

Avaliação da via das lectinas no soro de pacientes com doença de Chagas crônica pela detecção de C4 por Elisa

Evaluation of the Lectin Pathway in the Serum of Patients with Chronic Chagas Disease by Detection of C4 by Elisa

Renan Polachini; Lorena Bavia; Fabiana A. Andrade; Kárita C. F. Lidani; Vanessa F. Picceli; Nathalia M. D. L. Signorini; Pâmela D. Fontana; Helena M. B. S. Plácido; Iara J. M. Reason

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Médica, Curitiba, PR Paraná, Brasil.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical crônica causada pelo *Trypanosoma cruzi*, atingindo cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina. A via das lectinas (VL) do sistema complemento é uma das primeiras linhas de defesa na resposta imunológica contra a infecção pelo *T. cruzi*, e pode continuar sendo ativada na infecção crônica devido ao escape do parasito à sua ação. Embora alguns componentes dessa via tenham sido investigados na DC, não existem relatos sobre sua ativação em soro de pacientes. Neste contexto, nosso objetivo foi avaliar a ativação da VL no soro de pacientes com DC crônica e controles pela detecção do componente C4 empregando a técnica de ELISA. Para isso, amostras de soro de 80 pacientes com DC crônica (formas clínicas: indeterminada n=17; sintomática n=63; cardíaca n=45; cardiodigestiva n=13; digestiva n=5) atendidos no Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico (HC/UFPR) e 80 controles saudáveis (doadores do Banco de Sangue do HC) foram avaliados quanto a ativação da VL. Os resultados demonstraram que a ativação da VL pela lectina ligante de manose (MBL) encontra-se reduzida, enquanto que a ativação pelas ficolinas está aumentada em pacientes com DC quando comparados aos controles. Os mesmos resultados foram observados quando os pacientes foram categorizados quanto às formas clínicas indeterminada e sintomática. Concluímos que a detecção do componente C4 por ELISA é uma metodologia eficiente para avaliar a ativação da VL em soro de pacientes com DC crônica possibilitando diferenciar o perfil de ativação entre pacientes e controles.

Palavras-chave: doença de chagas; sistema complemento; ativação do complemento; via das lectinas; lectina de ligação a manose; ficolinas.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a chronic tropical disease caused by Trypanosoma cruzi, affecting about 8 million people in Latin America. The lectin pathway (LP) of the complement system is one of the first lines of host defense in the response against T. cruzi, and can continue to be activated in chronic infection due to the escape of the parasite to its action. Although some components of this pathway have been investigated in CD, there are no reports on its activation in patient serum. In this context, our objective was to evaluate the activation of LP in chronic chagasic patients and controls by the detection of the C4 component, using the direct ELISA assay. For this purpose, serum of 80 patient with chronic CD (clinical forms: asymptomatic n=17; symptomatic n=63; cardiac n=45; cardio digestive n=13; digestive n=5) followed at the Ambulatory of Attention to Chagasic Patients (HC/UFPR) and 80 healthy controls (donors of the Blood Bank of HC) were evaluated regarding the evaluation of the LP. The results showed that LP activation by mannose-binding lectin (MBL) was found reduced while activation by ficolins was increased in patients with CD when compared to controls. The same results were observed when the patients were categorized according to the indeterminate and

symptomatic clinical forms. We conclude that the detection of the C4 component by ELISA is an efficient methodology to assess LP activation in serum from patients with chronic CD, enabling to differentiate the activation profile between patients and controls.

Key words: chagas disease; complement system; complement activation; lectin pathway; mannose-binding lectin; ficolins

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) é considerada uma doença negligenciada, atingindo cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina, segundo a Organização Mundial da Saúde em 2019⁽¹⁾. No Brasil, entre o período de 2007 a 2018, foram registrados casos da DC na maioria dos estados brasileiros, com uma média anual de 220 casos. No Brasil, a transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da DC, tem como um dos principais vetores o *Triatoma infestans*, inseto da subfamília Triatominae. Em relação às formas prováveis de transmissão ocorridas no país, 73% foram por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial, 0,4% por transmissão vertical, 0,1% por transmissão acidental, e em 17,5% não foi identificada a forma de transmissão, segundo dados do DATASUS^(2,3).

O ciclo de vida do *T. cruzi* consiste em diversos estágios evolutivos. Após a contaminação do hospedeiro, o protozoário, que inicialmente encontra-se na forma tripomastigota metacíclica, sofre modificações para a forma reprodutiva amastigota no interior das células do hospedeiro. Essas se transformam em tripomastigotas flageladas, as quais são liberadas após lise da célula e tem o potencial de infectar outras células. Durante a fase aguda, as tripomastigotas migram pela via linfática e sanguínea para diversos tecidos principalmente cardíaco e musculares lisos, além de gânglios. Mesmo após o desenvolvimento da resposta imune específica contra os tripomastigotas, o parasito pode persistir no hospedeiro na forma amastigota em diferentes tecidos⁽⁴⁾. Embora a maioria dos indivíduos com DC permaneça assintomático, na forma indeterminada por toda vida, 2-5%

deles progridem a cada ano, para uma das formas sintomáticas da DC crônica: cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), megassíndromes digestivas, ou ambos⁽⁵⁾.

Imediatamente após a inoculação do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, o sistema complemento (SC) é um dos principais componentes da defesa inata a atuar no combate ao parasito. Este sistema consiste de pelo menos 35 proteínas plasmáticas e receptores de membrana e pode ser ativado em três vias: clássica (VC), lectinas (VL) e alternativa (VA). A VC é tipicamente inicializada por complexos imunes e requer a presença do complexo C1 (q,r,s). A VL é ativada pela ligação de moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs), como a lectina ligante de manose (MBL) e ficolinas, aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a células apoptóticas (DAMPs); enquanto a VA é ativada espontaneamente pela hidrólise de C3. Todas essas vias culminam nas clivagens dos componentes C3 e C5 por meio das convertases⁽⁶⁾. Uma vez ativado, diversas funções do SC são geradas, como a opsonização e fagocitose de partículas ou microorganismos, a potencialização da resposta inflamatória por anafilatoxinas (C3a e C5a) derivados dos componentes clivados, e a lise de células, através do complexo de ataque à membrana (MAC), desempenhando assim, papel fundamental no controle inicial da parasitemia por *T. cruzi*⁽⁷⁾ *Figura 1*.

A VL é uma das primeiras vias a ser ativada na presença do parasito e desempenha um importante papel na resposta imune do hospedeiro contra o *T. cruzi*⁽⁸⁾. Quando a MBL e ficolinas ligam-se ao *T. cruzi*, as enzimas serino-proteases associadas à MBL (MASPs) são autoativadas e clivam os componentes do complemento C2 e C4, e seus produtos C2b e C4b se depositam no parasito, dando sequência a ativação da VL. Esse reconhecimento e ativação da VL frente ao *T. cruzi* ocorre devido a presença de açúcares na superfície do parasito, como manose e n-acetilglicosamina, os quais promovem a ligação sinérgica da MBL e ficolinas a estes compostos⁽⁹⁾. Entretanto, sabe-se que o *T. cruzi* consegue evadir da ativação do SC e de outros mecanismos de defesa, estabelecendo uma infecção crônica⁽⁷⁾. Considerando a persistência da infecção pelo *T. cruzi* em indivíduos cronicamente infectados, é possível que uma ativação inadequada do SC possa promover injúria tecidual decorrente do processo inflamatório, contribuindo para a progressão clínica da doença⁽¹⁰⁾. Não existem relatos na literatura sobre a avaliação funcional da ativação da VL em pacientes

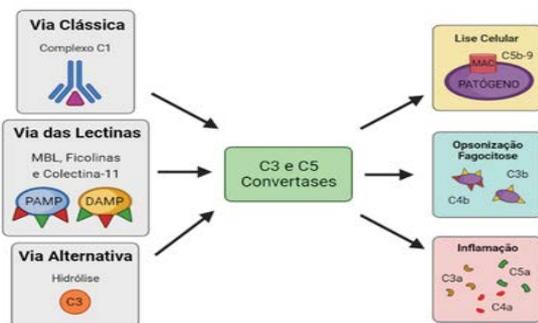


FIGURA 1 – Vias de ativação do sistema complemento

com DC crônica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ativação sistêmica da VL pela MBL e pelas ficolinas em pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, também propomos com este trabalho uma metodologia para a avaliar a ativação da VL no soro de pacientes chagásicos.

MÉTODOS

Desenho Do Estudo: Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR, Curitiba, Brasil) sob nº 15754513.7.0000.0096.

RECRUTAMENTO DOS CONTROLES E PACIENTES

Controles: O grupo controle (n = 80) foi composto de doadores de sangue voluntários do Biobanco do Hospital de Clínicas da UFPR que não apresentaram queixas clínicas⁽¹¹⁾ e tinham resultados negativos para sorologia contra o *T. cruzi* pelos testes de anticorpos anti-*T. cruzi* por imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas com sensibilidade de 100% (IC 95%: 97,90 a 100%) e especificidade de 99,93% (IC 95%: 99,80 a 99,99%) (*Architect Plus Chagas, Abbott, EUA*), e imunofluorescência indireta com 100% de sensibilidade e especificidade (IMUNO-Con Chagas, WAMA diagnóstica, Brasil)^(12,13); além de resultados negativos para outras análises sorológicas incluindo: *Treponema pallidum* (teste de flocação - VDRL), *hepatitis B virus (anti-HBc e HBsAg*, com pesquisa de IgG ou IgG + IgM), *hepatitis C virus (anti-HCV* e teste para detecção de ácido nucléico do vírus HCV), *HIV (anti-HIV-1, anti-HIV-2*, teste de antígeno p24 e teste para detecção de ácido nucléico do vírus HIV) e *human T-cell lymphotropic viruses 1 e 2 (anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2)*.

Pacientes: Os pacientes incluídos no estudo (n=80) foram atendidos no Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico do HC-UFPR. Todos os pacientes incluídos atenderam as seguintes características: ≥18 anos (sem limite de idade superior), com diagnóstico clínico e sorológico para DC, utilizando os mesmos testes empregados aos controles. Como critérios de exclusão foram empregadas as seguintes características: gestantes, lactantes, infecções recentes, suspeita de cardiomiopatia não chagásica (como cardiopatia hipertensiva), incapazes de fornecer consentimento para a pesquisa, incapazes de responder o questionário de fator de risco devido a deficiência ou outro fator, ou que não desejavam participar do estudo.

A história clínica e os dados epidemiológicos dos pacientes foram obtidos a partir de registros médicos presentes nos prontuários depositados no arquivo do Hospital de Clínicas, UFPR. Além disso, uma entrevista e exame clínico geral foram realizados em todos os pacientes para determinar outras variáveis como índice de massa corporal (IMC), pressão arterial e *diabetes*. A coleta desses dados tem o intuito de validar nosso estudo ao comparar a epidemiologia e as comorbidades atreladas à DC relatada na literature^(14,15). Os pacientes foram caracterizados quanto à forma clínica da DC com base na história clínica, diagnóstico e exames como eletrocardiograma de 12 derivações, ecocardiograma transtorácico, obtidos nos prontuários dos pacientes⁽¹³⁾.

Ensaio Funcional De Ativação Da Via Das Lectinas Pela Mbl E Pelas Ficolinas: A ativação da VL foi avaliada no soro de controles e pacientes com DC crônica quantificando-se a presença de moléculas de C4 por ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA*), adaptado de Bavia e colaboradores⁽⁶⁾. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µl/poço de solução de 10 µg/mL de manana (*Sigma, USA*) para a avaliação da ativação da VL pela MBL ou de 25 µg/mL albumina do soro bovino acetilada (*BSA-Ac, Promega, USA*) para avaliação da ativação da VL pelas ficolinas, em tampão carbonato (0,1 M NaHCO₃, 0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6) por 16 h a 4°C. As placas foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), bloqueadas com 1% de albumina do soro bovino (BSA) em PBS por 60 min a 37°C. Após as lavagens as placas foram incubadas por 60 min a 37°C com 100 µl/poço de um pool de soro humano normal (SHN) em diferentes diluições (para ativação via MBL: 1:50, 1:67, 1:89, 1:118, 1:157, 1:209 e para ativação via ficolinas: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) em tampão HEPES/NaCl++ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0,1% gelatina, pH 7,4) como curva padrão. A atividade da VL do pool de SHN, usado como padrão, fornece o valor arbitrário de uma unidade por mL (ou 1000 mUA/mL). Assim, cada diluição do pool de SHN corresponde a 1000, 750, 563, 422, 316, 237, 178 e 133 mUA/mL para a ativação via MBL, e 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 7,8125 mUA/mL para a ativação via ficolinas. Os soros de controles e pacientes foram diluídos 1:80 e 1:30 para os ensaios de ativação da VL pela MBL e pelas ficolinas, respectivamente, e incubados junto com as respectivas curvas padrões. Após lavadas, as placas foram incubadas por 60 min a 37°C com o anticorpo anti-C4 humano (ATB, USA) diluído 1:4000 em PBS-T contendo 1% de BSA (PTB). Depois da incubação, as placas foram lavadas novamente e incubadas por 60 min a 37°C com o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti-IgG policlonal anti-cabra (*Sigma, USA*) diluído 1:30000 em PTB. A revelação foi realizada após três lavagens, usando-se 1 mg/mL do substrato p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt (*PNPP*,

Sigma, USA) diluído em tampão de revelação composto por 1 M de dietanolamina suplementada com 0,5 mM de MgCl₂ em pH 9,8 e incubando a placa a 37°C. Após 15 min de incubação, foi realizada a primeira leitura das placas usando a absorbância de 405 nanômetros no espectrofotômetro ELx800 (Biotek, Brasil), e mais duas leituras foram realizadas a cada 15 min. A absorbância em função da concentração é essencialmente não linear, dado que o ensaio funcional é caracterizado por uma sequência de interações proteicas interdependentes. Considerando a natureza do processo, foi utilizado um modelo exponencial para ajustar os resultados da curva padrão em cada ensaio. A acurácia do ajuste foi avaliada pelo desvio padrão do ajuste ou standard deviation of the fit na língua inglesa (STDFIT), que é calculado pela raiz da soma ponderada dos quadrados dos resíduos dividido pelo número de graus de liberdade dos dados. O valor do STDFIT variou de 2,5% a 7,6% em relação ao valor médio das absorbâncias dos ensaios considerados. A concentração dos controles e dos pacientes foi calculada pela inversão da expressão analítica, e os respectivos erros foram estimados pela razão entre o STDFIT e o módulo da derivada da curva padrão no ponto. As concentrações finais foram obtidas pela média ponderada dos resultados das leituras, e o erro relativo médio das concentrações calculadas foi de 11%.

Análise Estatística: A distribuição dos dados quantitativos

foi avaliada com os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre dados quantitativos foram realizadas através dos testes não-paramétricos *de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis*. Os resultados obtidos foram corrigidos por regressão logística binária ajustados para idade, sexo e etnia STATA v.9.2 (*Stata-corp, EUA*). Para os dados qualitativos utilizamos o teste exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson. A análise de correlação foi realizada empregando o teste de correlação de Spearman. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos (p_{Aju} - p ajustado ou corrigido). Os dados foram apresentados como mediana e interquartis. Empregamos o programa GraphPad Prism – versão 5.0.

RESULTADOS

Controles E Pacientes: As características sócio-demográficas e as comorbidades apresentadas pelos controles e pacientes estão apresentadas na Tabela 1. A idade média para o grupo controle foi de 45 anos, enquanto que para os pacientes foi de 64 anos. Quanto ao sexo, o grupo controle apresentou 50% de homens e o grupo de pacientes 40%. Observamos uma maior frequência de diabéticos (12,5%) e hipertensos (75%) entre os pacientes, assim como um

TABELA 1 – Características sócio-demográficas e comorbidades em controles e pacientes

Características	Controles n=80	Pacientes n=80	Indeterminado n=17	Cardíaco n=45	Cardiodigestivo n=13	Digestivo n=5	Controles vs Pacientes valor de p
Idade (anos) mediana [máx. - min.]	45 [25 - 62]	64 [46 - 89]	64 [48 - 72]	63 [46 - 89]	66 [53 - 81]	61 [55 - 64]	p<0,0001
Sexo, n (%)							
Homens	40 (50,0%)	32 (40,0%)	8 (47,0%)	19 (42,2%)	5 (38,4%)	0 (0,0%)	p=0,2659
Mulheres	40 (50,0%)	48 (60,0%)	9 (53,0%)	26 (57,8%)	8 (61,6%)	5 (100%)	
Ancestralidade, n (%)							
Euro-Brasileiro	72 (90,0%)	62 (77,5%)	14 (82,0%)	32 (71,1%)	11 (84,6%)	5 (100%)	p=0,0420
Afro-Brasileiro	6 (7,5%)	17 (21,2%)	3 (18,0%)	12 (26,7%)	2 (15,4%)	0 (0,0%)	
Outros	2 (2,5%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Diabetes, n (%)	0 (0%) ^[*]	10 (12,5%)	0 (0%)	8 (17,8%)	1 (7,7%)	1 (20%)	p=0,0014
Hipertensão, n (%)	10 (12,5%) ^[*]	61 (75%)	11(64,7%)	37 (82,2%)	9 (69,2%)	4 (80%)	p<0,0001
IMC (kg/m ²), mediana	27,68 ^[*]	28,42	28,06	28,44	26,3	32,2	p=0,0681
IMC Categorizado ^[*] (kg/ m ²), mediana (n)							
Eutrófico	22,7	23,9	24,4	23,7	22,6	-	p=0,3372
Sobrepeso	27,7	27,4	27,5	27,5	26,3	-	p=0,4013
Obesidade grau I	32,0	31,3	30,9	31,8	32,4	30,7	p=0,3557
Obesidade grau II	36,9	37,1	-	37,1	-	37,2	p=0,2810

NOTA: [*] As comorbidades avaliadas para os controles foram autorreferidas. [#] O índice de massa corporal (IMC) foi classificado conforme as Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2016 escritas pela Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica.

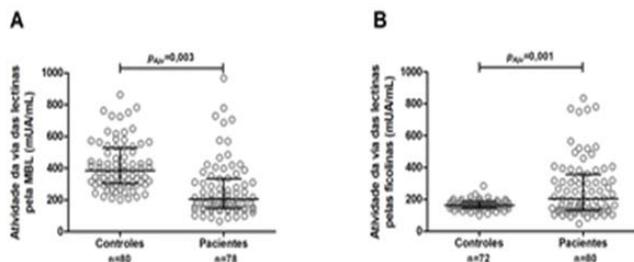


FIGURA 2 – Avaliação funcional da atividade da via das lectinas em controles e pacientes com doença de chagas crônica

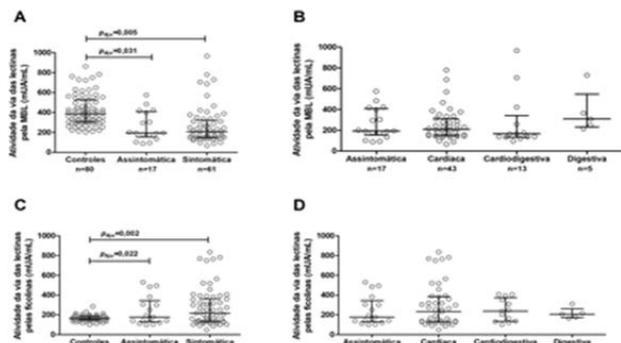


FIGURA 3 – Avaliação funcional da atividade da via das lectinas em controles e nas diferentes formas clínicas da DC crônica

maior número de afro-brasileiros acometidos por chagas (21,2%), em comparação com os controles (0, 12,5 e 7,5% respectivamente).

Avaliação Da Ativação Da Via Das Lectinas: Os resultados da ativação da VL pela MBL e pelas ficolinas em indivíduos controles e pacientes chagásicos crônicos são apresentados nas Figuras 2A e 2B, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas entre pacientes e controles para ambas as vias avaliadas. Houve redução pela MBL e aumento pelas ficolinas na atividade da VL e, nos pacientes com DC crônica quando comparados aos controles.

A ativação da via das lectinas pela MBL e pelas ficolinas foi avaliada na presença de manana (A) ou BSA-acetilado (B) pela técnica de ELISA. Os dados foram apresentados como mediana e interquartil, n = 80 para cada grupo. Valores de p ajustados por regressão logística binária.

Na sequência, os pacientes cronicamente infectados foram classificados quanto a sua forma clínica e observou-se que a ativação da VL pela MBL foi significativamente menor em indeterminados e sintomáticos, em relação aos controles Figura 3A. Para a ativação da VL pelas ficolinas observou-se aumento significativo entre os pacientes com a forma clínica sintomática e indeterminada quando comparado aos controles Figura 3C. Não encontramos diferença significativa entre as formas clínicas cardíaca, cardiodigestiva e digestiva para a ativação da VL pela

MBL ou pelas ficolinas Figura 3B e D.

A ativação da via das lectinas pela MBL e pelas ficolinas foi avaliada na presença de manana (A e B) ou BSA- acetilado (C e D) pela técnica de ELISA. Os dados foram apresentados como mediana e interquartil. Valores de p ajustados por regressão logística binária.

Não houve diferença significativa para nenhuma das comorbidades nos pacientes quanto a atividade da VL: diabetes mellitus (MBL: $p_{Aju}=0,407$; ficolinas $p_{Aju}=0,458$), hipertensão arterial (MBL: $p_{Aju}=0,427$; ficolinas $p_{Aju}=0,176$), e IMC categorizado em eutrófico vs. sobrepeso e obeso (grau I e II), (MBL: $p_{Aju}=0,874$; ficolinas: $p_{Aju}=0,929$). Nenhuma correlação foi observada entre a atividade da VL e variáveis como idade, sexo nos pacientes ou controles.

DISCUSSÃO

Os resultados indicam que a ativação da VL pela MBL e pelas ficolinas apresentam perfis distintos de resposta em pacientes com DC crônica. Possivelmente, no curso da infecção, a ativação diferencial da VL pode ser dependente de fatores oriundos tanto do parasito quanto do dano tecidual presente na infecção crônica. Essa diferença na ativação da VL pela MBL e ficolinas também foi observada entre os pacientes com forma indeterminada e sintomática da DC em relação aos controles.

Embora a ativação do SC pelo T. cruzi seja bem conhecida, conforme revisado por Lidani e colaboradores⁽⁷⁾, não existem relatos sobre a detecção da ativação do complemento em pacientes com DC. Entretanto, alguns componentes do sistema complemento estudados de forma isolada têm sido associados à DC crônica. A VL é uma das primeiras vias a ser ativada na presença do T. cruzi e a concentração sérica de componentes iniciadores desta via já foi avaliada em pacientes crônicos. Foi observado que baixos níveis séricos de MBL estão associados com a proteção contra a CCC⁽¹⁷⁾, e a concentração sérica de MBL aumenta com a gravidade do acometimento cardíaco⁽¹⁸⁾. Corroborando estes achados, uma correlação positiva entre os níveis séricos de MBL e do complexo MBL/MASP-2/C4 também foi observada previamente⁽¹⁹⁾. Além disso, níveis alterados de ficolina-2 se relacionaram com o grau de acometimento cardíaco⁽²⁰⁾. Já os níveis séricos de colectina-11 foram significativamente menores em pacientes com DC crônica em comparação aos controles⁽²¹⁾. Até o momento, não existem relatos sobre ensaios funcionais avaliando as três vias de ativação do SC, nem sobre os produtos gerados a partir da ativação, no soro de pacientes com DC crônica nem do seu impacto na história natural da doença.

Observamos uma divergência na ativação da VL pela MBL e pelas ficolinas nos pacientes, com redução da ativação da VL pela MBL e aumento pelas ficolinas em comparação aos controles. É possível, que no grupo de pacientes a MBL esteja sendo recrutada para atuar em processos oriundos da infecção crônica como na remoção de células apoptóticas e debris celulares, uma função também atribuída a MBL⁽²²⁾. Com isso, a concentração sérica de MBL poderia diminuir devido a um aumento do consumo, e consequentemente a ativação da VL pela MBL poderia ser comprometida, uma vez que a concentração sérica de MBL relaciona-se positivamente com as concentrações obtidas no ensaio funcional para a VL⁽²³⁾. Por outro lado, é preciso ter cautela na interpretação dos resultados com relação a ativação da VL pelas ficolinas, uma vez que neste ensaio usa-se BSA-acetilado, um ligante reconhecido pelas três ficolinas (1 a 3)^(24,25). Nesse contexto, foi observado maior atividade da VL pelas ficolinas entre os pacientes com DC quando comparado aos controles. É possível que o aumento da ativação da VL pelas ficolinas esteja relacionada a uma resposta diferencial e sinérgica das ficolinas⁽²⁶⁻²⁸⁾, atuando tanto na resposta inflamatória na fase crônica da doença quanto na remoção de células apoptóticas e debris celulares⁽²⁹⁻³¹⁾.

Nosso estudo tem algumas limitações. Por tratar-se de uma avaliação preliminar, o número de pacientes utilizados foi baixo. Porém, os resultados observados podem orientar futuros estudos, onde uma casuística maior poderá confirmar a alteração na ativação da VL em pacientes com DC crônica. Além disso, com o intuito de garantir maior confiança nos resultados obtidos, todos os resultados foram corrigidos por regressão logística, considerando a idade como covariável. Com relação a epidemiologia e comorbidades dos pacientes, nossos dados estão de acordo com o padrão evidenciado na literatura onde comorbidades como hipertensão, diabetes e obesidade são frequentemente observadas nos pacientes infectados pelo T. cruzi. Perante a ancestralidade, nossos dados corroboram com os estudos anteriores onde há maior prevalência da DC entre negros e pardos^(14,15). O método de avaliação funcional da ativação da VL foi padronizado pelo nosso grupo tendo como base as seguintes⁽³²⁾. Não testamos

amostras cujos valores sejam conhecidos para a ativação da VL pela MBL e pelas ficolinas devido à dificuldade para a aquisição de kits comerciais. Entretanto, isso não invalida nos resultados, uma vez que as diferenças observadas entre o grupo de pacientes com DC e o grupo controle validam a metodologia de dosagem. Portanto, eEmbora preliminares, os resultados apresentam pela primeira vez uma avaliação da ativação da VL em pacientes com DC crônica, indicando alteração tanto na atividade mediada pela MBL como por ficolinas. Essas hipóteses, no entanto, precisam ser confirmadas em estudos futuros com maior número de pacientes, realizando o estadiamento clínico das formas sintomáticas e quantificando as proteínas iniciadoras da VL no soro dos pacientes.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram a ativação da VL em soro de pacientes com DC crônica, onde a ativação dessa via, pela MBL e pelas ficolinas, sugerem distintas performances de resposta entre pacientes chagásicos e controles. Esses resultados indicam um papel da VL do sistema complemento na imunopatogenia da DC crônica. Além disso, o método empregado foi eficiente para avaliar funcionalmente a ativação da VL no soro de pacientes chagásicos uma vez que são concordantes com os dados presentes na literatura.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária, PPSUS e CAPES por seu apoio financeiro e bolsas de estudo. Lorena Bavia foi uma pós-doutora júnior pelo CNPq (420553 / 2017-7) e Renan Ribeiro Polachini foi bolsista de iniciação científica pelo PPSUS (acordo 045/2017 da Fundação Araucária). Agradecemos também ao Professor Doutor Rafael Carvalho Barreto da Universidade Tecnológica Federal do Paraná por adequar os resultados à curva padrão em ensaios funcionais para a ativação do percurso de docência por MBL e ficolins.

Conflito De Interesses: Todos os autores renunciam a qualquer conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde - OMS. Doença de Chagas (tripanosomíase americana). Genebra: OMS; 2019.
2. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Doença de Chagas. Lanceta. 2010; 375(9723): 1388-402.
3. Departamento de Informática do SUS - DATASUS. Informações de Saúde, Epidemiologia e Morbidade: banco de dados.
4. De Souza W, De Carvalho TM, Barrias ES. Revisão sobre Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010; 295394.
5. Cunha-Neto E, Chevillard C. Cardiomiopatia por doença de Chagas: imunopatologia e genética. Mediadores Inflamm. 2014; 683230.
6. Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, et al. Serine Proteases no Caminho do Lectin do Sistema Complemento. Proteases Fisiol Patol. 2017; 10: 397-420.
7. Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, et al. The Complement System: Uma presa do Trypanosoma cruzi. Microbiol frontal. 2017; 8: 607.
8. Barnum SR. C4a: Uma anafilatoxina apenas no nome. J Immun. inata. 2015; 7(4): 333-9.
9. Cestari Idos S, Krarup A, Sim RB, et al. Papel da ativação precoce da via de ensino na matança completa do Trypanosoma cruzi. Mol Immunol. 2009; 47(3): 426-37.

10. Aiello VD, Reis MM, Benvenuti LA, et al. Um possível papel de complemento na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica. *J Pathol.* 2002; 197(2): 224-9.
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 34, 2014.
12. Flores-Chavez MD, Sambri V, Schottstedt V, et al. Avaliação do Ensaio Elecsys® Chagas para a Detecção de *Trypanosoma cruzi*- Anticorpos Específicos em um Estudo Multicêntrico na Europa e América Latina. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(5): e01446-17.
13. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Gontijo ED, et al. 2 nd Consenso Brasileiro sobre a Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol.* 2016; 49(1): 3-60.
14. Lidani KCF, Sandri TL, Castillo-Neyra R, et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da doença crônica de Chagas do sul do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2020; 53: 1-10.
15. Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, et al. Epidemiologia da mortalidade relacionada à doença de Chagas no Brasil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2): e1508.
16. Bavia L, Dias Fontana P, Bovo F, et al. Efeito inibidor dos extratos supercríticos do *Arctium lappa* L. no Caminho da Lectina do Sistema Complemento. *Chem Biodivers.* 2019; 16(12): e1900401.
17. Luz PR, Miyazaki MI, Chiminacio Neto N, et al. A Deficiência de MBL Geneticamente Determinada está associada à Proteção contra Cardiomiopatia Crônica na Doença de Chagas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(1): e0004257.
18. Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, et al. Altos níveis de lectina de ligação manhosa estão associados ao risco de cardiomiopatia grave na doença crônica de Chagas. *Int J Cardiol.* 2010; 143(3): 448-50.
19. Boldt AB, Luz PR, Messias-Reason IJ. Os haplotipos MASP2 estão associados a alto risco de cardiomiopatia na doença crônica de Chagas. *Clin Immunol.* 2011; 140(1): 63-70.
20. Luz PR, Boldt AB, Grisbach C, et al. Associação de níveis de L-ficolina e genótipos FCN2 com doença crônica de Chagas. *PLoS Um.* 2013; 8(4): e60237.
21. Sandri TL, Andrade FA, Lidani KCF, et al. Human collectin-11 (COLEC11) e sua interação genética sinérgica com MASP2 estão associados com a fisiopatologia da doença de Chagas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13(4): e0007324.
22. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, et al. C1q e manose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2001; 194(6): 781-95.
23. Petersen SV, Thiel S, Jensen L, et al. Um ensaio para o caminho de ativação do complemento de ativação da lectin mannan-binding. *J Métodos Immunol.* 2001; 257(1-2): 107-16.
24. Garred P, Genster N, Pilely K, et al. A Journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev.* 2016; 274(1): 74-97.
25. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Novos insights sobre o papel das ficolinas no caminho das palestras da imunidade inata. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015; 316: 49-110.
26. Bjarnadottir H, Arnardottir M, Ludviksson BR. Freqüência e distribuição das variantes funcionais FCN2 e FCN3 entre os genótipos MBL2. *Imunogenética.* 2016; 68(5): 315-25.
27. Ishii M, Ohsawa I, Inoshita H, et al. Concentração sérica de componentes complementares da via de lectina em pacientes de hemodiálise de manutenção, e níveis relativamente mais altos de L-Ficolin e MASP-2 na deficiência de lectina de Manose-binding. *TherApher Dial.* 2011; 15(5): 441-7.
28. Tizzot MR, Lidani KCF, Andrade FA, et al. Os níveis de Plasma Ficolin-1 e Ficolin-3 são alterados em pacientes infectados com HIV e HIV/HCV do Sul do Brasil. *Immunol frontal.* 2018; 9: 2292.
29. Ma YJ, Doni A, Romani L, et al. A formação do complexo Ficolin-1-PTX3 promove a liberação de autocélulas alteradas e modula a produção de IL-8. *J Immunol.* 2013; 191(3): 1324-33.
30. Jensen ML, Honoré C, Hummelshøj T, et al. Ficolin-2 reconhece o DNA e participa da liberação das células hospedeiras moribundas. *Mol Immunol.* 2007; 44(5): 856-65.
31. Honoré C, Hummelshøj T, Hansen BE, et al. O componente imune inato ficolin 3 (antígeno Hakata) medeia a liberação de células apoptóticas tardias. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(5): 1598-607.
32. Kjaer TR, Thiel S. Ensaio para estimativa da atividade funcional da via de lectin mannan-binding do sistema complemento. *Métodos Mol Biol.* 2014; 1100: 131-9.

AUTOR CORRESPONDENTE

Renan Polachini  0000-0002-1219-8750
renanpolachini@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.