

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

Avaliação da via das lectinas no soro de pacientes com doença de Chagas crônica pela detecção de C4 por 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 Parana, Department of Medical Pathology, Curitiba, PR Parana, Brazil.

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.

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; cardiointestinal 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.

Concluimos 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.

Unitermos: Strongyloides; Covid-19; ciclo pulmonar; corticoides.

INTRODUCTION

Chagas disease (CD) is considered a neglected disease, affecting about 8 million people in Latin America, according to the World Health Organization in 2019⁽¹⁾. In Brazil, between 2007 and 2018, most cases of CD were registered. Brazilian states, with an annual average of 220 cases. In Brazil, the transmission of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which causes CD, has as one of the main vectors *Triatoma infestans*, an insect of the *Triatominae* subfamily. Regarding the probable forms of transmission occurring in the country, 73% were by oral transmission, 9% by vector transmission, 0.4% by vertical transmission, 0.1% by accidental transmission, and in 17.5% there was no identification of form of transmission, according to data from DATASUS^(2,3).

The life cycle of *T. cruzi* consists of several evolutionary stages. After contamination of the host, the protozoan, which is initially found in the trypomastigote form, undergoes modifications to the reproductive amastigote form inside the host's cells. These transform into flagellate trypomastigotes, which are released after cell lysis and have the potential to infect other cells. During the acute phase, trypomastigotes migrate via the lymphatic and bloodstream to different tissues, mainly cardiac and smooth muscle, in addition to ganglia. Even after the development of a specific immune response against trypomastigotes, the parasite can persist in the host in the amastigote form in different tissues⁽⁴⁾. Although most individuals with CD remain asymptomatic, in the indeterminate form for life, 2-5% of them progress to each year, for one of the symptomatic forms of chronic CD: chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), digestive megasyndromes, or both⁽⁵⁾.

Immediately after inoculation of *T. cruzi* in the vertebrate host, the complement system (SC) is one of the main components of the innate defense acting to combat the parasite. This system consists of at least 35 plasma proteins and membrane receptors and can be activated in three pathways: classical (VC), lectins (VL) and alternative (VA). VC is typically initiated by immune complexes and requires the presence of the C1 (q,r,s) complex. VL is activated by the binding of pattern recognition molecules (PRMs), such as mannose-binding lectin (MBL) and ficolins, to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and apoptotic cells (DAMPs); while VA is spontaneously activated by the hydrolysis

of C3. All these pathways culminate in the cleavage of C3 and C5 components through convertases⁽⁶⁾. Once activated, several SC functions are generated, such as opsonization and phagocytosis of particles or microorganisms, potentiation of the inflammatory response by anaphylatoxins (C3a and C5a) derived from cleaved components, and cell lysis through the membrane attack complex (MAC), thus playing a fundamental role in the initial control of parasitemia by *T. cruzi*⁽⁷⁾ Figure 1.

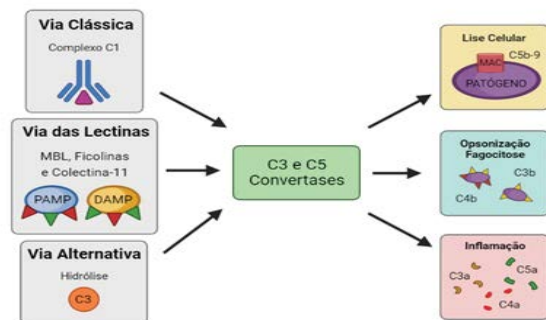


FIGURE 1 – Complement system activation pathways

VL is one of the first pathways to be activated in the presence of the parasite and plays an important role in the host's immune response against *T. cruzi*⁽⁸⁾. When MBL and ficolins bind to *T. cruzi*, the associated serine-protease enzymes to MBL (MASPs) are self-activated and cleave complement components C2 and C4, and their C2b and C4b products are deposited in the parasite, following the activation of the VL. This recognition and activation of the VL against *T. cruzi* occurs due to the presence of sugars on the surface of the parasite, such as mannose and n-acetylglucosamine, which promote the synergistic binding of MBL and ficolins to these compounds⁽⁹⁾. However, it is known that *T. cruzi* manages to evade SC activation and other defense mechanisms, establishing a chronic infection⁽⁷⁾. Considering the persistence of *T. cruzi* infection in chronically infected individuals, it is possible that an inadequate SC activation can promote tissue injury resulting from the inflammatory process, contributing to the clinical progression of the disease⁽¹⁰⁾. There are no reports in the literature on the functional assessment of VL activation in patients with chronic CD. The aim of the present study was to evaluate the systemic activation of VL by MBL and by ficolins in patients chronically infected with *T. cruzi*. In addition, with this work, we also propose a methodology to assess the activation of VL in the serum of chagasic patients.

METHODS

Study Design: This is an observational, analytical and cross-sectional study. The project was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná (HC-UFPR, Curitiba, Brazil) under number 15754513.70000.0096.

RECRUITMENT OF CONTROLS AND PATIENTS

Controls: The control group (n = 80) was composed of voluntary blood donors from the Biobanco Hospital de Clínicas da UFPR who had no clinical complaints⁽¹¹⁾ and had negative results for serology against *T. cruzi* by anti-*T. cruzi* microparticle chemiluminescent immunoassay with sensitivity of 100% (95% CI: 97.90 to 100%) and specificity of 99.93% (95% CI: 99.80 to 99.99%) (Architect Plus Chagas, Abbott, USA), and indirect immunofluorescence with 100% sensitivity and specificity (IMUNO-Con Chagas, WAMA diagnostica, Brazil)^(12,13); In addition to negative results for other serological tests including: *Treponema pallidum* (flocculation test - VDRL), hepatitis B virus (anti-HBc and HBsAg, with IgG or IgG + IgM testing), hepatitis C virus (anti-HCV and HCV virus nucleic acid detection test, HIV (anti-HIV-1, anti-HIV-2, p24 antigen test and HIV virus nucleic acid detection test) and human T-cell lymphotropic viruses 1 and 2 (anti-HTLV-1 and anti-HTLV-2).

Patients: The patients included in the study (n=80) were treated at the Chagas Patient Care Clinic at HC-UFPR. All patients included met the following characteristics: ≥18 years (no upper age limit), with clinical and serological diagnosis for CD, using the same tests used for controls. The following characteristics were used as exclusion criteria: pregnant women, lactating women, recent infections, suspected non-Chagas cardiomyopathy (such as hypertensive heart disease), unable to provide consent for the research, unable to answer the risk factor questionnaire due to disability or other factor, or who did not wish to participate in the study.

The clinical history and epidemiological data of the patients were obtained from medical records present in the medical records deposited in the archives of the Hospital de Clínicas, UFPR. In addition, an interview and general clinical examination were performed on all patients to determine other variables such as body mass index (BMI), blood pressure and diabetes. The collection of these data is intended to validate our study by comparing the epidemiology and comorbidities related to CD reported in the literature^(14,15). Patients were characterized as to the clinical

form of CD based on clinical history, diagnosis and tests such as electrocardiogram of 12-lead, transthoracic echocardiogram, obtained from patients' charts⁽¹³⁾.

Functional Assay of Lectin Pathway Activation by MBL and Ficolins: VL activation was evaluated in the serum of controls and patients with chronic CD, quantifying the presence of C4 molecules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), adapted from Bavia et al⁽¹⁶⁾. Polystyrene plates were sensitized with 100 µl/well of 10 µg/mL mannan solution (Sigma, USA) for the evaluation of VL activation by MBL or of 25 µg/mL acetylated bovine serum albumin (BSA-Ac, Promega, USA) for evaluation of VL activation by ficolins, in carbonate buffer (0.1 M NaHCO₃, 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.6) for 16 h at 4°C. Plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 60 min at 37°C. After washing, the plates were incubated for 60 min at 37°C with 100 µl/well of a pool of normal human serum (SHN) at different dilutions (for activation via MBL: 1:50, 1:67, 1:89, 1:118, 1:157, 1:209 and for activation via ficolins: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) in HEPES/NaCl++ buffer (10 mM HEPES), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.1% gelatin, pH 7.4) as standard curve. The SHN pool VL activity, used by default, gives the arbitrary value of one unit per mL (or 1000 mUA/mL). Thus, each SHN pool dilution corresponds to 1000, 750, 563, 422, 316, 237, 178 and 133 mUA/mL for activation via MBL, and 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 and 7.8125 mUA/ml for activation via ficolins. Sera from controls and patients were diluted 1:80 and 1:30 for VL activation assays by MBL and by ficolins, respectively, and incubated together with the respective standard curves. After washing, the plates were incubated for 60 min at 37°C with anti-human C4 antibody (ATB, USA) diluted 1:4000 in PBS-T containing 1% BSA (PTB). After incubation, the plates were washed again and incubated for 60 min at 37°C with the antibody conjugated with alkaline phosphatase anti-polyclonal anti-goat IgG (Sigma, USA) diluted 1:30000 in PTB. Development was performed after three washes, using 1 mg/mL of p-NitrophenylPhosphate substrate, Disodium Salt (PNPP, Sigma, USA) diluted in development buffer composed of 1 M diethanolamine supplemented with 0.5 mM MgCl₂ in pH 9.8 and incubating the plate at 37°C. After 15 min of incubation, the first reading of the plates was carried out using an absorbance of 405 nanometers in the ELx800 spectrophotometer (Biotek, Brazil), and two more readings were taken every 15 min. Absorbance as a function of concentration is essentially non-linear, as the functional assay is characterized by a sequence of interdependent protein interactions. Considering the nature of the process, an exponential model was used to adjust the results of the standard curve in each test. The accuracy of the fit was evaluated

by the standard deviation of the fit or standard deviation of the fit in English (STDFIT), which is calculated as the root of the weighted sum of squares of the residuals divided by the number of degrees of freedom of the data. The STDFIT value ranged from 2.5% to 7.6% in relation to the mean absorbance value of the considered assays. The concentration of controls and patients was calculated by inverting the analytical expression, and the respective errors were estimated by the ratio between the STDFIT and the modulus of the derivative of the standard curve at the point. The final concentrations were obtained by the weighted average of the reading results, and the mean relative error of the calculated concentrations was 11%.

Statistical Analysis: The distribution of quantitative data was assessed using the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov normality tests. Comparisons between quantitative data were performed using the non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The results obtained were corrected by binary logistic regression adjusted for age, sex and ethnicity STATA v.9.2 (Statacorp, USA). For qualitative data, we used Fisher's exact test and Pearson's chi-square test. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation test. P values less than 0.05 were considered significant (pAju-p adjusted or corrected). Data were presented as median and interquartiles. We employ the GraphPad Prism program – version 5.0.

RESULTS

Controls and Patients: The socio-demographic characteristics and comorbidities presented by the controls and patients are shown in Table 1. The mean age for the control group was 45 years, while for the patients it was 64 years. As for gender, the control group had 50% men and the patient group 40%. We observed a higher frequency of diabetics (12.5%) and hypertensive (75%) among patients, as well as a higher number of Afro-Brazilians affected by sores (21.2%), compared to controls (0.12 .5 and 7.5% respectively).

Assessment of Lectin Pathway Activation: The results of VL activation by MBL and ficolins in control subjects and chronic chagasic patients are shown in Figures 2A and 2B, respectively. Significant differences were observed between patients and controls for both evaluated pathways. There was a reduction by MBL and an increase by ficolins in the activity of VL and in patients with chronic CD when compared to controls.

Activation of the lectin pathway by MBL and by ficolins was evaluated in the presence of mannan (A) or acetylated BSA (B) by the ELISA technique. Data were presented as median and interquartile, n = 80 for each group. P values adjusted by binary logistic regression.

TABLE 1 – Socio-demographic characteristics and comorbidities in controls and patients

Characteristics	Controls n=80	Patients n=80	Indeterminaten=17	Cardiac n=45	Cardiodigestiven=13	Digestiven=5	Controls vs. Patients value of p
Age (years) median [máx. – mín.]	45 [25 - 62]	64 [46 - 89]	64 [48 - 72]	63 [46 - 89]	66 [53 - 81]	61 [55 - 64]	p<0,0001
Sex, n (%)							
Women	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%)	
Ancestry, n (%)							
Euro-Brazilian	72 (90,0%)	62 (77,5%)	14 (82,0%)	32 (71,1%)	11 (84,6%)	5 (100%)	p=0,0420
Afro-Brazilian	6 (7,5%)	17 (21,2%)	3 (18,0%)	12 (26,7%)	2 (15,4%)	0 (0,0%)	
Others	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
Hypertension, n (%)	10 (12,5%) ^[*]	61 (75%)	11 (64,7%)	37 (82,2%)	9 (69,2%)	4 (80%)	p<0,0001
IMC (kg/m ²), median	27,68 ^[#]	28,42	28,06	28,44	26,3	32,2	p=0,0681
IMC Categorization ^[#] (kg/m ²), Median (n)							
Eutrophic	22,7	23,9	24,4	23,7	22,6	-	p=0,3372
Overweight	27,7	27,4	27,5	27,5	26,3	-	p=0,4013
Grade Obesity I	32,0	31,3	30,9	31,8	32,4	30,7	p=0,3557
Grade Obesity II	36,9	37,1	-	37,1	-	37,2	p=0,2810

NOTE: [*] The comorbidities assessed for controls were self-reported. [#] The body mass index (BMI) was classified according to the Brazilian Guidelines on Obesity, 2016 written by the Brazilian Association for the Study of Obesity and Metabolic Syndrome.

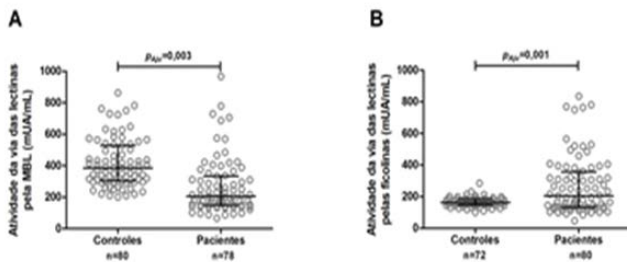


FIGURE 2 – Functional assessment of lectin pathway activity in controls and patients with chronic Chagas disease

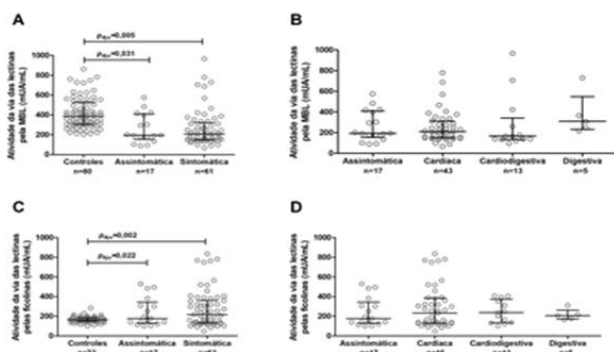


FIGURE 3 – Functional assessment of lectin pathway activity in controls and in the different clinical forms of chronic CD

Next, chronically infected patients were classified according to their clinical form and it was observed that the activation of VL by MBL was significantly lower in indeterminate and symptomatic patients, compared to controls Figure 3A. For VL activation by ficolins, a significant increase was observed among patients with the symptomatic and indeterminate clinical form when compared to controls Figure 3C. We found no significant difference between the cardiac, cardio digestive and digestive clinical forms for VL activation by MBL or by ficolins Figure 3B and D.

Activation of the lectin pathway by MBL and by phicolins was evaluated in the presence of mannan (A and B) or acetylated-BSA (C and D) by the ELISA technique. Data were presented as median and interquartile. P values adjusted by binary logistic regression.

There was no significant difference for any of the comorbidities in patients regarding VL activity: diabetes mellitus (MBL: pAju=0.407; ficolinas pAju=0.458), arterial hypertension (MBL: pAju=0.427; ficolinas pAju=0.176), and BMI categorized as eutrophicvs. Overweight and obese (grade I and II), (MBL: pAju=0.874; ficolins: pAju=0.929). No correlation was observed between VL activity and variables such as age, sex in patients or controls.

DISCUSSION

The results indicate that VL activation by MBL and ficolins have different response profiles in patients with chronic CD. Possibly, in the course of the infection, the differential activation of the VL may depend on factors arising from both the parasite and the tissue damage present in the chronic infection. This difference in VL activation by MBL and ficolins was also observed between patients with indeterminate and symptomatic form of CD compared to controls.

Although SC activation by *T. cruzi* is well known, as reviewed by Lidani et al⁽⁷⁾, there are no reports on the detection of complement activation in patients with CD. However, some components of the complement system studied in isolation have been associated with chronic CD. VL is one of the first pathways to be activated in the presence of *T. cruzi* and the serum concentration of initiating components of this pathway has already been evaluated in chronic patients. It has been observed that low serum MBL levels are associated with protection against CCC⁽¹⁷⁾, and serum MBL concentration increases with the severity of cardiac involvement⁽¹⁸⁾ Corroborating these findings, a positive correlation between serum MBL and MBL complex levels /MASP-2/C4 was also previously observed⁽¹⁹⁾. In addition, altered levels of ficolin-2 were related to the degree of cardiac involvement⁽²⁰⁾. Serum collectin-11 levels were significantly lower in patients with chronic CD compared to patients controls⁽²¹⁾ So far, there are no reports on functional assays evaluating the three pathways of SC activation, nor on the products generated from the activation, in the serum of patients with chronic CD, nor on their impact on the natural history of the disease.

We observed a divergence in VL activation by MBL and by ficolins in patients, with a reduction in VL activation by MBL and an increase by ficolins compared to controls. It is possible that in the group of patients MBL is being recruited to act in processes arising from chronic infection such as the removal of apoptotic cells and cell debris, a function also attributed to MBL⁽²²⁾. With this, the serum concentration of MBL could decrease due to an increase in consumption, and consequently the activation of VL by MBL could be compromised, since the serum concentration of MBL is positively related to the concentrations obtained in the functional assay for VL⁽²³⁾. On the other hand, caution must be exercised in the interpretation of the results regarding the activation of VL by ficolins, since in this assay acetylated BSA is used, a ligand recognized by the three ficolins (1 to 3)^(24,25). In this context, greater activity of VL by the ficolins was observed. Ficolins among patients with CD when compared to controls. It is

possible that the increased activation of VL by ficolins is related to a differential and synergistic response of ficolins⁽²⁶⁻²⁸⁾, acting both in the inflammatory response in the chronic phase of the disease and in the removal of apoptotic cells and cellular debris⁽²⁹⁻³¹⁾.

Our study has some limitations. As this is a preliminary assessment, the number of patients used was low. However, the observed results may guide future studies, where a larger sample may confirm the change in VL activation in patients with chronic CD. Furthermore, in order to ensure greater confidence in the results obtained, all results were corrected by logistic regression, considering age as a covariate. Regarding the epidemiology and comorbidities of patients, our data are in accordance with the pattern shown in the literature where comorbidities such as hypertension, diabetes and obesity are frequently observed in patients infected with *T. cruzi*. Regarding ancestry, our data corroborate previous studies where there is a higher prevalence of CD among blacks and browns^(14,15). The method of functional assessment of VL activation was standardized by our group based on the following⁽³²⁾. We have not tested samples whose values are known for VL activation by MBL and by ficolins due to the difficulty in acquiring commercial kits. However, this does not invalidate the results, since the differences observed between the group of patients with CD and the control group validate the measurement methodology. Therefore, although preliminary, the results present for the first time an evaluation of VL activation in patients with chronic CD, indicating an alteration in both MBL-mediated and ficolin-mediated activity. These hypotheses, however, need to be

confirmed in future studies with a larger number of patients, performing the clinical staging of the symptomatic forms and quantifying the VL initiating proteins in the patients' serum.

CONCLUSION

Our results demonstrate the activation of VL in serum from patients with chronic CD, where activation of this pathway, by MBL and by ficolins, suggest different response performances between chagasic patients and controls. These results indicate a role for the VL of the complement system in the immunopathogenesis of chronic CD. In addition, the method employed was efficient to functionally assess the activation of VL in the serum of chagasic patients, as they are in agreement with data in the literature.

Acknowledgements: The authors thank CNPq, Fundação Araucária, PPSUS and CAPES for their financial support and scholarships. Lorena Bavia was a junior postdoctoral fellow by CNPq (420553 / 2017-7) and Renan Ribeiro Polachini was a scientific initiation fellow by PPSUS (agreement 045/2017 of the Araucária Foundation). We are also grateful to Professor Doctor Rafael Carvalho Barreto of the Federal Technological University of Paraná for fitting the results to the standard curve in functional assays for activating the lectin pathway by MBL and ficolins.

Conflict of Interest: All authors disclaim any conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization - WHO. Chagas Disease (American trypanosomiasis) Geneva: WHO; 2019.
2. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723): 1388-402.
3. SUS Informatics Department - DATASUS. Health, Epidemiological and Morbidity Information: database.
4. De Souza W, De Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*. 2010; 295394.
5. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm*. 2014; 683230.
6. Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, et al. Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System. *Proteases Physiol Pathol*. 2017; 10: 397-420.
7. Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol*. 2017; 8: 607.
8. Barnum SR. C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. *J Innate Immun*. 2015; 7(4): 333-9.
9. Cestari Idos S, Krarup A, Sim RB, et al. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol*. 2009; 47(3): 426-37.
10. Aiello VD, Reis MM, Benvenuti LA, et al. A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. *J Pathol*. 2002; 197(2): 224-9.
11. National Health Surveillance Agency - ANVISA. Resolution of the collegiate board - RDC n° 34, 2014.
12. Flores-Chavez MD, Sambri V, Schottstedt V, et al. Evaluation of the Elecsys® Chagas Assay for the Detection of *Trypanosoma cruzi*- Specific Antibodies in a Multicenter Study in Europe and Latin America. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(5): e01446-17.
13. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Gontijo ED, et al. 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Epidemiol*. 2016; 49(1): 3-60.

14. Lidani KCF, Sandri TL, Castillo-Neyra R, et al. Clinical and epidemiological aspects of chronic Chagas disease from Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53: 1-10.
15. Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2): e1508.
16. Bavia L, Dias Fontana P, Bovo F, et al. Inhibitory Effect of Supercritical Extracts from *Arctium lappa* L. on the Lectin Pathway of the Complement System. *Chem Biodivers.* 2019; 16(12): e1900401.
17. Luz PR, Miyazaki MI, Chiminacio Neto N, et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(1): e0004257.
18. Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, et al. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int J Cardiol.* 2010; 143(3): 448-50.
19. Boldt AB, Luz PR, Messias-Reason IJ. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clin Immunol.* 2011; 140(1): 63-70.
20. Luz PR, Boldt AB, Grisbach C, et al. Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease. *PLoS One.* 2013; 8(4): e60237.
21. Sandri TL, Andrade FA, Lidani KCF, et al. Human collectin-11 (COLEC11) and its synergic genetic interaction with MASP2 are associated with the pathophysiology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13(4): e0007324.
22. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, et al. C1q and mannose 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. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods.* 2001; 257(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. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015; 316: 49-110.
26. Bjarnadottir H, Arnardottir M, Ludviksson BR. Frequency and distribution of FCN2 and FCN3 functional variants among MBL2 genotypes. *Immunogenetics.* 2016; 68(5): 315-25.
27. Ishii M, Ohsawa I, Inoshita H, et al. Serum concentration of complement components of the lectin pathway in maintenance hemodialysis patients, and relatively higher levels of L-Ficolin and MASP-2 in Mannose-binding lectin deficiency. *TherApher Dial.* 2011; 15(5): 441-7.
28. Tizzot MR, Lidani KCF, Andrade FA, et al. Ficolin-1 and Ficolin-3 Plasma Levels Are Altered in HIV and HIV/HCV Coinfected Patients From Southern Brazil. *Front Immunol.* 2018; 9: 2292.
29. Ma YJ, Doni A, Romani L, et al. Ficolin-1-PTX3 complex formation promotes clearance of altered self-cells and modulates IL-8 production. *J Immunol.* 2013; 191(3): 1324-33.
30. Jensen ML, Honoré C, Hummelshøj T, et al. Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol.* 2007; 44(5): 856-65.
31. Honoré C, Hummelshøj T, Hansen BE, et al. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(5): 1598-607.
32. Kjaer TR, Thiel S. Assay for estimation of the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of the complement system. *Methods Mol Biol.* 2014; 1100: 131-9.

CORRESPONDING AUTHOR

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.

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

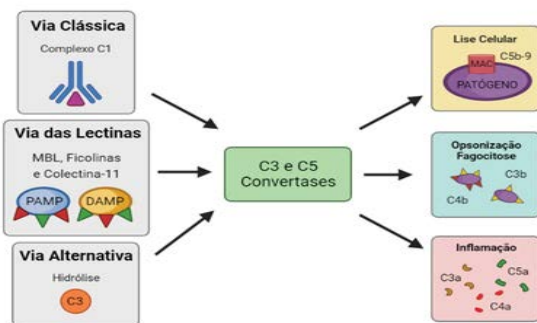


FIGURA 1 – Vias de ativação do sistema complemento

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.

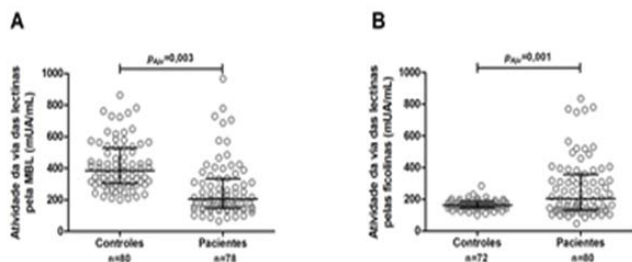


FIGURA 2 – Avaliação funcional da atividade da via das lectinas em controles e pacientes com doença de chagas crônica

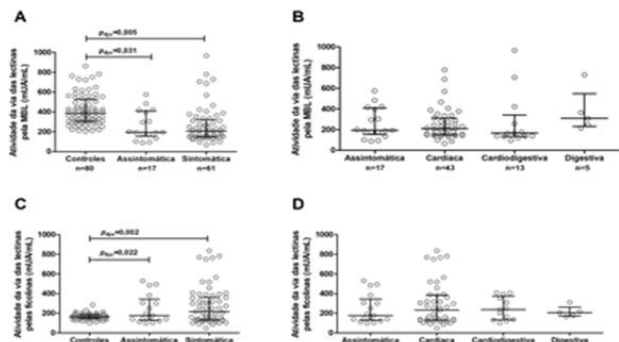


FIGURA 3 – Avaliação funcional da atividade da via das lectinas em controles e nas diferentes formas clínicas da DC crônica

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): e0007324.
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. Frequência 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.