatamente após (amostra pós-infecção) e comparadas entre os três grupos (sintomáticos, assintomáticos e controles). Para isso, foram selecionadas 25 amostras de casos de dengue (9 casos assintomáticos e 16 sintomáticos) e 50 controles, pareadas por idade (1 caso: 2 controles) nos momentos pré e pós-infecção.

Gráfico 2 – Correlação entre idade e níveis séricos de MBL dos lactentes incluídos no estudo



Fonte: A autora

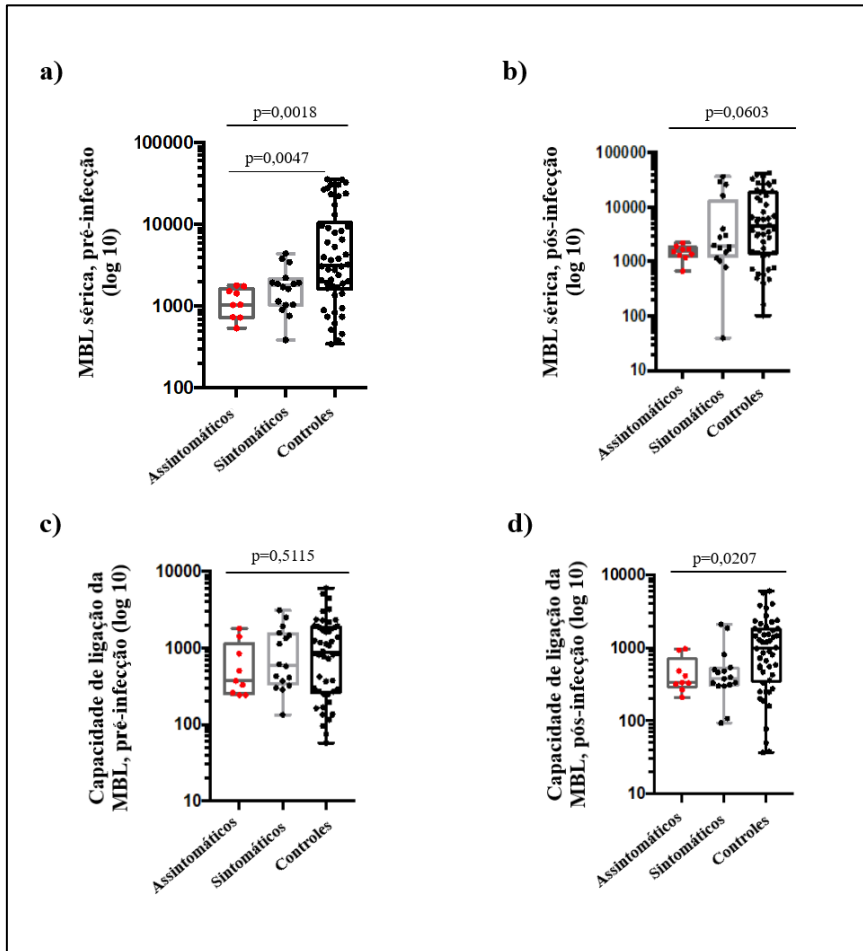
Legenda: O gráfico representa a correlação entre idade e os níveis séricos de MBL no grupo controle (A) e no grupo dos casos (B). No grupo dos casos, apenas foi observada correlação entre os casos sintomáticos (C) e não foi observada correlação com o grupo dos assintomáticos (D).

De maneira geral, lactentes não-infectados pelo DENV nos dois primeiros anos de vida apresentaram níveis maiores de MBL do que os lactentes que se tornaram caso, mas sem diferenças significativas entre casos sintomáticos e assintomáticos. Nas amostras pareadas, os níveis basais de MBL, no momento pré-infecção, foram maiores no grupo controle do que nos casos ($p=0,0018$), sendo essa diferença observada apenas quando comparado ao grupo dos assintomáticos ($p=0,0047$; gráfico 3A). No momento pós-infecção, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p=0,0603$; gráfico 3B). Em relação a capacidade de ligação, foram observadas diferenças entre casos e controles no momento pós-infecção ($p=0,0207$; gráfico 3D), mas sem diferenças significativas quando estratificado entre casos sintomáticos e assintomáticos. Não houve diferença na capacidade de ligação da MBL entre os grupos no momento pré-infecção ($p=0,5115$; gráfico 3C).

Dessa forma, as análises subsequentes de associação entre os níveis basais de MBL e o perfil genético (polimorfismos no gene *MBL2*) nos lactentes com dengue e lactentes *naive*

foram realizadas apenas com as amostras coletadas antes da confirmação laboratorial de infecção por dengue, totalizando 130 amostras.

Gráfico 3 – Níveis de MBL sérica e capacidade de ligação nas amostras pareadas



Fonte: A autora

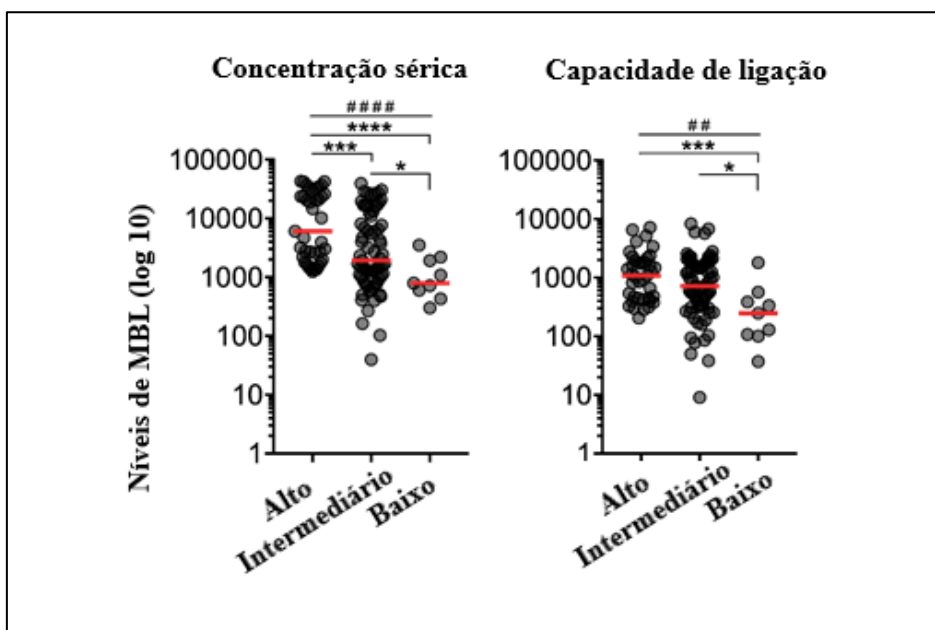
Legenda: a) Níveis de MBL sérica no momento pré-infecção de acordo com os grupos;
 b) Níveis de MBL sérica no momento pós-infecção de acordo com os grupos;
 c) Níveis de capacidade de ligação da MBL no momento pré-infecção de acordo com os grupos;
 d) Níveis de capacidade de ligação da MBL no momento pós-infecção de acordo com os grupos;

6.4 Correlação entre os haplótipos do *MBL2*, níveis séricos e capacidade de ligação da MBL com a infecção por dengue nos lactentes

As variantes alélicas foram combinadas para formação dos haplótipos e estes foram classificados em baixo, médio e alto produtores de MBL. Os níveis de MBL sérica e capacidade de ligação da MBL foram consistentes com a classificação dos haplótipos, como demonstrado no gráfico 4. Entre os grupos de haplótipos, sem estratificação por casos e controles, os níveis

de MBL sérica e capacidade de ligação foram significativamente distintos (Gráfico 4). As concentrações de MBL sérica apresentaram medianas de 6040ng/ml para o haplótipo de alta produção de MBL, 1923ng/ml para o haplótipo intermediário e 791,3ng/ml para o haplótipo de baixa produção de MBL. Já os níveis de capacidade de ligação da MBL, apresentaram medianas de 1089ng/ml, 719,2ng/ml, e 247ng/ml para os haplótipos de alta, intermediária e baixa produção de MBL, respectivamente.

Gráfico 4- Níveis de MBL sérica e capacidade de ligação de MBL de acordo com a classificação dos haplótipos do gene *MBL2*



Fonte: A autora.

Legenda: Os gráficos representam os níveis de MBL sérica e capacidade de ligação da MBL entre os haplótipos de alta, intermediária e baixa produção de MBL, sem estratificação por grupos (casos sintomáticos, casos assintomáticos e controles).

Nota: A linha horizontal vermelha representa a mediana; #### $p < 0,0001$ e ## $p < 0,01$ (Teste de Kruskal-Wallis); **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ (Teste de Mann-Whitney).

O haplótipo intermediário foi o mais frequente entre os grupos (44,4%, 75,0% e 61,3% entre sintomáticos, assintomáticos e controles, respectivamente), e no grupo dos assintomáticos não foi encontrado nenhum haplótipo relacionado à baixa produção de MBL. Nenhuma tendência estatisticamente significativa foi encontrada entre a estratificação dos haplótipos e a frequência de infecção por dengue nos lactentes (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência da distribuição dos haplótipos entre casos e controles

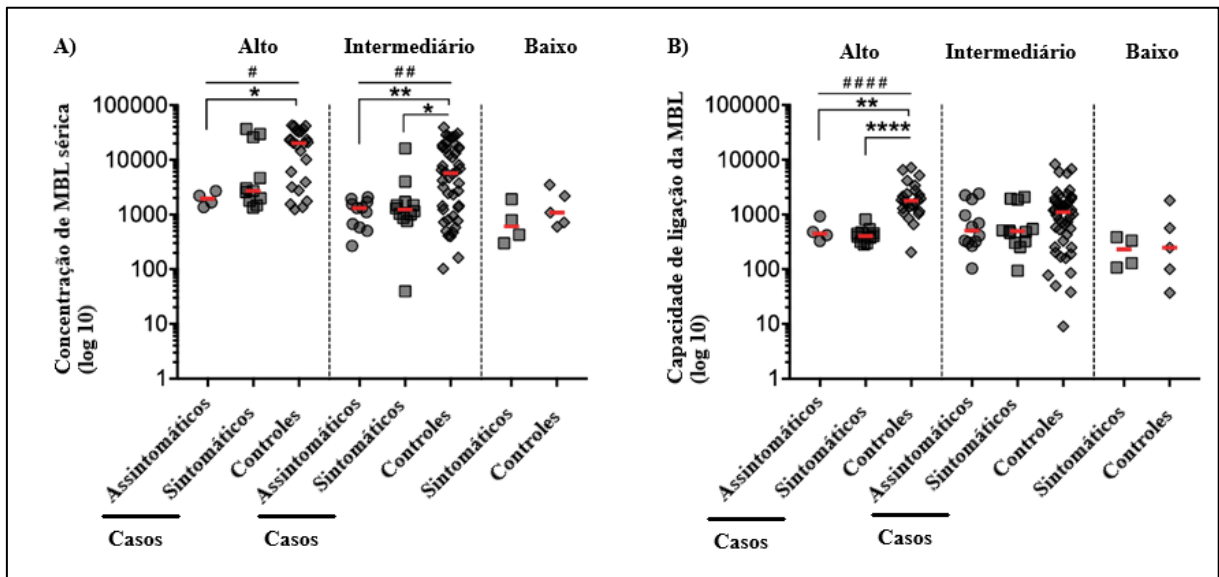
Haplótipos <i>MBL2</i>	Casos, n (%)			Controles		
	Total (n=43)	Sintomáticos (n=27)	Assintomáticos (n=16)	Total (n=75)	OR (IC 95%)*	p-value**
Alto	15 (34.9)	11 (40.7)	4 (25.0)	24 (32.0)	Referência	Referência
Intermediário	24 (55.8)	12 (44.4)	12 (75.0)	46 (61.3)	1.19 (0.53-2.61)	0.681
Baixo	4 (9.3)	4 (14.8)	0 (0.0)	5 (6.7)	0.78 (0.18-2.88)	>0.999

Fonte: A autora

Nota: *Casos (sintomáticos e assintomáticos) *versus* controles; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança; **Teste exato de Fisher; Haplótipos não foram determinados em amostras de a 3 casos de dengue (n=46) e b 9 controles (n=84).

Em relação aos níveis séricos e de capacidade de ligação da MBL entre os haplótipos, quando estratificado entre casos e controles, foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Gráfico 5). Entre os lactentes classificadas como altas produtoras de MBL, os níveis séricos ($p = 0,0173$) e capacidade de ligação da MBL ($p < 0,0001$) foram significativamente menores entre os casos de dengue do que nos controles. Para produtores intermediários de MBL, os níveis de MBL sérica também foram significativamente mais baixos entre os casos de dengue ($p = 0,0011$), porém o mesmo não foi observado para os níveis de capacidade de ligação ($p=0,3659$). Para os baixos produtores de MBL, nenhuma diferença foi observada entre os grupos. Igualmente, também não foram encontradas diferenças significativas nos níveis séricos e capacidade de ligação da MBL entre casos sintomáticos e assintomáticos de dengue.

Gráfico 5 – Níveis de MBL sérica e capacidade de ligação da MBL de acordo com os haplótipos, estratificado por casos e controles



Fonte: A autora

Legenda: O gráfico representa os níveis de MBL sérica (A) e capacidade de ligação da MBL (B) entre os haplótipos de alta, intermediária e baixa produção de MBL, estratificado por grupos (casos sintomáticos, casos assintomáticos e controles).

Nota: A linha horizontal vermelha representa a mediana; ##### $p < 0,0001$, ## $p = 0,0011$ e # $p = 0,0173$ (teste de Kruskal-Wallis; Casos *versus* Controles); **** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney; Casos assintomáticos/sintomáticos *versus* controles)

7 DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na patogênese da dengue são multifatoriais e ainda não totalmente compreendidos. É bem estabelecida a relação entre infecções sequenciais e heterólogas por DENV e o risco aumentado de desenvolver dengue grave. No entanto, diferente de adultos, adolescentes e crianças maiores, os lactentes constituem uma população particular quanto ao risco de desenvolver a infecção por dengue. Particularmente, mais de 5% de todos os casos graves de dengue relatados em lactentes com menos de 1 ano de idade estão associados a uma infecção primária (CAPEDING *et al.*, 2010; HALSTEAD *et al.*, 2002). Conforme relatado anteriormente, encontramos uma alta incidência de infecção por dengue no primeiro (107.6/1,000 pessoas-ano) e segundo (93.3/1,000 pessoas-ano) anos de acompanhamento da coorte (CASTANHA *et al.*, 2017). Isso sugere uma alta exposição à dengue na nossa população, semelhante à incidência geral de infecção por dengue entre crianças (119/1,000 pessoas-ano) relatada por Capeding *et al.* (2010).

Essas taxas são mais altas do que a incidência observada em estudos de coorte conduzidos em populações pediátricas de países asiáticos (CHAU *et al.*, 2009; PENGSAI *et al.*, 2006), onde a dengue grave é uma causa significativa de morte e hospitalizações entre crianças. Apesar da alta incidência de dengue entre as crianças incluídas em nossa coorte, nenhuma desenvolveu dengue grave, embora tenham nascido em uma área endêmica onde aproximadamente 90% das gestantes inseridas no estudo tinham marcadores sorológicos de infecção por dengue (LEITE *et al.*, 2014). Isso pode indicar que possivelmente outros mecanismos estão associados à gravidade da doença na população pediátrica, por exemplo, componentes da imunidade inata e perfil genético do hospedeiro. Assim, investigamos os níveis de MBL e polimorfismos associados à diminuição dos níveis de MBL em lactentes arrolados em uma de coorte de nascimento.

Inicialmente, não encontramos associação das características demográficas com a infecção por dengue, eliminando os possíveis vieses de idade e gênero. Além disso, as amostras utilizadas para determinação dos níveis séricos de MBL e capacidade de ligação foram coletadas antes da infecção, refletindo os níveis basais de MBL. A frequência de polimorfismos é amplamente variável entre diferentes grupos étnicos, como a população brasileira. Até o momento, poucos estudos relataram frequências de polimorfismos no gene *MBL2* na população brasileira, bem como avaliaram a associação entre esses SNPs e a suscetibilidade à infecção por dengue. As frequências dos alelos e genótipos do *MBL2* observadas em nosso estudo estão de acordo com as frequências observadas por Boldt *et al.* (2006) em populações brasileiras de

diferentes etnias do Sul e Centro-Oeste do país, e Ferraroni *et al.* (2012), em uma população do Rio de Janeiro, localizado na região Sudeste (BOLDT *et al.*, 2006; FERRARONI *et al.*, 2012).

Em relação à influência dos haplótipos do *MBL2* na dengue, encontramos níveis mais elevados de MBL sérica e capacidade de ligação da MBL entre os haplótipos de níveis alto e intermediário em crianças *naïve*, do que nos casos de DENV, o que pode indicar que níveis altos a intermediários de MBL são um fator protetor contra a infecção por DENV. Isso é corroborado por um estudo conduzido por Avirutnan *et al.* (2011), em que usaram um painel de soros *naïves* de humanos com variação nos níveis séricos de MBL como resultado de variantes alélicas de *MBL2*, e notaram que níveis elevados de MBL neutralizaram o DENV de forma mais eficiente do que aqueles com níveis mais baixos (AVIRUTNAN *et al.*, 2011).

Observamos uma grande variação interindividual na concentração sérica de MBL e na capacidade de ligação entre os haplótipos. Em geral, a maior concentração de MBL está associada ao HY, enquanto níveis um pouco menores – ou intermediários – estão associados ao haplótipo LY. O haplótipo LX está ligado aos níveis mais baixos de MBL circulantes, especialmente quando em associação com as variantes estruturais do éxon 1 (MADSEN *et al.*, 1995; MINCHINTON *et al.*, 2002; STEFFENSEN *et al.*, 2000). Neste estudo, observamos que o genótipo XY e o alelo X foram mais frequentes nos casos do que nos controles, e assim foram associados à dengue nos lactentes. Outros estudos, no entanto, não encontraram nenhuma associação entre SNPs na região -221 e a infecção por dengue (FIGUEIREDO *et al.*, 2016; PROMMALIKIT; THISYAKORN, 2015).

Os dados acerca da influência do polimorfismo P/Q na modulação da expressão do gene *MBL2* são mais conflitantes. Estudos demonstraram associação entre o alelo Q com níveis mais elevados de MBL, quando comparado ao alelo selvagem P (GARRED *et al.*, 2003; MADSEN *et al.*, 1995). Em contraste com os resultados de Swierzko *et al.*, obtidos de uma coorte de 1.800 neonatos poloneses que parecem indicar a associação oposta de valores mais altos de MBL sérica com o alelo P, embora a diferença na média da MBL sérica não tenha sido significativa entre os dois grupos (LYQA/LYQA e LYPA/LYPA) (ST. SWIERZKO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, encontramos uma frequência maior do alelo Q em homozigose e heterozigose no grupo controle, que normalmente está associado a níveis intermediários de MBL. No entanto, outras variantes parecem exercer maior impacto na modulação dos níveis de MBL e susceptibilidade à infecção por dengue nos lactentes.

As variantes do éxon 1 regulam a formação de oligômeros MBL funcionais e, juntamente com o promotor, influenciam os níveis circulantes da proteína no soro. Diferentemente dos alelos B e C, o alelo D tem um menor impacto nos níveis de MBL. Estudando crianças

brasileiras, Ornelas *et al.* (2019) observaram que haplótipos carregando os alelos Q, B e C foram associados ao risco de dengue grave, incluindo ajuste para ancestralidade genética (ORNELAS *et al.*, 2019). Da mesma forma, um outro estudo demonstrou que o haplótipo XO e o diplótipo XA/XO eram mais frequentes em casos de dengue, sugerindo um risco aumentado de dengue em uma população de Vietnamitas (GIANG *et al.*, 2020). Figueiredo *et al.* (2016) estudando casos de dengue em Recife, encontraram uma associação significativa entre o alelo B e o genótipo OO com dengue grave, sugerindo que os alelos e haplótipos variantes relacionados a MBL não funcional e baixos níveis séricos, parecem influenciar a susceptibilidade à dengue grave (FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

Nesse aspecto, comparando lactentes *naïve* e casos, nós demonstramos que a frequência do alelo O (10,0 e 4,4%, controles *naïve* e casos, respectivamente) e do genótipo AO (17,3 e 8,8%, controles *naïve* e casos, respectivamente) foram maiores nos controles, com o alelo B sendo o mais frequente entre os grupos. Apesar do genótipo AA, relacionado a maiores níveis de MBL, ter sido mais frequente nos casos, este grupo também apresentou a maior frequência do genótipo XY, o que poderia indicar que mesmo se eles tivessem altos níveis de MBL funcional, a secreção a nível transcricional seria deficiente na vigência da infecção pelo DENV.

Além disso, nós demonstramos que haplótipos relacionados a níveis intermediários de MBL foram mais frequentes em casos de dengue assintomáticos do que sintomáticos, o que sugere que a presença das variantes do *MBL2* pode conferir alguma proteção contra o desenvolvimento de sintomas durante a infecção por DENV nos lactentes. A hipótese de que níveis intermediários são protetores e suficientes em controlar a infecção por dengue pode ser demonstrada por um estudo conduzido por Acioli-Santos *et al.* (2008). De acordo com os autores, pacientes com genótipo AA apresentaram maior tendência de desenvolver trombocitopenia durante a infecção por dengue, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com DF ou DHF ($p=0,06$) (ACIOLI-SANTOS *et al.*, 2008).

Em síntese, este estudo demonstrou que lactentes infectados pelo DENV nos primeiros anos de vida possuíam níveis mais baixos de MBL do que crianças não-infectadas. Além disso, demonstramos que variantes no *MBL2* podem estar relacionadas a proteção ou susceptibilidade à dengue em lactentes. Uma limitação do nosso estudo foi o número de pacientes incluídos. Assim, um número maior de amostras seria necessário para confirmar qual variante estrutural estava associada em maior extensão à proteção contra dengue neste estudo. Além disso, estudos que avaliam a associação entre genótipos e níveis de *MBL2* podem ser bastante desafiadores, muitas vezes levando a resultados controversos devido a vários fatores, especialmente a

heterogeneidade das populações, seleção de grupos de estudo adequados e metodologia aplicada para detectar os oligômeros da MBL. Nossos resultados ampliaram as informações sobre a influência das variantes do alelo *MBL2* nos níveis séricos e atividade da MBL e forneceram mais informações acerca do papel dessa importante proteína da imunidade inata na proteção contra dengue em lactentes.

8 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que níveis intermediários a altos de MBL podem estar associados à proteção contra infecção pelo vírus dengue durante os dois primeiros anos de vida do lactente. Igualmente, que esses níveis – de MBL circulante e funcional – estão relacionados especialmente com a presença de variantes no gene *MBL2* na região promotora (-221; alelo X e genótipo XY) e do éxon 1 (alelo O). Essas variantes em associação, modulam a expressão e conformação estrutural da proteína e, conseqüentemente, tem um papel crucial na regulação dos níveis séricos e funcionalidade da MBL. A modulação desses níveis, especialmente durante os primeiros anos de vida da criança, é fundamental no combate à diversas infecções, como a dengue.

Isso foi evidenciado no nosso estudo pela presença de níveis séricos mais altos em crianças que não foram infectadas pelo DENV, sugerindo que a susceptibilidade para a infecção primária por dengue parece ser parcialmente influenciada pela composição do genótipo do *MBL2*. No entanto, mais estudos acerca do papel da MBL e dos SNPs no *MBL2* ainda são necessários para estabelecer qual é, de fato, a importância dessas variantes na patogênese da dengue, especialmente na população pediátrica.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo desenhado para fornecer uma compreensão dos níveis séricos basais e de atividade da MBL entre lactentes antes da infecção pelo DENV, a fim de investigar o papel desses níveis e das variantes do *MBL2* na suscetibilidade à infecção. Enfatizamos a importância de avaliar o papel da MBL na imunopatogênese da dengue e a relevância desta proteína, especialmente em lactentes, como uma molécula com potencial atividade antiviral na infecção pelo DENV.

REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B. *et al.* MBL2 Gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human Immunology**, New York, v. 69, n. 2, p. 122–128, 2008.
- ALAGARASU, K. *et al.* Elevated levels of vitamin D and deficiency of mannose binding Lectin in dengue hemorrhagic fever. **Virology Journal**, London, v. 9, n. 86, 2012. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-86>
- ALERA, M. T. *et al.* Incidence of Dengue Virus Infection in Adults and Children in a Prospective Longitudinal Cohort in the Philippines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0004337, 4 fev. 2016.
- AVIRUTNAN, P. *et al.* Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 193, n. 8, p. 1078–1088, 15 abr. 2006.
- AVIRUTNAN, P. *et al.* Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. **mBio**, v. 2, n. 6, p. 1–11, 2011.
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.
- BOLDT, A. B. W. *et al.* Diversity of the MBL2 Gene in Various Brazilian Populations and the Case of Selection at the Mannose-Binding Lectin Locus. **Human Immunology**, New York, v. 67, n. 9, p. 722–734, 2006.
- BRAGA, C. *et al.* Prospective birth cohort in a hyperendemic dengue area in Northeast Brazil: methods and preliminary results. **Cadernos de saude publica**, v. 32, n. 1, p. 1–11, 2016.
- CABEZAS, S. *et al.* Dengue Virus Induces Increased Activity of the Complement Alternative Pathway in Infected Cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 92, n. 14, p. 633–651, 9 maio 2018.
- CAPEDING, R. Z. *et al.* The incidence, characteristics, and presentation of dengue virus infections during infancy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, n. 2, p. 330–336, 5 fev. 2010.
- CASTANHA, P. M. S. *et al.* Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 141, n. 5, p. 1080–1088, 2013.

CASTANHA, P. M. S. *et al.* Placental Transfer of Dengue Virus (DENV)- Specific Antibodies and Kinetics of DENV Infection-Enhancing Activity in Brazilian Infants. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 214, p. 265–272, 2016.

CASTANHA, P. M. S. *et al.* Incidence and risk factors for Dengue virus (DENV) infection in the first 2 years of life in a Brazilian prospective birth cohort. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 145, n. 14, p. 2971–2979, 2017.

CAVALCANTI, L. P. *et al.* Change in Age Pattern of Persons with Dengue, Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 130–132, 2011.

CHAU, T. N. B. *et al.* Dengue Virus Infections and Maternal Antibody Decay in a Prospective Birth Cohort Study of Vietnamese Infants. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 200, n. 12, p. 1893–1900, 15 dez. 2009.

CHEN, H. L. *et al.* Evolution of dengue virus type 2 during two consecutive outbreaks with an increase in severity in Southern Taiwan in 2001-2002. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 4, p. 495–504, 2008.

CLAPHAM, H. *et al.* Epidemiology of Infant Dengue Cases Illuminates Serotype-Specificity in the Interaction between Immunity and Disease, and Changes in Transmission Dynamics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. e0004262, 11 dez. 2015.

CONDE, J. N. *et al.* The complement system in flavivirus infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 1–7, 2017.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 1128–1134, 2007.

COSTA, V. V. *et al.* Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: Protection versus disease induction. **American Journal of Pathology**, New York, v. 182, n. 6, p. 1950–1961, 1 jun. 2013.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 16, p. 7769–7773, 15 ago. 2001.

DE AZEVEDO, T. S.; LORENZ, C.; CHIARAVALLOTTI-NETO, F. Spatiotemporal evolution of dengue outbreaks in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 0, p. 1–10, 2020.

DE MESSIAS-REASON, I. J. *et al.* The Association between Mannan-Binding Lectin Gene Polymorphism and Clinical Leprosy: New Insight into an Old Paradigm. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 196, n. 9, p. 1379–1385, 2007.

DE PASCALE, G. *et al.* The role of mannose-binding lectin in severe sepsis and septic shock. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2013, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/625803/>.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. **Cell**, Cambridge, v. 162, n. 3, p. 488–492, 1 ago. 2015.

DICK, O. B. *et al.* Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 87, n. 4, p. 584–593, out. 2012.

DO NASCIMENTO, I. D. S. *et al.* Retrospective cross-sectional observational study on the epidemiological profile of dengue cases in Pernambuco state, Brazil, between 2015 and 2017. **BMC Public Health**, London, v. 20, n. 1, 12 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09047-z>

DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: Past, present and future. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 68, n. 3, p. 193–209, set. 2006.

DOURADINHA, B. *et al.* C1q binding to dengue virus decreases levels of infection and inflammatory molecules transcription in THP-1 cells. **Virus Research**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 231–234, 22 jan. 2014.

DUANGCHINDA, T. *et al.* Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 39, p. 16922–16927, 28 set. 2010.

DUYEN, H. T. L. *et al.* Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: Differential effects according to serotype and immune status. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 203, n. 9, p. 1292–1300, 1 maio 2011.

EISEN, D. P.; MINCHINTON, R. M. Impact of Mannose-Binding Lectin on Susceptibility to Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, n. 11, p. 1496–1505, 2003.

ELONG NGONO, A.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 279–308, 2018.

FARES, R. C. G. *et al.* Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/321873>

FERRARONI, N. R. *et al.* Mannose-binding lectin and MBL-associated serine protease-2 gene polymorphisms in a Brazilian population from Rio de Janeiro. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 32–38, 2012.

FIDLER, K. J. *et al.* Increased incidence and severity of the systemic inflammatory syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 30, n. 7, p. 1438–1445, 4 jul. 2004.

FIGUEIREDO, G. G. *et al.* Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. **Human Immunology**, New York, v. 77, n. 7, p. 571–575, 2016.

FRIED, J. R. *et al.* Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: An analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 3, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000617>

FUCHS, A. *et al.* Direct complement restriction of flavivirus infection requires glycan recognition by mannose-binding lectin. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 186–195, 19 ago. 2010.

GARCIA, M. *et al.* Skin innate immune response to flaviviral infection. **European Cytokine Network**, Montrouge, v. 28, n. 2, p. 41–51, 2 ago. 2017.

GARRED, P. *et al.* Dual Role of Mannan-Binding Protein in Infections: Another Case of Heterosis? **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 125–131, 1994.

GARRED, P. *et al.* Mannose-binding lectin deficiency - Revisited. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 40, n. 2–4, p. 73–84, 2003.

GARRED, P. *et al.* Mannose-binding lectin and its genetic variants. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 7, n. 2, p. 85–94, 5 mar. 2006.

GIANG, N. T. *et al.* Complement protein levels and MBL2 polymorphisms are associated with dengue and disease severity. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2020.

GLASNER, D. R. *et al.* Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 11, p. 1–22, 2017.

GORDON, A. *et al.* The Nicaraguan Pediatric Dengue Cohort Study: Incidence of Inapparent and Symptomatic Dengue Virus Infections, 2004–2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 9, p. e2462, 26 set. 2013.

GREEN, A. M. *et al.* Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 20 mar. 2014.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 8, n. 12 0, p. s7-16, 2010.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of Virology**, Wien, v. 158, n. 7, p. 1445–1459, 2013.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, London, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

HALLA, M. C. *et al.* Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. **Human Immunology**, New York, v. 71, n. 9, p. 883–887, 1 set. 2010.

HALSTEAD, S. Recent advances in understanding dengue. **F1000Research**, v. 8, n. 1279, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.19197.1>

HALSTEAD, S. B. In Vivo Enhancement of Dengue Virus Infection in Rhesus Monkeys by Passively Transferred Antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 140, n. 4, p. 527–533, 1979.

HALSTEAD, S. B. *et al.* Dengue hemorrhagic fever in infants: Research opportunities ignored. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1474–1479, 1 dez. 2002.

HALSTEAD, S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, 10 dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014>

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. **F1000Research**, v. 4, 2015. Disponível em: [doi:10.12688/f1000research.7024.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.7024.1)

HAMMOND, S. N. *et al.* Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 1063–1070, 2005.

HANAFUSA, S. *et al.* Clinical features and differences between child and adult dengue infections in Rayong Province, Southeast Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 39, n. 2, p. 252–259, 2008.

HÉJA, D. *et al.* Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 26, p. 10498–10503, 26 jun. 2012.

HERINGER, M. *et al.* Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: Case characterization following its introduction in an endemic region. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 17, n. 410, 9 jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2488-4>

IK, S. *et al.* Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 8, p. 5212–5215, 2001.

IP, W. K. E. *et al.* Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 10, p. 1697–1704, 15 maio 2005.

JAIN, A.; CHATURVEDI, U. C. Dengue in infants: An overview. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 119–130, 2010.

JAYARAJAH, U. *et al.* Clinical and Biochemical Characteristics of Dengue Infections in Children From Sri Lanka. **Global Pediatric Health**, v. 7, p. 1-11, 22 jan. 2020.

KAKKANAIHAH, V. N. *et al.* Association of low concentrations of serum mannose-binding protein with recurrent infections in adults. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 5, n. 3, p. 319–21, maio 1998.

KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S. Clinical presentations of dengue hemorrhagic fever in infants compared to children. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 86, n. 3, p. 673–80, ago. 2003.

KATZELNICK, L. C. *et al.* Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, Washington, v. 358, n. 6365, p. 929–932, 2017.

KITTIGUL, L. *et al.* The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 76–81, jun. 2007.

KLIKS, S. C. *et al.* Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 411–419, 1 mar. 1988.

KOCH, A. *et al.* Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 285, n. 10, p. 1316–1321, 14 mar. 2001.

L'AZOU, M. *et al.* Symptomatic Dengue in Children in 10 Asian and Latin American Countries. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 374, n. 12, p. 1155–1166, 24 mar. 2016.

LEITE, R. C. *et al.* Dengue infection in pregnancy and transplacental transfer of anti-dengue

antibodies in Northeast , Brazil. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 16–21, 2014.

LIBRATY, D. H. *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 15 out. 2002.

MADSEN, H. O. *et al.* Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 155, n. 6, p. 3013–20, 1995.

MADSEN, H. O. *et al.* Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 161, n. 6, p. 3169–3175, 1998.

MALAVIGE, G. N.; JEEWANDARA, C.; OGG, G. S. Dysfunctional Innate Immune Responses and Severe Dengue. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 590004, 23 out. 2020.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 4, p. 564–581, out. 2009.

MEHLHOP, E. *et al.* Complement Protein C1q Inhibits Antibody-Dependent Enhancement of Flavivirus Infection in an IgG Subclass-Specific Manner. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 2, n. 6, p. 417–426, 13 dez. 2007.

MELLORS, J. *et al.* Viral Evasion of the Complement System and Its Importance for Vaccines and Therapeutics. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1450, 9 jul. 2020.

MERLE, N. S. *et al.* Complement system part II: Role in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, p. 1, 26 maio 2015.

MESSINA, J. P. *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 1 set. 2019.

MINCHINTON, R. M. *et al.* Analysis of the relationship between mannanose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 56, n. 6, p. 630–641, 2002.

MONGKOLSAPAYA, J. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 7, p. 921–927, 1 jul. 2003.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the

Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 29, p. 587–619, 23 abr. 2011.

NANDWANI, S. *et al.* Early hematological parameters as predictors for outcomes in children with dengue in Northern India: A retrospective analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. 05192020, p. 1–7, 2021.

NASCIMENTO, E. J. M. *et al.* Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 8, 2009.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of Medical Research**, México, v. 36, n. 5, p. 425–435, 1 set. 2005.

NESARGIKAR, P.; SPILLER, B.; CHAVEZ, R. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 2, p. 103–111, jun. 2012.

NG, J. K. W. *et al.* First Experimental In Vivo Model of Enhanced Dengue Disease Severity through Maternally Acquired Heterotypic Dengue Antibodies. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e1004031, 3 abr. 2014.

NUNES, P. C. G. *et al.* 30 years of fatal dengue cases in Brazil: A review. **BMC Public Health**, London, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

OGDEN, C. A. *et al.* C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 194, n. 6, p. 781–795, 17 set. 2001.

ORNELAS, A. M. D. M. *et al.* Association between MBL2 haplotypes and dengue severity in children from Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, n. 4, p. 1–7, 2019.

PANG, X.; ZHANG, R.; CHENG, G. Progress towards understanding the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 1, p. 16–22, 2017.

PENGSA, K. *et al.* Dengue Virus Infections in the First 2 Years of Life and the Kinetics of Transplacentally Transferred Dengue Neutralizing Antibodies in Thai Children. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n. 11, p. 1570–1576, 1 dez. 2006.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, Oxford, v.

38, p. 133–149, 2001.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 1 jun. 2020.

PRESANIS, J. S.; KOJIMA, M.; SIM, R. B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). **Biochemical Society Transactions**, London, v. 31, n. 4, p. 748–752, 2003.

PROMMALIKIT, O.; THISYAKORN, U. Association Between Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms And Susceptibility To Dengue Virus Infection: A Preliminary Report. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 46, p. 29–34, 2015.

PUERTA-GUARDO, H.; GLASNER, D. R.; HARRIS, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. 1–29, 2016a.

RICO-HESSE, R. *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, New York, v. 230, n. 2, p. 244–251, 14 abr. 1997.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, ago. 2010.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 11, n. 8, p. 532–543, 15 ago. 2011.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 343, n. 1, p. 227–235, jan. 2011.

SCORZA, M. *et al.* Biological role of mannose binding lectin: From newborns to centenarians. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 451, p. 78–81, 7 dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25783214/>>. Acesso em: 18 set. 2020

SHENG, A. *et al.* A clinical case-control study on the association between mannose-binding lectin and susceptibility to HIV-1 infection among northern Han Chinese population. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 445–454, dez. 2010.

SHRESTA, S. Role of complement in dengue virus infection: Protection or pathogenesis? **mBio**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2012.

SILVA CEZAR, R. D. *et al.* Association between interferon lambda 3 rs12979860 polymorphism and clinical outcome in dengue virus-infected children. **International Journal**

of **Immunogenetics**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 351–358, 17 ago. 2020.

SIMMONS, C. P. *et al.* Maternal Antibody and Viral Factors in the Pathogenesis of Dengue Virus in Infants. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 196, n. 3, p. 416–424, ago. 2007.

SIMMONS, C. P. *et al.* Current concepts: Dengue. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 12 abr. 2012.

SIMMONS, C. P. *et al.* Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. **Vaccine**, Kidlington, v. 33, n. 50, p. 7061–7068, 10 dez. 2015.

ST. JOHN, A. L.; RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 19, n. 4, p. 218–230, 1 abr. 2019.

ST. SWIERZKO, A. *et al.* Mannan-binding lectin genotypes and genotype-phenotype relationships in a large cohort of Polish neonates. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 1, p. 68–72, 2009.

STEFFENSEN, R. *et al.* Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 241, n. 1–2, p. 33–42, 2000.

SUMMERFIELD, J. A. *et al.* Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. **The Lancet**, London, v. 345, p. 886–889, 1995.

SUWANMANEE, S.; LUPLERTLOP, N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectored arboviruses. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 55, n. 2, p. 81–89, 2017.

TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, R. A. B. The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, n. Supplement_7, p. S440–S444, 15 nov. 2005.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e2520, 19 dez. 2013.

THIEL, S.; FREDERIKSEN, P. D.; JENSENIUS, J. C. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 43, n. 1–2, p. 86–96, 2006.

THIEMMECA, S. *et al.* Secreted NS1 protects dengue virus from mannanose binding lectin-

mediated neutralization. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 197, n. 10, p. 4053–4065, 2016.

TUISKUNEN BÄCK, A.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 19839, 2013.

UNO, N.; ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 167, 2018.

VEKEMANS, M. *et al.* Low Mannose-Binding Lectin Concentration Is Associated with Severe Infection in Patients with Hematological Cancer Who Are Undergoing Chemotherapy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 44, n. 12, p. 1593–1601, 15 jun. 2007.

VERHAGEN, L. M.; DE GROOT, R. Dengue in children. **Journal of Infection**, London, v. 69, n. S1, p. S77–S86, 2014.

WAHALA, W. M. P. B.; SILVA, A. M. DE. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 3, p. 2374–2395, 2011.

WANG, W. H. *et al.* Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 6, p. 963–978, 26 mar. 2020.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, n. 42, p. 7221–7228, 2011.

WHO. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. In: **World Health Organization**. [s.l.: s.n.]. p. 1–144.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Dengue. **The Lancet**, London, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019.

WITAYATHAWORNWONG, P. DHF in infants, late infants and older children: a comparative study. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 36, n. 4, p. 896–900, jul. 2005.

WONG, S. S. F. *et al.* A simple method for DNA isolation from clotted blood extricated rapidly from serum separator tubes. **Clinical Chemistry**, New York, v. 53, n. 3, p. 522–524, mar. 2007.

WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G.; MULLIGHAN, C. G. Mannose-binding lectin: Biology and clinical implications. **Internal Medicine Journal**, Carlton, v. 35, n. 9, p. 548–555, 2005.

YAMANAKA, A. *et al.* Dengue virus infection-enhancing and neutralizing antibody balance

in children of the Philippines and Indonesia. **Microbes and Infection**, Paris, v. 14, n. 13, p. 1152–1159, 2012.

YAMANAKA, A.; KOSUGI, S.; KONISHI, E. Infection-Enhancing and -Neutralizing Activities of Mouse Monoclonal Antibodies against Dengue Type 2 and 4 Viruses Are Controlled by Complement Levels. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 2, p. 927–937, 15 jan. 2008.

YAUCH, L. E. *et al.* A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8 + T Cells . **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 8, p. 4865–4873, 15 abr. 2009.

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IAM/FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Níveis de MBL (lectina ligante de manose) e polimorfismos no gene mbl2 e sua relação com a infecção pelo vírus dengue em lactentes nascidos de mães imunes a dengue.

Pesquisador: MARILIA DE ALBUQUERQUE SENA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43051521.2.0000.5190

Instituição Proponente: FIOCRUZ - Instituto Aggeu Magalhães (IAM)

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.637.995

Apresentação do Projeto:

O projeto trata-se de um estudo financiado pelo Edital do Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP)/FIOCRUZ - APQ - 1670-2.11/15.

Resumo:

A dengue é uma arbovirose que representa um grande desafio para a saúde pública, especialmente em países da Ásia e da América Latina. A infecção por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV1-4) resulta em um amplo espectro clínico, que varia desde casos assintomáticos a um quadro febril autolimitante que pode evoluir para formas mais graves da doença. Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas da dengue são multifatoriais e não mutuamente exclusivos. Em lactentes, a imunidade inata desempenha um papel central no controle das infecções virais, antes do estabelecimento da imunidade adaptativa. A lectina ligante de manose (MBL), uma proteína essencial da imunidade inata, parece ter um papel crucial nas infecções por DENV. Polimorfismos (SNP) no gene MBL2, que estão associados a níveis reduzidos da proteína, podem influenciar na susceptibilidade e severidade da dengue. Estudos recentes têm explorado o papel desses SNPs e dos níveis de MBL nas infecções por dengue, mas tais estudos ainda são

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** cep.iam@fiocruz.br