

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO

**ASSOCIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO E NÍVEIS SÉRICOS DA LECTINA
LIGAÇÃO A MANOSE (MBL) À GRAVIDADE DA CARDIOMIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA**

RECIFE

2014

ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO

ASSOCIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO E NÍVEIS SÉRICOS DA LECTINA DE
LIGAÇÃO A MANOSE (MBL) À GRAVIDADE DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunopatogênese de doenças crônicas e infecciosas.

Orientadora: Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, Ph.D.

Co-orientadora: Dr^a Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura, Ph.D.

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A994a Azevedo, Elisa de Almeida Neves.
Associação dos níveis séricos e da capacidade de ligação da Lectina de Ligação à Manose (MBL) à gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica / Elisa de Almeida Neves Azevedo. - Recife: [s.n.], 2014.
67 p. : ilus., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Clarice Neuenschwander Lins de Moraes; co-orientadora: Patrícia Muniz Mendes de Freire Moura.

1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Cardiomiopatia chagásica - imunologia. 3. Lectina de Ligação à Manose - imunologia. I. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Moura, Patrícia Muniz Mendes de Freire. III. Título.

ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO

ASSOCIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO E NÍVEIS SÉRICOS DA LECTINA DE
LIGAÇÃO A MANOSE (MBL) À GRAVIDADE DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunopatogênese de doenças crônicas e infecciosas.

Aprovada em 30/04/2014

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Valéria Alves Rêgo Pereira
Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

Dr^a Lilian M. L. Montenegro
Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida, que contribuíram direta ou indiretamente para execução dessa dissertação.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biociências e Biotecnologia em Saúde por toda organização e infraestrutura oferecida.

À equipe do Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE e aos portadores da doença de Chagas pela contribuição na seleção dos participantes deste estudo.

As minhas orientadoras oficiais Clarice e Patrícia por todo carinho, esforço, atenção, paciência e por terem me ajudado a enfrentar todas as adversidades que surgiram nesses dois anos. A Dra. Yara pelo zelo de sempre. A Virgínia e a Roberto por toda contribuição, por cada palavra de afeto e incentivo. À Romero por ter me ajudado a iniciar a minha vida acadêmica, por todo carinho e dedicação dedicados a mim, mesmo quando os vínculos profissionais não mais existiam.

A Silvana, uma grande amiga que ganhei por causa do mestrado e que ficará pra sempre na minha vida. Muito obrigada por ter enfrentado cada obstáculo desse mestrado comigo, por ter sorrido quando o desespero batia, por ter feito o papel da minha mãe, sempre se preocupando com a minha alimentação, com o meu sono, com o meu bem estar, por ter me ensinado tanta coisa em tão pouco tempo.

Ao professor Jeans C. Jensenius, pela delicadeza de doar os materiais necessários para nossos experimentos, o que tornou possível a execução desse trabalho lindo.

A Rodrigo, pela análise estatística, pela paciência e pela amizade.

A primeira turma BBS, e aos amigos que recebi. A Lígia, Laís e Sávio que estiveram comigo do começo ao fim. A Renan, Camila, Reneta, Ross, que “chegaram” depois, mas que me apoiaram incondicionalmente. Vocês enriqueceram a minha formação e agradeço pela diversidade de opiniões e conselhos, que às vezes me desorientava, mas que na maioria das vezes foram cruciais para me orientar e me fortalecer. Vocês sabem o quanto foi difícil.

Aos amigos de sempre Thalita, Camila, Rafinha, Alvinho, Rodrigo e Denninho que mesmo sem entender nada do que eu faço, sempre me apoiaram e se preocuparam com cada etapa desse projeto. Vocês são lindos!

Aos biomédicos da minha vida; Rafa, Kat, Igor, Rays, Marcela, Peixe e Diego que mesmo longe sempre se faziam presentes. Obrigada pelo companheirismo.

A Paulo e a sua família que torceram por mim, desde a época da graduação, até a seleção e realização do mestrado. Obrigada por toda confiança e estímulo, por cada palavra de apoio, por cada momento de alegria e pelo amor.

À minha enorme família, a todos os tios, tias, primos e primas. Agradeço especialmente, aos meus primos irmãos; Artur, Amanda e Carol por estarem sempre ao meu lado.

À minha avó Almira, que me ensinou alçar voos cada vez mais altos e longe. A senhora foi e sempre será a minha maior escola.

À minha mãe, por toda dedicação, apoio e orações. Sem você nada disso existiria. Muito obrigada por tudo! Por acreditar em mim, por ver solução em tudo, pelo amor incondicional. Você é o melhor da minha vida, meu amor e minha fortaleza.

AZEVEDO, Elisa de Almeida Neves. Associação da capacidade de ligação e níveis séricos da Lectina Ligadora de Manose (MBL) à gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é considerada endêmica na América Latina, afetando cerca de 15 milhões de indivíduos. Estima-se que cerca de 30% das pessoas infectadas desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica, entre 5 à 30 anos após a infecção aguda. Com o objetivo de diferenciar portadores de DC com a evolução potencial para formas clínicas crônicas graves, pesquisadores tentam estabelecer marcadores biológicos de prognóstico da evolução da doença por meio de marcadores imunológicos. Lectina de Ligação a Manose (MBL) é uma molécula de reconhecimento de que a imunidade inata que desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro, mediando a fagocitose e a destruição dos agentes patogênicos mediada pelo complemento. Existem vários estudos que enfatizam a relevância da MBL em diferentes doenças infecciosas, inflamatórias e auto-imunes. A deficiência de MBL pode implicar na susceptibilidade bacteriana, fúngica, por protozoários e infecções virais. Nosso objetivo foi investigar a associação dos níveis séricos e atividade de ligação da MBL com cardiomiopatia chagásica crônica, através da formação de um índice, que inferiu as moléculas ligantes. Para isso, foi feita uma avaliação, através de ELISA, dos níveis séricos e da capacidade de ligação da MBL, para formação desse índice de relação (Mbi), em pacientes crônicos assintomáticos e cardíacos da doença de Chagas. O estudo incluiu 77 pacientes portadores DC indeterminados (n = 19), cardíaco grave (n = 29) e cardíaco leve (n = 29). Não foi observada diferença significativa nos níveis séricos de MBL entre os grupos de pacientes estudados. No entanto, em relação a atividade de ligação da MBL, houve diferença estatística entre indeterminados e cardíacos leves (p=0,02) e indeterminados e cardíacos graves (p=0,03). Com a formação do Mbi a comparação entre todos os grupos tiveram diferença estatística significativa: indeterminados *versus* cardíacos leves p=0,02; cardíacos leves *versus* cardíacos graves p=0,01 e indeterminados *versus* cardíacos grave p<0,0001. Com base nesses resultados concluímos que, a MBL é um possível marcador para a gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica, visto que, o índice (Mbi) criado nesse estudo foi correlacionado com as diferentes formas estudadas. Novos estudos são necessários para confirmar da MBL como indicador da evolução/progressão para as formas mais graves da doença, para assim contribuir com a melhora na qualidade de vida dos pacientes com doença de Chagas crônica.

Palavras-chave: Doença de Chagas - imunologia. Cardiomiopatia chagásica - imunologia, Lectina de Ligação a Manose (MBL) - imunologia.

AZEVEDO, Elisa de Almeida Neves. Association of binding capacity and serum levels of mannose-binding lectin (MBL) with the severity of chronic Chagas cardiomyopathy. 2014. Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

The Chagas disease (CD) is an infection caused by *Trypanosoma cruzi*. This disease is considered endemic in Latin America, affecting approximately 15 million individuals. It is estimated 30% of those infected develop chronic Chagas cardiomyopathy, between 5 to 30 years after the acute infection. Aiming to differentiate CD's bearers with potential evolution to chronic severe clinical forms, researchers try to establish biological markers in order to prognostic disease evolution through immunological molecules. The Mannose Binding Lectin (MBL) is a innate immunity recognition molecule that plays a crucial role in host defense, mediating the phagocytosis and complement-mediated destruction of pathogens. Several studies have emphasized the importance of MBL in various infectious, inflammatory and autoimmune diseases and some of these have shown that MBL deficiency might be involved in susceptibility to bacterial, fungal, protozoal and viral infections. The aim of this study was to investigate the association of MBL serum levels and binding activity with chronic Chagas cardiomyopathy, by forming an index that inferred the linker molecules. Therefore, an assessment by ELISA of the MBL serum levels and binding capacity was made for formation of the Mannose binding index (Mbi) in chronic patients with asymptomatic and cardiac forms of CD. This study included 77 patients with CD indeterminate (n=19), severe cardiac (n=29) and mild cardiac forms (n=29). There was no significant difference in serum MBL levels between groups of patients. However, evaluating the Mannose binding activity, there was a statistical difference between indeterminate and mild cardiac groups (p=0.02) and severe cardiac and indeterminate groups (p=0.03). With the formation of Mbi, the comparison between all groups had statistically significant difference; indeterminate versus mild cardiac (p=0.02); mild cardiac versus severe cardiac (p=0.01) and indeterminate versus severe cardiac (p<0.0001). Based on these results, we found a correlation with the different forms studied. So we suggest that MBL is able to be an immunological marker for the severity of chronic Chagas cardiomyopathy. New studies are necessary to confirm the MBL use as an indicator of the development/progression to more severe forms of the disease, contributing to improve the life quality of patients with chronic Chagas disease.

Keywords: Chagas disease – immunology. Chagas cardiomyopathy – immunology. Mannose-Binding Lectin – immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	17
Figura 2 - Principais vetores da doença de Chagas.....	18
Figura 3 - Estimativa do número de imigrantes infectados pelo <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos.....	19
Figura 4 - Manifestações Clínicas da doença de Chagas.....	24
Figura 5 - Estrutura da Lectina de Ligação a Manose.....	34
Figura 6 - Funções da Lectina de Ligação a Manose.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Concentração sérica de Lectina de Ligação a Manose em pacientes com a forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE 47
- Gráfico 2 -** Concentrações: baixa, intermediária e alta de Lectina de Ligação a Manose sérica em pacientes com as formas cardíacas e indeterminada da doença de Chagas do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE 48
- Gráfico 3 -** Capacidade de Ligação da Lectina de Ligação a Manose em pacientes das formas cardíacas e indeterminada da doença de Chagas crônica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco PROCAPE/UPE 50
- Gráfico 4 -** Índice da relação entre os níveis séricos e capacidade de ligação da Lectina de Ligação a Manose em pacientes das formas cardíacas e indeterminada da doença de Chagas crônica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/ Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas de portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/ Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE	46
Tabela 2 -	Percentual de pacientes dividido pela estratificação dos níveis séricos de Lectina de Ligação a Manose (ng/mL)	49
Tabela 3 -	Frequências das concentrações estratificadas em baixa, intermediária e alta de Lectina de Ligação a Manose sérica em pacientes com a forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	Unidade arbitraria
BSA	Albumina do soro bovino
CARD	Forma cardíaca
CDR	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
CRIT	<i>Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning</i>
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas aguda
DIG	Forma digestiva
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
HAI	Hemaglutinação indireta
HEMOPE	Hemocentro do Estado de Pernambuco
HRP	Peroxidase
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IND	Forma indeterminada
INF	Interferon
MAC	Complexo de ataque a membrana
MASP	Serino proteases associadas a MBL
MBL	Lectina de Ligação a Manose
MIS	Forma mista
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Arranjos Moleculares Associados aos Patógenos
PROCAPE	Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
SC	Sistema Complemento
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo
TA	Temperatura ambiente

TBS	Tampão Salina Tris
Th	Células T helper
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Histórico da doença de Chagas	16
2.2 Agente Etiológico	17
2.3 Vetores	17
2.4 Epidemiologia	18
2.5 Mecanismos de Transmissão	21
2.5.1 <i>Vetorial</i>	21
2.5.2 <i>Outras formas de transmissão</i>	21
2.5.2.1 <i>Transfusão de Sangue</i>	22
2.5.2.2 <i>Transplante órgãos</i>	22
2.5.2.3 <i>Vertical</i>	22
2.6 Manifestações Clínicas	23
2.7 Diagnóstico Laboratorial	25
2.7.1 <i>Fase Aguda</i>	25
2.7.2 <i>Fase Crônica</i>	25
2.8 Tratamento	26
2.9 Aspectos Imunológicos	27
2.9.1 <i>Sistema imune inato</i>	28
2.9.2 <i>Sistema complemento, MBL e doença de Chagas</i>	29
2.9.3 <i>MBL e outras doenças</i>	31
2.9.4 <i>Lectina de Ligação a Manose (MBL)</i>	32
2.9.4.1 <i>Estrutura</i>	33
2.9.4.2 <i>Funções</i>	35
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo Geral	38
4.2 Objetivos Específicos	38
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	39
5.1 Local do Estudo	39
5.2 Desenho e População de estudo	39

5.3 Critérios de Inclusão e Exclusão	40
5.4 Considerações Éticas	40
5.5 Obtenção das Amostras	40
5.6 Processamento das Amostras	41
5.6.1 <i>Dosagem de MBL</i>	41
5.6.2 <i>Padronização do ELISA de Atividade de Ligação da MBL</i>	41
5.6.3 <i>Avaliação do Coeficiente de ligação da MBL</i>	42
5.6.4 <i>Mannose binding index- Mbi</i>	44
5.7 Análise Estatística	44
6 RESULTADOS	45
6.1 Características epidemiológicas	45
6.2 Concentração sérica da MBL	46
6.3 Capacidade de Ligação da MBL	49
6.4 Mannose binding index- Mbi	50
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente Chagásico.	64
APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa.....	65
ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz.	66
ANEXO B – Parecer de Renovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz	67

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune inato consiste na primeira barreira contra patógenos, abrangendo diversos mecanismos de reconhecimento e eliminação de microorganismos. Dentre os mais importantes elementos deste sistema estão o sistema de complemento (SC), as células fagocíticas e as células *natural killer* (NK). A ativação do sistema complemento pelos patógenos é um dos mais eficazes mecanismos da defesa inata do hospedeiro. É composto por diversas proteínas plasmáticas que são ativadas em cascata que culmina com ataque à membrana, com a formação do complexo sobre a superfície do patógeno, causando morte celular por lise. O SC pode ser ativado por três vias: clássica, quando imunoglobulinas G ou M se ligam a superfície do patógeno, que recrutam o componente 1 do SC (C1), que cliva C2 e C4 para formar C3 convertase (C4b2a); a via da lectina, iniciada principalmente, pela lectina de ligação a manose (MBL) que através das serino-proteases (MASP) cliva C4 e C2 formando C3 convertase similar a da via clássica; e a via alternativa, que é ativada quando o C3b, hidrolisado espontaneamente, se associa com o fator B para formar C3 convertase (C3bBb) (LAMBRIS *et al.*, 2008).

Durante a inoculação do *T. cruzi*, estima-se que aproximadamente 10^5 tripomastigotas metacíclicos são liberadas pelo inseto vetor (KOLLIEN; SCHAUB, 1998), que rapidamente penetram na pele do hospedeiro. (SCHUSTER; SCHAUB, 2000). Na ausência de anticorpos específicos, as vias do complemento, alternativa e da lectina, são as responsáveis por ativar o sistema complemento contra esse patógeno na corrente sanguínea. LEON-PEREZ, *et al.* (2007) mostraram que tripomastigotas metacíclicos, derivados de triatomíneos ou de culturas axênicas, foram mortos pelo complemento do soro humano não imune.

A MBL é uma molécula que faz parte da família das colectinas, proteínas caracterizadas pela presença de uma região similar ao colágeno e um domínio de lectina. A MBL se liga a resíduos de oligossacarídeos (Manose e N-acetilglicosamina) presentes na superfície de agentes infecciosos e parasitários. Assim, a reação em cascata iniciada pela MBL produz na fase inicial de ativação da via, várias moléculas de C3b e na fase tardia de ativação, produz a formação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC), que atua causando a lise do agente invasor, mesmo na ausência de anticorpo (KALIL *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que concentrações baixas de MBL têm como consequência redução ou ausência da ativação do complemento pela via das lectinas, e estão associadas a uma maior susceptibilidade a infecções por vírus, bactérias, fungos e protozoários. Porém, em alguns casos, a deficiência de MBL parece ser vantajosa, especialmente em infecções

causadas por patógenos intracelulares, os quais usam a opsonização por componentes do complemento e seus respectivos receptores nos fagócitos para infectar o hospedeiro (LUZ *et al.*, 2009 ; TURNER, 2003).

Pesquisas têm buscado a compreensão dos mecanismos imunológicos relacionados à DC, e algumas tem como foco a imunidade inata (BOLDT *et al.*, 2011; CESTARI, 2009, LUZ *et al.*, 2009). Com o objetivo de diferenciar os pacientes portadores da DC com potencial de evolução para as formas clínicas crônicas graves, alguns grupos de pesquisa tentam estabelecer marcadores biológicos de evolução do prognóstico da doença através de marcadores imunológicos (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; CUNHA-NETO *et al.*, 1998; LORENA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010; VERÇOSA *et al.*, 2007;). Embora muitos conhecimentos tenham sido adquiridos em relação à resposta imune de pacientes portadores da DC, importantes aspectos sobre a contribuição da via das lectinas ainda precisam ser esclarecidos. Este sistema pode estar envolvido na predisposição a uma determinada forma clínica nos indivíduos com DC crônica (DUTRA *et al.*, 2005).

A progressão de uma infecção, assim como o desenvolvimento de diferentes formas clínicas e diferentes graus de gravidade, está relacionada à complexa relação existente entre o parasito e o hospedeiro, que envolve também fatores ambientais, além de características genéticas do patógeno e do hospedeiro (FILHO *et al.*, 2010). No caso da infecção pelo *T. cruzi*, o espectro clínico da DC varia muito desde pacientes assintomáticos até cardiomiopatas com falha cardíaca grave. Estas seriam fortes evidências da influência da variabilidade dos níveis e funções de algumas moléculas do sistema imunológico relacionado desde fatores genéticos do hospedeiro na suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*.

Desta forma, por meio estudo inédito pretende-se verificar se existe associação dos níveis séricos e da capacidade de ligação da MBL com a cardiomiopatia chagásica crônica, através da formação de um índice, que irá inferir as moléculas ativas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico da doença de Chagas

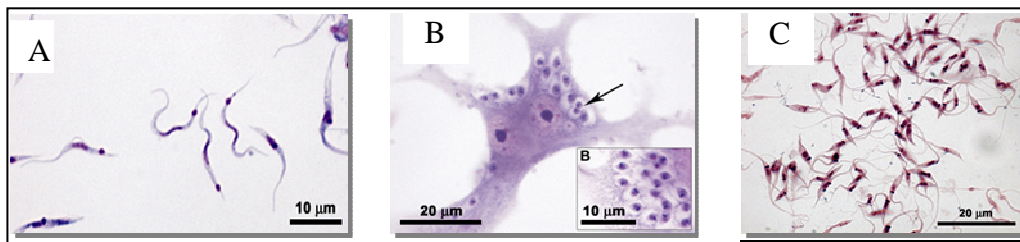
A hipótese clássica propõe que a DC foi originada na região Andina, quando o homem começou a domesticar animais e desenvolver técnicas de agricultura, ou seja, a adotar hábitos sedentários, ainda no período pré-histórico. Acredita-se que essas mudanças ocorreram há aproximadamente 6.000 anos. Dados da paleoparasitologia, com base em ferramentas moleculares, mostraram que a infecção pelo *T. cruzi* era comumente encontrada em populações pré-históricas do norte e do sul da América. Alguns estudos histopatológicos mostraram ninhos de amastigotas de *T. cruzi* em fibras cardíacas de restos humanos mumificados. Ainda de acordo com os dados paleoparasitológicos, a DC pode ser tão antiga quanto à presença humana no continente americano (FERREIRA *et al.*, 2011; FORNACIARI *et al.*, 1992).

Mesmo com vários indícios de que a DC seja uma enfermidade muito antiga, sua descoberta oficial é datada em abril de 1909. Foi descoberta pelo médico sanitário, Carlos Chagas, recém-formado em Medicina, com uma tese sobre o controle da malária, e fazia parte da equipe de Oswaldo Cruz e chefiava os trabalhos de combate à malária em Lassence, Minas Gerais, onde estava sendo construída a Estrada de Ferro Central do Brasil. Carlos Chagas começou, então, a examinar animais e pessoas, buscando informações sobre as principais doenças da região e encontrou barbeiros infectados com uma espécie de protozoário, ainda desconhecida. Ele, os enviou para Oswaldo Cruz, que em seu laboratório, no Rio de Janeiro, conseguiu infectar *Callithrix sp.*, comprovando a suspeita de Chagas de que este protozoário deveria ser uma espécie nova que circularia entre barbeiro, mamíferos e talvez humanos. A partir da confirmação de Oswaldo Cruz, Carlos Chagas procurou sem parar aquele protozoário no sangue de animais e pessoas que residiam em casas que tinham barbeiros. Foi através dessa procura incansável, que no dia 14 de abril de 1909, ao examinar Berenice, uma criança de apenas dois anos de idade, Carlos Chagas descobriu em seu sangue aquele mesmo protozoário encontrado nos barbeiros e nas diversas espécies de animais examinados. Sua sintomatologia coincidia com aquela observada nos animais experimentalmente infectados em laboratório (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013).

2.2 Agente Etiológico

As primeiras descrições morfológicas do *T. cruzi*, por Carlos Chagas, foram feitas por observações do parasito fixado e corado pelo corante de Giemsa, método até hoje empregado. As observações feitas por microscopia óptica permitem identificar no parasito: a forma geral da célula, o núcleo, o cinetoplasto (contendo DNA mitocondrial condensado) e o flagelo. (CARVALHO, 2011). No sangue dos mamíferos, o *T. cruzi* apresenta-se na forma de tripomastigota (flagelada) (Figura 1 A) que é extremamente móvel e, nos tecidos, como amastigota (sem flagelo) (Figura 1 B). Na parte anterior do intestino dos triatomíneos, insetos vetores, ocorre à transformação das formas tripomastigostas em formas epimastigostas (formas não infectantes) (Figura 1 C). Na porção posterior do intestino do inseto, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, dando origem as formas infectantes, presentes nas fezes do inseto (MELO *et al.*, 2009; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE 2009).

Figura 1 - Formas do *T. cruzi*



Fonte: Instituto Evandro Chagas, 2013.

Legenda: A: Forma tripomastigota metacíclico. B: Forma amastigota. C: Forma epimastigota.

2.3 Vetores

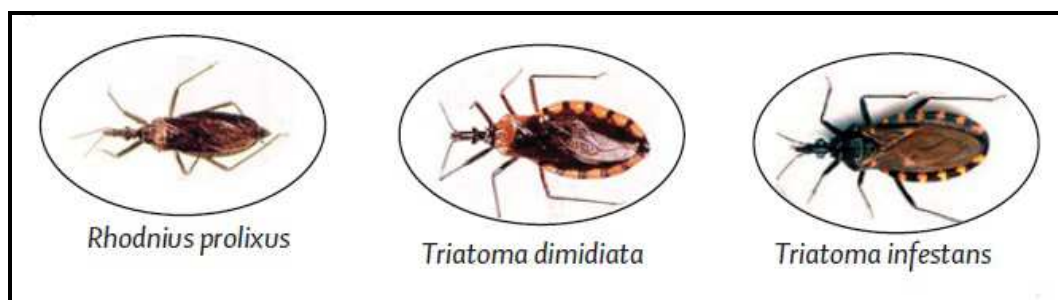
A DC é transmitida aos seres humanos e para mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, principalmente, por grandes insetos sugadores de sangue, do filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Apesar de cerca de 140 espécies de triatomíneos já terem sido identificados, apenas alguns, são vetores competentes para *T. cruzi*. (GORLA *et al.*, 2010). *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Figura 2) são as três espécies mais importantes na transmissão do *T. cruzi* para o homem. Historicamente, *T. infestans* tem sido o vetor mais comum, principalmente na região sub-Amazônica. *R. prolixus* é tipicamente reportado no norte da América do Sul e na América Central e *T. dimidiata* ocupa uma área

similar, mas se estende para o norte do México. Desde as fases mais precoces de ninfa, até adultos, os triatomíneos podem abrigar e transmitir o *T. cruzi* (RASSI JUNIOR *et al.*, 2010).

No inseto vetor, o *T. cruzi*, apresenta-se como epimastigostas replicativos não-infecciosos, que se diferenciam para tripomastigotas metacíclicos não-replicativos infecciosos. Durante a infecção, os tripomastigotas metacíclicos podem “escapar” do sistema imune inato do hospedeiro, infectando as células, e fazendo com que a infecção progrida. Os parasitos após infectar as células hospedeiras se diferenciam em amastigotas, uma fase replicativa intracelular, que depois de várias divisões se diferenciam, novamente, em tripomastigotas na corrente sanguínea, esses rompem as células, infectando novas células. Se insetos vetores se alimentarem do sangue de indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*, o ciclo se reinicia (BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

As aves, os répteis e anfíbios são refratários ao *T. cruzi*, no entanto, em algumas situações, as aves (principalmente, frango) são importantes fontes de refeições de sangue para triatomíneos, que são estritamente hematófagos (RASSI JUNIOR *et al.*, 2012).

Figura 2- Principais vetores da doença de Chagas



Fonte: Rassi Junior *et al.* (2010).

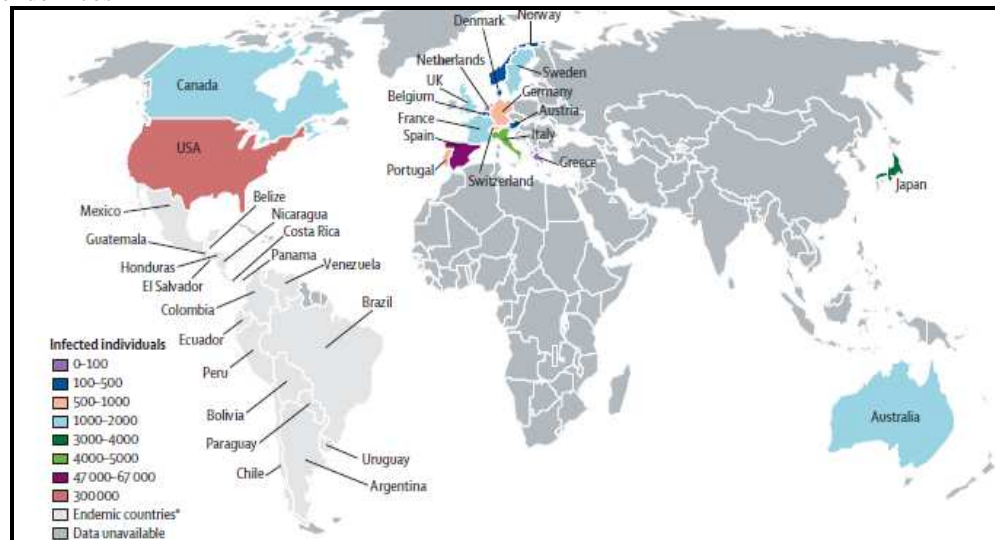
2.4 Epidemiologia

A DC é considerada endêmica no México, América Central e do Sul, onde a transmissão vetorial do *T. cruzi* ocorre geralmente na área rural. Durante muito tempo, foi considerada uma endemia exclusiva das Américas e por esse motivo, foi inicialmente denominada “tripanossomíase americana” (LEVINSON; JAWETZ, 2006). Atualmente sabe-se que a DC é um problema mundial (Figura 3). Países considerados não endêmicos, como, Espanha, Estados Unidos, Canadá e Austrália, têm notificado diversos casos da doença, devido ao fato de serem os principais destinos dos migrantes latinos. Problemas econômicos e políticos estimulam a migração, propagando a DC para os países desenvolvidos. Nas áreas

não endêmicas, os principais mecanismos de transmissão ocorrem por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e através da via congênita (PIRON *et al.*, 2008; SCHMUNIS, 2007;).

De acordo com estimativas pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e Organização Mundial da Saúde (OMS) entre 7-10.000.000 pessoas do mundo estão cronicamente infectados com o *T. cruzi*, e 10.000 a 14.000 mortes por ano são causadas por DC (RASSI JUNIOR *et al.*, 2012). No Brasil, estima-se que a infecção pelo *T. cruzi* atinja cerca de 3 milhões de pessoas, uma redução considerável se comparado com a década de 50, quando se iniciou, sem muito sucesso, o Programa Nacional de Controle Vetorial da Doença de Chagas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002). Apenas em meados dos anos 80, o programa foi consolidado e teve um impacto altamente positivo, com redução drástica dos índices triatomínico-tripanosômicos ao longo da área endêmica (DIAS *et al.*, 2008).

Figura 3 - Estimativa do número de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em países não endêmicos



Fonte: Rassi Junior *et al.*, (2010).

Após as medidas de controle adotadas, a epidemiologia da doença modificou consideravelmente no que diz respeito a sua incidência e formas de transmissão (LEDERBOUR; DIAS; VINHAES, 2004). O número de crianças e jovens infectados reduziu, se chegou a um rigoroso controle transfusional, e, conseqüentemente, a prevalência da infecção baixou consideravelmente. Em 2006, apenas depois de mais de 20 anos desde a implementação das ações de controle de maneira sistemática e regular, a OPAS certificou o Brasil, como a primeira nação da América Latina livre da transmissão da DC pela espécie *Triatoma infestans*, restando apenas o estado da Bahia com potencial de transmissão (ORAGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

No Brasil, entre 1999 e 2007, foram notificados, aproximadamente, 54 mil óbitos por DC, o que representou uma média de seis mil mortes anuais no país. A maioria dos óbitos ocorreu predominantemente em indivíduos do sexo masculino, idosos e residentes nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (MARTINS-MELO *et al.*, 2012). Apesar de ser observada uma tendência de diminuição de óbitos por DC na população brasileira em geral, o Nordeste brasileiro não segue esse padrão epidemiológico. Um aumento do número de óbitos por DC e no número de casos agudos da doença foram identificados na região Nordeste, através de um estudo realizado em Pernambuco. A inclusão da forma aguda no sistema de notificação compulsória do país em 2003 pode justificar essa elevação na quantidade de relatos da doença nessa forma. (BRAZ *et al.*, 2011)

A ocorrência de DC aguda (DCA) tem sido observada em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo), com maior frequência de casos e surtos registrados na região da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins), onde a transmissão oral tem sido registrada com maior frequência. Nos anos de 2000, 2001 e 2004, ocorreram 57 casos de DCA, por transmissão oral; no período de 2005 a 2007, esses números somaram 301 casos. Em 2008, foram diagnosticados 94 casos de DCA no estado do Pará, dos quais 57 (65%) estavam envolvidos em transmissão oral; 20, no estado do Amapá, todos por provável transmissão oral; e sete no estado do Tocantins, quatro por transmissão oral (80%) e três por transmissão vetorial. Outros resultados importantes foram as reduções de incidência de novos casos de DC (700.000 por ano em 1990 *vs* 41.200 por ano em 2006) e o número de mortes por DC (cerca de 50.000 por ano *vs* 12.500 por ano) (BRASIL, 2005 ; RASSI JUNIOR *et al.*, 2010).

Pernambuco apresenta perfil epidemiológico da DC diferenciado, quando comparado com o Brasil e com a região Nordeste, apresentando tendência estacionária em relação ao número de óbitos pela doença (BRAZ *et al.*, 2011). Através de um inquérito realizado recentemente pelo Hemocentro do Estado de Pernambuco (HEMOPE) foi identificado que 1264 indivíduos, no período de 2002 a 2007, apresentaram sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*, o que representou 6,89% do descarte de bolsas e uma prevalência de 0,17% no período (MELO *et al.*, 2009).

2.5 Mecanismos de Transmissão

2.5.1 Vetorial

A DC passou a se constituir como um problema de saúde pública, após a domiciliação e colonização dos vetores, provocada pela desagregação ambiental e invasão humana do ambiente silvestre. As formas habituais de transmissão da DC são aquelas ligadas diretamente ao vetor. No entanto, humanos também podem se infectar por transfusão de sangue e/ou órgãos, pela via congênita, e mais recentemente, pela via oral, pela ingestão de alimentos contaminados. Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados e aleitamento materno (SCHMUNIS, 2007).

A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem susceptível com as excretas contaminadas do vetor. Esses, ao fazerem repasto sanguíneo, em geral defecam após o ato, eliminando as formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos que penetram na circulação do hospedeiro através do orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar. A ocorrência da transmissão parece estar associada à densidade vetorial e à resistência do hospedeiro, o que poderia explicar o achado de que aproximadamente 30% dos indivíduos residentes em áreas de alta infestação do vetor permanecem negativos sorologicamente para o *T.cruzi* (BRASIL, 2005).

2.5.2 Outras formas de transmissão

O parasito pode também ser transmitido através do sangue, órgãos sólidos e/ou placenta. A maioria dos indivíduos infectados pelo *T.cruzi* apresenta antígenos parasitários nos tecidos e/ou sangue, durante toda a vida, o que significa que devem ser excluídos das doações de sangue e órgãos, para evitar essas formas de transmissão da doença (BRASIL, 2005).

Os recém-nascidos infectados, geralmente, são assintomáticos ou apresentam sintomas leves. As manifestações, em recém-nascidos sintomáticos com a DC congênita incluem baixo peso ao nascer, prematuridade, baixos índices de Apgar, hepatoesplnomegalia e anemia. Recém-nascidos gravemente afetados podem apresentar miocardite, meningoencefalite, megasíndromes gastrointestinais, pneumonia e / ou desconforto respiratório (RASSI JUNIOR *et al.*, 2010).

2.5.2.1 Transfusão de Sangue

Os movimentos migratórios, rural-urbano, que ocorreram na América Latina a partir da década de 1960 mudaram a epidemiologia tradicional de transmissão do *T. cruzi*. O que tinha sido principalmente uma infecção rural tornou-se urbana, que poderia ser transmitida por transfusão de sangue. Nas duas últimas décadas, o número de doadores com sorologia positiva tem sido muito elevado nos países endêmicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002).

O risco de aquisição da DC, após transfusão de uma unidade de sangue a partir de um doador infectado é inferior a 20%, e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasitos no sangue do doador, o componente do sangue, e, talvez, a estirpe do parasita. O risco de transmissão parece ser maior de transfusão de plaquetas do que para os outros componentes do sangue (RASSI JUNIOR *et al.*, 2010).

2.5.2.2 Transplante órgãos

Um transplante de órgão de um doador infectado para um destinatário não infectado é também um meio de transmissão da DCA, sendo o risco aumentado pela imunossupressão exigida pelo procedimento. No entanto, esta forma é epidemiologicamente irrelevante em áreas endêmicas uma vez que a situação é geralmente reconhecida previamente e a doença pode ser evitada através de tratamento específico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002).

2.5.2.3 Vertical

A transmissão vertical (ou transmissão congênita) ocorre de mãe para filho, tem a via transplacentária como a via de transmissão mais importante e pode ocorrer em qualquer fase da doença materna: aguda, indeterminada ou crônica. Sabe-se que não necessariamente a mãe transmitirá a doença em todas as gestações. Esse tipo de transmissão pode ser relacionado com características da mãe, fatores de nutrição, imunidade e com o grau de parasitemia (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013).

O risco de transmissão congênita parece variar de acordo com diferentes fatores epidemiológicos, tais como a estirpe do parasito, a parasitemia da mãe, a existência de lesões na placenta, e região geográfica. Este risco foi estimado por volta de 1% ou menos no Brasil a

7% ou mais em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai. A transmissão congênita depende diretamente da prevalência da infecção em mulheres em idade fértil que foram, geralmente, infectadas por transmissão vetorial. Em áreas endêmicas sujeitas ao controle vetorial, uma diminuição progressiva na doença congênita pode ser esperado a médio ou longo prazo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002).

2.6 Manifestações Clínicas

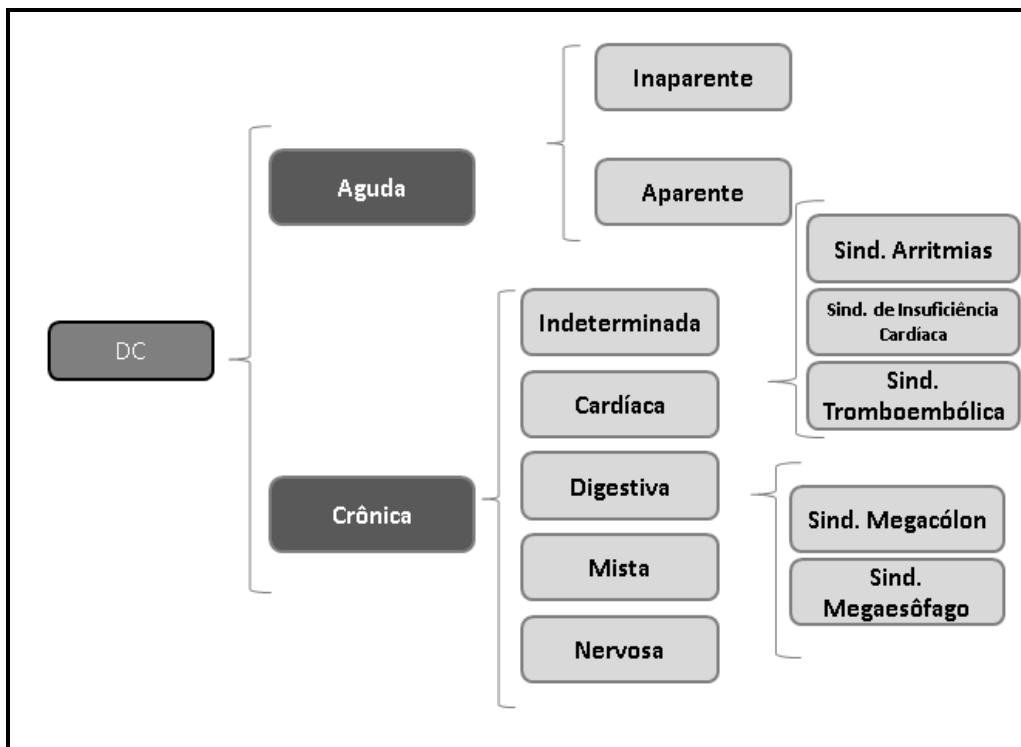
A doença de Chagas passa por duas etapas sucessivas - uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda dura, em média, de um a três meses após a infecção e é caracterizada por uma intensa parasitemia e baixos níveis de anticorpos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002). Esta fase pode ser aparente (sintomática) ou inaparente (assintomática) (Figura 4). Quando aparente, em geral, os indivíduos acometidos apresentam febre, mal-estar e cefaléia. O sinal de Romana e o chagoma de inoculação são manifestações locais que podem ocorrer conforme a entrada do parasito no organismo do hospedeiro. Algumas manifestações sistêmicas como hepatomegalia, esplenomegalia, edema, alterações nervosas e comprometimento cardíaco também podem estar presentes na fase aguda da doença (LANA; TAFURI, 2005).

O local de entrada do parasito é caracterizado pela presença de tripomastigotas infecciosos em leucócitos e nas células dos tecidos subcutâneos, bem como pelo desenvolvimento de edema intersticial, infiltração de linfócitos, e hiperplasia reativa de linfonodos adjacentes. Depois da difusão através do sistema linfático e da corrente sanguínea, os parasitos se concentram principalmente nos músculos (incluindo o miocárdio) e nas células ganglionares. A característica dos pseudocistos que estão presentes em alguns tecidos são agregados intracelulares da multiplicação de formas amastigotas (RASSI JUNIOR *et al.*, 2012).

Após a fase aguda da doença, o indivíduo pode permanecer num período de latência clínica pelo resto da vida, não apresentando sinais e sintomas, apenas com a sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*, caracterizando a forma clínica crônica indeterminada. Os pacientes que apresentam essa forma, geralmente evoluem para a forma cardíaca, originando uma estimativa entre 20 e 30% de pacientes portadores da doença de Chagas com algum tipo de alteração cardíaca. Diversos são os sintomas encontrados na cardiopatia chagásica crônica, relacionados com quadros de insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo, além da morte súbita (PRATA, 2001).

As manifestações digestivas atingem aproximadamente 20% dos pacientes com a doença de Chagas (CASTRO *et al.*, 1994). Ocorrem principalmente alterações no esôfago e no cólon, evoluindo para a formação do megaesôfago e do megacólon, respectivamente. Manifestações digestivas não são tão comuns, mas pode ser mais frequente em certas áreas geográficas (MACHADO *et al.*, 2012). Também pode haver o acometimento mútuo de algum órgão do aparelho digestivo e do coração, o que caracteriza a forma clínica mista (LANA; TAFURI, 2005). Pacientes imunodeprimidos, (HIV positivos e transplantados) podem apresentar alterações no sistema nervoso, caracterizando a forma clínica nervosa (PRATA, 2001).

Figura 4 - Manifestações Clínicas da doença de Chagas



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: DC = Doença de Chagas.

Sind.=Síndrome.

2.7 Diagnóstico Laboratorial

Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005) o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas se baseia nos seguintes critérios:

2.7.1 Fase Aguda

I. Critério Parasitológico: Presença de parasitos circulantes demonstráveis em exame direto do sangue periférico (esfregaço, gota espessa, exame de sangue a fresco ou método de Strout). Ainda podem ser utilizados exames indiretos, que permitem a reprodução artificial do parasito (hemocultura e xenodiagnóstico), raramente utilizado atualmente (RASSI JUNIOR *et al.*, 2012).

II. Critério Sorológico: A presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico é considerada indicativa da fase aguda, particularmente quando associada a alterações clínicas e epidemiológicas sugestivas, porém é pouco empregada devido à falta de kits comerciais aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela carência de controles positivos para IgM.

2.7.2 Fase Crônica

I. Critério Parasitológico: Devido à parasitemia subpatente na fase crônica, os métodos parasitológicos convencionais são de baixa sensibilidade, o que implica em pouco valor diagnóstico, tornando desnecessária a sua realização nesta fase da doença.

II. Critério Sorológico: Um indivíduo é considerado portador da doença de Chagas crônica quando apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, devido à grande resposta humoral desenvolvida pelo hospedeiro nesta fase da doença (RASSI Jr *et al.*, 2012). Estes anticorpos específicos devem ser detectados por meio de dois testes sorológicos de princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas. Os métodos sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da doença de Chagas são Hemaglutinação Indireta (HAI), Imunofluorescência Indireta (IFI) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

2.8 Tratamento

Os mesmos fármacos utilizados desde o início da década de 70 no tratamento etiológico da DC são usados atualmente, os antiparasitários tradicionalmente utilizados, Nifurtimox e Benzonidazol, são parcialmente eficazes, tendo sua maior eficácia terapêutica apenas na fase aguda da infecção (MARIN-NETO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2004).

A falta de interesse na importância do papel na persistência do parasita para o desenvolvimento das manifestações clínicas é apenas uma das barreiras atuais para uma conduta eficaz no tratamento da DC. A partir de uma perspectiva que integre os cuidados adequados com os pacientes crônicos e o desenvolvimento de novos medicamentos, pode haver uma mudança de paradigma (VIOTTI *et al.*, 2014).

Alguns estudos, tanto em modelos animais quanto em seres humanos, têm mostrado a eficácia do tratamento antiparasitário nas duas fases da DC (aguda e crônica) (HYLAND *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2005). Além disso, outro estudo experimental apresentou certa relevância do tratamento frente a alguns parâmetros da resposta imune (BUSTAMANTE *et al.*, 2008).

Dois estudos randomizados estão em processo de comparar benzonidazol ao placebo em pacientes crônicos. Os primeiros, incluindo pacientes com ou sem doença cardíaca leve, realizado na Argentina (TRAENA) e encerrou em 2012, está atualmente a ser analisado (RIARTE, *et al.* 2005) . O outro é um estudo multicêntrico, BENEFIT, (*Benzonidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) que deve ser finalizado, agora, em 2014 (MARIN-NETO *et al.*, 2008) e irá fornecer evidências sobre a evolução da doença cardíaca grave ou leve em pacientes crônicos tratados com medicamentos antiparasitários. (VIOTTI *et al.*, 2014).

Os sintomas da doença de Chagas são tratados de forma genérica, na forma cardíaca as drogas administradas são as mesmas que se usam em outras cardiopatias: cardiotônicos, diuréticos, antiarrítmicos, vasodilatadores, entre outras. Em alguns casos, indica-se a implantação de marca-passo, com resultados bastante satisfatórios na prevenção da morte súbita (OLIVEIRA JUNIOR, 2009). Na forma digestiva, indicam-se medidas menos invasivas (dietas, laxativos e/ou lavagens) em estágios precoces, enquanto que em estágios mais avançados, impõe-se a dilatação ou correção cirúrgica do órgão afetado (CASTRO *et al.*, 1994).

2.9 Aspectos Imunológicos

Entre os diversos aspectos relacionados à DC e a sua evolução clínica em indivíduos cronicamente infectados, certamente, a resposta imunológica tem grande destaque. Acredita-se que a evolução clínica da DC depende de uma interação entre o hospedeiro e o parasito. Duas hipóteses são as principais tentativas de explicar os mecanismos ligados à patogênese da DC. Uma delas aborda a persistência do parasito no hospedeiro como uma das principais causas da patologia, enquanto a outra acredita que uma resposta imune contra antígenos próprios é responsável pelo dano tecidual (DUTRA; GOLLOB, 2008; KIERSZENBAUM, 2005). Durante o desenvolvimento da patologia, o sistema imunológico do hospedeiro tem um papel importante e central, independente da origem dos antígenos que estimulem a resposta imune na fase crônica da DC. Assim, no entendimento dos mecanismos ligados a patologia da doença, ambas as hipóteses devem ser consideradas (DUTRA *et al.*, 2009).

A resposta *T. cruzi* específica devido à persistência do parasito nos tecidos e a autoimunidade não são incompatíveis ou mutuamente exclusivas e, provavelmente, a combinação de ambas as respostas estejam envolvidas na patogênese da DC (MARIN-NETO *et al.*, 2009).

O controle do *T. cruzi* depende tanto da resposta imune inata quanto da adquirida, que são acionadas durante a infecção inicial e são fundamentais para a sobrevivência do hospedeiro. Estas respostas envolvem desde macrófagos, células *natural killer* (NK), linfócitos T e B, até a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1, tais como IFN- γ , TNF- α , e IL-12 (MACHADO *et al.*, 2012).

A evolução para a fase crônica é acompanhada de um aumento na resposta celular. Nela, observa-se um aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes. Células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com cardiomiopatia chagásica produzem mais IFN- γ , TNF- α e IL-6, e menos IL-4 e IL-10 em comparação com indivíduos com a forma IND da doença (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; DUTRA *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 1993; SALVATELLA, 2007). Em pacientes com a infecção crônica sintomática ocorre uma modulação da resposta imunológica para um perfil pró-inflamatório, com proliferação de linfócitos Th1 e produção sistêmica de suas citocinas. Já a infecção assintomática seria caracterizada por uma supressão desse perfil, com predominância de linfócitos do tipo Th2 e suas citocinas anti-inflamatórias (ABEL *et al.*, 2001; CUNHA-NETO *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2003).

As células T reguladoras (Treg) são uma importante fonte de citocinas regulatórias e estão envolvidas no controle da resposta inflamatória local, evitando extensa destruição tecidual. No entanto, a sua presença no sítio de infecção é frequentemente considerada um indutor da persistência do parasito (BELKAID, 2007). As Treg são capazes de migrar para o local da inflamação cardíaca provocada por *T. cruzi*, suprimindo a função dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetores. E pode também inibir a ativação de linfócitos T auto-reativas por meio da expressão de moléculas co-inibitórias (CTLA-4) e produção de citocinas supressivas (IL-10, TGF- β , IL-35) (BAHIA-OLIVEIRA LM *et al.*, 1998; COLLISON LW *et al.*, 2007; ZHENG SG, *et al.*, 2004).

Vitelli-Avelar *et al.* (2005) demonstraram que apesar de observar um aumento da frequência de circulação de células NK em todos os pacientes crônicos, o percentual de subpopulações de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ e CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} é particularmente elevado em pacientes IND, sugerindo um possível papel protetor destas células no controle da morbidade durante a doença crônica. Estudos fenotípicos e funcionais demonstraram que as células NK CD56^{dim} apresentam maior capacidade citotóxica que pode suportar a hipótese de que este subconjunto de células NK pode contribuir para o controle efetivo do parasitismo tecidual em pacientes IND (LIEKE *et al.*, 2004) evitando a resposta imune deletéria criada por linfócitos T citotóxicas CD8⁺ que é relatado na CARD (DUTRA *et al.*, 1994, 1996; LEMOS *et al.*, 1998; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

Enquanto a forma IND é considerada uma situação de "equilíbrio" entre o parasito e o hospedeiro, e caracterizada por uma resposta imune predominantemente anti-inflamatória, (DUTRA *et al.*, 2009). Nas formas sintomáticas da DC crônica, as manifestações estão relacionadas com a ocorrência de uma reação próinflamatória nos órgãos afetados, especialmente em locais onde antígenos de *T. cruzi* foram encontrados (FUENMAYOR *et al.*, 2005).

2.9.1 Sistema imune inato

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa, e consiste em um sistema primitivo que protege contra patógenos, contando com barreiras mais amplas, porém menos específicas, tais como a linha inerte da superfície corporal, pH, movimento ciliar e enzimas (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Este é composto por 4 elementos que agem em conjunto para manter a proteção contra patógenos: os mediadores solúveis, incluindo componentes do sistema complemento e MBL; as barreiras epiteliais; as defesas celulares como os fagócitos,

células NK; os fatores da coagulação; e os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que desencadeiam cascatas de sinalização pró-inflamatórias (IP *et al.*, 2009; TAKAHASHI *et al.*, 2010).

Os PRRs são capazes de se ligar a diferentes tipos de arranjos moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Estes receptores ativados desencadeiam a estimulação das células de defesa e a produção de peptídeos que eliminam o patógeno. Os receptores Toll-like (TLR), as lectinas e as ficolinas constituem uma importante classe de PRRs. Dentro das lectinas humanas, a MBL é uma das mais bem estudadas, sendo um exemplo de proteína reconhecadora de determinados tipos de carboidratos na superfície de patógenos, que constituem uma classe de PAMPs (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

2.9.2 Sistema complemento, MBL e doença de Chagas

Para o *T. cruzi* estabelecer uma infecção é necessário a evasão da resposta imune do hospedeiro. O primeiro mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasito é o SC, que é composto de 30 proteínas séricas ativadas em cascata que culmina na lise do mesmo. Existem três vias do complemento que levam a lise dos agentes patogênicos através da formação de um complexo de ataque à membrana (CESTARI *et al.*, 2008). A via alternativa não requer a presença de anticorpo para sua ativação, iniciando-se com a ativação do fragmento C3. A via clássica é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo. A via das lectinas é ativada pela MBL e ficolinas (TURNER, 2003). As três vias convergem na proteólise da proteína C3 gerando produtos biologicamente ativos, denominados C3b o qual se liga às superfícies celulares microbianas ou ao anticorpo ligado ao antígeno (ABBAS, 2012).

O SC se mostra crucial para controle de doenças, como a DC, matando tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* suscetíveis (CESTARI; RAMIREZ, 2010). Para a infecção do hospedeiro ser bem sucedida é necessário que estirpes resistentes contornem a ativação do complemento, produzindo várias proteínas inibidoras, tais como a proteína *Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning* (CRIT), que inibe a via da lectina (CESTARI *et al.*, 2009). Além de escapar ao ataque do complemento, os tripomastigotas metacíclicos têm a capacidade de invadir as células hospedeiras (YOSHIDA, 2006). Além do seu papel no controle da infecção aguda, a ativação do SC também parece agir por meio da deposição de complexos de ataque da membrana sobre o tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos (BOLDT *et al.*, 2009).

A via da lectina é ativada após o reconhecimento dos PAMPs pela MBL ou ficolinas com subsequente ativação de enzimas associadas que são conhecidas como MASPs, que são proteínas associadas à MBL circulante (FUJITA *et al.*, 2002). Estas se ligam a uma gama de carboidratos comuns aos patógenos, por exemplo, terminais de manose ou N-acetilglucosamina (GlcNAc) em glicoproteínas ou em polímeros de carboidratos, incluindo SA85-1, a principal glicoproteína de superfície da forma amastigota do *T. cruzi* (KAHN *et al.*, 1995; WEIS *et al.*, 1992).

Por meio de estudos de associação entre MBL e doenças, surgiram evidências do papel dessa proteína na modulação da inflamação (TURNER, 2003). O mecanismo através do qual a MBL pode induzir uma resposta inflamatória não está claro, mas sabe-se que a mesma é capaz de promover a inflamação através da modulação dose dependente de citocinas, tais como IL-1 α e IL-1 β , e IL-10, e IL-6 (FRASER *et al.*, 2006).

Luz *et al.* (2009) observaram níveis de MBL aumentados nos portadores cardíacos da DC, isso se deve provavelmente, ao processo inflamatório progressivo característico da cardiomiopatia chagásica crônica. Após a lesão do tecido cardíaco provocada pelo parasito, novos epítomos antigênicos são expostos, podendo ocorrer à ligação da MBL a carboidratos anteriormente sequestrados, ativando o sistema complemento e intensificando a reação inflamatória.

A ausência de anticorpos específicos contra o *T. cruzi*, durante a infecção aguda reforça a importância da via da lectina na resposta imune inata do hospedeiro. Por outro lado, quando a via da lectina é bloqueada, a morte do parasito é inibida de forma significativa a curto tempo de incubação. A MBL, L- e H-ficolina se ligam à superfície de epimastigotas de *T. cruzi* e ativam a via da lectina levando à morte mediada por complemento. Em contraste, tripomastigotas metacíclicos infecciosos expressam CRIT em sua superfície, o que em contato precoce com soro humano normal inibe a ativação da via da lectina. Este mecanismo permite a evasão dos parasitos para sobreviver e lhes permite progredir na infecção (CESTARI *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que os estudos de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em humanos indicam uma possível função da MBL ou vias associadas à MBL, tais como MASP2, na regulação da cardiomiopatia induzida pelo *T. cruzi* (BOLDT *et al.*, 2011; WEITZEL *et al.*, 2012). Além disso, também é possível que a MBL influencie a inflamação cardíaca através de um mecanismo indireto. Independentemente disso, o papel da MBL na regulação das respostas do hospedeiro ao *T. cruzi* continua a ser investigado *in vivo* (ROTHFUCHS *et al.*, 2012).

2.9.3 MBL e outras doenças

Estudos vêm mostrando a importância da MBL na suscetibilidade ou proteção frente a algumas infecções. Miranda *et al.* (2008) demonstraram que altos níveis de MBL sérica são associados com a gravidade dos sintomas da leptospirose. Os pacientes apresentavam níveis séricos mais altos (>1000ng/mL), quando comparados com os pacientes controles, sugerindo assim, uma associação dos níveis da MBL com a gravidade da doença.

Halla *et al.* (2010) concluíram que há associação da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e a gravidade da fibrose hepática com os alelos variantes do gene *MBL2*. Os alelos variantes de *MBL2* expressam níveis baixos de MBL e são associados com a suscetibilidade pela infecção do HCV. O vírus da hepatite B, também foi associado com a alta frequência de alelos variantes do gene *MBL2*. No grupo de infectados pelo HBV foi encontrado um aumento significativo dos haplótipos associados com níveis baixos de MBL, dessa forma, foi sugerido que a MBL tenha um papel protetor frente à infecção pelo HBV (FILHO *et al.*, 2010).

Resultados de um estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2011), demonstram que os níveis séricos da MBL em pacientes com hanseníase são influenciados pela idade e pelos genótipos do *MBL 2*, porém não encontraram evidências da associação dos polimorfismos genéticos do *MBL2* com a propensão para hanseníase.

Altas concentrações de MBL podem favorecer as infecções, principalmente, por organismos intracelulares, como por exemplo, *Mycobacterium* que utilizam a opsonização para penetrar na célula do hospedeiro. Bonar *et al.* (2004), chegaram a conclusão que altos níveis de MBL podem está envolvidos na patogênese da tuberculose. A probabilidade de desenvolver leishmaniose visceral também foi correlacionada com os níveis de MBL. Essa proteína se mostrou capaz de modular a evolução clínica da infecção por *Leishmania chagasi* (SANTOS *et al.*, 2001).

O papel da MBL em algumas doenças é relativo, em algumas condições altas concentrações podem ser prejudiciais, por exacerbar a resposta inflamatória do hospedeiro. Em outro casos, a deficiência dessa proteína pode está relacionada com maior suscetibilidade a algumas infecções. Muitos questionamentos ainda fazem parte desse universo que envolve está pequena molécula que é a MBL, portanto, pesquisas são necessárias para ampliar o conhecimento e assim esclarecer essa relação MBL-doença.

2.9.4 Lectina Ligante de Manose (MBL)

Em 1968, foi relatado um caso de uma criança com infecção bacteriana recorrente devido a uma deficiência de um fator plasmático. Embora desconhecido na época, esse fator era a MBL. Estudos *in vitro*, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como alvo, mostraram uma imunodeficiência na opsonização do patógeno. Em 1987, a MBL foi reconhecida como fator capaz de ativar o sistema complemento em uma reação independente de anticorpo, revelando o mecanismo de imunodeficiência. Esses estudos foram confirmados através de estudos genéticos (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

A MBL é produzida pelo fígado, secretada na corrente sanguínea e é um importante componente da imunidade inata não específico, sendo uma das primeiras moléculas a agir contra agentes infecciosos (SORENSEN *et al.*, 2005). Por ser uma proteína de fase aguda, em processos inflamatórios os níveis da MBL se elevam, podendo ser encontrada em secreção nasofaríngea, na mucosa do ouvido médio, no líquido sinovial, mas também pode ser encontrada em condições normais, no fluido amniótico (HEITZENEDER *et al.*, 2012).

A MBL possui um domínio similar ao colágeno N-terminal e um domínio C-terminal que reconhece carboidrato (IP *et al.*, 2009). Os níveis de MBL na circulação são muito estáveis e determinados geneticamente. Entre indivíduos pode variar de 3µg/mL a 50µg/mL. Essa variação reside na ocorrência de mutações pontuais no éxon 1 e na região promotora (PETERSEN *et al.*, 2001). Há evidências de que ela possui um papel complexo no desenvolvimento de várias doenças, como lúpus eritematoso sistêmico, leishmaniose, hanseníase e DC. Entretanto a deficiência deste fator geralmente está associada à suscetibilidade das infecções (CARVALHO *et al.*, 2007; IP *et al.*, 2009).

A MBL é uma colectina tipo C (Ca⁺⁺ dependente) solúvel que apresenta duas porções: uma porção semelhante à haste de colágeno que é capaz de ativar o sistema complemento e promover a fagocitose; e outra com o domínio de ligação a carboidrato (domínios de lectina). O cálcio contribui para a manutenção estrutural do domínio de ligação a carboidrato que é essencial para assegurar a atividade biológica. A MBL circula predominantemente como uma proteína sérica. Existem ainda mais três lectinas tipo-C solúveis, as proteínas do surfactante pulmonar A e D (SPA1 e SPA2 e a SPD), mas estas últimas não são capazes de ativar o sistema complemento. Também há lectinas tipo C de membrana que funcionam como ligantes para células (IP *et al.*, 2009).

Estudos com MBL e DC ainda são controversos, portanto, é um assunto que necessita de alguns esclarecimentos. Luz *et al.*, (2009) associaram altos níveis séricos de MBL com o

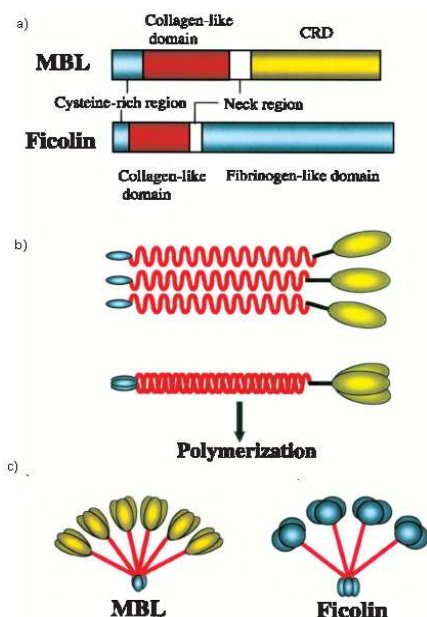
aumento do risco de cardiomiopatia grave na DC crônica, que pode ser devido ao papel proinflamatório da MBL em lesão tecidual, mediado pelo complemento. Alguns pesquisadores têm dado ênfase nesse papel proinflamatório da MBL em distúrbios cardíacos). Acredita-se que a mesma aumente a injúria tecidual no processo inflamatório que ocorre na reperfusão pós-isquêmica (CHAN *et al.*, 2006). Jordan *et al.*, (2001) utilizando um modelo experimental, demonstraram que a MBL pode ligar-se ao endotélio causando excessiva ativação do complemento e subsequente dano ao tecido.

Boldt *et al.*, (2011) compararam genótipos de *MASP2* em pacientes com DC associada a cardiomiopatia. Este estudo analisou seis polimorfismos de *MASP2* em 208 pacientes com DC crônica e 300 indivíduos saudáveis do sul do Brasil. O estudo revelou que genótipos *MASP2**CD, em sua maioria resultaram em baixos níveis de *MASP2* e, foram associados com um risco elevado de cardiomiopatia chagásica, sugerindo que genótipo de *MASP2* pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença. Os baixos níveis de *MASP2* também podem resultar em falha (ou ineficiência) da ativação da via da lectina, o que poderia favorecer infecção parasitária e progressão da doença.

2.9.3.1 Estrutura

A estrutura da MBL é constituída por oligômeros estruturados por subunidades que se formam pela associação de três cadeias polipeptídicas idênticas, possuindo individualmente 32kDa. Cada cadeia polipeptídica é composta por um domínio de reconhecimento de carboidrato (CDR), uma região hidrofóbica, chamada de “pescoço”, uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína. As regiões colagenosas interagem formando uma tríplice hélice, cada região hidrofóbica adota uma forma espiralada e os CDRs são características de proteínas globulares. Interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre as regiões N-terminais estabilizam o trímero e associam-se em oligômeros de duas a seis subunidades dando origem a uma estrutura quaternária, semelhante a um “buquê de tulipas” (Figura 5) (CARVALHO *et al.*, 2007). Essa estrutura permite alta afinidade na interação entre os domínios de lectina da MBL e oligossacarídeos de patógenos. A ligação com o patógeno muda a conformação da MBL, promovendo a ativação do complexo MBL/MASPs (HOLMSKOV; THIEL; JENSENIUS, 2003; KILPATRICK, 2002).

Por esses motivos a MBL, purificada do plasma sanguíneo ou recombinante, poderá ser usada como uma forte candidata como imunoterapia passiva para prevenir infecções, amenizando ou tratando algumas doenças (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Figura 5- Estrutura da Lectina de Ligação a Manose

Fonte: Fujita (2004).

Legenda: a) estrutura gênica da MBL e Ficolinas; b) formação da subunidade da MBL (polimerização); c) estrutura oligomérica da MBL e Ficolina.

Para MBL se ligar aos grupos hidroxilas 3 e 4 de vários açúcares, entre eles manose (manana), N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-manosamina, fucose e glucose se faz necessária a presença de cálcio, já o açúcar D-galactose, não se liga de maneira eficiente a MBL (PETERSEN *et al.*, 2001). Para que a MBL possa se ligar aos açúcares presentes na superfície dos micro-organismos é necessário que os três domínios de lectina de cada subunidade possuam uma distância constante de 45Å (PETERSEN *et al.*, 2001; TURNER 2003).

As chances da MBL se ligar as células do hospedeiro são reduzidas, visto que, as glicoproteínas não estão arranjadas de forma repetitiva e estão a uma distância entre 20 e 30Å . Acrescido a isso, a maioria das estruturas de carboidratos nas células animais termina com galactose e ácido siálico, os quais não são reconhecidos pelas colectinas (BOTOS *et al.*, 2005; GADJEVA *et al.*, 2001; JACK *et al.*, 2001).

São descritos dois genes relacionados à MBL, o MBL 1, um pseudo-gene, e o MBL2, que codifica a proteína MBL. O gene MBL2 é composto por quatro éxons: éxon 1 que codifica a região N-terminal rica em cisteína e parte da região de domínio do colágeno; éxon 2 que é responsável pelo restante da região de domínio do colágeno; éxon 3, que codifica a região do pescoço; éxon 4 que codifica a região C-terminal, contendo o sítio CRD; e três introns (DOMMETT *et al.*, 2006; PETERSEN *et al.*, 2001).

Indivíduos homocigotos para alelo variante (O/O) produzem MBL de baixo peso molecular, indivíduos heterocigotos (A/O) produzem MBL heterooligoméricas que podem

apresentar poucas moléculas de alto peso molecular e também moléculas de baixo peso molecular e os indivíduos homocigotos (A/A) para o alelo selvagem produzem a maior proporção de moléculas de MBL que se apresentam como oligômeros de alto peso molecular. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), geralmente, são desenhados para detectar oligômeros de alto peso molecular, detectando melhor a MBL de indivíduos homocigotos para o alelo selvagem (LIPSCOMBE *et al.*, 1992). Entre os oligômeros da MBL, apenas o de alto peso molecular são capazes de formar ligações eficientes com a manose e ativar o SC. Acredita-se que a MBL heterooligomérica esteja relacionada com a atividade de opsonização (DEAN *et al.*, 2006; GARRED *et al.*, 2003).

2.9.3.2 Funções

A MBL ativa o complemento por uma via independente da via clássica e alternativa, muito embora a via das lectinas tenha similaridade com a via clássica. Há evidências de que a proteína possui pelo menos quatro funções distintas: 1 - ativação do complemento, 2 - opsonização, 3 - modulação da inflamação e 4 - indução da apoptose (TURNER, 2003).

A ativação do SC regulada pela MBL ocorre por meio da ligação de polissacarídeos microbianos às lectinas e/ou ficolinas circulantes, que lembram o C1q. Para que a MBL consiga ativar a via da lectina é necessário que haja uma associação com a MASP. Existem quatro tipos de MASP, MASP-1, MASP-2, MASP-3 e sMAP/MAP19. Apenas a MASP-1 e MASP-2 tem um domínio serino-protease. Acredita-se que a ligação da MBL a superfície dos micro-organismos inicia a autoativação da MASP-2, permitindo a clivagem de C4 e C2 para formar a C3-convertase (C4b2a). A MASP-1 parece clivar C2 mais não C4. A partir da formação da C3-convertase essa via segue de maneira análoga à via clássica (CARVALHO *et al.*, 2007; IP *et al.*, 2009).

A opsonização é uma importante função biológica da MBL, visto que suas estruturas de colágeno se ligam a receptores de colectinas presentes nos fagócitos atuando assim, como opsonina (Figura 6) (SUMMERFIELD *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 1996). Acredita-se que para a MBL promover a opsonização não é necessário a ativação do complemento. Embora o mecanismo dessa função não esteja bem definido, presume-se que se houver uma atuação direta da MBL como opsonina, haverá uma interação com alguns receptores específicos como cC1qR/calreticulina, C1qRp e CR1, expressos na superfície de células fagocíticas (TURNER, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

A DC ainda é responsável por uma elevada taxa de morbidade e mortalidade (principalmente devido à cardiomiopatia chagásica) e acomete um grande número de pessoas na América Latina, atingindo cerca de 10 milhões de indivíduos em todo mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002). Alguns autores mostraram que a sobrevivência dos pacientes com cardiomiopatia chagásica é 2 a 4 vezes menor que a dos pacientes com cardiopatia dilatada idiopática. A cardiomiopatia chagásica corresponde a um terço dos casos de insuficiência cardíaca no Brasil. Um estudo multicêntrico brasileiro mostrou que a cardiomiopatia chagásica é a terceira maior causa de indicação para transplante cardíaco no nosso país (BOCCHI *et al.*, 2001).

Devido à demonstração de que a atividade do sistema complemento é importante para a destruição do *T. cruzi*, indivíduos que apresentam níveis séricos da MBL alterados e sua capacidade de ligação modificada, poderiam apresentar espectros clínicos diferenciados. Considerando que a ativação do complemento pela MBL possa levar ao aumento da inflamação, esta molécula poderia estar associada à gravidade da doença. Por outro lado, como uma função protetora, os níveis elevados da MBL poderiam ser importantes para a contenção do parasita pela imunidade inata. Se a associação da MBL com a progressão da cardiomiopatia chagásica for comprovada, futuramente, a MBL poderá ser utilizada como marcador dessa progressão.

A elucidação de mecanismos imunes que contribuam e controlem a progressão da doença de Chagas é de grande importância para, possivelmente, estabelecer marcadores biológicos de evolução do prognóstico da doença através de marcadores imunológicos, orientar a conduta na clínica médica e assim melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Associar a atividade de ligação e os níveis séricos da MBL com diferentes graus da cardiomiopatia chagásica crônica.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar capacidade de ligação da MBL e comparar com os diferentes graus da cardiomiopatia chagásica crônica,
- b) Quantificar os valores séricos de MBL e comparar com os diferentes graus da cardiomiopatia chagásica crônica,
- c) Estabelecer um índice que relacione a concentração sérica da MBL com a capacidade de ligação e comparar com os diferentes graus da cardiomiopatia chagásica crônica.

5 PROCEDIMENTOS METOLÓGICOS

5.1 Desenho e População de estudo

O grupo de estudo foi formado por pacientes portadores da doença de Chagas crônicos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, portadores da forma clínica cardíaca e indeterminada, com dois testes sorológicos reagentes, selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE-UPE. O desenho de estudo do presente projeto é do tipo corte transversal com grupos de comparação interna. Um grupo foi composto por pacientes com a forma CARD, sendo subdividido em CARD leve e CARD grave e outro grupo com IND. O grupo de pacientes foi estratificado, segundo a dilatação cardíaca. Indivíduos sem dilatação foram considerados pacientes com a forma cardíaca leve, indivíduos com a dilatação foram considerados pacientes com a forma cardíaca grave e indivíduos sem alterações cardíacas ou digestivas foram considerados com a forma indeterminada. O processo amostral foi determinado por conveniência, sendo assim, o grupo IND é formado por 19 pacientes e o grupo de CARD (leve e grave) é formado por 58 pacientes, cada um com 29.

Na rotina do Ambulatório, os pacientes portadores da DC foram submetidos a exames clínico-laboratoriais (exame físico, raios X contrastado de esôfago, raios X de tórax, eletrocardiograma) e sorologia para infecção pelo *T. cruzi* para categorização das formas clínicas IND, DIG, CARD ou MIS. A interpretação dos exames e a consequente classificação dos pacientes que foram selecionados para este estudo foi realizada pela equipe médica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE-UPE.

5.2 Local de estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM), ligado ao Departamento de Imunologia, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE e no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE-UPE, ambos situados na cidade de Recife, Pernambuco.

O LIBM desenvolve pesquisas em doenças infecciosas e parasitárias de importância em saúde pública, com o objetivo de contribuir para gerar conhecimento e controlar essas doenças.

O Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE-UPE é considerado um centro de referência no atendimento do paciente portador da DC no Nordeste do Brasil. Existem aproximadamente 1.800 pacientes cadastrados, com uma média de 200 consultas por mês (OLIVEIRA JR., 2009).

5.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão utilizados nesse estudo foram pacientes portadores de doença de Chagas crônica confirmada por dois testes sorológicos positivos, maiores que 18 anos, forma clínica definida, ter alteração cardíaca (forma cardíaca) ou não apresentar sintomas relacionados com a doença de Chagas (forma indeterminada).

Pacientes que embora atendam aos critérios de inclusão, mas apresentem coinfeção como HIV, doenças auto-imunes ou doenças parasitárias (esquistossomose, amebíase, giardíase) foram excluídos desse estudo.

5.3 Considerações Éticas

A conduta de inclusão dos pacientes portadores da doença de Chagas e os protocolos experimentais realizados neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz, sob o parecer de nº 07/2010, CAAE 0001.0.95.000.10 (Anexo 1 e 2). Os pacientes envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, após leitura e assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice 1). Eles também responderam a um formulário de pesquisa, para obtenção de dados clínicos e epidemiológicos dos mesmos (Apêndice 2). Todos os indivíduos envolvidos neste estudo tiveram 5 mL de seu sangue coletado, através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável, para posterior análise da concentração sérica e atividade de ligação da MBL.

5.4 Obtenção das Amostras

A coleta das amostras de sangue periférico foi realizada, no período de novembro de 2010 a agosto de 2012, no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE-UPE, seguindo as normas de biossegurança. De cada paciente, foram coletados 5 mL de sangue em tubo sem anticoagulante (tudo seco) por punção venosa. O sangue total coletado foi centrifugado para a retirada do soro que foi utilizado para determinação da

concentração e capacidade de ligação da MBL. Todas as amostras foram armazenadas no LIBM a -20°C.

5.5 Processamento das Amostras

5.5.1 Dosagem de MBL

A dosagem sérica da MBL foi feita medindo-se a MBL de alto peso molecular (forma oligomérica), por meio da técnica de ELISA, com *kits* Humam MBL Quantikine ELISA da R&D systems[®], de acordo com as orientações do fabricante.

A técnica consiste no uso de placas com micropoços previamente cobertos com um anticorpo monoclonal de captura anti-MBL, que se liga ao domínio de ligação a carboidratos da MBL. Inicialmente adicionou-se 50 µl do diluente de ensaio, posteriormente foram adicionadas, em posições pré-determinadas, 50 µl das amostras de soro diluídas, além dos controles necessários, foram então incubadas por duas horas no agitador. Assim, a MBL presente nas soluções se fixou aos poços cobertos com anticorpo de captura.

Após duas horas de incubação e 3 lavagens com PBS para retirar o material não fixado (processos repetidos nas próximas etapas), foi adicionado 100 µl do anticorpo de detecção monoclonal conjugado com peroxidase e foi incubado por duas horas no agitador. Este anticorpo detectou as moléculas de MBL ligadas a manana aderida na placa através dos domínios de ligação livres.

O processo de lavagem foi repetido, para a adição de 100µl da solução. A placa foi incubada por 30 minutos, protegida da luz. Após esse período 100µl da solução de parada foi acrescentado, parando assim a reação enzimática para a leitura ser realizada. A leitura foi realizada com um comprimento de onda de referencia de 450nm, comprimento de onda de correção de 540 ou 570 nm.

5.5.2 Padronização do ELISA de Capacidade de Ligação da MBL

Para a padronização da técnica do ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) foram avaliados os seguintes critérios: tipo de placa, tempo e temperatura de incubação, água para o preparo dos reagentes, concentrações dos reagentes e a curva padrão. Para definição das melhores concentrações ou diluições seriadas dos reagentes, foi realizada avaliação

simultânea de dois ou mais parâmetros. Os experimentos foram iniciados em dezembro de 2012 e finalizados em março de 2014.

No início dos testes de padronização, para sensibilização da placa, o tempo de incubação foi de 3 horas e 30 minutos, que no decorrer da padronização foi reduzido para 3 horas.

Para o bloqueio da placa foi utilizado *Bovine Serum Albumin* (BSA) (LOTE#028K0759). A concentração do BSA inicialmente era 10% e foi reduzida para 1%. Foram avaliadas as melhores diluições de soro, anticorpo anti-MBL e estreptavidina+HRP. Para isso foram testadas as seguintes diluições para o soro: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, e após resultados, foi estabelecida como melhor diluição do soro a de 1:5. Para o conjugado (anticorpo anti-MBL- LOTE L0308) foram testadas as diluições 1:2000 e 1:2500, onde ficou estabelecida a de 1:2500. Para estreptavidina+HRP (LOT 27) foram testadas 1:200, 1:4000 e 1:5000 e após resultados ficou estabelecida a de 1:5000.

Os tipos de placas testados foram NuncMaxiSorp®, NuncPolySorp® e a NuncMaxiSorp® teve melhor desempenho.

A água usada para preparar os tampões (lavagem, diluente e bloqueio) foi testada. Iniciamos a padronização com água destilada e deionizada, no decorrer da padronização observou-se melhor desempenho com água ultra-pura.

Para construção da curva padrão foram testadas amostras diferentes, com sete pontos em duplicata, nas concentrações 640 ng/mL(200 AU), 320 ng/mL (100AU), 160ng/mL (50AU), 80ng/mL (25AU), 40ng/mL (12,5AU), 20ng/mL (6,25AU), 10ng/mL (3,125AU). Inicialmente, a curva foi construída por diluições seriadas (obtidas através de padronização) de um soro padrão, genotipado para gene da MBL. Por fim, foi testada a construção da curva padrão com MBL padrão humana 1000 AU (unidades arbitrárias) do *Statens Serum Institut*, Copenhagen Dinamarca.

5.5.3 Avaliação da Capacidade de Ligação da MBL

A capacidade de ligação da MBL foi medida através do ELISA produzido *in house*. Esse ensaio teve como objetivo avaliar a atividade de ligação da MBL, ou seja, as moléculas que estão aptas a se ligar aos carboidratos presentes nas superfícies de alguns patógenos. A sensibilização da placa de ELISA (Nunc-Maxisorp®, Dinamarca) foi realizada revestindo os micropoços com 50µl de uma solução contendo manana de *Saccharomyces cerevisiae* purificada, pelo professor Jeans C Jensenius, da Universidade de Aarhus, Copenhagen,

Dinamarca, em uma concentração de 100µg/mL e incubada a 37°C em câmara úmida por três horas. A placa foi lavada três vezes com Tampão Salina Tris com Tween 20 (TBS-T). O tampão TBS tem como objetivo manter o pH em torno de 7,4, pH esse, próximo ao do corpo humano e que durante a reação, facilita a ligação antígeno-anticorpo. A adição do detergente Tween 20 permite uma lavagem mais efetiva, resultando na diminuição da coloração de fundo não-específica.

O bloqueio dos sítios de ligação inespecífica dos micropoços foi feito com uma solução de BSA a 1% em TBS e incubando 100 µl por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente (TA). Após essa incubação, a placa foi lavada três vezes com TBS-T. Após essa etapa, há possibilidade de estocar a placa a -80°C, podendo ficar armazenada por um período de aproximadamente 30 dias.

Amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:5 em tampão diluente, composto por TBS, BSA e cloreto de cálcio. O BSA a 0,5% e o cloreto de cálcio a 0,005 M (0,555g/100mL). A MBL padrão humana também foi diluída com tampão diluente nas concentrações de 640 ng/mL, 320 ng/mL, 160ng/mL, 80 ng/mL, 40ng/mL, 20ng/mL, 10ng/mL. A adição do cloreto de cálcio tem como objetivo estabilizar os domínios de ligação da MBL à manana. Em seguida, foram aplicados 50 µl das amostras diluídas em cada poço, em duplicata, e a placa foi incubada por duas horas a TA em câmara úmida. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com TBS-T.

A etapa seguinte foi a adição de 50 µl do anticorpo anti-MBL marcado com biotina, diluído em tampão diluente na diluição de 1:2500 (título obtido durante a padronização do ensaio). A placa foi incubada por uma hora a TA e após esse período, foram realizadas outras três lavagens com TBS-T.

Consecutivamente, foram adicionados 50 µl do conjugado de estreptavidina+HRP na diluição de 1:5000 (título obtido durante a padronização do ensaio) em tampão diluente. A estreptavidina tem a função de se ligar à biotina do anticorpo anti-MBL e a HRP (*horseradish peroxidase*) tem a função reagir com o cromógeno. Após a adição, a placa foi incubada por 45 minutos a TA e em seguida foi novamente lavada por três vezes com TBS-T.

O substrato cromógeno deve ser preparado com a solução A (tetrametilbenzidina-TMB- *BD reagentes*) e solução B (peróxido de hidrogênio-*BD reagentes*) na proporção de 1:2. A preparação dessa solução deve ocorrer cinco minutos antes da adição, mantendo ao abrigo da luz. Deve-se então adicionar 50 µl dessa solução em cada poço e incubar por 15 minutos também ao abrigo da luz. Houve o desenvolvimento de cor azul, o qual é proporcional à atividade de ligação da MBL.

Ao final dessa incubação, foi adicionado 50 µl de H₂SO₄ a 2 N, havendo mudança da cor azul para amarela, caracterizando a parada da reação, por mudança brusca do pH. A leitura da reação foi em absorbância com filtro simples de comprimento de onda 450nm.

5.5.4 Manose binding index- Mbi

O Mannose binding index (Mbi) foi desenvolvido neste estudo e consiste em um índice que busca avaliar a atividade de ligação da MBL, através da proporção estabelecida entre a concentração sérica (CS MBL) e a sua capacidade de ligação da MBL (CL MBL). Por meio de uma razão estabelecida entre os resultados obtidos em cada ELISA. A partir desse índice é possível observar a proporção de MBL ativa no soro. $Mbi = CS\ MBL / CL\ MBL$.

Uma alta capacidade de ligação da MBL pode está relacionada com o maior número de moléculas oligoméricas. Através da relação entre os níveis séricos e a capacidade de ligação da MBL, pode-se inferir a razão entre as moléculas funcionais (capazes de se ligar ao carboidrato), oligoméricas e as moléculas heteroligoméricas.

5.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi através do programa GraphPad Prism versão 6[®] e o Microsoft Excel[®] considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Gráficos foram utilizados para apresentar as variáveis, medidas descritivas como média, mediana e desvio padrão também foram utilizadas. Os dados relativos aos níveis séricos e a atividade de ligação da MBL foram testados quanto à normalidade usando o teste Shapiro-Wilk. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foram utilizados os teste *t-student* para comparação entre dois grupos, ou ANOVA para mais de dois grupos, quando observado o pressuposto de normalidade. Quando este não foi observado, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos ou Kruskal Wallis para comparação entre mais de dois grupos.

6 RESULTADOS

6.1 Características epidemiológicas

Dos pacientes portadores da doença de Chagas selecionados para esse estudo, 73% são do sexo feminino e 27% do sexo masculino. A média de idade entre os pacientes foi de $57,97 \pm 11,77$ anos. Quando se estratificou por faixas etárias observou-se um o maior percentual de idosos (maiores de 60 anos), como pode ser observado na Tabela 1.

Com relação às formas clínicas, foram incluídos 77 indivíduos portadores de doença de Chagas crônica, apresentando a seguinte distribuição: 19 pacientes com a forma indeterminada (pacientes assintomáticos) e 58 portadores da cardiomiopatia chagásica crônica. Entre os portadores da forma cardíaca, observou-se a seguinte distribuição: 29 com a forma grave, sendo 20 pacientes do sexo feminino e 9 do sexo masculino; e 29 com a forma leve, sendo 24 pacientes do sexo feminino e 5 do sexo masculino. Mesmo havendo um maior número de mulheres, não houve diferença estatisticamente significativa, quando há comparação entre os grupos (Tabela 1).

A maior parte dos portadores de doença de Chagas avaliados nesse estudo é proveniente de municípios do estado de Pernambuco, 83%, sendo a maioria da Zona da Mata de Pernambuco, (Timbaúba, Carpina e Vicência, 17%). E os 16,88% restantes pertencem a municípios da Paraíba, Alagoas e Piauí.

Todos os pacientes com a forma grave da cardiomiopatia apresentaram dilatação cardíaca, e seis dos 29 indivíduos que compõem esse grupo, apresentaram FEVE (fração de ejeção do ventrículo esquerdo) compensada ($\geq 50\%$) devido ao uso de medicamentos cardiotônicos, o restante apresenta uma FEVE $< 50\%$. Os pacientes com a forma cardíaca leve e indeterminada apresentam a FEVE $\geq 50\%$ e todos sem dilatação cardíaca. A mediana da FEVE no grupo cardíaco grave foi de 44% com mínimo de 24% e máximo de 62%, a mediana da FEVE no grupo cardíaco leve foi de 69% com mínimo de 65% e máximo de 80%, mediana da FEVE no grupo de indeterminado foi de 65% com mínimo de 57% e máximo de 77%. A comparação entre os grupos de cardíacos graves e cardíacos leves encontrou um $p < 0,0001$, cardíacos graves e indeterminados encontrou um $p < 0,0001$ e os cardíacos leves e indeterminados $p = 0,002$. Portanto, identificamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabela 1).

Com relação ao tratamento, foi observado que 41,56% dos pacientes que participaram desse estudo receberam tratamento com Benzonidazol. Entre os pacientes com a forma

cardíaca grave, 37,93% foram tratados; entre os cardíacos leves, 48,27% e entre os indeterminados, 36,84% fizeram tratamento para doença de Chagas. Ao compararmos os grupos, não foi encontrada diferença estatística significativa (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas de portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco-PROCAPE/UPE.

	Card Grave (n=29)	Card Leve (n=29)	Ind (n=19)	p1	p2	p3
Sexo (F:M)	20:9	24:5	12:7	0,35	0,75	0,17
Idade(Média±D.P)	60,3±10,1	59,5±11,2	52,0±13,5	0,77	0,02	0,04
Mediana FEVE	44 (24-62)%	69 (65-80)%	65(57-77)%	<0,0001	<0,0001	0,002
Tratamento (tratados:não tratados)	11:18	14:15	7:12	0,59	1.0	0,55

Fonte: Elaborada pelo autor

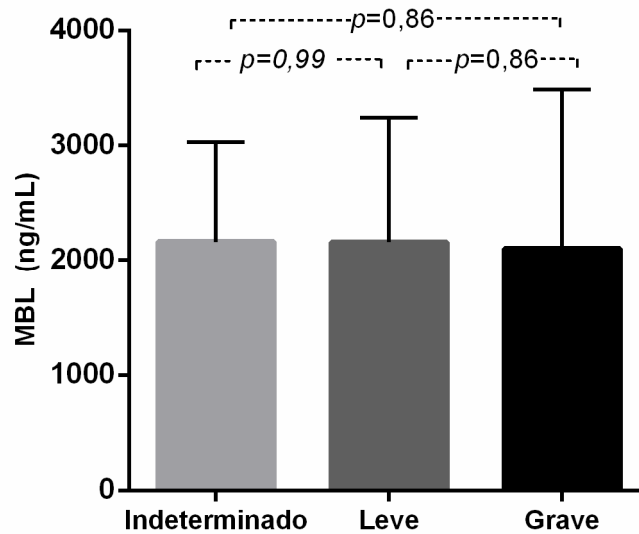
Nota: F: feminino; M: Masculino; D.P: desvio padrão; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; p1: Card Grave x Card Leve; p2: Card Grave x Ind; p3: Card Leve x Ind

6.2 Concentração sérica da MBL

Os níveis séricos de MBL foram avaliados nos 77 pacientes do estudo, através de um kit de imuno-reconhecimento. Para analisar os resultados dos níveis séricos, primeiramente foi realizado teste de hipótese de Shapiro-Wilk, a fim de evidenciar a suposição de normalidade em cada um dos grupos. Nos grupos dos cardíacos graves foi obtido um $p= 0.09$, no grupo dos cardíacos leves $p= 0.28$ e no grupo de indeterminados $p= 0.48$. Considerando um nível de significância de 5%, não rejeitamos a hipótese inicial, ou seja, as variáveis seguem uma distribuição normal.

As médias e os desvios padrão dos valores obtidos de MBL sérica foram de 2099 ± 1390 ng/mL na forma cardíacos grave, de 2156 ± 1084 ng/mL na forma cardíaca leve e de $2159\pm 872,3$ ng/mL nos pacientes com a forma indeterminada. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores séricos de MBL dos pacientes quando comparados entre os grupos (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Concentração sérica de Lectina de Ligação a Manose em pacientes com a forma cardíaca leve e grave e indeterminada da doença de Chagas do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/ Universidade de Pernambuco PROCAPE/UPE

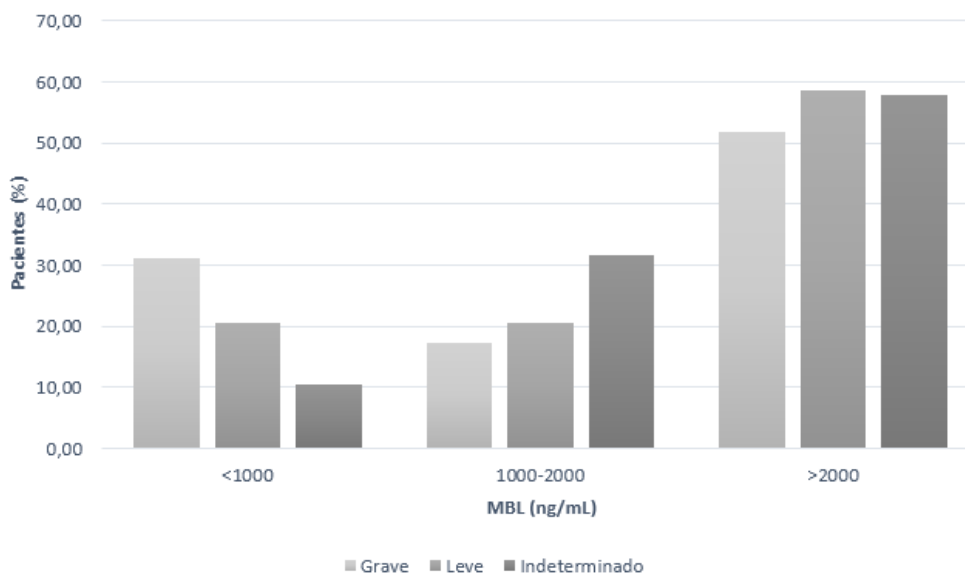


Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: O gráfico representa a concentração sérica da MBL em ng/mL nos grupos com cardiomiopatia leve e grave e no grupo indeterminado. Indeterminado *versus* Card leve $p=0,99$; Indeterminado *versus* Card grave $p=0,86$. Card Leve *versus* Card grave $p=0,86$.

O teste de Tukey também foi utilizado para testar a diferença entre os grupos dividindo os pacientes em concentração de MBL “alto” ($>2000\text{ng/mL}$), “intermediário” ($1000\text{-}2000\text{ng/mL}$) e “baixo” ($<1000\text{ng/mL}$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Concentrações: baixa, intermediária e alta de Lectina de Ligação a Manose sérica em pacientes com as formas cardíacas e indeterminada da doença de Chagas do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Percentual de pacientes dividido pela estratificação dos níveis séricos de MBL (ng/mL)

Depois de realizar a comparação entre os grupos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). No entanto, observou-se uma leve tendência quando se comparou os cardíacos graves e os indeterminados no grupo de baixo- produtores de MBL. Os pacientes com a forma cardíaca grave representaram o grupo com maior prevalência de baixo-produtores de MBL, enquanto o grupo de pacientes com a forma indeterminada são considerados altos produtores de MBL.

Tabela 2 - Percentual de pacientes dividido pela estratificação dos níveis séricos Lectina de Ligação a Manose (ng/mL)

	Grave (n°)	Leve (n°)	Indeterminado (n°)	p1	p2	p3
>2000	15	17	11	Referencia	Referencia	Referencia
1000- 2000	5	6	6	1	0,71	0,72
<1000	9	6	2	0,53	0,26	0,68

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: p1: Card Grave x Card Leve; p2: Card Grave x Ind; p3: Card Leve x Ind

O percentual dos pacientes que produzem MBL entre 1000-2000ng/mL foi de 17,24% entre os pacientes cardíacos graves, 20,69% entre pacientes cardíacos leves e de 31,57% entre pacientes indeterminados. O percentual dos pacientes que produzem MBL maior que 2000ng/mL foi de 51,73% entre os pacientes cardíacos graves, 58,62% de pacientes cardíacos leves e de 57,9% entre pacientes indeterminados (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequências das concentrações estratificadas em baixa, intermediária e alta de Lectina de Ligação a Manose sérica em pacientes com a forma cardíaca leve e grave e indeterminada da doença de Chagas atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE

			Formas clínicas			Total
			Leve	Indeterminado	Grave	
Concentração MBL (ng/mL)	Baixo	N	6	2	9	17
		%	20,7%	10,5%	31,0%	22,1%
	Intermediário	N	6	6	5	17
		%	20,7%	31,6%	17,2%	22,1%
	Alto	N	17	11	15	43
		%	58,6%	57,9%	51,7%	55,8%
Total	N	29	19	29	77	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3 Capacidade de Ligação da MBL

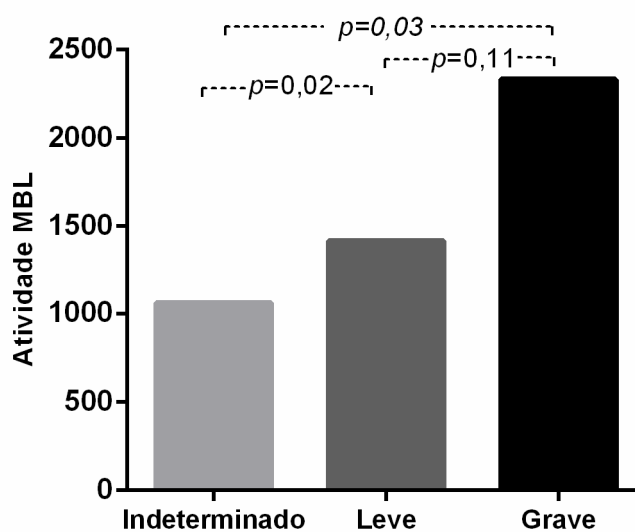
A capacidade de ligação da MBL foi avaliada em 77 pacientes portadores da doença de Chagas, os mesmos que tiveram os níveis séricos da MBL dosados, e foi avaliada segundo os parâmetros selecionados na padronização.

Após algumas análises, ficaram estabelecidos os seguintes parâmetros: a água que deve ser utilizada para realização desse experimento é a água ultra-pura, que a melhor diluição para o soro foi de 1:5, para o conjugado foi de 1:2500 e para a estreptavidina+HRP foi de 1:5000. Para construção da curva padrão a amostra escolhida foi MBL padrão humana (1000 AU e 3,2 ng/mL) do *Statens Serum Institut, Copenhagen Dinamarca*. A placa escolhida foi NuncMaxiSorp®.

A atividade variou de 2-2.451 UA/mL no grupo indeterminado, de 9-7.192 UA/mL no grupo cardíaco leve e de 5- 5.766 UA/mL no grupo cardíaco grave. Quando se confrontou o grupo de cardíacos grave com cardíaco leve observou-se um $p= 0,11$, por tanto não

apresentou diferença estatisticamente significativa. No entanto, quando se compara os pacientes indeterminados com os pacientes cardíacos graves ($p=0,03$) e os pacientes indeterminados com os pacientes cardíacos leves ($p=0,02$) encontra-se diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 3 - Capacidade de Ligação da Lectina de Ligação a Manose em pacientes das formas cardíacas e indeterminada da doença de Chagas crônica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE.

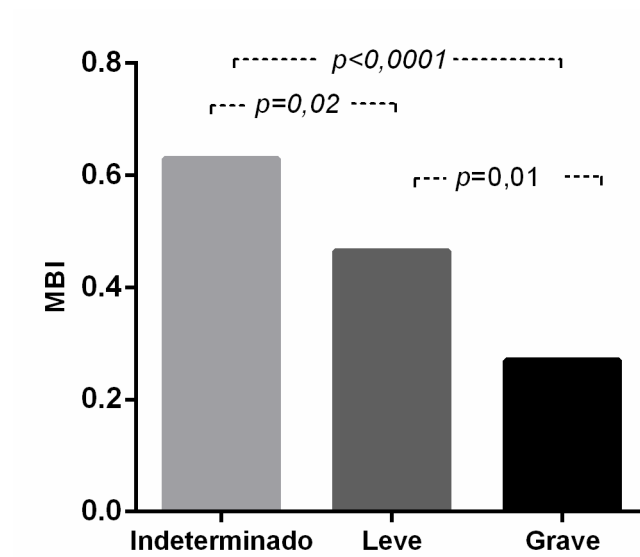


Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4 Mannose binding index- Mbi

A razão entre os resultados obtidos da dosagem sérica e capacidade de ligação, estabeleceu um índice que tornou possível a inferência de moléculas ligantes no soro. Após a formação do *Mbi*, foram analisados por grupos, e foi observada diferença estatisticamente significativa entre todos eles. Quando se realizou a comparação entre os pacientes indeterminados com cardíacos leves, foi observada diferença estatística com $p=0,02$; entre os cardíacos leves e cardíacos graves o $p=0,01$ e entre os grupos de indeterminados e cardíacos graves o $p<0,0001$.

Gráfico 4 - Índice da relação entre os níveis séricos e capacidade de ligação da Lectina de Ligação a Manose em pacientes das formas cardíacas e indeterminada da doença de Chagas crônica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco/ Universidade de Pernambuco - PROCAPE/UPE



Fonte: Elaborada pelo autor.

7 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a capacidade de reconhecimento da MBL à manana difere entre pacientes com doença de Chagas, nas formas indeterminada e cardíacas. Enquanto os níveis séricos de MBL determinados por imuno-reconhecimento através de anticorpos monoclonais não apresentou diferença entre os grupos estudados. Portanto, na tentativa de compreender a relação entre as moléculas de MBL produzidas e as moléculas que apresentassem uma atividade de reconhecimento correspondente, foi criado um índice, o Mbi, o qual foi capaz de distinguir uma diferença mais acentuada entre as formas cardíacas. Os resultados empregando o Mbi sugerem que, nos pacientes com a forma grave da doença de Chagas existe uma maior proporção de moléculas de MBL com maior atividade de reconhecimento à manana em comparação às formas cardíaca leve e indeterminada ($p= 0,01$ e $p= 0,0001$).

A população em estudo apresentou um maior número de mulheres (72,7%) e idosos portadores da doença de Chagas, que é um perfil característico, o qual também foi observado por Alves *et al.* (2009). A idade dos pacientes variou de 27 a 78 anos com a média de $57,97 \pm 11,85$ anos. Os indivíduos com a forma cardíaca grave apresentaram uma média de $60,31 \pm 10,16$ anos, enquanto os pacientes cardíacos leves a média de $59,51 \pm 10,16$ anos e indeterminados média de $52,05 \pm 13,58$ anos. O trabalho de Bozelli *et al.* (2006), encontrou resultado semelhante com relação à média de idade dos pacientes atendidos no serviço de internação ($61,2 \text{ anos} \pm 12,8$), aproximadamente 70% dos pacientes estudados eram idosos.

Em relação à dosagem sérica de MBL utilizando um imuno-reconhecimento por anticorpo monoclonal (R&D Systems®) não houve diferença significativa entre os grupos. Entretanto, quando se fez uma estratificação desses níveis, observou-se uma maior proporção de indivíduos com níveis mais baixos de MBL na forma cardíaca grave (31,0%) quando comparado às formas cardíaca leve; 20,7% e indeterminada 10,5%. Luz *et al.* 2009, também não encontraram diferença estatística entre as formas clínicas estudadas e os níveis séricos de MBL, embora tenham encontrado associação de níveis de MBL mais altos ($>1000\text{ng/mL}$) em relação à idade associada à gravidade da cardiomiopatia chagásica.

Contudo, uma comparação direta entre o presente estudo e o estudo de Luz *et al.* (2009) não pode ser feita, devido a diferença dos kits utilizados para dosagens da MBL. No atual estudo foi utilizado kit R&D Systems®, enquanto no estudo de Luz *et al.* empregou o kit da Antibody Shop®. A diferença principal entre os kits refere-se à especificidade dos anticorpos de captura de MBL em cada ensaio, podendo haver um reconhecimento diferente.

De fato, Garred *et al.* (2003) demonstraram que dependendo da especificidade do anticorpo monoclonal moléculas heteroligoméricas podem ser ou não reconhecidas pelo ensaio de ELISA.

Quando avaliamos a atividade da MBL, observamos diferença estatisticamente significativa, ao comparar o grupo leve com indeterminado ($p= 0,02$); e cardíaco grave com indeterminado ($p= 0,03$), fato este, não observado entre as dosagens séricas, onde os níveis séricos entre os grupos estão, praticamente, equivalentes. Sugerindo, que o kit utilizado para a dosagem pode reconhecer tanto moléculas oligoméricas, quanto moléculas heteroligoméricas, as quais apresentam uma capacidade diferencial de ligação ao carboidrato (DEAN *et al.*, 2006; GARRED *et al.*, 2003; JENSENIUS *et al.*, 2009). Sendo assim, os anticorpos monoclonais de captura, do kit utilizado em nosso estudo, puderam reconhecer uma região da molécula de MBL comum às diversas formas estruturais dessa lectina (oligoméricas e heteroligoméricas).

Jensenius *et al.* (2009) avaliaram a estrutura da MBL por microscopia de força atômica, concluindo que a MBL é uma molécula flexível, o que a torna capaz de se ligar a uma enorme variedade de superfícies patogênicas com diferentes padrões de distribuição de carboidratos. Porém essa flexibilidade fica limitada quando há mudanças na estrutura colagenosa da proteína, como é o caso das moléculas heteroligoméricas.

Os pacientes indeterminados têm capacidade de produzir altos níveis de MBL (média de $2159 \pm 872,3$ ng/mL), porém nem todas as moléculas produzidas são capazes de ligar à manana, pois esse grupo apresentou uma atividade mais baixa entre os grupos estudados assim como elevado Mbi em relação ao grupo de cardíacos graves. O grupo dos cardíacos leves manteve a condição de atividade intermediária de ligação à manana, assim como os níveis séricos.

Por outro lado, 30 % dos pacientes cardíacos graves produziram baixos níveis de MBL associada a uma alta capacidade de ligação à manana. De fato, nossos achados confirmam, que a concentração da MBL e a sua atividade, não necessariamente correspondem (LARSEN *et al.*, 2004). Isto deve ser devido a produção de moléculas variantes de MBL relacionadas com diferentes alelos polimórficos no éxon 1 do gene *MBL2* e sua interação com o polimorfismo da região promotora desse gene (GARRED *et al.*, 2003). Contudo, os estudos de polimorfismos genéticos de MBL e MASP2 apontam o polimorfismo associado com o risco para a forma mais grave de cardiopatia chagásica (BOLDT *et al.*, 2011; WEITZEL *et al.*, 2009).

Neste estudo, pacientes com forma cardíaca leve apresentaram um perfil intermediário de dosagem sérica e de atividade de reconhecimento de manana. Santos *et al.* (2001) expõem, que a MBL pode ter um papel de "faca de dois gumes" e que os níveis intermediários podem trazer vantagens para proteção inata contra uma ampla gama de agentes patogênicos, pois combateria o patógeno sem exacerbar a inflamação causada pelo mesmo. Assim, observamos uma maior proporção de pacientes com níveis baixos e intermediários de MBL e de atividade nos grupos de Chagas indeterminada e cardíaca leve, enquanto que, pacientes com a forma grave da cardiomiopatia, mostraram uma atividade de ligação mais alta e um Mbi mais baixo entre as formas estudadas, sugerindo a existência de formas mais oligomerizadas.

Esses resultados sugerem que há uma maior oligomerização da MBL no grupo com a doença grave em comparação aos grupos com formas de menor gravidade. Este fato pode ser explicado pela presença, no grupo de menor gravidade, de moléculas heteroligoméricas, pois isso afetaria a estrutura oligomérica da MBL e consequentemente sua ligação à manana. Contudo, a maioria dos estudos aponta para associação das formas variantes de MBL com suscetibilidade para progressão da cardiomiopatia. Como nesse estudo não foi possível realizar a genotipagem dos pacientes, essa hipótese necessita ser demonstrada em estudo futuro. Adicionalmente, como as variantes B (54) e D (52) da MBL podem também, quando associadas com o alelo A reconhecer manana em ensaio de ELISA, a presença dessas variantes no grupo da forma cardíaca grave não pode ser descartada (GARRED *et al.*, 2003).

Alternativamente, pacientes com a forma cardíaca grave, mesmo apresentando polimorfismos poderiam apresentar fatores ainda desconhecidos que podem favorecer a oligomerização dessas moléculas, assim como a manutenção mais estável dessa estrutura, o que pode influenciar indiretamente para maior capacidade de ligação nesse grupo em comparação com as formas indeterminada e cardíaca leve.

De acordo, a oligomerização de homopolímeros de MBL, em estruturas triméricas ou tetraméricas influencia diferentes capacidades de reconhecimento do carboidrato (TEILLET *et al.*, 2005). Outros estudos demonstram que estruturas heteroligoméricas da MBL (formadas pela interação de cadeias variantes normais de MBL) também são capazes reconhecer a manana, porém falham em ativar o sistema complemento via MASPs (DEAN *et al.*, 2006; GARRED *et al.*, 2003).

O Mbi estabelecido nesse estudo foi capaz de diferenciar os grupos de pacientes com a forma cardíaca da DC, o que poderia ser útil como parâmetro laboratorial para medir a gravidade da doença em seguimento de paciente com doença de Chagas.

8 CONCLUSÕES

- a) Pacientes com a forma cardíaca grave apresentaram maior capacidade de ligação da MBL.
- b) Pacientes com a forma leve da cardiomiopatia apresentaram capacidade de ligação intermediária.
- c) Pacientes com a forma indeterminada mostraram uma capacidade de ligação mais baixa.
- d) Não foi encontrada diferença estatística comparando os níveis séricos de MBL entre os diferentes grupos de pacientes.
- e) A MBL, possivelmente, pode atuar como marcador da gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2012.
- ABEL L.C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.*, London, v.17, p 99–107, 2001.
- AFONSO A.M.; EBELL M.H.; TARLETON R.L. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, San Francisc, v. 6, p. 1-9, 2012.
- ALVES R.M.A, *et al.* Chagas' disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas' disease in elderly patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v.42, p. 622-628, 2009.
- BAHIA-OLIVEIRA L.M. *et al.* IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz. J. Med. Biol. Res.*,v.31, p. 127–131, 1998.
- BELKAID Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.*, London, v.7, p. 875–888, 2007.
- BOCCHI, E. et al. The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report. *J. Heart. Lung. Transplant.*, New York, v.20, p 637-645, 2001.
- BOLDT, A.B.; LUZ P. R.; MESSIAS-REASON I.J. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clin. Immunol.*, Orlando, v. 140, p.63-70, 2011.
- BOZELLI C.E., *et al.* Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com doença de Chagas no Hospital Universitário de Maringá, Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 22, p. 1027-1034, 2006.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v. 38, Suppl. 3, p. 1-29, 2005.
- BRAZ, S. C. de M. *et al.* Chagas disease in the state of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 44, p.318-323, 2011.
- BUSCAGLIA, C.A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.*, London, v. 4, p. 229–236, 2006.
- BUSTAMANTE J. M.; BIXBY L. M.; TARLETON R. L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8_T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat. Med.*, New York, v. 14, p.542–550, 2008.
- CARVALHO, E. G.*et al.* Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças, *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.*, v.30, p.187–193. 2007.

- CASTRO, C. *et al.* Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em área endêmica de doença de Chagas, em um período de 13 anos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v. 27, n. 4, p. 227-233, 1994.
- CESTARI I., *et al.* Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Mol. Immunol.*, Oxford, v. 53, p. 328–33, 2013.
- CESTARI, I.; RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS One.*, San Francisco, v. 5, p. 1-11, 2010.
- CESTARI, I.S. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Immunol.*, Oxford, v. 47, p. 426–437, 2009.
- CESTARI, I. *et al.* Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, Oxford, v. 198, p.1276–1283, 2008.
- CHAN, R. K.; *et al.* The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J. Immunol.*, Bethesda, v.177, p.8080-5, 2006.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. *et al.* The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, Rio de Janeiro, v. 94, p. 253-255, 1999.
- COLLISON LW, *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nat.*, Basingstoke, v. 450, p. 566–569, 2007.
- CUNHA-NETO, E. *et al.* Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v. 31, p. 133-137, 1998.
- DEAN M.M., HEATLEY S., *et al.* Heterooligomeric forms of codon 54 mannose binding lectin (MBL) in circulation demonstrate reduced in vitro function. *Mol. Immunol.*, Oxford, v. 43, p.950-961, 2006.
- DIAS, J.C.P. *et al.* Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 41, p. 193-196, 2008.
- DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tis. Antigens*, Oxford, v.68, p.193-209, 2006.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES initiative. *Doenças Negligenciadas*. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx> Acesso em: 15 mar 2013.
- DUTRA, W. O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 208-218, 2009.

DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, London, v. 21, p. 287-292, 2008.

DUTRA, W. O. ROCHA M. O, TEIXEIRA M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends. Parasitol.*, Oxford, v.21, n.12, p. 581-587, 2005.

FERREIRA, L. F. *et al.* Chagas disease in prehistory. *An. Acad. Bras. Cienc.*, Rio de Janeiro, v.83 n.3 p1041-1044, 2011.

FILHO, R.M. *et al.* High frequency of variant alleles of the Mannose-Binding Lectin 2 (MBL2) gene are associated with patients infected by Hepatitis B vírus. *Viral. Immunol.*, New York, v. 23, n. 4, p 449- 453. 2010.

FORNACIARI G, *et al.* Chagas' disease in a Peruvian Inca mummy. *Lancet*, London, v.339, p.128–129, 1992.

FRASER, D. A *et al.* C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v.80, p.107-16. 2006.

FUENMAYOR, C. *et al.* Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. *Acta. Cardiol.*, Bruxelas, v.60, p. 33-67, 2005.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev. Immunol.*, London, v.2, p.346-53. 2002.

GADVEJA M.; STEFFEN T.; JENSENIUS J.C. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, London.v. 13, p.74-78. 2001.

GARCIA, S. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Washington, v.49, p. 1521-1528, 2005.

GARRED, P. *et al.* Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Mol. Immunol.*, Oxford, v. 40, p. 73–84. 2003.

GODFREY D.I.; KRONENBERG M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v.114, p. 1379-1388, 2004.

GOMES J.A. *et al.* Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect. Immun.*, Washington, v. 73, p. 7960–7966, 2005.

GOMES, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: MALTA, J. *Doença de Chagas*. São Paulo: Sarvier, p. 202, 1996.

GORLA D, Noireau F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: Telleria J, Tibayrenc M, (Ed.) *American trypanosomiasis (Chagas disease)*. One hundred years of research. 1st edition. Burlington (VA): Elsevier Inc;. p. 209–231. 2010.

HEITZENEDER S, *et al.* Mannan-binding lectin deficiency — Good news, bad news, doesn't matter?. *Clin. Immunol.*, Orlando, v. 143, p. 22–38, 2012.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* Palo Alto, v. 21, p. 547–578, 2003.

HYLAND KV, *et al.* Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. *Infect. Immun.*, Washington, v. 75, p.3641–3650, 2007.

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC. Doença de Chagas. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4> > Acesso em: 5 mar 2013.

IP, W.K.E.; *et al.* Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol. Rev.*, Oxford, v.230, p.9-2, 2009.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: Targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol. Rev.*, Oxford. v. 180, p. 86-99, 2001.

JANEWAY, C.A. JR; MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, Palo Alto, v. 20, p.197-216, 2002.

JENSENIUS H, *et al.* Mannan-Binding Lectin: Structure, Oligomerization, and Flexibility Studied by Atomic Force Microscopy. *J. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.391, p. 246–259, 2009.

JORDAN, J. E.; *et al.* Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation.*, Hagerstown v.104, p.1413-8, 2001.

KALIL, K.F. *Análise do Polimorfismo no éxon 1 do gene da Lectina de Ligação à Manose (MBL) em indivíduos primoinfectados por Plasmodium vivax.* Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

KAHN, S., *et al.* The Major Surface Glycoproteins of Trypanosoma cruzi Amastigotes Are Ligands of the Human Serum Mannose- Binding Protein. *Infect. Immun.*, Washington v.64, p. 2649–2656, 1996.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol.*, Oxford, v. 21, n. 11, p. 513-516, 2005.

KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus. Med.*, Oxford, v.12, p. 335–52, 2002.

KOLLIEN, A.H. ; SCHAUB, G.A. Development of Trypanosoma cruzi after starvation and feeding of the vector - a review. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, Tokyo . v.23, p.335–340, 1998.

LAMBRIS, J.D. *et al.* Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, London, v. 6, p.132–142, 2008.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 494p, 2005.

LARSEN F, *et al.* Disease-associated Mutations in Human Mannose-Binding Lectin Compromise Oligomerization and Activity of The Final Protein. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 279, p. 21302–21311, 2004.

LEDERBOUR, C. C.; DIAS, J. C. P.; VINHAES, M. C. Relatório Final. II Reunião Anual de Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas. *Boletim Eletrônico da Secretaria de Vigilância em Saúde*, Uberaba, p.1-5, 2004.

LEMOS E.M., *et al.* Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal Chagas disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, Orlando, v.88: 150-155. 1998.

LEON-PEREZ, F. *et al.*, Mexican *Trypanosoma cruzi* isolates: in vitro susceptibility of epimastigotes to anti-trypanosoma cruzi drugs and metacyclic forms to complement mediated lysis. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* Larchmont, NY. v.7, p.330–336, 2007.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia médica e imunologia. Porto Alegre: Artmed, 2006.

LIEKE T, *et al.* NK-cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect. Immun.*, Washington, v.72, p. 6817-6825, 2004.

LIPSCOMBE R.J., SUMIYA M., HILL A.V. High frequencies in African and non-african populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 1, p.709-15. 1992.

LORENA, V.M.B. *et al.* Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.*, Oslo, v. 72, p. 529–539, 2010.

LUZ, P. R. *et al.* High levels of mannose-binding lectin are association with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int. J. Cardiol.*, Amsterdam, v. 143, p.448-50, 2009.

MACHADO F.S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.*, Berlin, v.34 p. 753-770, 2012.

MARIN-NETO, J.A. *et al.* The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 319-324, 2009.

MARTINS-MELO, F.R. *et al.* Epidemiology to mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.

MELO, A.S. *et al.* Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. *Rev.Bras. de Hem. e Hemot.*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 69-73, 2009.

OLIVEIRA JR., W. All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI century. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 181-186, 2009.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE <Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>> Acesso em: 25 jan. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Control of Chagas disease*. Geneva (WHO Technical Report Series, 905), 2002.

PETERSEN, S. V, *et al.* An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam v. 257, p.107–16, 2001.

PIRON, M. *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion.*, Philadelphia, v. 48, n. 9, p. 1862-1868, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet*, London, v. 1, p. 92-100, 2001.

RASSI JUNIOR *et al.* American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, Philadelphia, v.26. p.275–291 2012.

RASSI JUNIOR, A. *et al.* Chagas disease. *Lancet*, London, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REIS, D.D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 48, n.5, p. 637-642, 1993.

ROTHFUCHS AG, *et al.* Mannose-Binding Lectin Regulates Host Resistance and Pathology during Experimental Infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 7(11). 2012.

SANTOS, R.R. *et al.* Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v. 37, n. 6, p. 490-495, 2004.

SANTOS I KF M, *et al.* Mannan-Binding Lectin Enhances Susceptibility to Visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, p. 5212–5215, 2001.

SALVATELLA R. Andean subregional Chagas disease area and the Andean initiative of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102 Suppl 1 p. 39–40, 2007.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p.75-85, 2007.

SCHUSTER, J.P.; SCHAUB, G.A. *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *Int. J. Parasitol.*, Oxford v.30, p.1475–1479, 2000.

SØRENSEN R., THIEL S., JENSENIUS JC. Mannan-binding-lectin associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin. Immunopathol.*, Berlin, v. 27, p.299–319, 2005.

SUMMERFIELD, J. A. *et al.* Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *B.M.J.* London, v. 26, p. 1229–1232. 1997

TAKAHASHI, K *et al.* Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology*, Amsterdam, v. 216. n. 1-2. p. 96-102, 2010.

TEILLET F, *et al.* The Two Major Oligomeric Forms of Human Mannan-Binding Lectin: Chemical Characterization, Carbohydrate-Binding Properties, and Interaction with MBL-Associated Serine Proteases. *J. Immunol.*, Bethesda, v 174:p.2870-2877, 2005.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol.*, Amsterdam v.40, n.7, Nov, p.423-9. 2003.

TURNER M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today*, Barking, v. 17, p.532–540, 1996.

VASCONCELOS, R.H. *et al.* Immunoglobulin M antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Hum. Immunol.*, New York, v.72, p 402-405. 2010.

VERÇOSA, A. F. A. *et al.* Chagas' Disease: IgG Isotypes against Cytoplasmatic (CRA) and Flagellar (FRA) Recombinant Repetitive Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagasic Patients. *J. Clin. Lab. Anal.*, Hoboken v. 21, p. 271-276, 2007.

VIOTTI *et al.* Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington. v 58. n 2. p. 635–639, 2014.

VITELLI-AVELAR DM, *et al.* Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3.CD16.CD56 natural killer T cells and CD4.CD25^{Hi} regulatory T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, Oxford 62: 297-308. 2005.


WEIS, W.I., Drickamer, K., Hendrickson, W.A. Structure of a C-type mannose binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature*, Basingstoke, v. 360, p.127–134, 1992.

WEITZEL T, *et al.* Mannose-binding lectin and Toll-like receptor polymorphisms and Chagas disease in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v. 86, p. 229–232. 2012.

WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G.; MULLIGHAN, C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern. Med. J.*, Carlton. v. 35. n. 9. p. 548-555. Set. 2005

ZHENG SG, *et al.* Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25² cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J. Immunol.*, Bethesda v. 172, p. 5213–5221, 2004.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA PACIENTE CHAGÁSICO**

Projeto: CORRELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.

Eu, _____,
 RG _____, residente na _____,
 bairro _____, município _____, estado _____, usuário do
 telefone (____) _____, abaixo assinado, atesto que aceito participar desse estudo cujo
 objetivo é analisar genes (DNA) que fazem parte do sistema imune (sistema de defesa do
 organismo) e estariam influenciando o nível sanguíneo de citocinas (substâncias liberadas na
 corrente sanguínea pelas células do sistema imune). O estudo irá analisar se estes genes podem
 estar influenciando no desenvolvimento de uma determinada forma clínica crônica da Doença
 de Chagas. Fui informado que como indivíduo selecionado para o estudo terei 1 colher de sopa
 (15 ml) de meu sangue coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e
 descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é
 descartável, porém, poderá causar dor ou hematoma. Também fui informado que meu sangue
 será separado e que o soro (parte líquida) e o DNA das células do sistema imune serão
 guardados a -20°C para depois serem analisados, durante a execução deste estudo. Fui
 informado ainda que, se os genes que influenciam na quantidade destas substâncias produzidas
 pelo sistema imune funcionarem para diferenciar as formas clínicas crônicas da Doença de
 Chagas, serão de grande auxílio para direcionar a conduta dos médicos em relação ao
 tratamento de pacientes chagásicos no futuro. Fui informado que os meus dados serão
 preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui
 informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de
 penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo.
 Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse
 do pesquisador responsável e outra comigo. Atesto que entendi o conteúdo deste termo de
 consentimento, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que
 esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável pelo projeto.


Recife, ____ de _____ de 20__

Assinatura do Participante

Assinatura do pesquisador responsável pelo projeto

Romero Henrique Teixeira Vasconcelos
 Doutorando em Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz
 Telefone para contato: 2101-2561

APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

FORMULÁRIO DE PESQUISA

1. Nome: _____
 Prontuário HUOC: _____ Registro CPqAM: _____ Data da coleta: ____/____/____

2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino

3. Idade: _____
 (1) De 18 a 39 anos (2) De 40 a 59 anos (3) A partir de 60 anos (4) Ignorada

4. Situação trabalhista:
 (1) Empregado (2) Desempregado (3) Aposentado (4) Do lar (5) Ignorada

5. Endereço: _____
 Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____

6. Município de nascimento: _____ Estado: _____

7. Forma provável de contaminação:
 (1) Vetorial (2) Transfusional/ Transplante de órgão (3) Congênita
 (4) Oral (5) Acidente de laboratório (6) Ignorada

8. Exames clínicos convencionais:
 RX coração (1) normal (2) dilatação (3) ignorado
 ECG (1) normal (2) alterado (3) ignorado
 RX esôfago (1) normal (2) dilatação (3) ignorado
 Enema opaco (1) normal (2) dilatação (3) ignorado

9. Sorologia:
 IFI (1) positivo (2) negativo (3) ignorada
 HAI (1) positivo (2) negativo (3) ignorada
 ELISA (1) positivo (2) negativo (3) ignorada

10. Forma clínica crônica:
 (1) Cardíaca (2) Digestiva (3) Indeterminada (4) Mista

11. Medicação (tratamento etiológico):
 (1) Sim – ano de tratamento: _____ (2) Não

12. Outras patologias/agravos/hábitos:
 (1) DIP: _____ (2) Neoplasia: _____ (3) Tabagismo
 (4) Diabetes: _____ (5) Hipertensão: _____ (6) Alcoolismo
 (7) Hipercolesterolemia: _____ (8) Sedentarismo

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br

ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz

Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Correlação entre polimorfismo genético e níveis séricos de citocinas na doença de Chagas crônica.

Pesquisador responsável: Romero Henrique Teixeira Vasconcelos

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 10/03/10

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 02/10

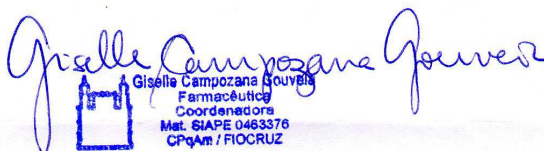
Registro no CAAE: 0001.0.095.000-10

PARECER Nº 07/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 18 de março de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.


Recife, 18 de março de 2010.


Giselle Campozana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463376
CPqAM / FIOCRUZ

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 08/10/2010.

ANEXO B – Parecer de Renovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz



Comitê de Ética
em Pesquisa

PARECER DE RELATÓRIO FINAL

Título: “Correlação entre polimorfismos genéticos e níveis séricos de citocinas na Doença de Chagas crônica”

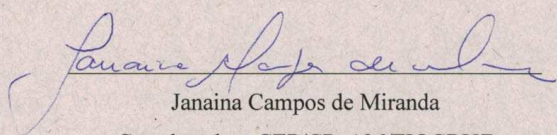
Pesquisador responsável: Romero Henrique Teixeira Vasconcelos
Instituição onde foi realizado o Projeto: CPqAM
Instituições Envolvidas: CPqAM/ FIOCRUZ
Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM: 18/03/2010
Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM: 06/03/2013
Registro no CAAE: 0001.0.95.000.10

Prezado Dr. Romero,

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 06 de março de 2013, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, número 196, de 10 e outubro de 1996 ([HTTP://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/resolucao196-96.doc](http://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/resolucao196-96.doc)).



O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação do pesquisador responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 06 de março de 2016. Foram acatadas todas as alterações metodológicas que constam no relatório (incluindo o estudo da lectina ligante de manose – MBL). Houve a inclusão na equipe executora de ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO.

Recife, 11 de março de 2013.



Janaina Campos de Miranda
Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

1/2