



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMATOTERAPIA DO
AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE *MBL2* EM PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

LEONARDO CALHEIROS DE OLIVEIRA

MANAUS - AMAZONAS

2023

LEONARDO CALHEIROS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE *MBL2* EM PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências aplicadas à Hematologia*.

Orientador: **Dr. Gemilson Soares Pontes**

MANAUS - AMAZONAS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

C152c Oliveira, Leonardo Calheiros de
Caracterização do polimorfismo do gene MBL2 em
pacientes com leucemia linfóide aguda / Leonardo
Calheiros de Oliveira. Manaus : [s.n], 2023.
68 f.: color.; 1 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Hematologia - PPGH - Universidade do Estado
do Amazonas, Manaus, 2023.
Inclui bibliografia
Orientador: Pontes, Gemilson Soares

1. Lectina ligante de manose (MBL). 2. gene MBL2.
3. Leucemia linfóide aguda. 4. doenças infecciosas. I.
Pontes, Gemilson Soares (Orient.). II. Universidade do
Estado do Amazonas. III. Caracterização do polimorfismo
do gene MBL2 em pacientes com leucemia linfóide aguda



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM**



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 02/2023

Ao vigésimo dia do mês de junho do ano de 2023, às 09h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação do discente **Leonardo Calheiros de Oliveira**, sob o título: “**Caracterização do polimorfismo do gene MBL2 em pacientes com leucemia linfóide aguda**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Gemilson Soares Pontes**, segundo encaminhamento da Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes – Presidente (INPA)	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Documento assinado digitalmente  GEMILSON SOARES PONTES Data: 27/06/2023 19:28:42-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Assinatura: _____ CPF:6781283215
Prof. ^a Dr. ^a Tatiana Nayara Libório Kimura – Membro (UEA)	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 638.613.132-00
Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat – Membro (UFAM)	Aprovado(a) (x) Reprovado(a) ()	Documento assinado digitalmente  ANTONIO LUIZ RIBEIRO BOECHAT LOPES Data: 27/06/2023 19:24:56-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Assinatura: _____ CPF417.793.20272

O parecer final do Exame de Defesa foi:

(X) Aprovado

() Não Aprovado

Documento assinado digitalmente
 GEMILSON SOARES PONTES
Data: 27/06/2023 19:27:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da Banca Examinadora

Coordenação PPGH-UEA/HEMOAM

• Endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 – Chapada
• Manaus-AM – CEP 69050-001 / • Fone: (92) 3655-0123
• E-mail: mestrado@hemoam.am.gov.br
• Site: <http://www.pos.uea.edu.br/hematologia>
• www.instagram.com/ppgh_uea



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar essa oportunidade. Obrigado por ouvir minhas orações e por me guiar durante esse período de crescimento em minha vida.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha família, especialmente à minha mãe, Ana Cláudia Alves Calheiros, ao meu irmão, Luertt Calheiros de Oliveira, e à minha cunhada, Jéssica Bruce Calheiros, por todas as palavras de otimismo. Vocês sempre me motivaram a continuar firme em meus objetivos. Lembro-me dos momentos difíceis em que, mesmo quando eu não acreditava em meu próprio potencial, vocês renovaram minha confiança com palavras de encorajamento. Sem mais palavras, vocês são extremamente importantes para mim. Meus sinceros agradecimentos, amo vocês.

À minha noiva, Paula Ferreira de Souza, meu porto seguro, obrigado por me apoiar sempre. Seu companheirismo foi essencial para que eu mantivesse a confiança, mesmo em momentos de insegurança. Agradeço imensamente por cada conselho, abraço, sorriso e conforto que você me proporcionou durante todo esse período. Não consigo descrever tudo o que você representa para mim nesses dois anos e continuará representando. Serei eternamente grato a você por tudo, te amo.

A todas as pessoas que fazem parte do laboratório de imunologia e virologia do INPA, agradeço pelo apoio técnico e emocional durante este período. Em especial, aos meus amigos Carlos Eduardo de Castro, Alice de Freitas, Anderson Nogueira e Paulo Henrique Rodrigues, agradeço por todo o companheirismo e por compartilharem comigo momentos incríveis que levarei para sempre em minha memória. Não sei como teria passado por essa fase sem tê-los por perto, vocês são muito especiais para mim.

Ao meu amigo Sandro Silva, por sempre acreditar em mim e por mostrar o quanto sou capaz de conquistar meus sonhos. Agradeço por estar ao meu lado, mesmo morando em outra cidade você continuou sendo meu amigo e parceiro. Você também foi muito importante nessa jornada. Obrigado por tudo. Te amo, irmão.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, Gemilson Soares Pontes, pelo apoio técnico-científico incansável que me foi fornecido em todas as etapas do meu mestrado. Sua disponibilidade constante para me auxiliar e esclarecer minhas dúvidas foi inestimável. Tenho uma enorme estima e admiração por você, tanto como profissional exemplar quanto como ser humano excepcional.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e à Universidade do Estado do Amazonas (UEA), gostaria de expressar minha gratidão pela oportunidade de realizar esta etapa da minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH) por contribuir para o meu crescimento profissional e por sempre buscar melhorias na formação dos acadêmicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), gostaria de expressar minha profunda gratidão por conceder-me a bolsa de estudo durante a realização deste mestrado. Essa oportunidade foi fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Também gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo valioso apoio financeiro fornecido para a realização deste estudo. Sua contribuição foi fundamental para o sucesso e conclusão deste trabalho.

Agradeço sinceramente à FAPEAM e ao CNPq por reconhecerem o valor da pesquisa e por investirem no avanço científico em nosso país.

DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Mais uma vez, agradeço sinceramente ao CNPq e à FAPPEAM por acreditarem em meu trabalho e pelo valioso suporte financeiro concedido. Essa parceria é essencial para o progresso da ciência no Brasil e para o desenvolvimento de pesquisas que possam trazer benefícios para a sociedade como um todo.

RESUMO

A lectina ligante de manose (MBL) é uma proteína plasmática de fase aguda da imunidade inata, com propriedades efetoras e reguladoras que desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos. A MBL exerce sua atividade por meio da ativação do sistema complemento, mecanismos de opsonização e fagocitose, através de sua capacidade de se ligar a carboidratos ricos em manose, fucose e glucosamina, presentes na superfície celular de vários microrganismos patogênicos. Contudo, a presença de variantes genéticas no éxon 1 do gene *MBL2* estão associadas a baixas concentrações plasmáticas da proteína. Essas variações podem resultar em maior suscetibilidade às infecções, especialmente em indivíduos imunossuprimidos. Este estudo teve como objetivo principal caracterizar o polimorfismo do gene *MBL2* e avaliar a possível associação dos genótipos e níveis séricos da proteína MBL com a suscetibilidade às infecções em pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda (LLA). Um total de 122 pacientes portadores de LLA atendidos na Fundação HEMOAM foram incluídos neste estudo. A genotipagem do éxon 1 do gene *MBL2* foi realizada por meio da técnica de PCR e digestão por enzimas de restrição (RFLP), seguida pela dosagem dos níveis plasmáticos de MBL por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados revelaram uma frequência maior do alelo *MBL*A* (0,37) nessa população de estudo, enquanto o alelo *MBL*D* (0,32) foi o mais frequente entre os alelos variantes, seguido pelo alelo *MBL*B* (0,31). O alelo *MBL*C* não foi encontrado. Contudo, ao se considerar a frequência do alelo polimórfico O (presença de B ou D) foi observada uma frequência de 0,68. O genótipo A/O (0,49) foi o mais comum e seus portadores apresentaram maior número de infecções, seguidas do genótipo O/O (0,38) e o genótipo A/A (0,13). No período de 2015 a 2023, um total de 239 infecções ocorreram na população de estudo. As infecções mais frequentes foram as parasitárias (n=103) e bacterianas (n=69). Além disso, também foram observadas infecções virais (n=48) e fúngicas (n=19). Contudo, não foram observadas associações significativas entre os níveis séricos da MBL, os tipos de genótipos e a suscetibilidade às infecções. Este estudo apresenta a primeira descrição da variabilidade genética do gene *MBL2* em pacientes com LLA e sua associação com a suscetibilidade às infecções. Os resultados obtidos contribuem para uma melhor compreensão das bases genéticas da resposta imunológica e sua relação com a saúde e a doença no contexto da LLA.

Palavras-chave: Lectina ligante de manose (MBL), gene *MBL2*, Leucemia Linfóide Aguda (LLA), doenças infecciosas.

ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) is an acute phase plasma protein of innate immunity, with effector and regulatory properties that play a key role in host defense against pathogenic microorganisms. MBL exerts its activity through the activation of the complement system, mechanisms of opsonization and phagocytosis, through its ability to bind to carbohydrates rich in mannose, fucose and glucosamine, present on the cell surface of several pathogenic microorganisms. However, the presence of genetic variants in exon 1 of the *MBL2* gene are associated with low plasma concentrations of the protein. These variations can result in greater susceptibility to infections, especially in immunosuppressed individuals. The main objective of this study was to characterize the polymorphism of the *MBL2* gene and to evaluate the possible association of genotypes and serum levels of the MBL protein with susceptibility to infections in patients with Acute Lymphoid Leukemia (ALL). A total of 122 patients with ALL treated at foundation HEMOAM were included in this study. Genotyping of exon 1 of the *MBL2* gene was performed using the PCR and restriction enzyme digestion (RFLP) technique, followed by measurement of plasma levels of MBL using an immunoenzymatic assay (ELISA). The results revealed a higher frequency of the *MBL**A allele (0.37) in this study population, while the *MBL**D allele (0.32) was the most frequent among the variant alleles, followed by the *MBL**B allele (0.31). The *MBL**C allele was not found. However, when considering the frequency of the O polymorphic allele (presence of B or D) a frequency of 0.68 was observed. The A/O genotype (0.49) was the most common and its carriers had the highest number of infections, followed by the O/O genotype (0.38) and the A/A genotype (0.13). In the period from 2015 to 2023, a total of 239 infections occurred in the study population. The most frequent infections were parasitic (n=103) and bacterial (n=69). In addition, viral (n=48) and fungal (n=19) infections were also observed. However, no significant associations were observed between MBL serum levels, types of genotypes and susceptibility to infections. This study presents the first description of the genetic variability of the *MBL2* gene in patients with ALL and its association with susceptibility to infections. The results obtained contribute to a better understanding of the genetic basis of the immune response and its relationship with health and disease in the context of ALL.

Keywords: Mannose-binding lectin (MBL), *MBL2* gene, Acute Lymphoid Leukemia (ALL), infectious diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização celulares de receptores de reconhecimento padrão do sistema imune inato. Fonte: Abbas et al., (2019).....	4
Figura 2. Vias de ativação do sistema complemento, formação do complexo C3 convertase, responsável por desencadear as primeiras etapas do sistema complemento e formação do complexo C5 que dará início ao complexo de ataque à membrana (MAC), responsável pela fagocitose e morte celular do invasor. Fonte: Abbas et al., (2019).	6
Figura 3. Ativação do sistema complemento através da via da lectina. Fonte: Luo (2014).	7
Figura 4. Estrutura da cadeia polipeptídica da MBL e suas regiões estruturais. Fonte: Adaptado de Luo (2014).	8
Figura 5. Estrutura da formação oligomérica da proteína MBL. Fonte: Adaptado de Luo (2014).....	8
Figura 6. As diferenças estruturais conforme o alelo variante. Fonte: Adaptado de Auriti et al., (2017).	10
Figura 7. Subtipos de Leucemia Linfóide Aguda de acordo com a FAB. (A) célula cancerosa, (B) célula tipo L1, (C) célula tipo L2, (D) célula tipo L3. Fonte: Shafique (2018)	13
Figura 8. Taxa de incidência ajustada para casos de leucemia por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimados para o ano de 2020. Fonte: Dieguez (2019).....	15
Figura 9. Um modelo de seleção de células pré-leucêmicas derivadas de uma infecção por estresse proliferativo. Os clones pré-leucêmicos TEL-AML1, estão envolvidos na supressão do processo de hematopoese, o que contribui para o aumento da quantidade de células imaturas na circulação, as quais são incapazes de combater, de forma eficaz, as infecções e com isso os seus clones são proliferados causando um crescimento seletivo dando origem a leucemia linfóide aguda. Fonte: adaptado de Greaves et al., (2006).	18
Figura 10. Correlação dos níveis séricos da proteína MBL com os genótipos gerais A/A, A/O, O/O e estratificados A/B, A/D, B/B e B/D do éxon 1, gene MBL2.	31
Figura 11. Relação entre os diferentes genótipos do gene MBL2, éxon 1 e a suscetibilidade às infecções em pacientes com LLA.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da OMS (2016) para leucemias linfoides agudas.....	13
Tabela 2. Frequência alélica do éxon 1, gene MBL2 em pacientes portadores de LLA.	27
Tabela 3. Variantes genóticas e frequência alélica do éxon 1, gene MBL2 em pacientes portadores de LLA.	28
Tabela 4. Frequência alélica éxon 1, gene MBL2 em pacientes portadores de LLA em relação ao sexo e idade.....	29
Tabela 5. Frequência dos genótipos do éxon 1 do gene MBL2 de acordo com o sexo e idade da população de estudo.	30
Tabela 6. Total de infecções e indivíduos infectados de acordo com o tipo de infecção e genótipo.....	32
Tabela 7. Total de infecção de acordo com a espécie de microrganismo.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Alto risco
<i>BCR-ABL1</i>	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>BCR/ABL</i>
BR	Baixo risco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETS	Elementos transponíveis
<i>ETV6-RUNX1</i>	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>ETV6 E RUNX1</i>
FAB	Franco-Américo-Britânica
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
LLA	Leucemia linfóide aguda
MBL	Lectina ligante de manose
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NK	Natural killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Reação de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
SNC	Sistema nervosa central
SOBOPE	Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
TP53	Proteína tumoral 53
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Imunidade inata.....	3
2.2 Sistema complemento	4
2.3 Lectina ligante de manose (MBL)	6
2.3.1 Estrutura e genética da MBL	7
2.3.2 Polimorfismo do gene <i>MBL2</i>	9
2.3.3 Relação entre o polimorfismo do gene <i>MBL2</i> e a susceptibilidade às infecções.....	10
2.4 Leucemia linfóide aguda (LLA)	12
2.4.1 Epidemiologia das leucemias.....	15
2.4.2 Immunopatogenia da LLA.....	16
2.4.3 LLA e susceptibilidade às infecções	19
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Geral.....	22
4.2 Específicos.....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1 Delineamento do estudo	23
5.2 Aspectos éticos.....	23
5.3 Extração do DNA.....	23
5.4 Investigação dos polimorfismos do éxon 1 do gene <i>MBL2</i>	24
5.4.1 Determinação dos Alelos <i>MBL*A</i> , <i>MBL*B</i> e <i>MBL*C</i>	24
5.4.2 Determinação do Alelo <i>MBL*D</i>	25
5.4.3 Eletroforese.....	25

5.5 Dosagem da MBL sérica	26
5.6 Análise Estatística	26
6. RESULTADOS	27
6.1 Frequência alélica e genotípica do gene <i>MBL2</i> na população estudada	27
6.2 Níveis séricos de MBL de acordo com os genótipos	30
6.2 Associação dos polimorfismos do éxon 1 do gene <i>MBL2</i> e a susceptibilidade às infecções.	31
7. DISCUSSÃO	36
8. CONCLUSÃO	42
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	43

1. INTRODUÇÃO

A lectina ligante de manose (MBL) é uma proteína pertencente à família das colectinas produzida no fígado, dependente de cálcio e apresenta um domínio de colágeno, agindo no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). A MBL atua como importante receptor no combate a microrganismos patogênicos, principalmente via ativação do sistema complemento(1). Esta proteína também desempenha um papel importante na opsonização de células hospedeiras microbianas e anormais, caracterizando um efeito protetor contra diversas infecções, bem como contra o desenvolvimento de algumas doenças malignas (2).

No entanto, os níveis altos de MBL na corrente sanguínea podem estar relacionados com inflamação excessiva ou crônica, o que pode resultar em dano ao organismo, visto que em alguns casos, esse processo inflamatório pode ocasionar carcinogênese, podendo evoluir para falência de órgãos (3). A deficiência na via da lectina é comum no sistema complemento, afetando cerca de 20% da população humana. Essa deficiência está relacionada às modificações genéticas, implicando diretamente no desenvolvimento e no prognóstico de várias doenças (4).

A MBL apresenta três variações no alelo selvagem do gene *MBL2*, localizadas no códon 52, 54 e 57, que dão origem a três modificações classificadas em *MBL D*, *MBL B*, *MBL C*, respectivamente (5). As combinações dessas variações alélicas podem ocasionar deficiência sérica de MBL e, conseqüentemente, suscetibilidade às infecções por vários patógenos. Embora os polimorfismos do gene *MBL2* possam ser clinicamente despercebidos, as baixas concentrações séricas de MBL podem causar defeitos de opsonização e de ativação do sistema complemento. Estas deficiências podem resultar no aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas, principalmente em indivíduos imunodeprimidos, como pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (6,7).

A LLA é caracterizada pela proliferação desordenada de células progenitoras linfóides no sangue, medula óssea e outros locais extramedulares. Embora a LLA acometa tanto adultos quanto crianças, 80% dos casos ocorre em indivíduos com idade entre 2 a 10 anos (8). Sua sintomatologia pode ser inespecífica, apresentando um conjunto de sinais de insuficiência da

medula óssea, como anemia (9). O diagnóstico é estabelecido pela pesquisa de linfoblastos no sangue e da sua produção na medula óssea (10). A presença de 20% ou mais de linfoblastos na circulação é a principal característica clínica na LLA (11). Os exames comumente utilizados para a investigação são imunofenotipagem, feito por meio de citometria de fluxo e teste citogenético, além do hemograma e exames imunogenético (12).

Na LLA são observadas múltiplas alterações genéticas incluindo aneuploidia, deleções, inserções e rearranjos cromossômicos. Essas alterações genéticas são responsáveis por desregular a expressão gênica ou induzir a produção de proteínas de fusão quiméricas (13). Muitas dessas alterações interferem em processos celulares importantes, como: regulação da linhagem linfóide; impede a supressão tumoral através da via da proteína supressora de tumor TP53; interfere no metabolismo de nucleotídeos; e prejudica a regulação do desenvolvimento e diferenciação de células hematopoiéticas (14). Além disso, fatores imunogenéticos relacionados ao aumento da susceptibilidade às infecções, como a presença de variantes no gene *MBL2*, podem influenciar diretamente o curso clínico da LLA (15).

Diante disso, esse estudo tem como objetivo principal caracterizar os alelos e genótipos do gene *MBL2* em pacientes portadores de LLA atendidos na fundação HEMOAM. Os dados gerados por este estudo podem contribuir para uma melhor compreensão sobre a relação entre características imunogenéticas e a suscetibilidade às infecções em pacientes portadores de LLA.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Imunidade inata

A imunidade inata consiste em diversas moléculas solúveis, barreiras físicas, químicas, biológicas e células especializadas que estão presentes no sangue e nos tecidos, sendo responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo humano (16,17).

As barreiras físicas ou epiteliais são responsáveis por bloquear a entrada de diferentes microrganismos no corpo através de moléculas antimicrobianas presentes nas superfícies das células epiteliais (16). As células sentinelas teciduais, incluindo macrófagos, células dendríticas e mastócitos, possuem a função de detectar microrganismos e iniciar as respostas contra agentes estranhos. Já os neutrófilos, macrófagos, *natural killer*, dentre outras células que contêm sensores citosólicos e receptores de reconhecimento padrão (RRPS), por exemplo os receptores *Toll-like* (TLRs), são capazes de se ligar aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) para gerar uma resposta imunológica (18).

Os RRP's são importante componentes da imunidade inata, pois são capazes de ativar mecanismos como a fagocitose, apoptose, liberação de citocinas, quimiocinas, mediadores da inflamação, síntese de proteínas da fase aguda e ativação do sistema complemento (Figura 1) (16,19). Esses receptores estão presentes na membrana celular ou no interior dos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) (16). Além desses, existem outros receptores presentes nas células dos fagócitos, como os do tipo NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), capaz de identificar danos ou infecções no citoplasma celular, N-metil-formilados, capaz de reconhecer peptídeos bacterianos contendo resíduos de metionida, e o receptor do tipo *Scavenger*, envolvido na fagocitose (16).

Os PAMPs são por exemplo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ácidos lipoteicóicos, mananas, peptídoglicano, glucanos, DNA bacteriano e RNA de fita dupla presentes nos microrganismos (20). Ressalta-se que os PAMPs são produzidos apenas por patógenos microbianos, suas estruturas são essenciais para a sobrevivência ou patogenicidade dos microrganismos e são invariáveis em suas classes (19).

As interleucinas, citocinas, imunoglobulinas (Fc γ R), moléculas de reconhecimento padrão como a proteína C reativa (PCR), proteína amilóide sérica (SAP), também são partes

integrantes da imunidade inata. Além disso, um conjunto de mais de 30 proteínas termolábeis denominado de sistema complemento é parte essencial da imunidade inata, pois atua diretamente na eliminação de processos infecciosos e na manutenção da homeostase (21–23).

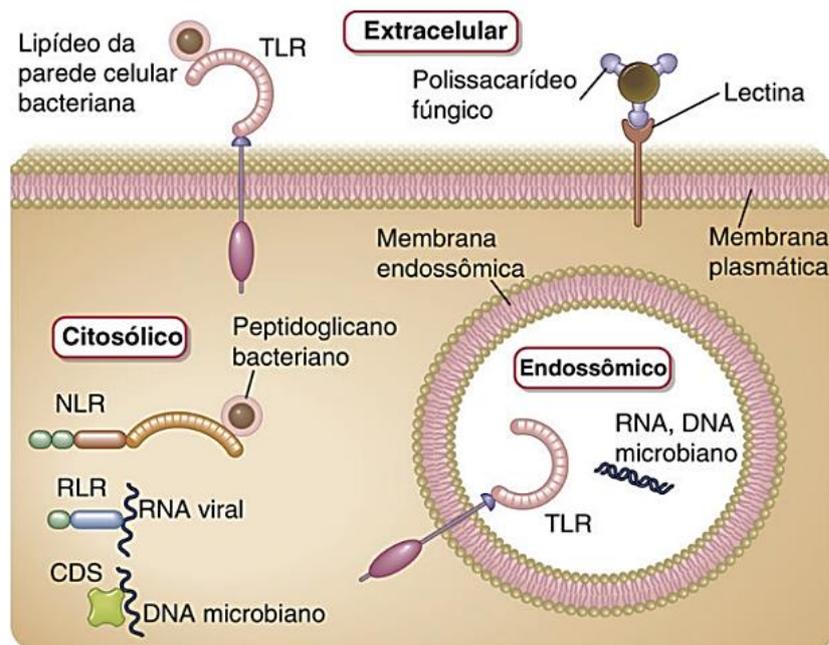


Figura 1. Localização celulares de receptores de reconhecimento padrão do sistema imune inato. Fonte: Abbas et al., (2019).

2.2 Sistema complemento

O Sistema Complemento (SC) é um importante componente da imunidade inata, constituído por uma diversidade de proteínas plasmáticas que têm por função a opsonização de microrganismos, recrutamento de células fagocíticas para locais de infecção e, em alguns casos, destruição direta de microrganismos (16). A ativação do SC envolve três vias distintas: a via clássica, a via alternativa e a via da lectina (24). O SC é ativado quando suas proteínas reconhecem moléculas específicas nas superfícies microbianas e após a ativação destas vias, se inicia uma cascata proteolítica, onde uma enzima precursora inativa, chamada de zimogênio, se torna uma protease ativada que por sua vez será capaz de induzir a atividade proteolítica da próxima proteína da cascata (16,25).

A via clássica é iniciada por meio da ligação do componente C1q a duas moléculas da imunoglobulina IgG ou a uma IgM (26). O resultado dessa ligação ativa as proteases R (C1r) e S (C1s), que por sua vez clivam os componentes C2 e C4 que estão envolvidos na mudança de permeabilidade vascular. A ativação dessas proteases resulta na clivagem dos componentes C2 e C4 em fragmentos menores, C2b e C4a, e em fragmentos maiores, C2a e C4b. A formação do complexo C4bC2a constitui a C3 convertase da via clássica que irá clivar C3 em C3a e C3b. A molécula C3b liga-se ao complexo C4bC2a na superfície do microrganismo originando o complexo C4bC2aC3b (C5) (27). A ativação desta via está relacionada a imunidade humoral, pois depende da ligação de antígeno-anticorpo (16,18).

A via alternativa é ativada por hidrólise espontânea de C3 que após a clivagem, gera C3a e C3b. Essa clivagem expõe uma ligação tioéster do fragmento C3b, favorecendo a ligação covalente da molécula C3b com a superfície dos microrganismos (16,28). Em seguida a molécula C3b se associa ao fator B, que por sua vez, será clivado em Ba e Bb pelo fator D. O complexo formado após essas clivagens é denominado C3bBb ou C3 convertase da via alternativa, que por sua vez, irá clivar outra molécula C3, que dará origem ao complexo C3bBbC3b. A estabilidade desse complexo se dá pelo fator P, properdina (29).

A via da lectina é ativada por meio da ligação da MBL plasmática na superfície de microrganismos. A MBL é capaz de reconhecer glicolipídeos e glicoproteínas microbianas (30). Quando ocorre a ligação da MBL ao microrganismo, acontece a ativação de duas serinas proteases chamadas de MASP1 e MASP2, as quais possuem funções semelhantes das proteases C1r e C1s da via clássica e que segue a mesma cascata de ativação como descrito acima (16,31).

O ponto de convergência de todas as vias do complemento é o complexo C3. O componente C3 convertase realiza uma clivagem da principal proteína do SC, a C3, que por sua vez irá produzir a C3a solúvel e C3b. A porção maior, C3b, se liga na superfície do microrganismo atuando como uma opsonina induzindo a fagocitose dos microrganismos (32). Enquanto que o fragmento C3a é utilizado na modulação da inflamação através dos neutrófilos e da degranulação dos mastócitos, aumentando a permeabilidade vascular e dessa forma promovendo o extravasamento de fluidos plasmáticos para o local da infecção (16,33).

Por meio de diversas ligações de componentes C3b nas superfícies dos microrganismos, acontece a formação do complexo C4bC2aC3b, denominado C5 convertase. A C5 convertase por sua vez, produz dois fragmentos a C5a e C5b (32). A C5a é uma anafilotoxina que participa na ativação da inflamação recrutando neutrófilos para o local (25). A C5b, se liga na superfície dos microrganismos, iniciando a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) com os componentes C6 e C7 na bicamada lipídica da membrana celular, resultando no complexo C5bC6C7, que por sua vez favorece a ligação do componente C8, e por fim ocorre a polimerização do componente C9 (16). O MAC utiliza a bicamada fosfolipídica para promover a lise osmótica do patógeno (Figura 2) (16,25).

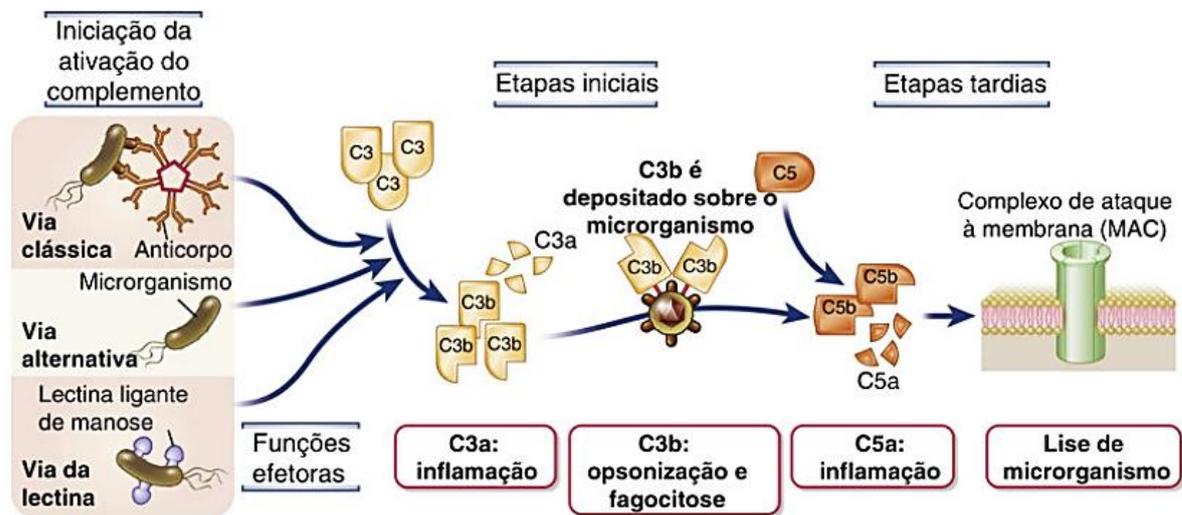


Figura 2. Vias de ativação do sistema complemento, formação do complexo C3 convertase, responsável por desencadear as primeiras etapas do sistema complemento e formação do complexo C5 que dará início ao complexo de ataque à membrana (MAC), responsável pela fagocitose e morte celular do invasor. Fonte: Abbas et al., (2019).

2.3 Lectina ligante de manose (MBL)

O primeiro relato da MBL ocorreu em 1968, quando foi verificada a ação opsonizante dessa proteína em uma menina que sofria de dermatite atópica e infecções recorrentes com defeitos na fagocitose (34). A MBL é sintetizada pelo fígado e secretada na corrente sanguínea, sendo classificada como lectina cálcio-dependente (35). Essa proteína apresenta uma região rica em colágeno e outra com afinidade aos carboidratos. Além de participar da ativação de uma das vias do SC, a MBL também atua na opsonização, modulação da

inflamação, remoção de células apoptóticas e indução da fagocitose de microrganismos (36). Para ativar o SC, a MBL precisa estar acoplada a diferentes serinas proteases chamadas de MASP1 e MASP2 as quais formam um complexo, capaz de se ligar ao patógeno e iniciar a cascata de proteínas do SC como já descrito. A ativação da cascata induz a fagocitose do patógeno pelas células apresentadoras de antígenos (Figura 3) (37).

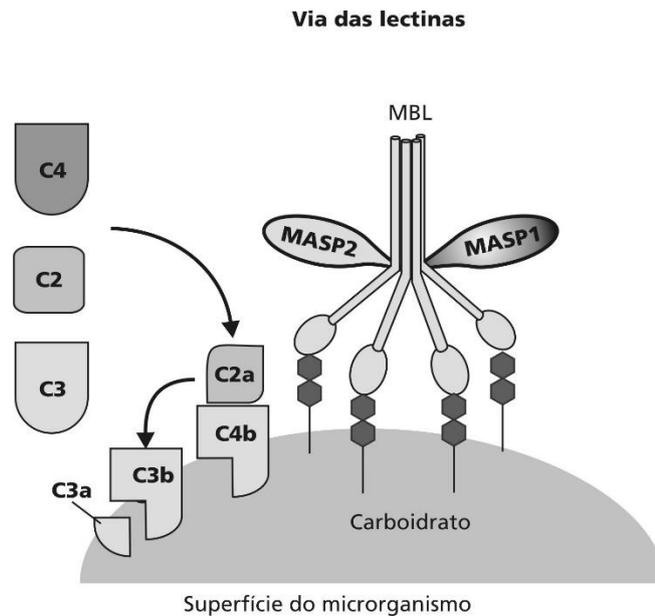


Figura 3. Ativação do sistema complemento através da via da lectina. Fonte: Luo (2014).

2.3.1 Estrutura e genética da MBL

A proteína MBL é composta por até 6 polímeros que são ligados por ponte de dissulfeto onde cada cadeia polipeptídica apresenta diferentes regiões: uma região rica em cisteína, domínio N-terminal NH_2 , um domínio de colágeno, uma região denominada de pescoço, caracterizada por um domínio de espiral α -helicoidal curto e um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (Figura 4) (38).

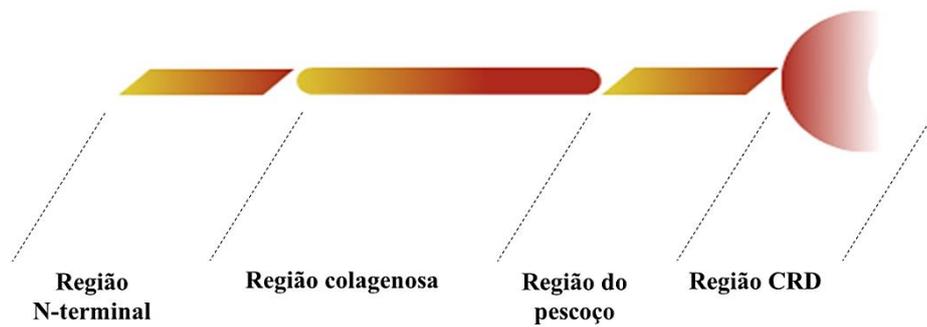


Figura 4. Estrutura da cadeia polipeptídica da MBL e suas regiões estruturais. Fonte: Adaptado de Luo (2014).

A unidade básica funcional da MBL consiste em 3 cadeias polipeptídicas que formam uma tripla hélice de 32kDa estabilizada por interação hidrofóbicas e ligações dissulfeto dentro da região rica em cisteína (1). Por meio do CRD é realizada a ligação com os carboidratos específicos que estão presentes nas paredes celulares dos patógenos, como por exemplo a mannose ou N-acetilglucosamina. Por essa habilidade, a MBL é pertencente ao grupo de moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs) (figura 5) (39).

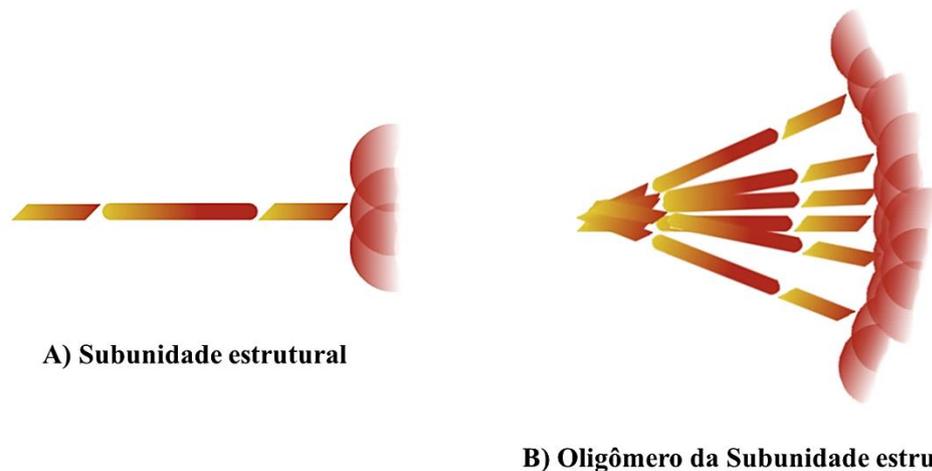


Figura 5. Estrutura da formação oligomérica da proteína MBL. Fonte: Adaptado de Luo (2014).

Os pesquisadores Taylor e Sastry identificaram a estrutura genética da proteína MBL no ano de 1989 (40). Naquele ano, foi realizada a clonagem e sequenciamento do gene MBL humano, o gene *MBL1* (um pseudogene) e o gene *MBL2*, o qual está localizado no cromossomo 10q11.1-q21. O gene *MBL2* é constituído por 4 éxons separados por 3 íntrons de 600, 1300 e 800 pares de base (pb), respectivamente (41).

2.3.2 Polimorfismo do gene *MBL2*

O éxon 1 corresponde ao domínio rico em cisteína capaz de codificar o peptídeo sinal, responsável pela formação da tripla hélice da estrutura de colágeno e possui 3 alelos variantes (42). O éxon 2 codifica o restante da parte colagenosa rica em glicina, o éxon 3 está presente na região do pescoço, uma região espiralizada α -hélice, o éxon 4 é responsável pelo domínio de ligação de carboidratos (DRC) em forma de uma configuração globular (43).

As variantes estruturais do éxon 1 compreendem alterações em trocas de bases nitrogenadas nos códons 52, 54 e 57 e são referidas como variantes *MBL*D* (*rs5030737*), caracterizada pela troca da arginina por cisteína (códon CGT por TGT), *MBL*B* (*rs1800450*) caracterizada pela troca de glicina por ácido aspártico (códon GGC por GAC) e *MBL*C* (*rs1800451*) caracterizada pela troca de glicina por ácido glutâmico (códon GGA por GAA). Esses alelos são chamadas coletivamente de O, enquanto que o alelo A é o tipo selvagem, denominado de *MBL*A* (Figura 6) (44).

O alelo A em homozigose está relacionado aos níveis normais de MBL. Contudo, a heterozigose com algum alelo polimórfico pode resultar na diminuição da concentração sérica de MBL em até 10% (15). Quando há homozigose de polimorfismos da região estrutural (O/O), é possível observar níveis de MBL sérico diminuídos em até 90%, sendo dificilmente detectados em ensaios imunoenzimáticos (45).

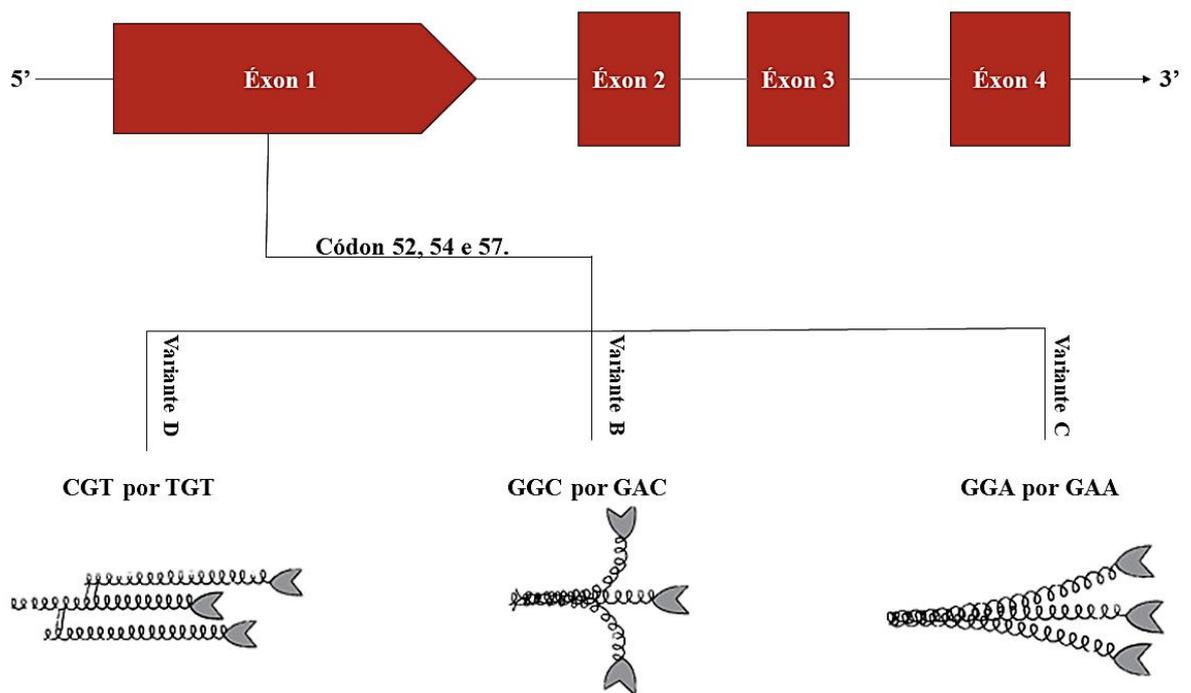


Figura 6. As diferenças estruturais conforme o alelo variante. Fonte: Adaptado de Auriti et al., (2017).

Polimorfismos na região do éxon 1 do gene *MBL2* são comumente encontrados na população mundial, atingindo principalmente pessoas brancas. O alelo *MBL*B* está presente principalmente na população europeia (26%) caracterizando baixas concentrações de MBL sérica, enquanto que o alelo *MBL*C* ocorre na população da África Subsaariana (50%) (46).

2.3.3 Relação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e a susceptibilidade às infecções

Existem várias associações do polimorfismo do gene *MBL2* e a susceptibilidade às infecções, como é o caso da associação com a infecção pelo vírus linfotrófico T humano 1 (HTLV-1), um retrovírus que pode causar doenças graves como a leucemia de células T (47).

No estudo de Coelho et al., (2013) foi observado que a deficiência de proteases envolvidas na ativação da via da lectina gerava suscetibilidade a infecção por HTLV-1 (47). Em outro estudo sobre a associação do polimorfismo do MBL em pacientes com HCV, foi observado que a frequência dos genótipos YA/YO foi maior em pacientes com HCV em comparação com o grupo controle saudável. O estudo sugeriu que o polimorfismo da região

promotora do gene *MBL2* está associado não somente ao aumento da susceptibilidade à infecção pelo vírus da hepatite C, mas também com o prognóstico da doença e a resposta ao tratamento (42).

No estudo de Das (2015) realizado na Índia com 336 indivíduos com malária grave, foi observado alta prevalência do polimorfismo B e Y-221 do gene *MBL2*, os quais estavam associados a maior suscetibilidade a disfunções em diferentes órgãos em pacientes acometidos com malária por *Plasmodium falciparum* (48). Em um estudo realizado com 279 pacientes vietnamitas acometidos com dengue grave, foi observado a associação dos polimorfismos B e -550 H/L com a infecção (49).

Essa associação dos níveis séricos de MBL e suscetibilidade às infecções também é observada em pacientes imunodeprimidos, como apresentado em um estudo realizado com 75 pacientes com LLA, onde verificou-se que 65% dos pacientes com níveis diminuídos de MBL apresentavam 2 ou mais episódios de infecções. O estudo sugeriu que baixos níveis de MBL sérico está relacionado a um aumento da suscetibilidade às infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos (50).

Em um outro estudo realizado com 44 crianças portadoras de LLA que apresentaram 142 episódios de neutropenia febril e 92 infecções bacterianas, observou-se que o aumento de duração de neutropenia febril e a suscetibilidade, principalmente, às infecções bacterianas estaria associados com a deficiência de MBL sérica (46).

No estudo de Ferenc et al. (2016) realizado com 54 pacientes oncohematológicos foi observado a associação dos genótipos AY/AY e AY/AX a uma diminuição na duração de febre. Por outro lado, os genótipos relacionados a níveis séricos inferiores (AX/AX, AY/O, AX/O ou O/O) foram associados ao aumento da duração de neutropenia febril. Diante dos resultados, foi sugerido que os genótipos de *MBL2* podem influenciar no curso da neutropenia febril em pacientes imunodeprimidos (51).

Apesar da existência de diversos estudos relacionados a níveis de MBL séricos e suas associações com a suscetibilidade às infecções, não há estudos imunogenéticos no Estado do Amazonas com o objetivo de caracterizar o polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes

imunocomprometidos, como portadores de LLA e seus possíveis impactos na suscetibilidade às doenças infecciosas.

2.4 Leucemia linfoide aguda (LLA)

A doença maligna LLA é resultado da proliferação descontrolada de linfócitos B ou T na medula óssea e circulação sanguínea (52). A produção desordenada de linfócitos contribui para a substituição de elementos celulares da medula óssea, sangue periférico e outros órgãos linfoides. A LLA é responsável por 2% das neoplasias linfoides diagnosticadas nos Estados Unidos e 2,6% das leucemias no Brasil (53,54). A incidência de LLA é maior em homens de pele branca e paciente com Síndrome de Down (54).

A linhagem B é a mais presente na LLA, sendo a forma mais comum na infância e compreende mais de 20 subtipos conforme a idade e perfis distintos de expressão gênica, como a expressão do gene *BCR-ABL* (52). LLA-B expressa antígenos específicos de células B, como por exemplo CD19, CD20, CD22, CD24, CD79a (55). As principais alterações genéticas envolvidas na linhagem B da LLA são aneuploidia, rearranjos que desregulam oncogenes e mutações. Todas essas alterações prejudicam o desenvolvimento linfoide, a hematopoiese, a sinalização da quinase e a regulação da cromatina (56).

O acometimento das células T na leucemia linfoide aguda (LLA-T) é caracterizada por diversas alterações nas vias regulatórias, atingindo principalmente a expressão de fatores de transcrição, sinalização de *NOTCH1/MYC* e o gene de receptor de célula (*TCR*), mais comumente o *TCR α* (14q11.2) e *TCR β* (7q35) (55,57). A LLA-T expressa antígenos específicos para células T, como o CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 e também CD1a, CD10, CD34, CD99 (58). Essas alterações foram caracterizadas com a ajuda do perfil de expressão gênica, onde pôde-se classificar mais de 90% dos casos de LLA-T em subgrupos (55). Os subgrupos de LLA são classificados de acordo com a desregulação de fatores de transcrição, os quais geram resultados em variantes estruturais ou mutações nos genes *TAL1*, *TAL2*, *TLX1*, *TLX*, *HOXA*, *LMO1/LMO2*, *LMO2/LYL1* ou *NKX2-1* (59).

A LLA apresenta sintomas muito semelhantes aos de anemia, trombocitopenia e neutropenia. Esses sintomas estão intimamente relacionados aos defeitos na produção das células de defesa na medula óssea (60). A febre, suores noturnos, sintomas envolvendo o

sistema nervoso central (SNC) e a perda de peso também costumam estar presentes em pacientes com leucemia linfóide aguda variando de acordo com os subtipos (61).

Conhecer os subtipos de LLA é indispensável para a classificação de risco e a escolha das terapias (52). Conforme a classificação Franco-Américo-Britânica (FAB), a LLA é dividida em três subtipos, a L1, L2 e L3. O subtipo L1 apresenta-se por células de tamanho pequeno e padronizado, com escassez de citoplasma e com seu núcleo discoide, porém, bem estruturado (62). O subtipo L2 não apresenta padrões em suas formas e são maiores com relação ao subtipo L1. O núcleo se mostra irregular e semelhante ao citoplasma (52). As células do subtipo L3 têm forma idêntica e tamanho padrão, com o núcleo oval ou redondo, apresenta vacúolos no citoplasma e são normalmente maiores que as células do subtipo L1. A FAB ainda considera os seguintes parâmetros: relação núcleo citoplasma, presença e números de nucléolos, regularidade da membrana nuclear e tamanho da célula (Figura 7) (62,63).

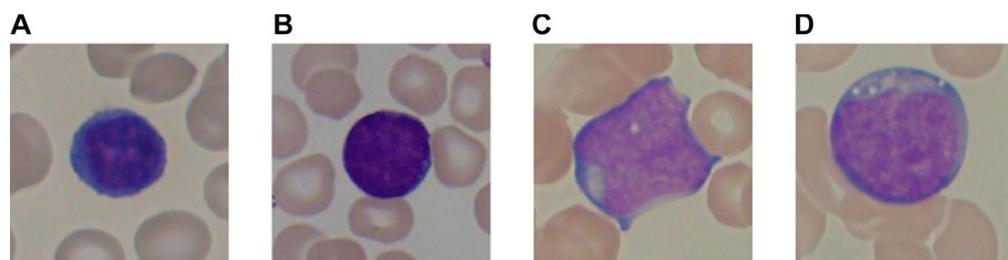


Figura 7. Subtipos de Leucemia Linfóide Aguda de acordo com a FAB. (A) célula cancerosa, (B) célula tipo L1, (C) célula tipo L2, (D) célula tipo L3. Fonte: Shafique (2018)

No ano de 2016 foi publicada a quarta edição da classificação pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de tumores e tecido hematopoiéticos e linfóides, em colaboração com a Sociedade de Hematopatologia e a Associação Europeia de Hematopatologia. A ocasião reuniu mais de 100 profissionais. Entre eles estiveram presentes patologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas de todo o mundo. A revisão da quarta edição seguiu os mesmos princípios das anteriores e está alinhada nos seguintes critérios: características clínicas, morfologia, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular (Tabela 1). O objetivo desta reunião foi apontar as inovações e descobertas recentes sobre neoplasias mielóides, linfóides e leucemia aguda (58).

Tabela 1. Classificação da OMS (2016) para leucemias linfóides agudas.

Neoplasia de células Linfoide

Leucemias agudas de linhagem ambígua

Leucemia aguda indiferenciada

Leucemia aguda de fenótipo misto (MPAL) com t (9; 22) (q34.1; q11.2); *BCR-ABL1*

MPAL com t (v; 11q23.3); *KMT2A* reorganizado

MPAL, B / mieloide, NOS

MPAL, T / mieloide, NOS

Leucemia linfoblástica B / linfoma

Leucemia / linfoma linfoblástico B, NOS

Leucemia / linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes

Leucemia / linfoma linfoblástico B com t (9; 22) (q34.1; q11.2); *BCR-ABL1*

Leucemia / linfoma linfoblástico B com t (v; 11q23.3); *KMT2A* reorganizado

Leucemia / linfoma linfoblástico B com t (12; 21) (p13.2; q22.1); *ETV6-RUNX1*

Leucemia / linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia

Leucemia B-linfoblástica / linfoma com hipodiploidia

Leucemia / linfoma linfoblástico B com t (5; 14) (q31.1; q32.3) *IL3-IGH*

Leucemia / linfoma linfoblástico B com t (1; 19) (q23; p13.3); *TCF3-PBX1*

Entidade provisória: leucemia / linfoma linfoblástico B, semelhante a *BCR-ABL1*

Entidade provisória: leucemia / linfoma linfoblástico B com *iAMP21*

Leucemia T-linfoblástica / linfoma

Entidade provisória: leucemia linfoblástica precursora de células T precoce

Entidade provisória: leucemia / linfoma linfoblástico de células natural killer (NK)

Fonte: Arber et al. (2016)

A presença de alterações no número de cromossomos (aneuploidia) está presente em 50% dos casos de leucemias agudas infantis, 20-30% das crianças apresentam hiperdiploidia alta e em 1% das crianças com LLA está presente a hipodiploidia baixa (31-39 cromossomos). O cromossomo 21 é frequentemente mais afetado pelo ganho de cromossomos e cerca de 90% dos pacientes com hiperdiploidia alta já tiveram trissomia ou tetrassomia nesse cromossomo (64).

A hiperdiploidia está associada a mutações em proteínas Ras, que podem originar genes como *NRAS*, envolvido na leucemia mieloide crônica (LMC), além de modificações na cromatina e a resultados desfavoráveis no prognóstico (65). Em contrapartida, a hipodiploidia é altamente recorrente em indivíduos com LLA com ocorrência de deleção do gene *IKZF2* ou

mutações no gene *TP53*, assim como está associada a um prognóstico ruim (66). Além das alterações numéricas, anormalidades estruturais também estão presentes, como *ETS* variante 6, um fator de transcrição relacionado a *Runt1* (*ETV6-RUNX1*), que ocorre em 15-25% dos pacientes com leucemia linfóide aguda (67). Outra translocação muito comum é o fator de transcrição 3 – PBX homeobox 1 (*TCF3-PBX1*), causada por t (1;19) (q23; p13) observada em 5-10% das pessoas com LLA. Essas translocações implicam diretamente na resposta do paciente ao tratamento (68).

2.4.1 Epidemiologia das leucemias

A estimativa mundial mostra que ocorreram 474,5 mil casos sendo 269,5 mil novos casos de leucemia na população masculina, com um risco de 6,3/100 mil homens e 205 mil novos casos em mulheres, cerca de 4,5/100 mil, no ano de 2020 (69). A maior incidência de casos de leucemias está concentrada em países com altos índices de desenvolvimento humano como: Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos, Canadá e grande parte da Europa (70).

No Brasil, estima-se um total de 5.920 mil novos casos de leucemia em homens e 4.890 mil novos casos de leucemia em mulheres para o triênio 2020-2022, sendo 5,67/100 mil entre homens e 4,56/100 mil entre as mulheres (Figura 8) (53).

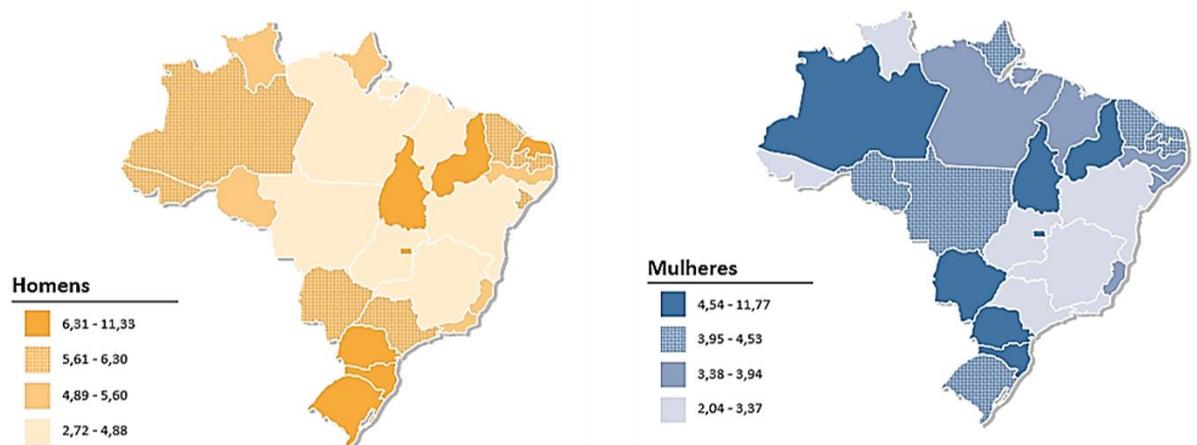


Figura 8. Taxa de incidência ajustada para casos de leucemia por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimados para o ano de 2020. Fonte: Dieguez (2019).

Dentre os mais frequentes cânceres na população masculina, sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia é o 5º câncer mais frequente na região Norte do Brasil (4,45/100mil). A mortalidade para o ano de 2017 foi de 4.795 mil óbitos, sendo 4,75/100 mil entre homens e de 4,25/100 mil entre mulheres (71). No ano de 2020, o Amazonas apresentou uma taxa estimada de leucemia de 5,78/100 mil entre os homens e 4,86/100 mil entre as mulheres (71).

A cidade de Manaus foi classificada em 2º lugar com maior taxa de incidência de leucemias infantis no ano de 2010. No ano seguinte, a capital amazonense ocupou o primeiro 1º com maior taxa de incidência do Brasil, apresentando 76,8 casos por milhão de habitantes, aumentando para 87,1 milhões de casos em 2016 (72–74). Em 2020 a incidência estimada de casos de leucemias em Manaus, foi de 6,18/100 mil entre homens e 5,75/100 mil entre mulheres (53).

Por existir apenas uma Fundação de Vigilância Hematológica no Amazonas (FHEMOAM) e pela grande extensão territorial da região amazônica, o centro enfrenta desafios relacionados a subnotificações de novos casos de leucemias infantis no estado (74).

2.4.2 Imunopatogenia da LLA

Na LLA é comum expressões de genes que são capazes de transformar o fenótipo celular, resultado da ocorrência de translocações, mutações e deleções cromossômicas, como já mencionado (75). Muitos dos produtos dessas alterações são fatores de transcrição, aos quais tem a capacidade de interagir com o DNA, ocasionando uma interferência nas cascatas regulatórias do crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de células sanguíneas normais. Tais alterações contribuem com a expressão de genes supressores de tumores, o que favorece a desregulação do sistema imunológico nos combates a diferentes infecções (76). As infecções são bastantes associadas ao desenvolvimento de LLA e segundo os modelos de Mel Greaves e Leo Kinlen isso pode se dar por meio de infecções de origem tardia ou através de interações de populações infectadas com populações sadias (77,78).

Segundo Mel Greaves (2018), o desenvolvimento de LLA passa por duas fases diferentes. A primeira fase ocorre *in útero* com a formação de gene pré-leucêmico, resultado

de alterações cromossômicas como hiperdiploidia. A segunda fase se dá pela aquisição de modificações genéticas secundárias a partir das primeiras semanas após o parto, como é o caso da fusão de genes (*ETV6-RUNX1*). Acredita-se também que as repostas imunológicas anormais à processos infecciosos, como o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias de maneira desordenada podem resultar em mutações relacionadas ao desenvolvimento de LLA (79).

A variante *ETV6-RUNX1* foi estudada em modelos como zebrafish, camundongos e em células animais para avaliar seu papel na LLA (80–82). O gene *RUNX1* codifica a subunidade α do fator que regula independentemente a formação das células hematopoiéticas. A fusão quimérica *ETV6-RUNX1* desregula o processo de hematopoese desfavorecendo a criação e maturação de células imunes e seus fatores de crescimento, como por exemplo, a interleucina IL-2 responsável pela proliferação de células T com efeitos antitumoral e microbiano (83). Os modelos sugeriram o envolvimento do gene *ETV6-RUNX1* como um oncogene fraco, estando relacionado com a proliferação ou sobrevivência de células pró-B ou pré-B (84). As células *ETV6-RUNX1*⁺ LLA expressam receptores funcionais de eritropoietina (EPO) e em modelos de células humanas e animais observou-se que esses receptores podem favorecer um sinal de sobrevivência para *ETV6-RUNX1*, resultando em expressão de células pré-leucêmicas (85). A fusão de *ETV6-RUNX1* é insuficiente para o desenvolvimento de LLA, no entanto os clones desse gene associados a outras mutações, incluindo o *Cdkn2a* e *Pax5* podem progredir para LLA (86,87).

Leo Kinlen, médico e epidemiologista, após verificar um aumento significativo de casos de LLA próximo às usinas nucleares no Reino Unido, propôs que os casos fossem ocasionados por uma sintomatologia rara ou anormal à uma infecção de baixa patogenicidade, supostamente viral, em uma população que migrou para a zona rural do Reino Unido (88,89). O epidemiologista sugeriu que onde ocorreu o influxo de adultos e famílias infectados em zonas mais isoladas como as rurais, a taxa de incidência de infecções foi aumentada, principalmente em pessoas com menos de 25 anos (77,89).

As hipóteses de Greaves e Kinlen ganham mais evidência quando associadas a mecanismos celulares do sistema imunológico. Um exemplo desses mecanismos são as alterações nas respostas de células T (78). Essas respostas alteradas podem resultar na excessiva liberação de quimiocinas e citocinas envolvidas na inflamação, como as

interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8, aumentando dessa forma a ação inflamatória, contribuindo com a produção e morte programada de células de defesa e suprimindo a hematopoese (16). Uma vez que há uma desregulação no sistema imunológico, as células pré-leucêmicas aumentam a proliferação de seus clones. Essa expansão de células pré-leucêmicas, resulta em mutações secundárias espontâneas ou resultantes da ação de radicais livres (ROS). Por consequência dessa proliferação, ocorrem erros no processo inflamatório, aos quais estão associados com o aumento ou diminuição de agentes inflamatórios, dando origem a um estresse proliferativo (figura 9) (78).

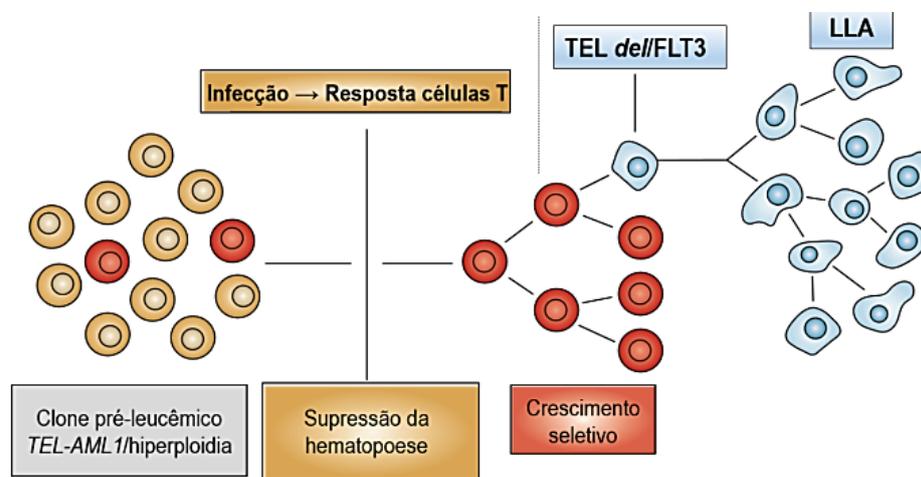


Figura 9. Um modelo de seleção de células pré-leucêmicas derivadas de uma infecção por estresse proliferativo. Os clones pré-leucêmicos *TEL-AML1*, estão envolvidos na supressão do processo de hematopoese, o que contribui para o aumento da quantidade de células imaturas na circulação, as quais são incapazes de combater, de forma eficaz, as infecções e com isso os seus clones são proliferados causando um crescimento seletivo dando origem a leucemia linfóide aguda. Fonte: adaptado de Greaves et al., (2006).

O estresse proliferativo, proveniente de uma desregulação, precisa ser diminuído e para isso o sistema imune dispõe de ferramentas responsáveis pela regulação e homeostasia do organismo, chamadas de *checkpoints* (90). Como por exemplo o antígeno linfocitário T citotóxico (CTLA-4) e a via de apoptose constituída pelas proteínas PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 (90). Os *checkpoints* desempenham papéis importantes na inibição e estimulação de atividades das células T, além de serem importantíssimos na tolerância imunológica (91). Entretanto, vários tipos de cânceres possuem a capacidade de anular essas respostas regulatórias, um exemplo são as leucemias. Muitos *checkpoints* são inibidos na LLA devido à

alta carga tumoral e proliferação celular. Essas neoplasias hematológicas acabam se estabelecendo antes mesmo da ação dos *checkpoints* (90).

2.4.3 LLA e susceptibilidade às infecções

A sobrevida dos pacientes com LLA vem aumentando com a utilização dos atuais protocolos de tratamentos (92). No entanto, a intensificação das doses medicamentosas está associada ao aumento das infecções (93). De acordo com O'Connor e colaboradores (2014), a frequência de mortes é equivalente a 2-4% dos pacientes e a principal causa são principalmente as infecções bacterianas (93). Fatores como Síndrome de Down, sexo feminino e intensidade medicamentosa na quimioterapia estão relacionados ao aumento do risco de mortalidade (94).

As medicações podem ser substituídas de acordo com a necessidade de cada paciente, no entanto, uma simples mudança dos medicamentos administrados na fase de indução pode acarretar em uma elevação do índice de mortes, como é o exemplo da troca de prednisona (40mg/m² diariamente) por dexametasona (6mg/m² diariamente), cuja mudança ocasionou em quatro mortes tóxicas no estudo de Hurwitz et al., (2000) (95).

Indivíduos acometidos com LLA, imunossuprimidos devido ao tratamento quimioterápico, estão suscetíveis ao desenvolvimento de neutropenia em decorrência de infecções oportunistas que podem ocorrer também em decorrência da influência de polimorfismos existentes nos genes de algumas citocinas, como por exemplo a IL-10, IL-15 e TFN α (96). As principais causas que levam a neutropenia na corrente sanguínea são infecções por bactérias, vírus e fungos (97).

Em estudo realizado por Joyce e colaboradores (2015), 197 pacientes apresentaram 587 episódios de neutropenia febril e os microrganismos encontrados foram: uma proporção igual de bactérias gram-positivas e gram-negativas (36,4%), vírus (17,4%) e fungos (8,4%) (97).

Em uma outra pesquisa feita por Inaba e colaboradores (2017) com 419 pacientes com LLA em tratamento, foi relatado 1107 ocorrências de neutropenia febril, seguida por infecções no trato respiratório superior (389 casos), no ouvido (151 casos), na corrente

sanguínea (147 casos) e no trato gastrointestinal (147 casos) (98). O quadro de neutropenia febril e as outras infecções foram maiores na fase de indução e reindução. As infecções labiais, do trato gastrointestinal, urinário e fúngicas, também estavam presentes nesta fase (98).

A IL-10 é uma importante citocina envolvida nas respostas anti-inflamatórias, produzida por células Th2, macrófagos, monócitos ativados entre outros (99). Essa citocina apresenta 3 polimorfismos na sua região promotora: -1086, -819 e -592. O polimorfismo -819 e -592, foram associados a desregulação da produção de IL-10 e sugeriram que esses SNPs, estão envolvidos na produção de níveis altos dessa citocina(99). Segundo Ding et al., (2013), o polimorfismo -592 contribuiu para a suscetibilidade ao câncer gástrico e ao linfoma de não-Hodgkin (100).

A interleucina IL-15 é um importante componente do sistema imunológico e está envolvida na ativação e diferenciação de células natural killer, linfócitos T e B, bem como a manutenção de células T de memória (101). Além disso, desempenha um papel importante na hematopoese, controlando a sobrevivência, diferenciação e proliferação de células normais e leucêmicas (102,103). Alguns estudos demonstraram associação de níveis altos de IL-15 ao crescimento de células tumorais e sua infiltração em órgãos (103,104). A IL-15 possui 5 polimorfismos, e no estudo de Dandan e et al., (2010), os haplotipos ACAC, CAGT e CCAT foram associados ao desenvolvimento de LLA em adultos, enquanto que o haplotipo CCAT conferiu suscetibilidade à LLA-T (105).

O fator de necrose tumoral alfa, $TNF\alpha$, é uma citocina pró-inflamatória envolvida na inflamação sistêmica, diferenciação e proliferação de células do sistema imunológico (106). Ela é produzida por macrófagos, linfócitos T e B, neutrófilos e também por fibroblastos, células do musculo liso dentre outras (107). A $TNF\alpha$ possui um polimorfismo na região promotora, na posição -308. O estudo realizado por Power et al., (2007), observou a associação do polimorfismo -308 A/A e a progressão da Síndrome Mielodisplásica (107). Segundo Wunderik e colaboradores (2003), os pacientes em quimioterapia apresentam maior suscetibilidade às infecções e a presença do polimorfismo -308 pode agravar os sintomas de pacientes com linfoma (108).

O quadro de infecção pode ser explicado pelo estado deprimido do sistema imunológico inato (109). Essa alteração pode estar envolvida com as suas vias de defesa, como por exemplo, a via da lectina, dependente da proteína lectina ligante de manose (MBL), proteína responsável pela opsonização e ativação do sistema complemento (109).

No estudo de Schmiegelow (2002), realizado em 137 crianças com LLA e 250 crianças saudáveis, foi observado que os genótipos *XA/O* ou *O/O*, ligados a níveis baixos de MBL sérico, estava associado a um risco aumentado de suscetibilidade à infecções e à neutropenia febril (110).

Em um outro estudo realizado por Merlen (2015), com o objetivo de avaliar os níveis de MBL e antitrombina (AT) plasmática em pacientes submetidos a terapia com L-asparaginase, foi observado que esse agente terapêutico prejudica a síntese de proteínas plasmáticas. Os resultados deste estudo sugeriram que os níveis de MBL e AT são diminuídos em pacientes com LLA submetidos a terapias prolongadas de L-asparaginase, e que isso está relacionado ao risco aumentado de desenvolver trombose ou neutropenia febril (111).

Segundo Jack et al, (2001), a proteína MBL também influencia na produção de citocinas pelos leucócitos, e em pacientes submetidos a tratamento quimioterápico apresenta diminuição dessa produção, o que implica em um risco aumentado do desenvolvimento de neutropenia febril e suscetibilidade às infecções (112).

Alterações nos níveis plasmáticos de MBL ou polimorfismos nesse gene podem estar envolvidos com a suscetibilidade às infecções em pacientes leucêmicos. Isso apoia a importância da avaliação dos níveis séricos destes pacientes e a caracterização do polimorfismo do gene MBL em nossa região, afim de adquirir um melhor entendimento sobre esses aspectos para contribuir com uma boa conduta clínica.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar os polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2* em pacientes portadores de LLA e investigar a possível correlação dos genótipos com o aumento da suscetibilidade às infecções.

4.2 Específicos

- ✓ Descrever as frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2* em pacientes com LLA;
- ✓ Correlacionar os níveis séricos de MBL com os genótipos do éxon 1 do gene *MBL2* na população estudada;
- ✓ Investigar a possível associação entre os polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2* e a suscetibilidade às infecções em pacientes com LLA.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo exploratório descritivo. Foram utilizadas 122 amostras de sangue de pacientes com leucemia linfóides aguda (LLA) atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (FHEMOAM). As amostras já foram coletadas, uma vez que este estudo é continuidade de outra pesquisa envolvendo o perfil sorológico de infecções virais nesses pacientes, já finalizado. Para o armazenamento e descarte das amostras, foram seguidas as diretrizes descritas na resolução 079/2014 do GHEMOAM.

Com o intuito de obter dados com informações clínicas acerca dos pacientes envolvidos no estudo, foi efetuada uma pesquisa no banco de dados do HEMOAM, onde foi investigado o histórico clínico de cada paciente correspondente às amostras utilizadas.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Virologia e Imunologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e na Fundação HEMOAM.

5.2 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), sob CAAE: 25710819.0.0000.0009, de acordo com o número de parecer: 5.081.493, conforme o que determina a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

5.3 Extração do DNA

O DNA foi extraído *in house*, seguindo um protocolo padronizado, utilizando o reagente Brazol (Fenol clorofórmio), que ocorreu em duas etapas: etapa de extração e etapa de precipitação do DNA. O processo de extração do DNA consistiu na utilização de 200 uL de buffy coat (papa de leucócitos) das amostras de sangue dos pacientes. Foi adicionada 400 uL de Brazol a 4°C em um tubo contendo a amostra e após a homogeneização foi adicionada 100 uL de clorofórmio 4°C que também foi homogeneizado. Os tubos com as amostras e

reagentes foram levadas para centrifugação por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente.

Após a centrifugação outro tubo previamente identificado foi utilizado para o depósito do sobrenadante. Nesse momento iniciou-se a segunda etapa do protocolo, a de precipitação. Foi adicionado 500 uL de Etanol 100% a 4°C na amostra extraída. Em seguida a amostra foi homogeneizada durante 15 segundos no vórtex. Em seguida o álcool foi descartado e foi realizada novamente a adição de 500uL de álcool e seguiu igual a etapa anterior. Após isso a amostra foi colocada em um termo bloco a 56°C por 10 minutos com o intuito de realizar a precipitação do etanol restante e permanecer o DNA purificado. Ao final foi adicionada água estéril sem DNase/RNase para hidratação e posterior armazenamento. Com o intuito de observar a quantidade de DNA extraído por ng, foi utilizado o equipamento NanoDROPS 1000.

5.4 Investigação dos polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2*

5.4.1 Determinação dos Alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*C*

Um fragmento de 349 pb do gene *MBL2* (éxon 1) foi amplificado a partir do DNA de pacientes com LLA. A reação de amplificação foi realizada com um volume total de 50 µL contendo: DNA extraído (500 ng); dNTP (225 µM cada); iniciadores (5 µM cada); KCl (50 mM); MgCl₂ (2,5 mM); Tris-HCl (pH 8,3; 10 mM); e *Taq DNA polimerase* (0,5 U) (113). O par de iniciadores envolvido nesta reação foi: mbIE01 (5'-AGTCGACCCAGATTGTAGGACAGAG-3') e mbIE02 (5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'). A reação de amplificação ocorreu com um ciclo de desnaturação inicial à 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com a seguinte configuração: 94 °C por 30 segundos; 58 °C por 60 segundos; e 72 °C por 120 segundos (114).

A identificação da presença dos alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*C* foi realizada pela digestão enzimática do produto amplificado (349 pb) utilizando as endonucleases de restrição *BshNI* e *MboII*. A endonuclease *BanI* será responsável por clivar o alelo *MBL*A* em dois fragmentos (260 pb e 89 pb), enquanto o alelo *MBL*B* somente esteve presente caso não

houvesse a digestão. A atividade da endonuclease *Mbo*II, por sua vez, resultou no corte do alelo *MBL**C em dois fragmentos (279 pb e 70 pb) (114).

5.4.2 Determinação do Alelo *MBL**D

Para a determinação do alelo *MBL* *D foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR com sequências de iniciadores específicos para a mutação *D (268pb). A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL contendo: DNA extraído (500 ng); dNTP (225 µM cada); iniciadores (5 µM), KCl (50 mM); MgCl₂ (1,1 mM); Tris-HCl (pH 8,3; 10 mM); e 0,5 U de *Taq DNA polimerase* (0,5 U). A reação de amplificação ocorreu com um ciclo de desnaturação inicial à 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos com a seguinte configuração: 94 °C por 20 segundos; 62 °C po 20 segundos; 72 °C por 30 segundos. Ao término, seguiu com 1 ciclo de extensão final à 72 °C por 5 minutos. O par de iniciadores envolvidos nesta reação foi: sspMBP1a (5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3') e 52-D (5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACA-3'), responsáveis por amplificar as regiões 617nt-640nt e 887nt-868nt, respectivamente (113).

Com o objetivo de determinar a ocorrência da mutação *D em homo ou heterozigose com os alelos *MBL**A, *MBL**B e *MBL**C, foi realizada uma segunda PCR utilizando as mesmas condições descritas acima. Para esta segunda reação foi utilizada o seguinte par de iniciadores: sspMPB1a (5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3') e 52-ABC (5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACG-3') responsáveis por amplificar as regiões 617nt-640nt e 887nt-868nt, respectivamente. A ocorrência da variante *D foi determinada pela presença do fragmento de DNA amplificado.

5.4.3 Eletroforese

Os produtos das amplificações e digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose (2%), em tampão TAE 1x (TrisBase 1,6 M; Acetato de sódio 0,8 M; EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada), corado com brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

5.5 Dosagem da MBL sérica

A concentração da proteína MBL sérica foi avaliada no plasma dos pacientes utilizando um ensaio imunoenzimático comercial (Invitrogen, EUA). O ensaio empregado foi do tipo "sanduíche", em que a placa foi sensibilizada com um anticorpo anti-MBL. A primeira etapa consistiu na diluição das amostras em uma proporção de 1:800, utilizando o diluente fornecido no kit. Em seguida, os reagentes (biotina e estreptavidina) e os padrões foram diluídos de acordo com as recomendações do fabricante.

Posteriormente, 100 μ L das amostras e dos padrões foram adicionados aos poços da placa para permitir a ligação com o anticorpo de captura imobilizado. Após um tempo de incubação de 2 horas e 30 minutos, seguido de lavagens, adicionou-se 100 μ L de biotina, a incubando por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, adicionou-se 100 μ L de estreptavidina e incubou-se por 45 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, após as lavagens, acrescentou-se o substrato para reagir com o complexo formado e a placa foi mantida em ambiente escuro durante 30 minutos, gerando um sinal mensurável. Após a adição da solução de parada, a placa foi levada até o leitor de microplaca para a leitura em 450nm.

A intensidade desse sinal foi diretamente relacionada com a concentração de MBL na amostra. A concentração por ng foi determinada por meio de uma interpolação utilizando os padrões fornecidos pelo kit, através do programa Prisma 8.

5.6 Análise Estatística

As frequências dos alelos do gene *MBL2* foram comparadas através do teste *t* de Student não pareado para a amostra total de 122 pacientes com LLA. As associações entre os alelos e fatores que predispõem a suscetibilidade às infecções foram medidas pela análise de Odds Ratio (OR). Foi utilizado o *chi*-quadrado com correção de Yates para comparações da frequência de cada alelo e genótipo estudado. Resultados com valores de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os testes foram feitos no programa GraphPad Prism 8.

6. RESULTADOS

6.1 Frequência alélica e genotípica do gene *MBL2* na população estudada

Neste estudo, foi analisado um total de 122 pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda (LLA) atendidos na Fundação HEMOAM. Dentre eles, 76 eram do sexo masculino e 46 do sexo feminino, com idades variando entre 2 e 63 anos.

Os resultados obtidos demonstraram que, para o códon 54 (rs1800450), a frequência alélica do alelo selvagem *MBL*A* (0,37) foi maior em comparação com o alelo *MBL*B* (0,31), conforme pode ser observado na Tabela 2. Quanto ao códon 52 (rs5030737), a frequência observada do *MBL*D* (rs5030737) foi de 0,32, sendo a variante alélica mais prevalente. O alelo *MBL*C* (rs1800451) não foi detectado na população estudada.

Tabela 2. Frequência alélica do éxon 1, gene *MBL2* em pacientes portadores de LLA.

Alelos	N (F*)
<i>MBL*A</i>	92 (0,37)
<i>MBL*B</i>	75 (0,31)
<i>MBL*C</i>	—
<i>MBL*D</i>	77 (0,32)
Total	244 (1,00)

*F = frequência alélica

Ao se considerar a presença de alelo polimórfico O (B ou D) foi observado uma frequência de 0,63 (Tabela 3). Ao realizar a análise dos alelos em relação à homozigose ou heterozigose, verificou-se que o genótipo mais frequente foi o A/O (0,49) e o menos frequente o A/A (0,13). Ao realizar a soma dos genótipos A/O (0,49) e O/O (0,38), observou-se uma frequência total de 0,87.

O alelo *MBL*D* foi observado com uma frequência de 0,63 quando em heterozigose com qualquer outro alelo, não sendo encontrado em genótipo homozigoto (Tabela 3). Quanto

ao alelo *MBL*B*, sua frequência foi de 0,45 em heterozigose com qualquer outro alelo e de 0,08 no genótipo heterozigoto.

Tabela 3. Variantes genóticas e frequência alélica do éxon 1, gene *MBL2* em pacientes portadores de LLA.

	N	F*
Codon 52 "AD" variante (rs5030737)		
Genótipos		
—/—	45	0,37
—/D	77	0,63
D/D	0	0,00
—/D + D/D	77	0,63
Codon 54 "AB" variante (rs1800450)		
Genótipos		
—/—	57	0,47
—/B	55	0,45
B/B	10	0,08
—/B + B/B	65	0,53
Total		
Alelos		
A	92	0,37
O	152	0,63
Genótipos		
A/A	16	0,13
A/O	60	0,49
O/O	46	0,38
A/O + O/O	106	0,87

O "—" denota qualquer outro alelo

*F = frequência alélica

Ao realizar a estratificação dos resultados com base no sexo dos pacientes, constatou-se que a frequência dos alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*D* na população masculina foi de 0,22, 0,18 e 0,21, respectivamente. Na população feminina, essas frequências foram de 0,26, 0,20 e 0,17, respectivamente (Tabela 4). Nota-se que a variante alélica O (*MBL*B* ou *MBL*D*) foi um pouco mais frequente em pacientes masculinos (0,39) em relação às pacientes do sexo feminino (0,37). Ao analisar as frequências genóticas, observou-se uma maior ocorrência de genótipos heterozigotos (A/O). O genótipo A/B foi mais frequente em mulheres (0,22) do que em homens (0,12), enquanto o genótipo A/D foi mais frequente em homens (0,35) do que em

mulheres (0,30). Portanto, os genótipos heterozigotos (A/O) foi mais frequente entre os homens (tabela 5).

Embora não haja uma associação direta entre a frequência do polimorfismo e a faixa etária, devido à sua natureza de herança genética, este estudo realizou uma estratificação sistemática das frequências alélicas e genotípicas de acordo com a faixa etária, com o objetivo de fornecer uma descrição detalhada dos dados obtidos (Tabela 4). Observou-se uma maior proporção de indivíduos com idades entre 1 e 10 anos (n=62) na população estudada, enquanto a faixa etária de 21 a 30 anos apresentou menor número de participantes (Tabela 4). Foi identificada uma maior frequência do alelo *MBL*A* (0,27) na faixa etária de 21-30 anos. Quanto aos alelos variantes, o alelo *MBL*B* apresentou maior frequência entre indivíduos de 1 a 10 anos (0,21), enquanto o alelo *MBL*D* foi mais frequente em indivíduos com idades entre 21 e 30 anos (0,26).

Ao avaliar as frequências genotípicas, verificou-se que o genótipo B/D foi mais frequente em indivíduos com idade entre 1 e 10 anos (0,32) e entre 11 e 20 anos (0,21). O genótipo A/D apresentou maior frequência em indivíduos com idade entre 21 e 30 anos (0,53). Em participantes com idade acima de 30 anos, foi observada uma maior frequência do genótipo B/D (0,35) (Tabela 5).

Tabela 4. Frequência alélica éxon 1, gene *MBL2* em pacientes portadores de LLA em relação ao sexo e idade.

	Pacientes N (%)	Alelos N (F*)			
		A	B	D	O
Sexo					
Masculino	76 (62,30)	54 (0,22)	46 (0,18)	52 (0,21)	98 (0,39)
Feminino	46 (37,70)	38 (0,26)	29 (0,20)	25 (0,17)	54 (0,37)
Idade					
01-10	62 (50,82)	44 (0,22)	43 (0,21)	37 (0,18)	80 (0,39)
11-20	33 (27,05)	28 (0,27)	18 (0,17)	20 (0,19)	38 (0,37)
21-30	13 (10,66)	10 (0,24)	5 (0,12)	11 (0,26)	16 (0,38)
>30	14 (11,47)	10 (0,21)	9 (0,20)	9 (0,20)	18 (0,39)

*F = frequência alélica

Tabela 5. Frequência dos genótipos do éxon 1 do gene *MBL2* de acordo com o sexo e idade da população de estudo.

	Pacientes N (%)	Genótipos N (F*)				
		A/O			O/O	
		AA	AB	AD	BB	BD
Sexo						
Masculino	76 (62,30)	9 (0,12)	9 (0,12)	27 (0,35)	6 (0,08)	25 (0,33)
Feminino	46 (37,70)	7 (0,15)	10 (0,22)	14 (0,30)	4 (0,09)	11 (0,24)
Faixa etária						
01–10	62 (50,82)	8 (0,13)	11 (0,18)	17 (0,27)	6 (0,10)	20 (0,32)
11–20	33 (27,05)	6 (0,18)	3 (0,10)	13 (0,39)	4 (0,12)	7 (0,21)
21–30	13 (10,66)	1 (0,08)	1 (0,08)	7 (0,53)	–	4 (0,31)
>30	14 (11,47)	1 (0,07)	4 (0,29)	4 (0,29)	–	5 (0,35)

*F = frequência dos genótipos

6.2 Níveis séricos de MBL de acordo com os genótipos

Não foi encontrada associação entre os níveis séricos de MBL e os genótipos, uma vez que as diferenças observadas entre os genótipos A/A vs. A/O ($p=0,577$), A/O vs. O/O ($p=0,668$) e A/A vs. O/O ($p=0,420$) não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$) (Figura 10). No entanto, o genótipo A/A apresentou as maiores concentrações de níveis séricos na média entre os grupos ($377,7 \pm 257,4$), seguida das concentrações do genótipo A/O ($344,8 \pm 195,2$) e do genótipo O/O ($328,5 \pm 189,5$).

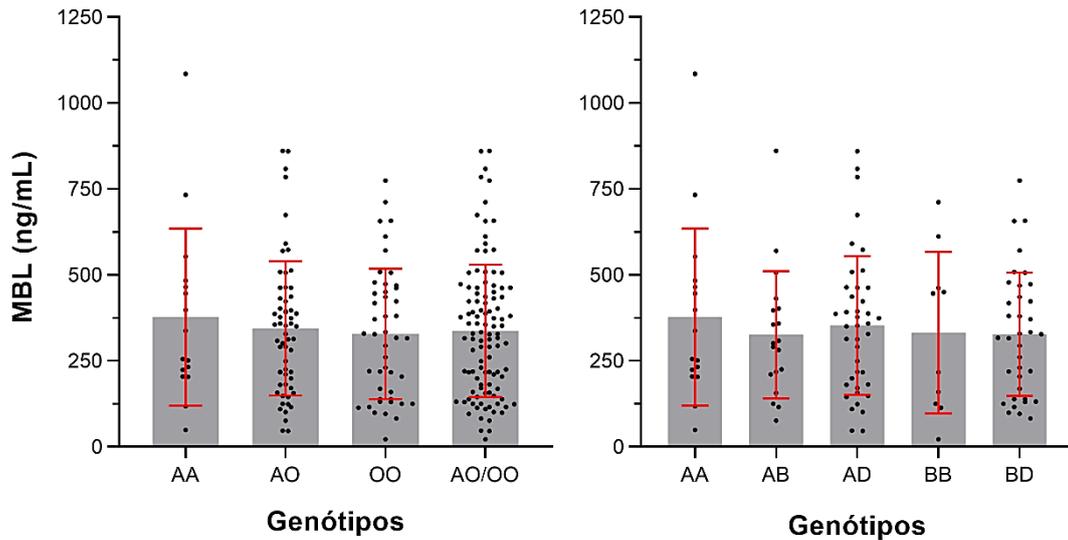


Figura 10. Correlação dos níveis séricos da proteína MBL com os genótipos gerais A/A, A/O, O/O e estratificados A/B, A/D, B/B e B/D do éxon 1, gene *MBL2*.

6.2 Associação dos polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2* e a suscetibilidade às infecções.

Um total de 239 casos de infecção ocorreu na população de estudo no período de 2015 a 2023 (Tabela 6). Dentre esses casos, 103 foram infecções parasitárias, 69 bacterianas, 48 virais, e 19 fúngicas. Não foi observado associação significativa entre a suscetibilidade às infecções e os genótipos encontrados na população estudada ($p > 0,05$).

Ao descrever as associações entre a presença de polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2* e os tipos de infecções em pacientes com LLA, observamos a prevalência de infecções parasitárias 39 (37,86%) maior nos pacientes com o genótipo A/O em relação aos outros genótipos, principalmente pacientes com o genótipo A/D, 26 (66,67%) (Tabela 6). De modo semelhante aconteceu entre os pacientes portadores do genótipo A/B, onde se observou um maior número de infecções parasitárias 13 (33,33%). Além disso, observou-se uma maior quantidade de infecções parasitárias quando somados os genótipos polimórficos em homocigose e heterocigose (O/O+A/O) 83 (80,58%), em relação a demais infecções associadas aos genótipos. No geral, as infecções parasitárias foram as mais frequentes em todos os genótipos.

As infecções bacterianas foram observadas com maior frequência em pacientes portadores do genótipo A/O (46,38%). Do total de 32 casos de infecção observados em portadores do genótipo A/O, 11 (34,37%) casos ocorreram em pacientes portadores do genótipo A/B e 21 (65,63%) do genótipo A/D (Tabela 6). Além disso, foram identificados 27 casos (39,13%) de infecções bacterianas em pacientes com o genótipo O/O, sendo 17 (62,96%) portadores do genótipo B/D e 10 (37,04%) do genótipo B/B.

Em relação às infecções virais, foi observada uma maior incidência em pacientes portadores do genótipo A/O, com um total de 21 (43,75 %) casos (Tabela 6). Desses casos, 11 (52,38%) ocorreram em pacientes com o genótipo A/D e 10 (47,62%) em pacientes com o genótipo A/B. Além disso, foram observados 9 (18,75%) casos em pacientes com o genótipo O/O, sendo 4 (44,44%) casos em pacientes com o genótipo B/B e 5 (55,56%) casos em pacientes com o genótipo B/D.

Por outro lado, as infecções fúngicas foram menos frequentes em comparação com as demais infecções. Semelhante às outras infecções, as infecções fúngicas também apresentaram uma maior frequência em pacientes com o genótipo A/O, com um total de 6 (31,58%) casos, sendo 3 (50,00%) casos em pacientes com o genótipo A/B e 3 (50,00%) casos em pacientes com o genótipo A/D. Além disso, foram registrados 5 (26,31%) casos de infecções fúngicas em pacientes com o genótipo O/O, todos eles ocorrendo em pacientes com o genótipo B/B. Não foi encontrada nenhuma infecção fúngica em pacientes com o genótipo B/D. A distribuição da quantidade de indivíduos infectados na população do estudo, de acordo com o tipo de infecção, pode ser observada na Tabela 6.

Tabela 6. Total de infecções e indivíduos infectados de acordo com o tipo de infecção e genótipo.

Infecções	Total de infectados (%)	Total de infecções (%)	OR (95% CI)*	p**
Bacteriana				
Homozigoto AA (n = 16)	6 (16,22)	10 (14,49)	1,45 (0,49–4,34)	0,344
Heterozigoto AO (n = 60)	16 (43,24)	32 (46,38)	0,71 (0,33–1,54)	0,252
AB (n = 19)	4 (25,00)	11 (34,37)	0,64 (0,18–2,35)	0,368
AD (n = 41)	12 (75,00)	21 (65,63)	1,55 (0,43–5,65)	0,368
Homozigoto OO (n = 46)	15 (40,54)	27 (39,13)	1,19 (0,54–2,62)	0,409
BB (n = 10)	3 (20,00)	10 (37,04)	0,86 (0,19–3,92)	0,582

BD (n = 36)	12 (80,00)	17 (62,96)	1,17 (0,26–5,33)	0,582
AO+OO (n = 106)	31 (83,78)	59 (85,51)	0,69 (0,23–2,06)	0,344
Total	37 (100,00)	69 (100,00)	–	–
Viral				
Homozigoto AA (n = 16)	5 (20,83)	18 (37,50)	2,08 (0,65–6,69)	0,178
Heterozigoto AO (n = 60)	14 (58,34)	21 (43,75)	1,58 (0,64–3,91)	0,22
AB (n = 19)	6 (42,86)	10 (47,62)	1,90 (0,55–6,56)	0,239
AD (n = 41)	8 (57,14)	11 (52,38)	0,53 (0,15–1,81)	0,239
Homozigoto OO (n = 46)	5 (20,83)	9 (18,75)	0,37 (0,13–1,06)	0,05
BB (n = 10)	2 (40,00)	4 (44,44)	2,75 (0,39–19,30)	0,295
BD (n = 36)	3 (60,00)	5 (55,56)	0,36 (0,05–2,55)	0,295
AO+OO (n = 106)	19 (79,17)	30 (62,50)	0,48 (0,15–1,54)	0,178
Total	24 (100,00)	48 (100,00)	–	–
Parasitária				
Homozigoto AA (n = 16)	7 (43,75)	20 (42,86)	1,23 (0,43–3,57)	0,45
Heterozigoto AO (n = 60)	22 (45,83)	39 (37,86)	0,80 (0,39–1,66)	0,341
AB (n = 19)	6 (27,27)	13 (33,33)	0,72 (0,23–2,28)	0,398
AD (n = 41)	16 (72,73)	26 (66,67)	1,39 (0,44–4,39)	0,398
Homozigoto OO (n = 46)	19 (39,59)	44 (42,72)	1,14 (0,54–2,41)	0,438
BB (n = 10)	6 (31,58)	14 (31,82)	2,65 (0,63–11,20)	0,16
BD (n = 36)	13 (68,42)	30 (68,18)	0,38 (0,09–1,58)	0,16
AO+OO (n = 106)	41 (85,42)	83 (80,58)	0,81 (0,28–2,35)	0,45
Total	48 (100,00)	103 (100,00)	–	–
Fúngica				
Homozigoto AA (n = 16)	3 (30,00)	8 (42,11)	3,26 (0,75–14,20)	0,125
Heterozigoto AO (n = 60)	5 (50,00)	6 (31,58)	1,04 (0,28–3,78)	0,607
AB (n = 19)	2 (40,00)	3 (50,00)	1,49 (0,23–9,75)	0,511
AD (n = 41)	3 (60,00)	3 (50,00)	0,67 (0,10–4,39)	0,511
Homozigoto OO (n = 46)	2 (20,00)	5 (26,31)	0,39 (0,08–1,90)	0,196
BB (n = 10)	2 (100,00)	5 (100,00)	–	–
BD (n = 36)	–	–	–	–
AO+OO (n = 106)	7 (70,00)	11 (57,89)	0,31 (0,07–1,33)	0,125
Total	10 (100,00)	19 (100,00)	–	–

*CI foi calculado pelo método de Woolf logit

**Teste exato de Fisher's

Ao investigar uma possível associação entre os genótipos do éxon 1 do gene *MBL2* e a suscetibilidade às infecções, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 11). Além disso, uma análise de Odds Ratio (OR) revelou que os fatores de exposição, seja um genótipo selvagem ou variante (A/O ou O/O), não apresentaram relação ou associação com a suscetibilidade às infecções.

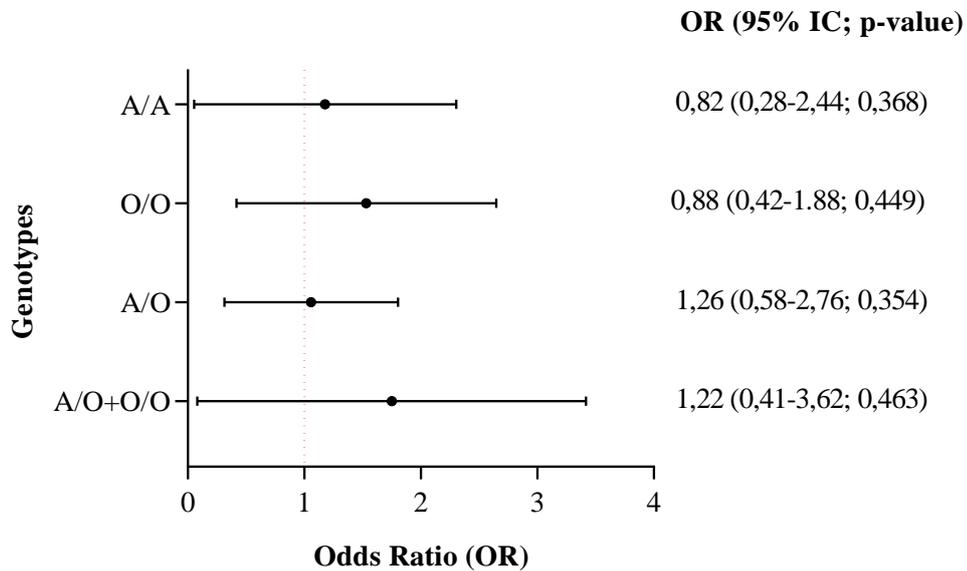


Figura 11. Relação entre os diferentes genótipos do gene MBL2, éxon 1 e a suscetibilidade às infecções em pacientes com LLA.

Em relação aos agentes patogênicos, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi a mais predominante entre as infecções bacterianas, sendo responsável por 20,29% dos casos. No que diz respeito às infecções virais, a hepatite B (HBV) foi a mais comum, correspondendo a 15 casos (31,25%) das infecções virais. O protozoário *Endolimax nana* foi o mais prevalente, responsável por 25 casos (24,27%) de infecções causadas por protozoários. Quanto às infecções fúngicas, o fungo *Candida parapsilosis* apresentou uma frequência significativa, com ocorrência em 8 casos (42,11%). Todos os patógenos identificados estão detalhados na Tabela 7.

Tabela 7. Total de infecção de acordo com a espécie de microrganismo.

Infecção	Total (%)
Bacteriana	69 (28,87)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (1,45)
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2 (2,90)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (1,45)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (1,45)
<i>Escherichia coli</i>	10 (14,49)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (1,45)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14 (20,29)

<i>Kocuria kristinae</i>	1 (1,45)
<i>Kocuria rósea</i>	1 (1,45)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (4,35)
<i>Serratia marcescens</i>	13 (18,84)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (7,24)
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (1,45)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4 (5,79)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2 (2,90)
<i>Staphylococcus hominis</i>	1 (1,45)
<i>Staphylococcus lentus</i>	1 (1,45)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3 (4,35)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1 (1,45)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 (2,90)
<i>Streptococcus faecalis</i>	1 (1,45)
Viral	48 (20,08)
<i>Hepatitis B virus (HBV)</i>	15 (31,25)
<i>Human alphaherpesvirus 1 (HSV 1)</i>	2 (4,17)
<i>Human alphaherpesvirus 2 (HSV 2)</i>	2 (4,17)
<i>Human herpesvirus 4 (EBV)</i>	2 (4,17)
<i>Human herpesvirus-5 (CMV)</i>	9 (18,75)
<i>Human T-lymphotropic virus (HTLV)</i>	1 (2,08)
<i>Rubivirus rubellae</i>	8 (16,66)
<i>SARS-CoV-2</i>	9 (18,75)
Parasitária	103 (43,10)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	6 (5,83)
<i>Blastocystis hominis</i>	24 (23,30)
<i>Endolimax nana</i>	25 (24,27)
<i>Entamoeba coli</i>	6 (5,83)
<i>Entamoeba histolytica</i>	7 (6,79)
<i>Giardia lamblia</i>	21 (20,38)
<i>Iodamoeba butschilli</i>	6 (5,83)
<i>Toxoplasma Gondii</i>	6 (5,83)
<i>Trichuris trichiura</i>	2 (1,94)
Fúngica	19 (7,95)
<i>Candida ciferrii</i>	2 (10,53)
<i>Candida famata</i>	1 (5,26)
<i>Candida guilliermondii</i>	4 (21,05)
<i>Candida parapsilosis</i>	8 (42,11)
<i>Candida pelliculosa</i>	2 (10,53)
<i>Candida tropicalis</i>	1 (5,26)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1 (5,26)
Total	239

7. DISCUSSÃO

A MBL é uma proteína essencial do sistema imunológico inato, desempenhando funções bem definidas no combate a diversos microrganismos, por meio da ativação do sistema complemento (45). No entanto, é importante destacar que as variantes do éxon 1 do gene *MBL2* já foram associadas ao aumento de suscetibilidade a diferentes infecções, principalmente em indivíduos em situação de imunodepressão, como em pacientes portadores de LLA, especialmente durante o curso de tratamentos quimioterápicos (30,68,115). Este estudo descreve pela primeira vez a caracterização do polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* e sua possível associação com os níveis séricos de MBL e a suscetibilidade às infecções em indivíduos portadores de LLA residentes no estado do Amazonas.

O nosso estudo identificou a presença dos alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*D* na população estudada, os quais se apresentam de forma comum na região amazônica (114,116). O alelo *MBL*A* (0,37) foi observado com maior frequência, enquanto o alelo *MBL*D* (0,32) foi mais comum entre as variantes alélicas seguido do alelo *MBL*B* (0,31). No entanto, não há evidências científicas que sustentem um padrão claro nas frequências alélicas do gene *MBL2* em pacientes com doenças hematológicas.

Um estudo recente conduzido por Oguz et al. (2023) teve como objetivo avaliar a relação entre os alelos HLA-DRB1 e as variantes do gene *MBL2* em pacientes diagnosticados com LLA na cidade de Istambul, Turquia. Nesse estudo, foram observadas frequências significativas dos alelos *MBL*A* (82,2%) e *MBL*B* (17,4%). No entanto, as frequências alélicas em pacientes com LLA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com indivíduos saudáveis (117). Apesar das diferenças na população de estudo e contexto geográfico, o estudo de Oguz et al. e o nosso estudo observaram uma maior frequência do alelo *MBL*A* e menor do *MBL*B* em pacientes com LLA, indicando um possível padrão comum nas frequências alélicas do gene *MBL2*.

Semelhantemente ao nosso estudo, uma pesquisa que examinou a relação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e a ocorrência de neutropenia febril em adultos suecos submetidos à quimioterapia, observou a frequência mais elevada do alelo *MBL*A* (0,64). Porém o mesmo estudo verificou uma baixa frequência do alelo variante *MBL*D* (0,11) enquanto que em nosso estudo este foi o alelo variante mais frequente (0,32) (118). Os

resultados oferecem informações importantes sobre as frequências alélicas dos alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*D* na população estudada, com implicações potenciais para pesquisas futuras sobre variabilidade genética do hospedeiro no contexto das doenças hematológicas que possam contribuir com o manejo clínico do paciente.

A variante alélica *MBL*C* não foi identificada em nosso estudo. Resultado semelhante foi relatado por Pontes et al. (2005), em um estudo realizado no estado do Pará, também localizado na região norte do Brasil. Geralmente, a ocorrência da variante *MBL*C* é observada comumente em países da região subsaariana (114). A ausência ou baixa frequência da variante *MBL*C* do gene *MBL2* na região amazônica pode ser atribuída a fatores genéticos e evolutivos específicos da população local, como por exemplo, a miscigenação histórica ocorrida durante o período de colonização, que trouxe consigo a contribuição genética de diferentes grupos étnicos, como europeus, africanos e indígenas (116,119). No entanto, é importante notar que a prevalência de variantes genéticas pode diversificar em diferentes populações, podendo haver várias explicações possíveis para a baixa frequência da variante *MBL*C* na região amazônica (116,120–122).

O genótipo mais prevalente na população estudada foi A/O (0,49), seguido pelo genótipo A/D com uma frequência de 0,63 e o genótipo A/B com uma frequência de 0,45. O genótipo A/A apresentou uma frequência de 0,13, enquanto o genótipo O/O ocorreu com uma frequência de 0,38. Essas variações nas frequências genotípicas são consistentes com a literatura científica, especialmente em relação a doenças hematológicas. Por exemplo, nesse estudo sobre leucemia mieloide aguda, foi observada uma frequência mais elevada do genótipo A/A (64,1) e uma frequência mais baixa do genótipo O/O (17,7) (123). Apresentando um padrão diferente da frequência desses genótipos em relação ao que foi encontrada na nossa população. No contexto do mieloma múltiplo, os pacientes do estudo demonstraram frequências genotípicas de A/A (7,37) e B/B (8,81)(124). Mais uma vez, observou-se uma variabilidade nas frequências encontradas em relação à literatura existente. Esses resultados destacam a relevância do presente estudo para a compreensão das frequências genotípicas na população estudada, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre a relação entre os genótipos A/O, A/D, A/B, A/A e O/O e suas implicações clínicas.

Em um estudo envolvendo pacientes com condições onco-hematológicas, a maior frequência genotípica encontrada foi A/A (58,3), seguida pela frequência do alelo A/O (36,1)

(118). Outro estudo descreveu a frequência genótipo de pacientes com LLA em comparação ao grupo controle e os resultados revelaram que o genótipo A/B (19,3%) foi mais prevalente entre os pacientes com LLA em comparação ao grupo controle (14%). Por outro lado, em relação ao genótipo A/A, observou-se o inverso, com uma frequência de 71,9% no grupo com LLA e 76,7% no grupo controle (117). Os resultados são consistentes com a literatura científica existente, que também relata variações nas frequências genotípicas em diferentes condições onco-hematológicas. Em suma, os resultados alcançados neste estudo consolidam a relevância das frequências genotípicas, destacando seu potencial como marcadores genéticos para a compreensão e manejo das doenças onco-hematológicas, em especial a doença LLA. Essa contribuição é fundamental para o avanço da ciência nessa área e pode levar a avanços significativos no cuidado e tratamento dos pacientes afetados por essas condições complexas.

Ao analisarmos a associação entre os genótipos do éxon 1 do gene *MBL2* e a suscetibilidade às infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias não foi possível observar significância. Entretanto, observamos uma maior frequência de infecções foi encontrada em pacientes portadores do genótipo A/O, principalmente o A/D. Diferente dos nossos achados, Pana et al. (2014) observaram que as variantes A/O do gene *MBL2* estavam associadas a um aumento na suscetibilidade a infecções bacterianas em crianças com leucemia linfóide de células B. (46).

Em outro estudo, também foi possível observar uma relação dos genótipos A/O e O/O do gene *MBL2* com um risco aumentado de pacientes oncohematológicos desenvolverem neutropenia febril ou infecções quando submetidos à quimioterapia (125). No estudo conduzido por Summerfield e colaboradores (1997), revelou achados significativos relacionados à suscetibilidade a quadros infecciosos. Foi observado que crianças com os genótipos A/O e O/O apresentavam uma probabilidade duas vezes maior de desenvolverem infecções quando comparadas às crianças com o genótipo A/A. Além disso, dos 17 participantes com o genótipo O/O, 13 crianças apresentaram infecções mais graves (126). Por fim, o estudo de Molle et al. (2006) observou que os pacientes portadores de mieloma múltiplo (MM) que possuíam o genótipo A/A apresentavam um risco diminuído de desenvolverem septicemia após o transplante autólogo de células-troncos (127).

Por outro lado, de forma consistente com nossa pesquisa, outros estudos também observaram resultados semelhantes (110,128). Holanda et al. (2014), identificaram uma

maior frequência do genótipo A/A, enquanto não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos alelos X/Y, H/L e A/O entre os grupos ($p = 0,39$, $p = 0,12$ e $p = 0,5$) respectivamente em uma população de pacientes com Leucemia linfóide crônica (129). Um estudo que investigou crianças com LLA na fase de indução durante o tratamento de quimioterapia, também não observou correlações significativas entre a frequência de infecções e os polimorfismos no gene *MBL2*. Além disso, ocorreram quatro óbitos, sendo que dois desses indivíduos apresentaram o genótipo XA/O, o qual geralmente está associado à deficiência da proteína MBL (130). Entretanto, neste estudo não foi possível avaliar o polimorfismo nos loci H/L, X/Y e P/Q da região promotora do gene *MBL2* para investigar as potenciais associações entre os haplótipos e os níveis séricos de MBL, bem como a suscetibilidade a infecções.

A heterogeneidade dos dados existentes na literatura em relação à suscetibilidade à infecção devido a deficiências na proteína funcional MBL pode ser parcialmente explicada pela natureza de certos microrganismos, que atuam como patógenos intracelulares facultativos (131). Esses microrganismos enfrentam a resposta do sistema imunológico inato somente quando são expostos ao ambiente extracelular (132). Como resultado, esse mecanismo pode desempenhar um papel crucial não apenas na persistência bacteriana, mas também na progressão das infecções.

A literatura científica atual ainda não apresenta um consenso sobre a associação entre as variantes do gene *MBL2* e a suscetibilidade a infecções em pacientes com doenças hematológicas (133). Por isso, é importante salientar que embora não tenham sido encontradas correlações significativas nesse estudo, outros fatores além dos polimorfismos do gene *MBL2* podem influenciar na suscetibilidade às infecções durante o tratamento de quimioterapia e no curso da doença LLA. Diversos outros componentes do sistema imunológico como a atuação de citocinas pró-inflamatórias, ação de imunoglobulinas e receptores celulares, bem como fatores ambientais e o tipo de quimioterapia administrada, podem desempenhar papéis cruciais nesse contexto (16). Diante disso, é importante a realização de estudos mais abrangentes, incluindo uma quantidade amostral maior e o acompanhamento fidedigno do estado clínico desses participantes para uma melhor compreensão acerca desse tema.

Em nosso estudo, observou-se que os pacientes com o genótipo A/A apresentaram níveis mais elevados da proteína sérica MBL. Contudo, não foi observada nenhuma associação significativa entre qualquer genótipo e os níveis séricos da proteína MBL. Além disso, os níveis plasmáticos da proteína MBL encontrados não demonstraram associação significativa com a suscetibilidade às infecções, o que corrobora com os achados de Wong et al. (2012) (118).

No entanto, outros estudos já relataram a associação direta entre os níveis séricos da MBL e aumento de suscetibilidade às infecções. Em um estudo realizado por Merlen et al. (2015), foi observado que o uso da terapia com L-asparaginase resulta na redução dos níveis séricos da proteína MBL. E essa diminuição foi associada a um maior risco de eventos trombóticos e infecciosos em pacientes com LLA (111). Além disso, um estudo envolvendo 255 pacientes oncohematológicos submetidos a 569 ciclos de quimioterapia foi observado uma maior incidência de quadros infecciosos em comparação com pacientes saudáveis. (134). Os resultados destacam a complexidade da relação entre os níveis da proteína MBL e a suscetibilidade às infecções. Essa associação reforça a importância da avaliação dos níveis de MBL como um potencial marcador de risco para infecções nesse contexto clínico.

Este estudo apresenta algumas limitações importantes. O tamanho da amostra utilizado (n=122) foi restrito, o que pode ter afetado as análises estatísticas relacionadas à correlação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e a suscetibilidade às infecções. Além disso, é relevante mencionar que as amostras foram armazenadas por um período prolongado de cerca de 5 anos, o que pode ter impactado a disponibilidade de componentes essenciais da proteína MBL. Essa condição pode ter influenciado a avaliação precisa dos níveis séricos plasmáticos e sua associação com os genótipos estudados. Por fim, é importante ressaltar que houve um acesso limitado aos dados dos pacientes, pois informações detalhadas sobre histórico clínico, estado imunológico e tratamentos não estavam disponíveis.

Em resumo, de forma pioneira esse estudo descreveu a variabilidade genética do gene *MBL2* associada a infecções em pacientes com LLA no estado do Amazonas, Brasil. Os alelos *MBL*A*, *MBL*B* e *MBL*D* foram identificados na população estudada, sendo o alelo *MBL*D* o alelo variante mais frequente. Genótipos variantes em heterozigose (A/O), especialmente o genótipo A/D, apresentaram maior prevalência de infecções. O genótipo A/A revelou níveis elevados da proteína MBL no soro, apesar de ter uma representação limitada na

amostra do estudo. Não foram encontradas diferenças significativas na associação entre infecção, níveis séricos da proteína MBL e as variantes do gene *MBL2* em pacientes com LLA. Apesar da relevância dos achados apresentados por este estudo, é essencial conduzir investigações adicionais para obter uma compreensão abrangente desse cenário.

8. CONCLUSÃO

Este estudo marca o esforço pioneiro para elucidar a variabilidade genética dentro do exon1 do gene *MBL2* e sua relação com infecções em pacientes residentes no estado do Amazonas no Brasil, que são afetados pela LLA. O alelo *MBL*D* foi o alelo variante mais frequente. A frequência de episódios de infecções foi maior entre pacientes com os genótipos heterozigotos variantes (*A/O*), especialmente o genótipo *A/D*. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que os pacientes com LLA eram deficientes em níveis de MBL séricos e isso não estava relacionado as variantes encontradas no exon 1. Embora sejam necessárias mais investigações com amostras maiores para caracterizar a ligação entre o polimorfismo do exon 1 e a suscetibilidade à infecção no contexto da LLA, este estudo oferece informações valiosas sobre três aspectos principais: a diversidade genética do gene *MBL2*, sua correlação potencial com infecções e a intrincada interação entre os níveis séricos de MBL e a suscetibilidade à infecção entre pacientes com LLA no Amazônia ocidental brasileira.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Eppa Ł, Pağowska-Klimek I, Świerzko AS, Moll M, Krajewski WR, Cedzyński M. Deposition of mannose-binding lectin and ficolins and activation of the lectin pathway of complement on the surface of polyurethane tubing used for cardiopulmonary bypass. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2018 Apr;106(3):1202–8.
2. Hammad NM, El Badawy NE, Nasr AM, Ghramh HA, Al Kady LM. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its association with susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
3. Dommett R, Chisholm J, Turner M, Bajaj-Elliott M, Klein NJ. Mannose-binding Lectin Genotype Influences Frequency and Duration of Infectious Complications in Children With Malignancy. Vol. 35, *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013.
4. Nevadunsky NS, Korneeva I, Caputo T, Witkin SS. Mannose-binding lectin codon 54 genetic polymorphism and vaginal protein levels in women with gynecologic malignancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;163(2):216–8.
5. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun*. 2006 Mar;7(2):85–94.
6. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2003 Dec;37(11):1496–505.
7. Çelik GG, Taş DA, Tahiroglu AY, Erken E, Seydaoğlu G, Ray PÇ, et al. Mannose-Binding Lectin 2 Gene Polymorphism in PANDAS Patients. *Noro Psikiyatrs Ars*. 2019 Jun;56(2):99–105.
8. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):577.
9. Hunger SP, Mullighan CG, Terwilliger T, Abdul-Hay M, Rafei H, Kantarjian HM, et al. Acute lymphoblastic leukemia with treatment-naïve fanconi anemia. *Blood Cancer J*. 2013 Jun;50(2):207–23.
10. Bielorai B, Fisher T, Waldman D, Lerenthal Y, Nissenkorn A, Tohami T, et al. Acute lymphoblastic leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013;30(6):574–82.
11. Chessells JM, Harrison G, Richards SM, Chessells D. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment A report from the MRC childhood leukaemia working party. Vol. 85, *Arch Dis Child*. 2001.

12. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. Vol. 373, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2015. p. 1541–52.
13. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Targeted therapy paves the way for the cure of acute lymphoblastic leukaemia. Vol. 188, *British Journal of Haematology*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 207–23.
14. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003 Oct;102(7):2321–33.
15. Litzman J, Freiburger T, Grimbacher B, Gathmann B, Salzer U, Pavlík T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2008 Sep;153(3):324–30.
16. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 9th ed. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2019.
17. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016 Oct;60(3):275–301.
18. Janeway CAJ. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992 Jan;13(1):11–6.
19. Janeway CAJ, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
20. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul;343(1):37–49.
21. Schwalbe RA, Dahlbäck B, Coe JE, Nelsestuen GL. Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry*. 1992 May;31(20):4907–15.
22. Gewurz H, Mold C, Siegel J, Fiedel B. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med*. 1982;27:345–72.
23. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol*. 1998 Oct;10(5):363–72.
24. Giang J, Seelen MAJ, van Doorn MBA, Rissmann R, Prens EP, Damman J. Complement Activation in Inflammatory Skin Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:639.
25. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):227–35.
26. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in

- inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2001 Apr;180:5–15.
27. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr;344(14):1058–66.
 28. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *J Thromb Haemost.* 2015 Jun;13 Suppl 1:S72-81.
 29. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr;344(15):1140–4.
 30. Cedzyński M, Świerzko AS. Components of the Lectin Pathway of Complement in Haematologic Malignancies. *Cancers (Basel).* 2020 Jul;12(7).
 31. Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Fujita T. Human serum mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1): determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. *Clin Exp Immunol.* 1997 Nov;110(2):317–23.
 32. Meri S, Jarva H. Complement regulation. *Vox Sang.* 1998;74 Suppl 2:291–302.
 33. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest.* 2017 Mar;127(3):780–9.
 34. Miller ME, Seals J, Kaye R, Levitsky LC. A familial plasma-associated defect of phagocytosis. *Lancet.* 1968;2:60–3.
 35. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today.* 1996;17(11):532–40.
 36. Kilpatrick DC. Introduction to mannan-binding lectin. *Biochem Soc Trans.* 2003 Aug;31(Pt 4):745–7.
 37. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep;1572(2–3):401–13.
 38. Xu J, Chen G, Yan Z, Qiu M, Tong W, Zhang X, et al. Effect of mannose-binding lectin gene polymorphisms on the risk of rheumatoid arthritis: Evidence from a meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2021 Mar;24(3):300–13.
 39. Luo J, Xu F, Lu G-J, Lin H-C, Feng Z-C. Low mannose-binding lectin (MBL) levels and MBL genetic polymorphisms associated with the risk of neonatal sepsis: An updated meta-analysis. *Early Hum Dev.* 2014 Oct;90(10):557–64.
 40. Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J.* 1989 Sep;262(3):763–71.
 41. Shen W, Xiao L, Li Y, Zhou D, Zhang W. Association between polymorphisms in mannose-binding lectin 2 gene with pulmonary tuberculosis susceptibility. *Hereditas.*

- 2020 Aug;157(1):33.
42. Alves Pedroso ML, Boldt ABW, Pereira-Ferrari L, Steffensen R, Strauss E, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clin Exp Immunol*. 2008 May;152(2):258–64.
 43. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016 Nov;274(1):74–97.
 44. Levy ER, Yip W-K, Super M, Ferdinands JM, Mistry AJ, Newhams MM, et al. Evaluation of Mannose Binding Lectin Gene Variants in Pediatric Influenza Virus-Related Critical Illness. *Front Immunol*. 2019;10:1005.
 45. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus Med*. 2002 Dec;12(6):335–52.
 46. Pana ZD, Samarah F, Papi R, Antachopoulos C, Papageorgiou T, Farmaki E, et al. Mannose binding lectin and ficolin-2 polymorphisms are associated with increased risk for bacterial infections in children with B acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Jun;61(6):1017–22.
 47. Coelho AVC, Brandão LAC, Guimarães RL, Loureiro P, de Lima Filho JL, de Alencar LCA, et al. Mannose binding lectin and mannose binding lectin-associated serine protease-2 genes polymorphisms in human T-lymphotropic virus infection. *J Med Virol*. 2013 Oct;85(10):1829–35.
 48. Das BK, Panda AK. MBL-2 polymorphisms (codon 54 and Y-221X) and low MBL levels are associated with susceptibility to multi organ dysfunction in *P. falciparum* malaria in Odisha, India. *Front Microbiol*. 2015;6:778.
 49. Giang NT, van Tong H, Quyet D, Hoan NX, Nghia TH, Nam NM, et al. Complement protein levels and MBL2 polymorphisms are associated with dengue and disease severity. *Sci Rep*. 2020 Sep;10(1):14923.
 50. Ghazi M, Isadyar M, Gachkar L, Mahmoudi S, Goudarzi H, Eslami G, et al. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012 Mar;34(2):128–30.
 51. Fekete F, Fadgyas B, Papp É, Szilágyi Á, Prohászka Z, Müller B, et al. The role of mannose binding lectin on fever episodes in pediatric oncology patients. *Pathol Oncol Res*. 2016 Jan;22(1):139–43.
 52. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin*

- Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2017 Mar;35(9):975–83.
53. Dieguez C, Oliveira MHR, Pachá C. Estimativa 2020 - Incidência de câncer no Brasil. 2019;122.
 54. Puckett Y, Chan O. Acute Lymphocytic Leukemia. In Treasure Island (FL); 2021.
 55. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2009 Aug;23(4):655–74.
 56. Roberts KG, Mullighan CG. The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020 Jul;10(7).
 57. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004 Oct;306(5694):269–71.
 58. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391–406.
 59. Gianni F, Belver L, Ferrando A. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020 Mar;10(3).
 60. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet (London, England). 2020 Apr;395(10230):1146–62.
 61. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute Leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2017;31(6):1011–28.
 62. Shafique S, Tehsin S. Acute Lymphoblastic Leukemia Detection and Classification of Its Subtypes Using Pretrained Deep Convolutional Neural Networks. Technol Cancer Res Treat. 2018 Jan;17:1533033818802789.
 63. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976 Aug;33(4):451–8.
 64. Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, et al. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. Vol. 166, British journal of haematology. England; 2014. p. 295–8.
 65. Carroll AJ, Shago M, Mikhail FM, Raimondi SC, Hirsch BA, Loh ML, et al. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. Cancer

- Genet. 2019 Oct;238:62–8.
66. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013 Mar;45(3):242–52.
 67. Raimondi SC, Zhou Y, Mathew S, Shurtleff SA, Sandlund JT, Rivera GK, et al. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2003 Dec;98(12):2715–22.
 68. Yen H-J, Chen S-H, Chang T-Y, Yang C-P, Lin D-T, Hung I-J, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)/TCF3-PBX1 in Taiwan. *Pediatr Blood Cancer.* 2017 Oct;64(10).
 69. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J cancer.* 2021 Apr;
 70. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394–424.
 71. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J cancer.* 2019 Apr;144(8):1941–53.
 72. de Camargo B, de Oliveira Santos M, Rebelo MS, de Souza Reis R, Ferman S, Noronha CP, et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. *Int J cancer.* 2010 Feb;126(3):715–20.
 73. Reis RDS, Camargo B De, Santos MDO, Moreira J, Oliveira D, Silva FA, et al. Childhood Leukemia Incidence in Brazil According to Different Geographical Regions. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56:58–64.
 74. Silva-junior AL, Silva Alves F, Wendell M, Gabriela M, Kerr A, Xabregas LA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One.* 2019;14(8):1–16.
 75. Heerema NA. Cytogenetic abnormalities and molecular markers of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1990 Aug;4(4):795–820.
 76. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997 Nov;278(5340):1059–64.
 77. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet (London, England).* 1988 Dec;2(8624):1323–7.

78. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Mar;6(3):193–203.
79. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018 Aug;18(8):471–84.
80. Sabaawy HE, Azuma M, Embree LJ, Tsai H-J, Starost MF, Hickstein DD. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct;103(41):15166–71.
81. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*. 2008 Jan;319(5861):336–9.
82. Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, Zahurak M, Cheng L, Civin CI, et al. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res*. 2002 Jul;62(14):3904–8.
83. North TE, de Bruijn MFTR, Stacy T, Talebian L, Lind E, Robin C, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity*. 2002 May;16(5):661–72.
84. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun;99(12):8242–7.
85. Inthal A, Krapf G, Beck D, Joas R, Kauer MO, Orel L, et al. Role of the erythropoietin receptor in ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Nov;14(22):7196–204.
86. van der Weyden L, Giotopoulos G, Wong K, Rust AG, Robles-Espinoza CD, Osaki H, et al. Somatic drivers of B-ALL in a model of ETV6-RUNX1; Pax5(+/-) leukemia. *BMC Cancer*. 2015 Aug;15:585.
87. Li M, Jones L, Gaillard C, Binnewies M, Ochoa R, Garcia E, et al. Initially disadvantaged, TEL-AML1 cells expand and initiate leukemia in response to irradiation and cooperating mutations. *Vol. 27, Leukemia*. 2013. p. 1570–3.
88. Chan LC, Lam TH, Li CK, Lau YL, Li CK, Yuen HL, et al. Is the timing of exposure to infection a major determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hong Kong? *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2002 Apr;16(2):154–65.
89. Kinlen L. Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing. *Br J Cancer*. 2011 Jan;104(1):12–8.
90. Shang Y, Zhou F. Current Advances in Immunotherapy for Acute Leukemia: An

- Overview of Antibody, Chimeric Antigen Receptor, Immune Checkpoint, and Natural Killer. *Front Oncol.* 2019;9:917.
91. Boddu P, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Allison J, Sharma P, Daver N. The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk Lymphoma.* 2018 Apr;59(4):790–802.
 92. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England).* 2013 Jun;381(9881):1943–55.
 93. O'Connor D, Bate J, Wade R, Clack R, Dhir S, Hough R, et al. Infection-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia: an analysis of infectious deaths on UKALL2003. *Blood.* 2014 Aug;124(7):1056–61.
 94. Afzal S, Ethier M-C, Dupuis LL, Tang L, Punnett AS, Richardson SE, et al. Risk factors for infection-related outcomes during induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Dec;28(12):1064–8.
 95. Hurwitz CA, Silverman LB, Schorin MA, Clavell LA, Dalton VK, Glick KM, et al. Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2000 Apr;88(8):1964–9.
 96. Inaba H, Pui C-H. Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* 2019 Dec;38(4):595–610.
 97. Lam JC, Chai JY, Wong YL, Tan NW, Ha CT, Chan MY, et al. Causative Pathogens of Febrile Neutropaenia in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Ann Acad Med Singapore.* 2015 Nov;44(11):530–4.
 98. Inaba H, Pei D, Wolf J, Howard SC, Hayden RT, Go M, et al. Infection-related complications during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017 Feb;28(2):386–92.
 99. Domingo-Domènech E, Benavente Y, González-Barca E, Montalban C, Gumà J, Bosch R, et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica.* 2007 Nov;92(11):1475–81.
 100. Ding Q, Shi Y, Fan B, Fan Z, Ding L, Li F, et al. The interleukin-10 promoter polymorphism rs1800872 (-592C>A), contributes to cancer susceptibility: meta-analysis of 16,785 cases and 19,713 controls. *PLoS One.* 2013;8(2):e57246.
 101. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol.* 1995 Jan;154(2):483–90.
 102. Giron-Michel J, Giuliani M, Fogli M, Brouty-Boyé D, Ferrini S, Baychelier F, et al.

- Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R α complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2005 Oct;106(7):2302–10.
103. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001 Jan;97(1):14–32.
 104. Cario G, Izraeli S, Teichert A, Rhein P, Skokowa J, Möricke A, et al. High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Oct;25(30):4813–20.
 105. Lin D, Liu C, Xue M, Liu R, Jiang L, Yu X, et al. The role of interleukin-15 polymorphisms in adult acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2010 Oct;5(10):e13626.
 106. Wu Y, Zhou BP. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2010 Feb;102(4):639–44.
 107. Powers MP, Nishino H, Luo Y, Raza A, Vanguri A, Rice L, et al. Polymorphisms in TGF β and TNF α are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Dec;131(12):1789–93.
 108. Waterer GW, Wunderink RG. Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response. *Crit Care*. 2003 Aug;7(4):308–14.
 109. Madsen EC, Levy ER, Madden K, Agan AA, Sullivan RM, Graham DA, et al. Mannose-Binding Lectin Levels in Critically Ill Children With Severe Infections. *Pediatr Crit Care Med a J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc*. 2017 Feb;18(2):103–11.
 110. Schmiegelow K, Garred P, Lausen B, Andreassen B, Petersen BL, Madsen HO. Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002 Nov;100(10):3757–60.
 111. Merlen C, Bonnefoy A, Wagner E, Dedeken L, Leclerc J-M, Laverdière C, et al. L-Asparaginase lowers plasma antithrombin and mannan-binding-lectin levels: Impact on thrombotic and infectious events in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Aug;62(8):1381–7.
 112. Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev*. 2001 Apr;180:86–99.
 113. Carlos A, Vallinoto R, Freitas FB, Guirelli I, Fernando L, Machado A, et al. Characterization of mannose-binding lectin plasma levels and genetic polymorphisms in HIV-1-infected individuals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):1–3.

114. Pontes GS, Tamegão-Lopes B, Machado LFA, Azevedo VN, Ishak MOG, Ishak R, et al. Characterization of mannose-binding lectin gene polymorphism among human T-cell lymphotropic virus 1 and 2-infected asymptomatic subjects. *Hum Immunol.* 2005;66(8):892–6.
115. Zehnder A, Fisch U, Hirt A, Niggli FK, Simon A, Ozsahin H, et al. Prognosis in pediatric hematologic malignancies is associated with serum concentration of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Jul;53(1):53–7.
116. Agostinho ME. Black American Colonization in the Brazilian Amazon. *Sæculum – Rev História.* 2020;25(43):164–79.
117. Oguz R, Ciftci HS, Gokce M, Ogret Y, Karadeniz S, Pehlivan S, et al. The association of HLA-DRB1 alleles and MBL2 gene variant in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematol Transfus cell Ther.* 2023 Mar;
118. Wong M, Öhrmalm L, Broliden K, Aust C, Hibberd M, Tolfvenstam T. Mannose-binding lectin 2 polymorphisms do not influence frequency or type of infection in adults with chemotherapy induced neutropaenia. *PLoS One.* 2012;7(2):e30819.
119. Ferraroni NR, Segat L, Guimarães RL, Brandão LAC, Crovella S, Constantino-Silva RN, et al. Mannose-binding lectin and MBL-associated serine protease-2 gene polymorphisms in a Brazilian population from Rio de Janeiro. *Int J Immunogenet.* 2012;39(1):32–8.
120. Edge MD, Rosenberg NA. Implications of the apportionment of human genetic diversity for the apportionment of human phenotypic diversity. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2015 Aug;52:32–45.
121. Hunley KL, Cabana GS, Long JC. The apportionment of human diversity revisited. *Am J Phys Anthropol.* 2016 Aug;160(4):561–9.
122. Novembre J. The background and legacy of Lewontin’s apportionment of human genetic diversity. *Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci.* 2022 Jun;377(1852):20200406.
123. Sokołowska A, Świerzko AS, Gajek G, Gołos A, Michalski M, Nowicki M, et al. Associations of ficolins and mannose-binding lectin with acute myeloid leukaemia in adults. *Sci Rep.* 2020 Jun;10(1):10561.
124. Pehlivan M, Nursal AF, Gündeş İ, Oyacı Y, Kıvanç D, Pehlivan S. Role of MIF-173G/C and Mbl2 Codon 54A/B Variants in the Risk of Multiple Myeloma: An Association Study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2021;21(5):925–31.

125. Frakking FNJ, Israëls J, Kremer LCM, Kuijpers TW, Caron HN, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin (MBL) and the risk for febrile neutropenia and infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jul;57(1):89–96.
126. Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ*. 1997 Apr;314(7089):1229–32.
127. Mølle I, Peterslund NA, Thiel S, Steffensen R. MBL2 polymorphism and risk of severe infections in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Oct;38(8):555–60.
128. Klostergaard A, Steffensen R, Møller JK, Peterslund N, Juhl-Christensen C, Mølle I. Sepsis in acute myeloid leukaemia patients receiving high-dose chemotherapy: no impact of chitotriosidase and mannose-binding lectin polymorphisms. *Eur J Haematol*. 2010 Jul;85(1):58–64.
129. Holanda K, Lucena-Araujo AR, Quintas A, Mendonça T, Lima A, Vasconcelos LR, et al. Mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene polymorphisms do not influence frequency of infections in chronic lymphocytic leukemia patients. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(1):29–34.
130. Lausen B, Schmiegelow K, Andreassen B, Madsen HO, Garred P. Infections during induction therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia--no association to mannose-binding lectin deficiency. *Eur J Haematol*. 2006 Jun;76(6):481–7.
131. Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost*. 2007 Sep;98(3):488–96.
132. Dresen M, Valentin-Weigand P, Berhanu Weldearegay Y. Role of Metabolic Adaptation of *Streptococcus suis* to Host Niches in Bacterial Fitness and Virulence. *Pathog (Basel, Switzerland)*. 2023 Mar;12(4).
133. Ruskamp JM, Hoekstra MO, Rovers MM, Schilder AGM, Sanders EAM. Mannose-binding lectin and upper respiratory tract infections in children and adolescents: a review. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 May;132(5):482–6.
134. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, et al. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007 Jun;44(12):1593–601.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização sorológica e genotípica da infecção pelo vírus Epstein-Barr em pacientes com doenças hematológicas atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM.

Pesquisador: LILIAN FERRARI DE FREITAS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 25710819.0.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.081.493

Apresentação do Projeto:

O vírus Epstein-Barr (EBV) ou herpes vírus humano tipo 4 (HHV-4) pertence à família Herpesviridae, que é constituída por oito vírus que possuem a capacidade de estabelecer latência no hospedeiro, reativando quando ocorre imunodepressão ou imunossupressão no indivíduo infectado, sendo a principal causa de mononucleose infecciosa e alterações hematológicas em pacientes imunodeprimidos. Este estudo tem como objetivo principal

caracterizar sorológica e genotípicamente as infecções por EBV em pacientes com doenças hematológicas atendidos na fundação HEMOAM. Aproximadamente 279 amostras oriundas de residentes da área metropolitana de Manaus serão estudadas por meio de ensaios imunoenzimáticos e métodos moleculares para estimar a prevalência das infecções e os genótipos circulantes em nossa região. Todos os indivíduos serão submetidos a um inquérito epidemiológico que, entre outras variáveis, avaliará as características sócio demográficas dos indivíduos participantes assim como os comportamentos de risco associados às infecções. Com este estudo, espera-se determinar a soroprevalência da infecção por EBV e os genótipos circulantes na região estudada, além de gerar maiores informações sobre o perfil clínico das infecções, principalmente no que tange a desenvolvimento de distúrbios hematológicos.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

Continuação do Parecer: 5.081.493

Palavras-Chave: vírus Epstein-Barr, prevalência, distúrbios hematológicos, perfil imunológico.

Objetivo da Pesquisa:

- Estimar a soroprevalência do EBV em pacientes com doenças hematológicas.- Dosar os níveis séricos de IgM em pacientes com doenças hematológicas. - Identificar os genótipos de EBV circulantes na população estudada- Identificar as possíveis características sociodemográficas dos indivíduos estudados, que possam estar relacionadas a susceptibilidade à infecção por EBV.- Identificar os distúrbios hematológicos mais frequentes em indivíduos infectados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A manipulação das amostras, ainda que realizada com as normas de biossegurança, apresenta riscos mínimos para o manipulador. Como as amostras já foram previamente coletadas para o projeto de outro herpesvírus, os riscos atribuídos anteriormente foram possíveis erros na coleta de sangue dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador apresentou todos os termos, trata-se de uma emenda de projeto, somente solicitando a prorrogação do prazo e a inclusão de nova metodologia de diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados - ok

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências, meu parecer é favorável a aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto é executável e importante para estimar a soroprevalência do EBV em pacientes com doenças hematológicas. É viável do ponto de vista ético e está de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Diante do exposto esse CEP julga o projeto APROVADO. Salvo melhor juízo, esse é o parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_182749	16/09/2021		Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.081.493

Básicas do Projeto	_E1.pdf	13:07:49		Aceito
Outros	cartadeencaminhamento.pdf	16/09/2021 13:07:03	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Outros	metodologia.doc	16/09/2021 13:01:50	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Outros	cronograma.docx	16/09/2021 12:59:40	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_EBV.docx	26/07/2020 20:44:05	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Outros	Carta_resposta.docx	26/07/2020 00:25:10	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Outros	Termo_De_Compromisso_Para_Utilizacao_De_Dados_E_Prontuarios.doc	23/07/2020 16:14:55	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.docx	20/02/2020 22:48:27	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Outros	anuencia_instituicao_co.pdf	20/01/2020 22:32:01	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia.pdf	13/01/2020 22:07:39	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_renato.docx	31/10/2019 00:14:04	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_jean.docx	31/10/2019 00:13:39	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_eduardo.docx	31/10/2019 00:13:11	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_gemilson.docx	31/10/2019 00:11:00	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	31/10/2019 00:04:27	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.docx	31/10/2019 00:01:40	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/10/2019 23:52:50	LILIAN FERRARI DE FREITAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.081.493

MANAUS, 05 de Novembro de 2021

Assinado por:
SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br