

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MENEGHETTI DA ROSA

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE E DE C3 EM  
PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

CURITIBA

2020

JULIANA MENEGHETTI DA ROSA

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE E DE C3 EM PACIENTES  
COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Medicina, no  
Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna  
e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da  
Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Kárita Cláudia Freitas Lidani  
Co-orientadora: Dra. Iara Messias-Reason

CURITIBA

2020

R789 Rosa, Juliana Meneghetti da

Concentração sérica da lectina ligante de manose e de C3 em pacientes com doença arterial coronariana [recurso eletrônico] / Juliana Meneghetti da Rosa. – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Kárita Cláudia Freitas Lidani

Coorientadora: Dra. Iara Messias-Reason

1. Lectina de ligação a manose da via do complemento.
2. Proteínas do sistema complemento. 3. Lectina de ligação a manose da via do complemento. I. Lidani, Kárita Cláudia Freitas. II. Reason, Iara Messias. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA MENEGHETTI DA ROSA** intitulada: **CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE E C3 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica

24/08/2020 23:56:26.0

KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/08/2020 17:43:15.0

MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL

Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/08/2020 13:18:25.0

IGOR ALEXANDRE CÔRTEZ DE MENEZES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Rua General Cameiro, 181 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80080-900 - Tel: (41) 3360-1073 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 50501

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 50501

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram de alguma forma na realização desse trabalho para a conclusão do mestrado em Medicina Interna.

À Dra. Kárita Cláudia Freitas Lidani, por sua excelente orientação. Obrigada por sua importante e fundamental ajuda na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Iara José de Messias-Reason por sua importante coorientação e colaboração.

À Dra Fabiana Antunes Andrade por sua importante colaboração para realização deste trabalho.

Agradecer à Dra. Lorena Bavia por sua importante ajuda e disponibilidade de seu tempo nos auxiliando, sempre dedicada, atenciosa e ética.

Ao Dr Renato Mitsunori Nisihara, Altair Ambrosio e à Leia de Sena Barboza pela colaboração nos auxiliando na realização das dosagens.

À Dra Vanessa Picceli pela sua colaboração na elaboração deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Hemodinâmica e de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR por sua importantíssima ajuda na realização das coletas, que foi fundamental para a realização do trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** Na doença arterial coronariana (DAC) o desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio para o miocárdio pode gerar isquemia, de intensidade variada, sendo sua principal causa a doença aterosclerótica coronariana. A DAC é responsável por cerca de 7,4 milhões de mortes anualmente em todo o mundo. O sistema complemento (SC) é parte do sistema imune inato, e uma vez ativado pode induzir o processo inflamatório e contribuir para a patogênese da DAC, em parte, pela ação da Lectina Ligante de Manose (MBL). A MBL é componente chave da ativação da via das lectinas do SC, que pode se ligar a carboidratos presentes em tecidos cardíacos lesionados, levando a ativação do SC e alta expressão de C3 em lesões ateroscleróticas. Dessa forma, tanto MBL como C3 podem apresentar-se como potenciais candidatos a fator de risco para o desenvolvimento e gravidade da DAC. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a concentração sérica de MBL e C3 em pacientes com suspeita de DAC, incluindo um grupo de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM); em comparação a controles saudáveis. **Método:** Os níveis séricos de MBL foram determinados pelo método de ELISA em 119 pacientes sintomáticos para DAC, sendo 48 com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (IAM); e em 93 controles. Os níveis de C3 foram determinados por imunoturbidimetria em 118 pacientes, 48 com IAM, e em 58 controles. Dentre pacientes, 87 (73,11%) apresentaram angiografia coronária alterada. As características clínicas foram obtidas a partir de registros médicos e entrevistas. A distribuição da normalidade de cada variável foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Associações pareadas foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman para variáveis não paramétricas. A análise estatística foi realizada usando o STATA e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** A concentração sérica de MBL foi significativamente maior no grupo de pacientes que em controles ( $p=0,002$ ), independente da presença de IAM ( $p=0,006$ ). Além disso, altas concentrações de MBL ( $>2000\text{ng/mL}$ ) foram mais frequentes em pacientes ( $p=0,017$  OR 2,2 IC95% 1,1-4,3) quando comparado aos controles. Os níveis de C3 não diferiram significativamente entre o grupo de pacientes e controles ( $p=0,142$ ), ou na presença de IAM ( $p=0,957$ ). Os níveis de C3 foram positivamente correlacionados com IMC ( $p=0,004$ ), triglicérides ( $p=0,002$ ), número de eritrócitos ( $p=0,003$ ) e plaquetas ( $p=0,008$ ). **Conclusão:** Os resultados demonstraram que a MBL pode atuar como fator de risco na fisiopatologia da DAC e C3 como fator de risco cardiovascular.

**Palavras-chave:** doença arterial coronariana, sistema complemento, lectina ligante de manose, C3

## ABSTRACT

**Introduction:** In coronary artery disease (CAD) the imbalance between supply and consumption of oxygen to the myocardium can generate ischemia of different intensity. The main cause of this problem is coronary atherosclerotic disease, which is responsible for about 7.4 million deaths worldwide. The complement system (CS) is part of the immune system, and once activated can induce the inflammatory process and contribute to the pathogenesis for cardiovascular diseases. In this context, Mannose Binding Lectin (MBL), a key component of the activation of the Lectin Pathway, can bind to the carbohydrates present in the injured cardiac tissues, leading to the activation of CS as well as C3 deposits in atherosclerotic lesions. Thus, MBL and C3 might be considered potential candidates as risk factors for the development and severity of CAD. **Objective:** The present study aims to evaluate the serum concentration of MBL and C3 in patients undergoing coronary angiography to investigate CAD, including a group of patients with acute myocardial infarction (AMI) compared with healthy individuals. **Method:** Serum MBL levels were determined by the ELISA method in 119 patients symptomatic, 48 of whom were diagnosed with AMI, and in 93 controls. Among patients, 87 (73.11%) had altered coronary angiography. C3 levels were determined by immunoturbidimetry in 118 patients symptomatic for CAD, 48 with AMI and 58 controls. Clinical features were obtained from medical records and interviews. The normality distribution of each variable was assessed using the Shapiro-Wilk test. Paired associations were performed using the Spearman correlation test for nonparametric variables. Statistical analysis was performed using STATA and values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. **Results:** MBL serum concentration was significantly higher in the patient group compared to the controls ( $p=0.002$ ), regardless the presence of AMI ( $p=0.006$ ). In addition, high concentration of MBL ( $> 2000\text{ng / mL}$ ) were more frequent in patients when compared to controls ( $p=0.017$  OR 2.2, 95% CI 1.1-4.3). C3 levels did not differ significantly between patients and controls ( $p=0.142$ ), no for the presence or absence of AMI ( $p=0.957$ ). C3 levels were positively correlated with BMI ( $p=0.004$ ), triglycerides ( $p=0.002$ ), erythrocytes number ( $p=0.003$ ) and blood platelets ( $p=0.008$ ). **Conclusion:** The results demonstrated that MBL may act as a risk factor in the pathophysiology of CAD whereas C3 was associated with cardiovascular risk factors.

**Key words:** coronary artery disease, complement system, mannose-binding lectin, C3

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- FORMAÇÃO DA PLACA DE ATEROSCLEROSE.....	18
FIGURA 2- SÍNDROME CORONARIANA AGUDA.....	19
FIGURA 3- ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	20
FIGURA 4- FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC) E FUNÇÕES DE CADA COMPONENTE.....	24
FIGURA 5- ELISA INDIRETO.....	35
FIGURA 6- IMUNOTURBIDIMETRIA.....	36



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES, E EM RELAÇÃO A PRESENÇA DE IAM OU IC NO GRUPO DE PACIENTES.....	58
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE C3 EM PACIENTES E CONTROLES, E EM RELAÇÃO A PRESENÇA DE IAM OU IC NO GRUPO DE PACIENTES.....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS COM SUSPEITA DE DAC E COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES COM E SEM IAM.....	55
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS PRODUTORES DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES.....	57
TABELA SUPLEMENTAR 1 – NÍVEIS SÉRICOS DE MBL E C3 ENTRE PACIENTES COM SUSPEITA DE DAC SUBMETIDOS À CORONARIOGRAFIA E CONTROLES.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI- angina instável

C1-INH- inibidor da C1 esterase

CK – creatina quinase

CKMB- isoenzima MB da creatina quinase

CL-K1- colectina 11

CT- colesterol total

DAC - doença arterial coronariana

DCVs - doenças cardiovasculares

ELISA- ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo

HAS- hipertensão arterial sistêmica

HDL-C- lipoproteína de alta densidade

HE- hemaglutinação

IAM- infarto agudo do miocárdio

IAMSSST- infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST

IAMCSST- infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST

ICC- insuficiência cardíaca congestiva

IFN- $\gamma$ - interferon- $\gamma$

IL-6- interleucina-6

IL-8 – interleucina-8

IMC- índice de massa corpórea

LDL-C- lipoproteína de baixa densidade

MAC- complexo de ataque a membrana

MASPs- serino-proteases associadas à MBL

MBL- lectina ligante de manose

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde

PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos

SC- sistema complemento

SCA- síndrome coronariana aguda

RNI- razão normalizada internacional

TAP- tempo de atividade da protrombina

TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral

PCR- proteína C reativa

VL- via das lectinas

WHO- Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1. Fisiopatologia da Doença Arterial Coronariana (DAC).....	16
2.2. Sistema Complemento.....	19
2.3. Doença arterial coronariana e o Sistema Complemento.....	26
2.4. Doença arterial coronariana e Lectina Ligante de Manose.....	27
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Aprovação do projeto pelo comitê de ética.....	31
4.2. Desenho do estudo.....	31
4.3. Pacientes.....	32
4.3.1. Dados clínicos e laboratoriais.....	33
4.4. Controles.....	34
4.5. Quantificação de MBL e C3.....	34
4.6. Análise estatística.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a primeira causa de morte no mundo. Aproximadamente 17,9 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2016, representando 31% de todas as mortes. Dentre essas, estima-se que 7,4 milhões foram devido a doença arterial coronariana (DAC) (WHO, 2020). No Brasil, as DCVs representam as principais causas de morte desde 1960 (KATZMARZYK; HEYMSFIELD, 2013) e em 2017, 358.882 brasileiros morreram afetados por essas doenças (DATASUS, 2020). Diante da gravidade deste problema, iniciativas devem ser tomadas para o desenvolvimento de técnicas e busca de marcadores moleculares para a avaliação do risco cardiovascular, tornando possível uma melhor triagem da população com início do acompanhamento e terapêutica o mais precocemente possível (LITWIN, 2008). As DCVs englobam a DAC, doença cerebrovascular, hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita e insuficiência cardíaca (WHO, 2016).

A DAC tem como característica marcante o desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio para o miocárdio, resultando em isquemia de intensidade variada. Sua principal causa é a doença aterosclerótica coronariana (LUZ; FAVARATO, 1999), cujo desfecho está relacionado com o grau de obstrução (PINHO et al., 2010), incluindo desde um espessamento progressivo até a ruptura da placa da parede arterial (GOLDSCHMIDT-CLERMONT et al., 2005). Portanto, dependendo do grau de obstrução, as complicações podem variar desde um quadro assintomático até o desenvolvimento de angina estável, síndrome coronariana aguda (SCA), insuficiência cardíaca aguda, arritmias ou morte súbita (GRACE, 2001; MENEES; BATES, 2010).

O sistema imune inato tem um importante papel na fisiopatologia da aterosclerose (ROSS, 1999) e em doenças cardíacas, como o IAM (VENGEN et al., 2012). A imunidade inata compreende as barreiras físicas e químicas, citocinas, células fagocíticas e NK, peptídeos antimicrobianos e o SC (CRUVINEL et al., 2010). O SC é um dos principais componentes da imunidade inata, tendo eficiente ação sobre microrganismos e a resposta inflamatória como também integrando a imunidade inata e a adaptativa (GARDINALLI et al., 1995). Sua ativação tem importante atuação na patogênese da aterosclerose (GE et al., 2018), contribuindo para o desenvolvimento de algumas DCVs como a DAC, lesão de isquemia e reperfusão e rejeição de transplante, uma vez que sua ativação contribui para o agravamento do dano miocárdico (GARDINALLI et al., 1995). O SC é composto por mais de 50 proteínas solúveis e de

membrana e pode ser ativado por três vias: Via das Lectinas (VL), Via Clássica (VC) e Via Alternativa (VA) (RICKLIN et al., 2010). Subsequente à ativação das três vias, o SC pode executar suas principais funções como: opsonização, fagocitose e lise de partículas alvo através da formação do complexo de ataque a membrana. Além disso, a ativação do complemento pode induzir vários efeitos inflamatórios, tais como promover a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, quimiotaxia, ativação de leucócitos, liberação de espécies reativas de oxigênio, secreção de citocinas e quimiocinas (BELTRAME et al., 2015). Estes efeitos, quando exacerbados ou desregulados, contribuem para a progressão e perpetuação do processo inflamatório.

A VL apresenta papel fundamental na ativação do sistema complemento e está relacionada aos processos de coagulação, inflamação, lesão de tecidos, e contribui para lesão de reperfusão isquêmica (LA BONTE et al., 2012; SINGH et al., 2016). A VL é ativada pela interação da MBL, ficolinas (1, 2 ou 3) ou colectina 11 (CL-K1) com manose, N-acetilglicosamina, frutose, glicose, entre outros resíduos abundantes na superfície de microrganismos, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), alterações de célula apoptóticas, necróticas ou malignas (DAMPs) (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; BELTRAME et al., 2015; HOLERS; BANDA, 2018). A lectina ligante de manose (MBL) é uma proteína de fase aguda (DAHL et al., 2004) e desempenha importante papel na aterogênese, estando presente em placas de aterosclerose rompidas (MATTHIJSSEN et al., 2009). Os níveis plasmáticos de proteínas associadas à MBL, como as serino proteases associadas à MBL (MASP) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAp44), também foram associados com fatores de risco cardiovasculares, incluindo dislipidemia, obesidade e hipertensão (FRAUENKNECHT et al., 2013).

O componente C3 é uma molécula chave do sistema complemento, sintetizado principalmente pelo fígado e também por monócitos, neutrófilos, túbulos renais e célula apresentadora de antígeno. É formado pelas cadeias alfa e beta, ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto. Possui 8 domínios de macroglobulina (MG1-8) com locais de ligação para receptores do complemento (C3aR, CR1, CR2, CR3), proteínas reguladoras da VA e domínio tio éster que é hidrolisado levando ao processo conhecido como C3 “*thick-over*” (DELANGHE et al., 2014; ŁUKAWSKA et al., 2018). C3 fornece fragmentos ativos C3a, C3b, iC3b e C3d que atuam como moduladores inflamatórios, com ações que protegem ou agridem o organismo, dependendo do contexto, regulam o metabolismo celular, a autofagia e colaboram para detectar patógenos intracelulares (ZARANTONELLO et al., 2022; RAWISH et al., 2021). A deficiência de C3 foi associada a doenças graves como, lúpus eritematoso sistêmico, infecções piogênicas

como pneumonia, sepse e meningite (ŁUKAWSKA et al., 2018). Níveis séricos elevados de C3 foram também considerados fator prognóstico para eventos cardiovasculares e mortalidade de pacientes em hemodiálise (LINES et al., 2016), e preditor de IAM em homens (MUCARINI et al., 2000). Altas concentrações de fragmentos de C3, como C3c originado a partir da degradação de C3, foram encontradas no soro de pacientes com insuficiência cardíaca e função sistólica preservada. Logo, esses dados reforçam o papel do componente C3 como potencial biomarcador para insuficiência cardíaca (FREY et al., 2013).

O SC é composto por elementos essenciais para a manutenção da homeostase (LING et al., 2019), incluindo a do sistema cardiovascular. Dessa forma, estudos que explorem o papel de MBL e C3 no desenvolvimento da DAC são de interesse para determinar o seu papel na patogênese da DAC (MARTIN-VENTURA et al., 2019). Nesse contexto, a avaliação das concentrações séricas de MBL e C3 pode contribuir para o esclarecimento da atuação do SC no desenvolvimento de DAC.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Fisiopatologia da Doença Arterial Coronariana (DAC)**

As DCVs são as principais causas de morte em homens e mulheres no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos, as doenças isquêmicas do coração foram responsáveis por 115.058 mortes no Brasil em 2017 (DATASUS, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde as DCVs se desenvolvem por alterações cardíacas e vasculares, dentre elas a DAC, doença cerebrovascular, hipertensão arterial sistêmica, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita e insuficiência cardíaca (WHO, 2016).

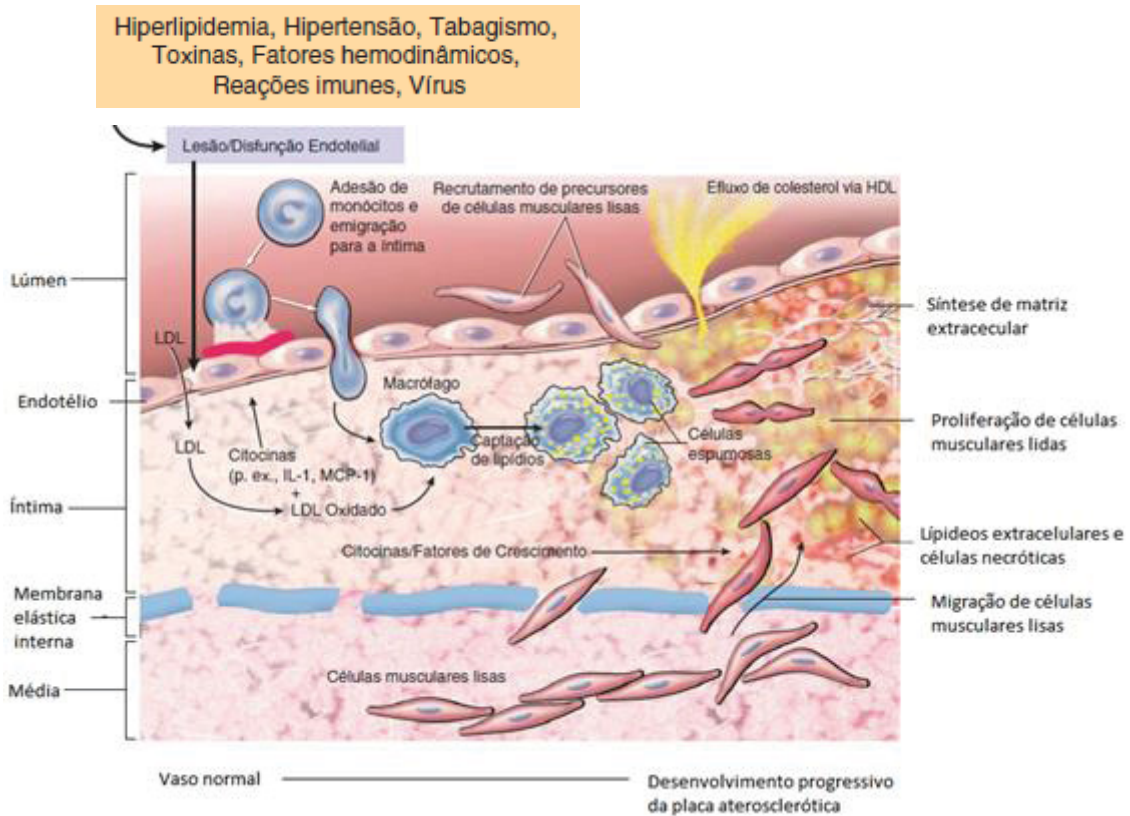
A DAC é caracterizada pela insuficiência de irrigação sanguínea no coração através das artérias coronárias, e tem relação direta com o grau de obstrução do fluxo sanguíneo pelas placas ateroscleróticas (PINHO et al., 2010). As complicações da aterosclerose incluem a estenose arterial, ruptura da placa e trombose (GOLDSCHMIDT- CLERMONT et al., 2005), podendo levar o indivíduo a apresentar angina instável, IAM, acidente vascular encefálico e morte súbita (LIBBY; RIDKER, 2006). Hermann e Lerman (2001) sugerem que vários fatores de risco para a DAC estão diretamente relacionados à disfunção endotelial. Tais fatores de risco causam inúmeras alterações teciduais com consequente prejuízo à biologia vascular, incluindo a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), aumento da formação de radicais



livres e aumento da atividade endotelial. Diversas comorbidades, como as dislipidemias, a aterosclerose e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) apresentam, em sua gênese e/ou em seus mecanismos fisiopatológicos, alterações na função endotelial. Assim, a disfunção endotelial, caracterizada por menor produção e/ou biodisponibilidade de NO representa um dos fatores que contribuem para o aparecimento da DAC (RUSH et al., 2007).

A isquemia tecidual é fortemente atribuída à aterosclerose, a qual se trata de uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta à agressão endotelial. A lesão aterosclerótica acomete principalmente a túnica íntima das artérias, promovendo o aumento da permeabilidade desta camada às lipoproteínas plasmáticas, e conseqüentemente, favorecendo a retenção de partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (HANSSON, 2005). Como consequência da lesão tecidual e acúmulo de lipoproteínas no endotélio vascular, os monócitos sanguíneos migram para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos (LIBBY; THERIOUX, 2005; LIBBY et al., 2013), onde englobam o LDL oxidado, e passam a se chamar células espumosas. Os macrófagos ativados produzem citocinas, que são estímulos para adesão leucocitária, produção de quimiocinas e fatores de crescimento que estimulam células musculares lisas a migrarem para a íntima. Há recrutamento de linfócitos T para íntima, que interagem com macrófagos e podem desencadear um processo inflamatório crônico, estimular proliferação de células musculares e síntese de matriz extracelular (ROBBINS & COTRAN, 2010). Por fim, ocorre o desenvolvimento da placa aterosclerótica, constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular, núcleo lipídico e necrótico (LIBBY; THERIOUX, 2005; LIBBY et al., 2013) (FIGURA 1). Na lesão cardíaca de isquemia-reperfusão ocorrem alterações funcionais e estruturais nas células do tecido cardíaco, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. No momento que se restaura o fluxo sanguíneo podem ocorrer vários efeitos deletérios como: necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular e restauração não uniforme do fluxo para todas as porções do tecido. O retorno da circulação de forma inadequada gera um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local, mais alterações disfuncionais e edema (KÖHLER et al., 2003). Com o conhecimento da ação do sistema imunológico no desencadeamento das lesões pós-injúria cardíaca observou-se que os linfócitos T auxiliares secretam citocinas em resposta ao estímulo isquêmico, que regulam a ativação de diferentes linhagens celulares, inflamação e reparo tecidual. No quadro de isquemia-reperfusão, as citocinas, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas IL-6 e IL-8 podem ser liberadas mediando a resposta inflamatória sistêmica (WAN; LECLERC; VINCENT, 1997). O TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por macrófagos, e também por

linfócitos e células NK, contribui para disfunção miocárdica pós isquemia pela ação depressora da contratilidade e pela indução de apoptose do miócito (MELDRUM, 1998). Essa depressão acontece devido a mecanismos dependentes e independentes do óxido nítrico (LIUZZO et al., 1994).

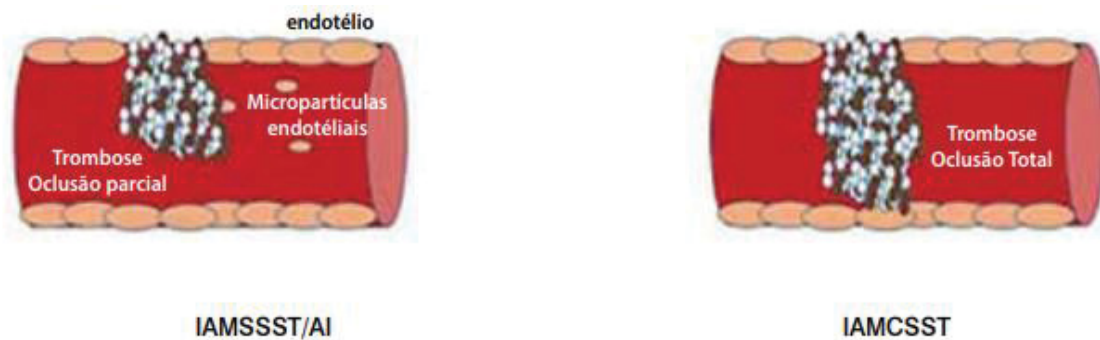


**FIGURA 1. FORMAÇÃO DA PLACA DE ATEROMA:** Os fatores de risco como hipertensão, tabagismo, dislipidemia, entre outros, contribuem para lesão endotelial, levando ao aumento da permeabilidade vascular e retenção de LDL, estímulo para adesão leucocitária. Monócitos migram para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos, que captam LDL oxidado se tornando células espumosas, responsáveis pela progressão da placa. Os macrófagos ativados atuam na secreção de citocinas, que amplificam a inflamação e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais. As células musculares lisas da camada média migram para a camada íntima, onde passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular, que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica.

**FONTE:** ROBBINS E COTRAN, 2010.

A DAC estável pode levar ao desenvolvimento de angina, caracterizada por dor ou desconforto em tórax, epigástrio, mandíbula, dorso, ou membros superiores, é precipitada ou agravada por esforço físico ou estresse emocional, devido ao aumento da necessidade de oxigênio pelo músculo cardíaco e impossibilidade de fornecimento de oxigênio, levando a isquemia, com possibilidade de evolução desse quadro por meses ou anos (Diretriz de Doença Coronária Estável, 2014). A DAC instável pode levar ao desenvolvimento da síndrome coronariana aguda (SCA), condição caracterizada pela ruptura da placa de aterosclerose, levando ao IAM com supradesnível do segmento ST (IAMCSST), com oclusão total do vaso,

o que resulta em infarto transmural. A oclusão parcial pode apresentar-se como angina instável (AI), caracterizada por dor de início a menos de dois meses, duração maior que vinte minutos, angina em crescendo previamente diagnosticada e que se torna mais frequente, com maior duração e um menor limiar, ou IAM sem supradesnível do segmento ST (IAMSSST), sendo diferenciados pelos marcadores de necrose miocárdica, presentes no IAMSSST (HEDAYATI, 2018) (FIGURA 2).



**FIGURA 2.** SÍNDROME CORONARIANA AGUDA. A oclusão parcial de vasos coronarianos leva ao infarto do miocárdio sem supradesnível do segmento ST (IAMSSST) e angina instável. A oclusão total leva ao infarto do miocárdio com supradesnível do segmento ST (IAMCSST).

**FONTE:** FONSECA et al., 2016.

## 2.2. Sistema Complemento

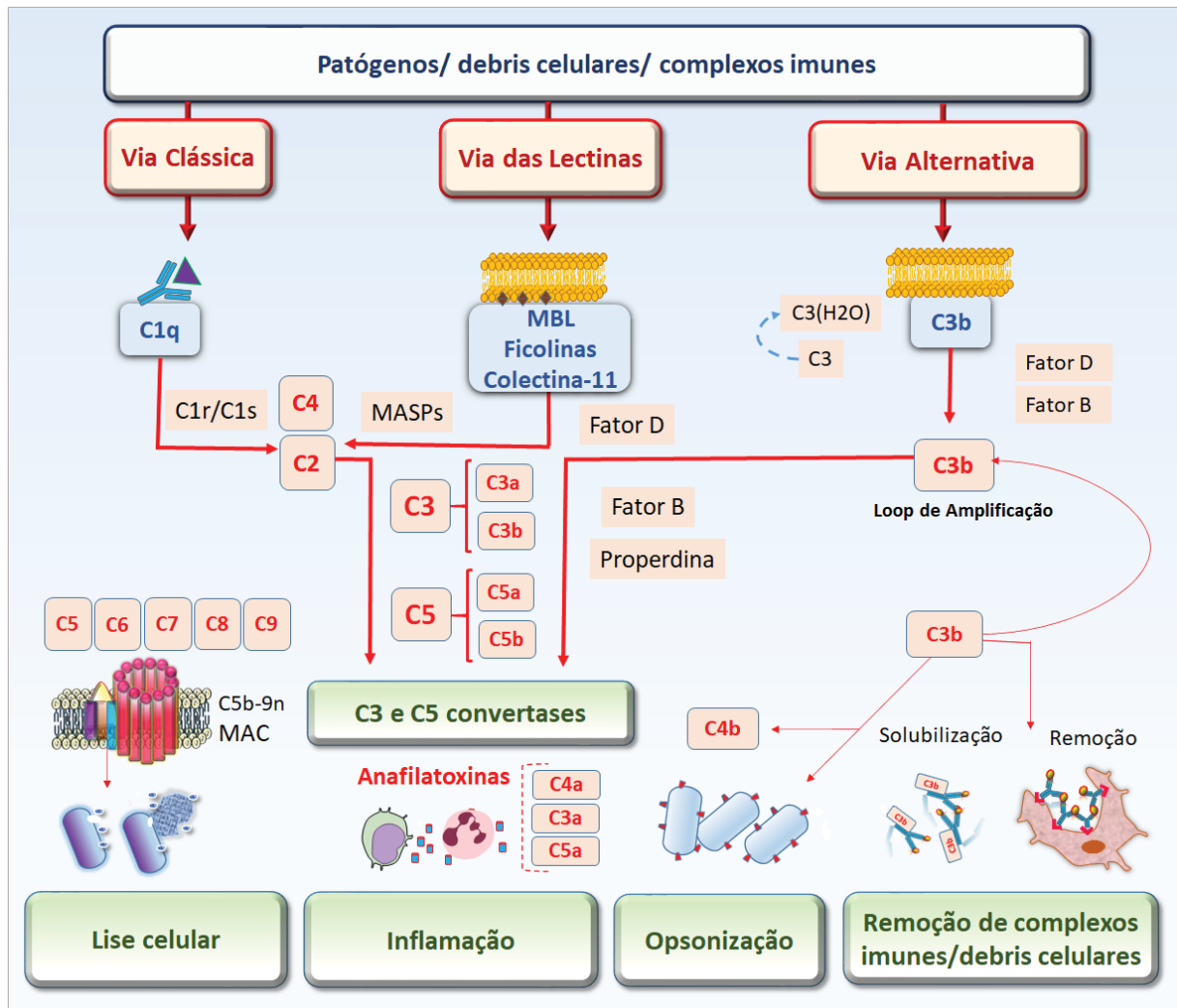
O SC corresponde a um ramo central da imunidade inata, com mais de 50 proteínas plasmáticas, receptores e reguladores de superfície, sendo um importante mediador inflamatório, que podem atuar independentemente ou em colaboração com outros mecanismos de defesa da imunidade inata e adquirida do hospedeiro (VARELA; TOMLINSON, 2015; RICKLIN et al., 2010). Essas proteínas são sintetizadas principalmente pelo fígado, monócitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais do trato gastrointestinal e urinário (VARELA; TOMLINSON 2015).

O SC induz uma série de funções efetoras da resposta imune (FREELEY et al., 2016), que incluem opsonização, fagocitose, lise de patógenos, remoção de células apoptóticas e debris celulares, além de solubilização, transporte e eliminação de complexos imunes. Atua também na proteção contra o desenvolvimento de autoimunidade (LING; MURALI, 2019). Ainda, o SC possui um papel central na resposta inflamatória. Sua ativação estimula efeitos pró-inflamatórios através da quimioatração e ativação de leucócitos (macrófagos e neutrófilos principalmente) (HOLERS, 2014; LIDANI et al., 2021), que liberam citocinas como TNF- $\alpha$ , interleucina-1 (IL-1) e IL-6. Essas citocinas aumentam a produção de proteínas do

complemento e agentes de fase aguda diante de um processo inflamatório ou infeccioso (LING; MURALI, 2019).

### 2.2.1 Ativação do Sistema Complemento

O SC é ativado por três vias de ativação: a Clássica (VC), das Lectinas (VL) e a Alternativa (VA). Todas as vias convergem na clivagem de C3 para a formação de complexos enzimáticos C3 e C5 convertases, culminando com a formação do complexo de ataque a membrana (MAC), que irá promover a lise celular (BAHIA et al., 2016) (FIGURA 3).



**FIGURA 3. ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.** O sistema complemento pode ser ativado através de três vias. A Via Clássica, ativada por ligação de C1q à superfície do patógeno. A Via das Lectinas, ativada pela ligação de MBL, ficolinas ou colectinas a açúcares. A via alternativa, por hidrólise espontânea de C3 à superfície de patógenos. As três vias convergem para a produção de convertase C3, que cliva C3 em C3b e C3a. A ligação de C3b à convertase C3 forma convertase C5, que é responsável pela clivagem de C5 em C5a e C5b. Esse evento comum às três vias irá resultar na amplificação do processo inflamatório, com a liberação de anafilatoxinas, lise do patógeno a partir da formação do complexo de ataque à membrana (MAC), opsonização e remoção de complexos imunes e debris celulares. **FONTE:** Modificado de LIDANI et al., 2020

A VC é ativada pela interação de C1 a complexos imunes, reconhecimento de C1q por domínios Fc em IgM ou IgG agrupados, PAMPs, lipopolissacarídeos, porinas de bactérias gram-negativas, fosfolipídeos, pentraxinas, elementos de células apoptóticas, entre outros (FRAZER-ABEL et al., 2016; VARELA; TOMLINSON 2015). Sua ativação é iniciada pelo complexo C1, formado por uma molécula de C1q, duas moléculas de C1r e de C1s. O C1q é composto por seis subunidades idênticas com cabeças globulares e caudas longas que se ligam a C1r e C1s para formar o complexo C1 (C1q:C1r<sub>2</sub>:C1s<sub>2</sub>). As cabeças globulares de C1q ligam-se à região constante das moléculas de imunoglobulina (IgM ou IgG), complexos imunes ou diretamente na superfície do patógeno. Esta ligação promove mudanças conformacionais em C1r ativando-o, o qual ativa o C1s, que, por sua vez, passa a exibir um sítio catalítico de serino-protease podendo clivar os componentes C4 em C4a (liberado na circulação) e C4b (opsonina), e C2 em C2a e C2b. C1s cliva C4 e expõe um grupo tioéster interno, inacessível no C4 nativo, que possibilita a ligação covalente de C4b à grupos amina e hidroxila de superfícies celulares. C2 se associa a C4b e é clivado por C1s em C2a e C2b (liberado na circulação), onde o C2a permanece ligado a C4b formando a C3 convertase da VC (C4b2a), uma protease chave na cascata do complemento (FRAZER-ABEL et al., 2016). C4b, C3b também expõe um grupo tioéster interno, inacessível no C3 nativo, que possibilita sua ligação covalente a grupos amina e hidroxila presentes em superfícies celulares (MORGAN et al., 1995). C3 convertase cliva C3 em C3a e C3b. C3a é uma anafilatoxina que atua na amplificação do processo inflamatório, e C3b atua na opsonização e pode também se ligar covalentemente com C4b2a formando a C5 convertase desta via (C4b2b3b), que cliva C5 em C5a e C5b dando início à ativação da via terminal do SC (FRAZER-ABEL et al., 2016).

A VL é ativada pela ligação de moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs) tais como lectina ligante de manose (MBL), ficolinas (ficolina-1 ou (ficolina- M), ficolina-2 ou (ficolina L) e ficolina-3 ou (ficolina H), e colectinas (colectina-10, CL-10 ou CL-L1; e colectina 11 (CL-11 ou CL-K1), que se ligam à padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície de patógenos; ou alterações atípicas em glicocalix de células apoptóticas, necróticas ou malignas (DAMPs) (HOLERS; BANDA, 2018; BELTRAME et al., 2015; HEIN, GARRED, 2015, MERLE et al., 2015). MBL, ficolinas ou colectinas formam complexos com dímeros de serino proteases associadas à MBL (MASP), como a MASP-1 e MASP-2, gerando os seguintes complexos: MBL/MASPs, ficolina/MASPs ou CL-K1/MASPs (BELTRAME et al., 2015).

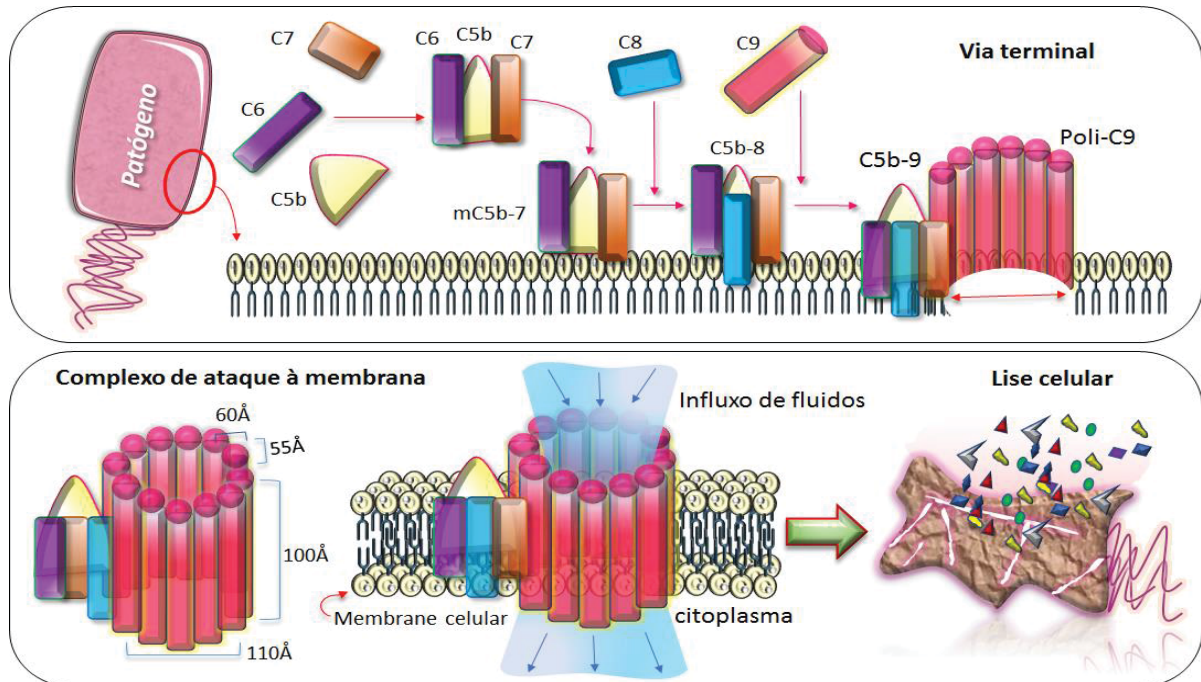
Uma vez que MBL liga-se à superfície de patógenos esta sofre uma alteração conformacional levando a autoativação de MASP-1 que ativa MASP-2 (KIDMOSE et al., 2012;

HÉJA, 2012; YONGQING et al., 2012). MASP-2 cliva os componentes C4 e C2 resultando na formação de C3 convertases (C4b2a), a mesma convertase gerada na VC (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001). Além da MASP-1 e MASP-2 outras proteínas também podem se associar à MBL, como a serino protease MASP-3, e duas proteínas truncadas MAp44 e MAp19, que não possuem domínio serino protease e podem competir com MASP-1 e MASP-2 pela ligação à MBL (DEGN; JENSENIUS, THIEL, 2011; YONGQING et al., 2012; BELTRAME et al., 2015). As proteínas MAp44 e MAp19 não têm o seu papel completamente elucidado, é possível que elas atuem como reguladores negativos na VL (BELTRAME et al., 2015). Entretanto, o principal regulador dessa via é o C1-INH, que atua dissociando MASP-2 do complexo MBL (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). A VL é importante no reconhecimento e remoção de patógenos. A deficiência de seus componentes está associada a infecções recorrentes (TURNER; HAMVAS, 2000). A MBL também possui propriedades de opsonização marcando patógenos e facilitando sua fagocitose (GARRED et al., 2016; PARHAM, 2001). A MBL pode se ligar a cristais de colesterol presentes na placa aterosclerótica (PILELY et al., 2016), células apoptóticas ou necróticas, além de interagir com carboidratos presentes na superfície de patógenos, conferindo-lhe assim a capacidade de reconhecimento tanto de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) como padrões moleculares associados a danos (DAMPS) (BELTRAME et al., 2015).

A VA consiste na atuação do fator B, fator D, properdina e C3. Essa via é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tioéster da cadeia alfa de C3, gerando C3(H2O). Essa hidrólise, conhecida como C3 “tick over”, está constantemente ocorrendo, independente do fator B e fator D, estando sempre pronta para ativação (LUKAWSKA et al., 2018). A hidrólise promove uma alteração conformacional de C3 permitindo a ligação do fator B. Na sequência, o fator D, uma protease plasmática, cliva o fator B em Ba e Bb, sendo essa clivagem mais lenta sem a properdina, que é um regulador ativo dessa via e pode promover de forma independente a ativação em certas superfícies. O fragmento Bb permanece ligado a C3(H2O), formando o complexo C3(H2O)Bb, uma C3 convertase que pode clivar C3 em C3a e C3b (HOLERS; BANDA, 2018). A molécula de C3b liga-se covalentemente à superfície de patógenos ou das células do hospedeiro e desta forma é capaz de se ligar ao fator B, favorecendo a sua clivagem pelo fator D, formando Ba e a protease ativa Bb, resultando na formação da C3 convertase da VA, C3bBb (FRAZER-ABEL et al., 2016; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). C3 convertase pode se ligar a moléculas adicionais de C3b e formar C5 convertase, que cliva C5 em C5a e C5b, culminando na formação do MAC. Como regulador natural da via, o fator H

pode ligar-se ao C3b na fase fluida facilitando a degradação enzimática de C3b, controlando a formação da C3 convertase (VARELA; TOMLINSON 2015).

A ativação das três vias do SC converge para a formação de complexos enzimáticos denominados “C3 convertases” que clivam o componente C3 em C3a, importante mediador inflamatório (anafilotoxina), e C3b, componente de clivagem enzimática (LING; MURALI, 2019). Na VC e VL o C3b associa-se a C4b2a formando a C5 convertase, C4b2a3b. Na VA a C5 convertase é formada pela união de C3b à C3 convertase para formar C3b2Bb. As C5 convertases ligam-se a C5 por meio de C3b, deixando a proteína sob ação da C2a ou Bb, que ao clivá-la forma C5b e C5a (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010), sendo C5a uma anafilatoxina e C5b componente que irá formar o MAC. As anafilotoxinas formadas, C3a, C4a e C5a ativam mastócitos que contribuem para a fase vascular da inflamação (VARELA; TOMLINSON, 2015). O fragmento C5b inicia a via terminal, liga-se à C6 e forma um complexo de fase fluida C5b6. A ligação de C7 gera no complexo um sítio hidrofóbico metaestável que o torna capaz de se inserir em membranas. A inserção mais efetiva ocorre no próximo passo, onde C8 se liga a C5b-7, formando C5b-8. C5b-8 inserido na membrana constitui um receptor para múltiplas moléculas de C9. A ligação e polimerização de várias moléculas de C9 forma o MAC, levando à perda do equilíbrio hidroeletrólítico, com consequente indução de lise da célula alvo (FRAZER-ABEL et al., 2016) (FIGURA 4).



Componentes do Complexo de Ataque à Membrana (MAC)		
Proteína	Componente ativo	Funções
C5	*C5a	Peptídeo pequeno mediador da inflamação - anafilatoxina
	C5b	Inicia a união do MAC
C6	C6	Liga-se à C5b formando o receptor para C7
C7	C7	Liga-se à C5b-C6 inserido na membrana
C8	C8	Liga-se à C5b-C6-C7 e inicia a polimerização de C9
C9	C9n	Polimeriza C5b-C6-C7-C8 para formar o poro na membrana e lisá-la

**FIGURA 4. FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC) E FUNÇÕES DE CADA COMPONENTE.** As vias do complemento convergem para ativação de C5, com a formação de C5 convertase, que cliva C5a e C5b, que se liga a cadeia alfa de C6 formando C5b6. A formação do complexo C5b-7 ocorre através da interação de C7 com a cadeia alfa de C5b em C5b6. A cadeia beta de C8 liga-se ao C5b de C5b-7 associada à membrana e conduz à formação de C5b-8. A ligação de C9 a C5b-8 produz o complexo C5b-8,91, que é integrado a várias moléculas de C9 formando a polimerização C5b-8,9n, C9-C9, incorporando até 16 moléculas de C9. \*C5a não participa da formação do MAC.

**FONTE:** Modificado de LIDANI, 2017.

O SC é ativado por diferentes patógenos e protege contra infecções, doenças crônicas e células displásicas, e na maioria das vezes, poupa as células saudáveis (ESPARZA-GORDILLO et al., 2004). Recentemente foi demonstrado que adipócitos e o próprio endotélio podem expressar fator H, sendo depositado na camada íntima arterial, com provável papel protetor contra danos teciduais decorrentes do excesso de ativação do complemento (OKSJOKI et al., 2003). Além disso, Yasojima e colaboradores (2001) demonstraram em modelo animal que o SC é amplamente ativado em lesões ateroscleróticas.



### 2.2.2 Regulação do Sistema Complemento

A ativação do SC deve ser regulada com o objetivo de limitar possíveis danos ao organismo. Tais reguladores compreendem proteínas solúveis (C1-INH, C4bp, fator I e fator H) e associadas a membrana (CD46, CD55, CD59 e CR1), atuando em várias etapas e de forma distinta (MATHERN; HEEGER, 2015). A VC é regulada pelo inibidor da C1 esterase (C1-INH), C4BP, CR1, FI, CD55 e CD46. C1-INH se liga à enzima ativa, C1r: C1s, fazendo com que ela se dissocie de C1q, que permanece ligado ao patógeno. Atuando dessa maneira, C1-INH limita o tempo durante o qual o C1s é capaz de clivar C4 e C2 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). C1-INH é uma proteína de fase aguda e possui funções biológicas como interação com coagulação/fibrinólise, inativação dos fatores XII, XI, trombina, plasmina, ativação plasminogénio tecidual, e calicreína, aumento da fagocitose, inibição da adesão de leucócitos nas células endoteliais, inibição de todas as vias de ativação do complemento (MEJIA; DAVIS, 2012), inativação de C1r e C1s. C4BP, regulador de fase fluida, promove a clivagem de C4b em iC4b, mediado por FI, e após em C4c e C4d (BAJIC et al., 2015), onde C4d limita a ativação do sistema complemento (LING; MURALI, 2019).

A regulação da VL ocorre por ação de MASP-3, MAP1 (anteriormente denominada MAp44) e MAP2 (anteriormente denominada MAp19), as quais competem com MASP-1 e MASP-2 pelos sítios de ligação em moléculas de reconhecimento de padrões. A VL também é controlada por C1-INH que inibe MASP-1 e MASP-2 (MATHERN; HEEGER, 2015; MERLE et al., 2015). MASP-3 atua inibindo a deposição de C4 no complexo MBL-MASP (DOBÓ et al., 2016). A MAP-1 atua inibindo a formação do complexo MBL-MASP, impedindo a ativação de MASP (DEGN et al., 2013). A MAp19 compete com MASP-2 na ligação com MBL e não permite a clivagem de C4 (IWAKI et al., 2006).

A VA é inibida pelo Fator H, fator de aceleração do decaimento (DAF ou CD55), cofator de membrana (MCP/CD46) e receptor de complemento 1 (CR1). Fator H representa um regulador chave do SC, que se liga à fase fluida de C3b/C3 ligado à superfície (H<sub>2</sub>O), evitando a formação de C3 convertase ou promovendo sua rápida dissociação e atuando como cofator para o Fator I. CD55 compete com o fator B pela ligação com C3b ou desloca o fator B da convertase já formada. O Fator I associado a proteínas cofatores de C3b, como cofator de proteólise de membrana (MCP ou CD46) impedem a formação da C3 convertase pela clivagem de C3b no seu derivado inativo, iC3b. O receptor de superfície celular do complemento tipo 1 (CR1) se liga a C3b em complexos imunes e é cofator para degradação de C3b mediada pelo Fator I. Ainda C3b pode ligar-se a receptores expressos na superfície celular (CR1, CR2, CR3,

CR4) e atuar como opsonina (MATHERN; HEEGER, 2015; SCHATZ-JAKOBSEN, et al., 2016). Apesar do fígado ser o principal local de síntese de Fator H, outras células como monócitos, fibroblastos e mioblastos também são capazes de sintetizar essa proteína (SCHLAF et al., 2001). O regulador de membrana CD59 (proteína inibidora de MAC ou protectina) atua inibindo a formação da MAC e a citólise (LING; MURALI, 2019), além da clusterina que atua impedindo a ligação de C9 ao complexo C5b-8 e da vitronectina que impede a associação de C5b-7 a membranas (BAJIC et al., 2015).

### 2.3. Doença arterial coronariana e o Sistema Complemento

Durante o desenvolvimento das DCVs, fatores como inflamação crônica, alteração na coagulação e fibrinólise resultam em um estado pró-inflamatório e pró-trombótico, os quais contribuem tanto para a gravidade como para a progressão clínica do quadro (ANDREWS et al., 2015). Além disso, os componentes do SC podem depositar-se espontaneamente na lesão aterosclerótica e promover a progressão da lesão pela ativação do complemento (TORZEWSKI et al., 1996). Dessa forma, o SC apresenta-se envolvido em várias DCVs (CUBEDO et al., 2013), apresentando um importante papel na patogênese da DAC (SHIELDS et al., 2017), tanto na formação da placa de aterosclerose, como na exacerbação do dano no miocárdio após isquemia (CUBEDO et al., 2013). Também pode levar a vasculite devido a deposição de imunocomplexos (SMILEY; MOORE, 1989). Diante de um processo inflamatório vascular, o SC pode estar envolvido em diferentes fases da aterosclerose, desde o início da formação de estrias gordurosas até desestabilização de placas maduras (SEIFERT, et al., 1989).

Adicionalmente, o SC pode contribuir para injúria cardíaca de isquemia e reperfusão por meio do processo inflamatório e dano tecidual desencadeado nos tecidos devido a presença de imunocomplexos, fosfolipídeos e proteínas mitocondriais expostos após isquemia tecidual e reperfusão. Essa ativação pode ocorrer pela ligação de C1q ou MBL e ficolinas com seus ligantes, como por exemplo, anticorpos naturais ou proteína C reativa (WALPORT, 2001). O SC apresenta importante atuação na patogênese da DAC, estando associado a instabilidade da placa e a um maior risco de complicações vasculares (JADCZYK et al., 2018). Foi demonstrado que a VL apresenta um papel na instabilidade da placa em pacientes submetidos a endarterectomia de carótidas, com presença de ficolinas e MBL no núcleo necrótico e na camada média da túnica (FUMAGALLI et al., 2017). Por outro lado, C3, componente central do SC, e seus produtos de clivagem, foram associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Depósitos de C3 nas placas de aterosclerose sugerem sua atuação na doença aterosclerótica

(CAI et al., 2019). Além disso, Hertle e colaboradores (2012) sugerem que C3 pode estar relacionado a distúrbios metabólicos, incluindo dislipidemia, diabetes, obesidade, além de atuar no sistema de coagulação e em eventos ateroscleróticos e aterotrombóticos.

Portanto, a ativação do SC nos locais de injúria tecidual promove dano devido a formação dos produtos de ativação como C4b e C3b que darão continuidade a cascata de ativação do SC e culminando com a formação do complexo lítico de membrana. Ainda, neste contexto, os fragmentos C3a e C5a, que apresentam receptores expressos em células da camada íntima de artérias coronárias ateroscleróticas (OKSJOKI et al., 2007), contribuem para o recrutamento e ativação de células inflamatórias, as quais amplificam a injúria tecidual (WALPORT, 2001).

A atuação do SC na aterogênese ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que é ativado em placas de aterosclerose, podendo atuar tanto como agente pró-aterogênico, como ateroprotetor. Pró-aterogênico porque sua ativação contribui com a progressão da aterogênese e desestabilização da placa aterosclerótica, ocasionando quadro de SCA (SPEIDL et al., 2011). Por outro lado, pode melhorar o processo aterosclerótico, uma vez que sua ativação pode desencadear um efeito protetor por meio da remoção de debris celulares e imunocomplexos encontrados nas lesões ateroscleróticas (GARRED et al., 2009). Diante deste cenário há necessidade de estudos que possam contribuir para a elucidação da atuação do SC na DAC.

#### 2.4. Doença arterial coronariana e Lectina Ligante de Manose

Dada a importância da MBL no desenvolvimento da DAC e sua presença em lesões ateroscleróticas, tem-se sugerido sua participação na aterogênese e como um potencial marcador de aterosclerose (VENGEN et al., 2012; SEIFERT et al., 1989). Ainda, a MBL pode atuar com um agente potencializador da injúria cardíaca de isquemia-reperfusão e da rejeição de transplante cardíaco (TIMMERS, et al., 2012; PAGOWSKA-KLIMEK; CEDZYNSKI, 2014). Em associação com a MBL, estão as serino proteases MASP-1, -2 e -3. Estas também foram alvo de estudo em DCVs, onde observou-se que MASP-1 e MASP-2 estão envolvidas com a coagulação sanguínea, MASP-1 fazendo a clivagem de trombina, fibrinogênio e fator XIII, e MASP-2 a protrombina (GARRED et al., 2016). Adicionalmente, em modelo murino, MASP-1 mostrou-se como um importante elo entre a inflamação e a trombose (LA BONTE et al., 2012). Considerando que a VL pode ser regulada pela proteína MAp44 que compete com as MASPs na ligação com MBL, MAp44 pode ter um efeito protetor na DAC, como

preservação da função cardíaca, diminuição do tamanho do infarto impedindo a trombogênese (PAVLOV et al., 2012).

Na homeostasia, a MBL não reconhece elementos do organismo como estranhos. Porém, situações isquêmicas podem acarretar alterações celulares e teciduais levando a glicosilação superficial neste local que podem atuar como sítios de ligação para MBL e ativação da VL levando a lesão tecidual isquêmica (COLLARD et al., 1999; COLLARD et al., 2001). Uma forma de limitar o tamanho da lesão causada pela isquemia é a reperfusão feita o mais precocemente possível através da intervenção percutânea transluminal coronária. Apesar de benéfica, a reperfusão também leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório no local da isquemia, resultando em danos de isquemia/reperfusão ao miocárdio também causados, em parte, pela ativação da VL através de MBL (MOENS et al., 2005; THIEL et al., 2006). Porém, ainda não são bem conhecidos os danos desse processo inflamatório, devido ao fato de não se compreender bem a relação entre os níveis séricos de MBL durante o desenvolvimento de tal evento (SUPER et al., 1989; KOCH et al., 2001; SUMMERFIELD et al., 1997).

Aproximadamente 10% da população geral apresenta deficiência de MBL, que pode ser explicada por polimorfismos no gene *MBL2*. Porém, esta deficiência não está necessariamente associada ao desenvolvimento de doenças (KILPATRICK, 2002). Os níveis séricos de MBL podem ser classificados de acordo com Petersen et al (2001) como baixos ou deficientes para concentração  $\leq 100$  ng/ mL; nível médio, entre 101-2000 ng/mL; e elevado, quando  $>2000$  ng/mL. A deficiência de MBL pode estar associada com maior suscetibilidade a infecções (SUPER et al., 1989); e com o desenvolvimento de doenças crônicas (SAEVARSDOTTIR et al., 2001; KILPATRICK, 2002) e inflamatórias como Lúpus eritematoso sistêmico (LES) (FIDLER et al., 2004; NETH et al., 2001). Acredita-se também que altos níveis de MBL podem aumentar o risco para o desenvolvimento de processos inflamatórios (LIPSCOMBE et al., 1992).

A MBL pode apresentar caráter nocivo no desenvolvimento da DAC (KLIMEK; CEDZYNSKI, 2014), atuando na aterogênese, através da ligação a lipoproteínas que sofreram modificações oxidativas na parede das artérias (MAIURI et al., 2013), desencadeando lesão tecidual (PAVLOV et al., 2012), liberação de citocinas, migração e ativação de macrófagos (NADESALINGAM et al., 2005). Esses eventos conferem a MBL capacidade de atuar na aterogênese subendotelial levando a desestabilização da placa aterosclerótica e desencadeando eventos coronarianos (KELLER et al., 2006).

Trendelenburg e colaboradores (2010) ao analisarem níveis de MBL, de pacientes recrutados do estudo APEX-IAM, o desfecho de quadros de IAMCSST em indivíduos

submetidos a intervenção coronária percutânea, observaram redução da mortalidade nos que apresentavam deficiência ( $\leq 100$  ng/mL) em comparação com níveis suficientes de MBL. A deficiência de MBL reduziu principalmente a taxa de arritmia fatal em pacientes com ICC. Porém a deficiência não afetou o desfecho de morte associada ao choque cardiogênico e a ICC como também não influenciou o tamanho do infarto. Já Vengen e colaboradores (2012) associaram a deficiência de MBL, em indivíduos com suspeita de DAC em indivíduos da Noruega que participaram do estudo HUNT2, a um risco duas vezes maior de IAM e o desenvolvimento de placa de aterosclerose vulnerável, independente dos fatores de risco quando comparado ao controle.

A determinação sérica de MBL, como possível candidato preditivo de fator de risco para eventos coronarianos agudos, foi avaliada em pacientes com IAM e angina instável comparados com indivíduos sem DAC na Suécia. As amostras de sangue foram coletadas logo após a admissão hospitalar e outras duas amostras colhidas 3 e 6 meses após o evento cardiovascular. As concentrações de MBL foram maiores nas primeiras 24 horas após o evento cardiovascular agudo que nos seguimentos no terceiro e sexto mês. Os pacientes com diagnóstico de IAM apresentaram concentrações maiores de MBL quando comparados aos controles. Interessantemente, foi observado que os níveis de MBL se elevam durante o IAM, e, posteriormente, tendem a diminuir sugerindo que tal aumento pode ocorrer dias antes do paciente apresentar o evento, já que são necessários alguns dias de processo inflamatório para que ocorra a elevação dos níveis de MBL (PESONEN et al., 2009). Níveis elevados de MBL também foram associados ao maior risco de desenvolvimento de DAC em homens saudáveis (KELLER, 2006).

## 2.5 Doença arterial coronariana e C3

C3 é um importante fator do sistema imune inato e central componente na ativação do SC. Interage com aproximadamente 25 proteínas solúveis e ligadas à membrana, e participa das três vias de ativação do SC (VC, VL e VA) (DELANGHE et al., 2014). Estudos têm demonstrados que os componentes do SC, tais como proteínas reguladoras e o componente C3, são encontrados em lesões ateroscleróticas na espécie humana (OKSJOKI et al., 2007) e em placas ateroscleróticas de pacientes com IAM (OKSJOKI et al., 2003). O aumento de C3 na camada íntima das artérias com lesões ateroscleróticas sugere sua atuação no desenvolvimento DAC (CAI et al., 2019). Níveis séricos elevados de C3 foram previamente associados à DAC grave e risco de IAM (MUSCARI et al., 1995; SZEPLAKI et al., 2004). Aihara e colaboradores

(2017) demonstraram um papel de C3 no desenvolvimento da aterosclerose e como fator de risco cardiovascular, identificando C3 em lesões ateroscleróticas. Além disso, os produtos de ativação de C3 (C3a e C3b) estão relacionados à aterogênese (KOSTNER, 2004), sendo C3b associado a componentes lipídicos da parede do vaso contribuindo dessa forma para o desenvolvimento da placa aterosclerótica (YASOJIMA, et al., 2001). Já C3a foi associado ao aumento na espessura da camada íntima da carótida de indivíduos fumantes, e às DCVs (HERTLE et al., 2014).

Apesar de C3 ter sido associado a fatores de risco cardiometabólicos como dislipidemia, diabetes, aterosclerose e síndrome metabólica (ONAT et al., 2011), sua atuação nesses eventos não está totalmente esclarecida (NILSSON et al., 2014). Provavelmente deve-se, em parte, ao fato de C3 não ser produzido apenas no fígado, mas também pelo tecido adiposo (CIANFLONE et al., 2003). Sabe-se que níveis elevados de C3 podem afetar adipócitos e macrófagos (MEIJSEN et al., 2002), ocasionar a ativação de C5 e formação de anafilatoxinas C3a e C5a que levam a uma inflamação de baixo grau (PHIELER et al., 2013). C3 pode ainda gerar aumento do metabolismo dos triglicerídeos (ZHOU et al., 2013), influenciar na vulnerabilidade de placas ateroscleróticas e no desenvolvimento da SCA (ZARKADIS, et al., 2001) além de atuar como possível marcador de resistência à insulina e doenças cardiometabólicas (URSINI et al., 2018).

Muscarini e colaboradores (2000) indicaram C3 como um importante fator de risco para IAM em indivíduos que residiam em Bolonha na Itália, com correlação positiva com IMC, lipídeos séricos e pressão arterial. Capuano e colaboradores (2006) concluíram que alta concentração de C3 pode ser considerada como marcador de risco de aterogênese, após observaram correlações significativas com IMC, nível de insulina, triglicerídeos e colesterol em um estudo realizado com moradores de Campânia Itália. Da mesma forma, Engström e colaboradores (2007) observaram correlação positiva entre concentrações de C3 e fatores de risco cardiovascular, incluindo pressão arterial, IMC, colesterol e triglicerídeos, com aumento de DCVs em homens com altos níveis de C3, estudo realizado na cidade de Malmö, Suécia. Já Yan e colaboradores (2016) em estudo realizado em Xangai, associaram níveis de C3 aumentados com IAM e angina estável quando comparados a controles, porém não encontraram correlação com IMC, triglicerídeos, colesterol e glicemia.

Por fim, Ajjan e colaboradores (2005) observaram níveis de C3 significativamente maiores em pacientes de caucasianos submetidos à angiografia coronariana para sintomas típicos de DAC quando comparados aos controles, bem como associados com síndrome

metabólica (JIANG et al., 2014), demonstrando que C3 está envolvido no desenvolvimento da DAC.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo geral

Verificar a influência da concentração sérica de MBL e C3 na doença arterial coronariana.

#### 3.2. Objetivos específicos

- A. Determinar a concentração sérica de MBL e C3 em pacientes que apresentam doença arterial coronariana e controles saudáveis;
- B. Correlacionar a concentração sérica de MBL e C3 com as enzimas cardíacas e com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo em pacientes;
- C. Avaliar a relação entre os eventos cardiovasculares prévios com a concentração sérica de MBL e C3 em pacientes;
- D. Associar fatores de risco cardiovasculares com a concentração sérica de MBL e C3 em pacientes.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1. Aprovação do projeto pelo comitê de ética

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP/HC-UFPR 1.663.023). Os participantes da pesquisa foram orientados sobre a proposta do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 4.2. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal e analítico, em que o recrutamento dos pacientes e controles foi realizado de forma consecutiva e por conveniência baseado no estudo de Frauenknecht e colaboradores (2013) e Schoos e colaboradores (2013). Foram coletadas amostras de 155 pacientes, indivíduos encaminhados à cineangiogramia do HC/UFPR, sendo que a concentração sérica de MBL foi determinada em 119 e de C3 em 118 amostras desse grupo. O grupo controle compreendeu amostras de soro de indivíduos do Biobanco do

HC, armazenadas no banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR.

#### 4.3. Pacientes

Foram incluídos inicialmente no estudo 155 pacientes, sendo 74 (47,7%) do sexo feminino, 81 (52,2%) masculinos, com média de idade de 63,5 anos, 146 (94,2%) euro-brasileiros e 9 (5,8%) afro-brasileiros, submetidos a cineangiocoronariografia para investigação de doença cardiovascular, em que as amostras de sangue foram colhidas no Serviço de Hemodinâmica do HC/UFPR, no período julho de 2016 a fevereiro de 2017. Os critérios de inclusão foram: pacientes submetidos a cineangiocoronariografia e com idade mínima de 18 anos. Pacientes gestantes e com diagnóstico de doenças crônicas, como: autoimunes, infecciosas, neoplásicas e renais foram excluídos do estudo. O número amostral final foi de 119 pacientes, pois 23% (n=36/155) apresentaram algum critério de exclusão como cardiomiopatia dilatada 0,64% (1/155), sífilis 0,64% (1/155) e hemorragia digestiva baixa 0,64% (1/155), transplante cardíaco 0,64% (1/155), miocardite viral aguda 0,64% (1/155), miopatia inflamatória necrotizante 0,64% (1/155), insuficiência renal crônica 0,64% (1/155), usuário de drogas 0,64% (1/155), hanseníase 0,64% (1/155), HIV 1,29% (2/155), com prótese valvar 2,58% (4/155), Doença de Chagas 3,87% (6/155), doença reumática 4,52% (7/155) e neoplasias 5,16% (8/155).

Inicialmente, visando a caracterização dos participantes da pesquisa, foram levantadas as seguintes informações através da aplicação de um questionário (ANEXO 1): idade, sexo, ancestralidade, índice de massa corpórea (IMC), história mórbida atual, história mórbida pregressa e histórico familiar. Esses dados foram coletados durante o processo de atendimento no Serviço de Hemodinâmica do HC/UFPR, uma vez que os pacientes aceitaram participar do projeto.

De acordo com o protocolo de atendimento do serviço, após entrevista e aferição da pressão arterial não invasiva, os pacientes foram encaminhados para a sala de exames, onde foi realizada antisepsia na região que seria colocado o acesso arterial. Um médico cardiologista realizou anestesia local onde foi introduzido o acesso arterial para o procedimento de cateterismo. Após a obtenção das imagens, o cateter foi removido, mas o acesso permaneceu na artéria permitindo a coleta de sangue (8 mL em tubos sem anticoagulante e com EDTA). Após a coleta de sangue, o introdutor foi removido pela equipe do Serviço de Hemodinâmica, com compressão local e curativo compressivo por 24h.



Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburg, Alemanha). Em seguida, as amostras sem anticoagulante foram subdivididas em 3 alíquotas de soro, e armazenadas à - 80°C até serem utilizadas. Já as amostras com EDTA foram subdivididas em plasma e camada leucocitária - que foram armazenados a - 80°C até sua utilização.

#### 4.3.1. Dados clínicos e laboratoriais

Para a caracterização clínico-laboratorial dos 119 pacientes sintomáticos para DAC submetidos a cinecoronariografia foram utilizados os seguintes dados obtidos dos prontuários médicos: A) cineangiocoronariografia; B) exames bioquímicos de enzimas cardíacas (creatina quinase -CK, isoenzima MB da creatina quinase -CKMB e troponina). Para a determinação da gravidade clínica da doença cardiovascular utilizamos os resultados de exames de função cardíaca como o ecocardiograma, com a determinação da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE). Além disso, foram avaliados resultados dos seguintes exames: tempo de atividade da protrombina (TAP) e razão normalizada internacional (RNI), os quais são realizados rotineiramente. Dados do perfil lipídico, como colesterol HDL, colesterol LDL, triglicérides e colesterol total; índice glicêmico, hemograma completo e Proteína C Reativa (PCR) foram obtidas a partir de registros médicos. Altura, peso, pressão arterial e informações sobre tabagismo e alcoolismo foram obtidas durante a entrevista e/ou exames ecocardiográficos.

A hipertensão foi definida como pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial). Os parâmetros do perfil lipídico foram estratificados de acordo com o V Consenso Brasileiro sobre Dislipidemia, considerando dislipidemia como colesterol total maior que 240 mg/dL, LDL-C maior que 160 mg/dL, triglicérides maior que 200 e/ou HDL-C menor que 40 mg/dL. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado usando a fórmula padrão: peso (kg) dividido pela altura ao quadrado ( $m^2$ ) e classificado como  $<30$  kg /  $m^2$  (não obesos) e  $\geq 30$  kg /  $m^2$  (obesos). Os valores de glicemia foram avaliados segundo a Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014, classificando como diabetes mellitus uma glicemia de jejum maior que 126 mg/dl ou glicemia aleatória maior que 200 mg/dL associada a sintomas clássicos de poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.

#### 4.4. Controles

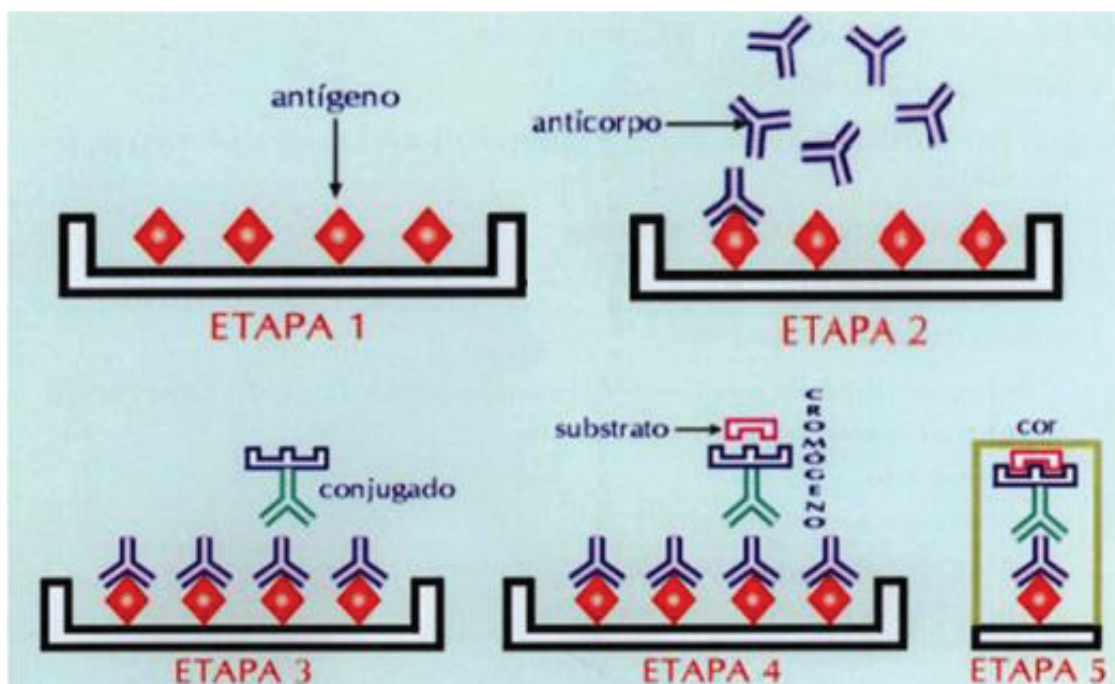
O grupo controle compreendeu 93 amostras de soro de doadores de sangue do Biobanco do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR). Tais amostras estavam armazenadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR, conforme aprovação do CEP com o parecer aprovado em julho de 2017 (número 1457.122/2007-06) e com autorização para o uso no presente trabalho. A amostra foi composta por 65 mulheres (69,9%) e 28 homens (30,1%), com média de idade de 63,6 anos, sendo 17 afro-brasileiros (18,3%) e 76 euro-brasileiros (81,7%).

Também foram incluídos 58 controles, que já apresentavam C3 dosado, provenientes do Banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR), conforme aprovação do Comitê de Ética da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba (1.669.709 e CAAE: 57674716.1.0000.0103) e com autorização para uso. A amostra foi composta por 34 mulheres (58,6%) e 24 homens (41,4%), com média de idade de 51 anos, sendo 58 (100%) euro-descendentes. Tal grupo foi utilizado para as análises de C3.

#### 4.5. Quantificação de MBL e C3

A quantificação de MBL foi realizada pelo método ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) utilizando o protocolo de PERTERSEN e colaboradores (2001). Manana foi diluída (1:3000) em solução tampão de bicarbonato de sódio (0,1 M pH 9,6), aplicada em placa de Elisa (Nunc maxisorb) 100 uL/poço a qual foi incubada a 4 °C por 18 horas. No dia seguinte a placa foi lavada com tampão de lavagem (10 mM Tris Base, 0,14 M NaCl, 0,05% tween 20, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% NaN<sub>3</sub> - azida de sódio -0,015 M, pH7,4) para remoção do excesso da manana. No segundo dia, como tampão de bloqueio a albumina humana foi diluída em tampão de diluição (200 g/L), aplicada 100 uL/poço, incubada a 25°C por 1 hora. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem. O passo seguinte foi diluir as amostras de soro (1:100) em tampão de diluição (20 mM Tris Base, 1 M NaCl, 0,05% triton X, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg de albumina humana/mL, pH7,4). Como curva de referência, empregou-se um pool de plasmas (equivalente a 2000 ng/mL de MBL) que foi diluído seriadamente (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800; 1:1600; branco). Foram aplicadas 100 uL/poço das amostras e da curva previamente diluídas e a placa incubada a 4°C por 18 horas. No terceiro dia a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem, posteriormente realizado a diluição do anticorpo primário monoclonal anti-MBL humana (Antibodyshop cat. 04262T) (1:1000) em tampão de

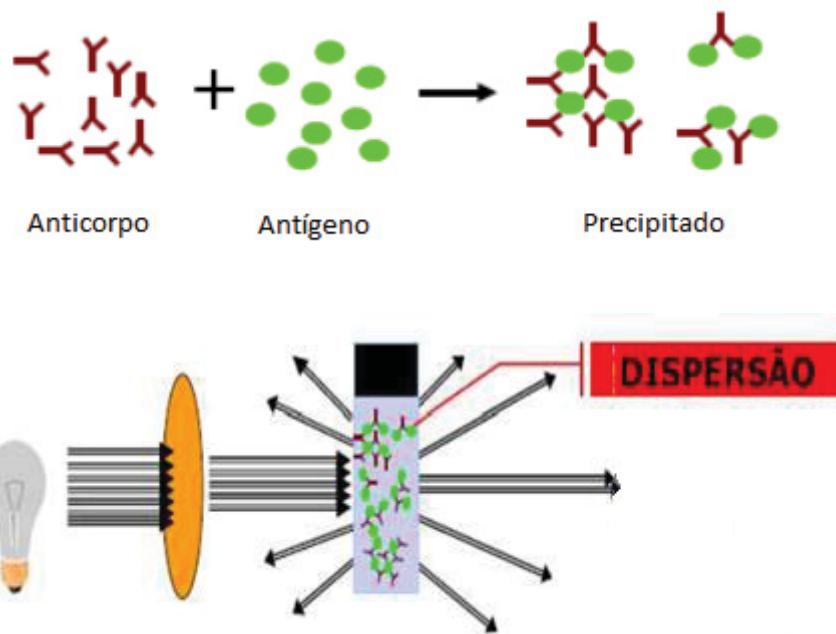
diluição, e então aplicado 100 uL/poço e a placa incubada a 25°C por 1 hora 30 min sob leve agitação. Na sequência a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem. Posteriormente o anticorpo secundário de coelho anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (SIGMAFast pNPP cat. N. 2770) foi diluído (1:1300) em tampão de diluição e aplicado 100 uL/poço sendo incubado 25°C por 60 minutos. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem. Por fim, 100 uL/poço do substrato da fosfatase alcalina (SIGMAFast pNPP cat. N. 2770) foram aplicados sendo incubado a 25°C por 18 h no escuro. A leitura da placa foi realizada a 405 nm (FIGURA 5).



**FIGURA 5.** ELISA INDIRETO. Na etapa 1 o antígeno é adsorvido no poço, posteriormente na etapa 2 é adicionado anticorpo específico ao antígeno. Na etapa 3 é adicionado anticorpo conjugado a uma enzima. Essa enzima reagirá ao substrato que será acrescentado na etapa 4, associado a um cromógeno. Na etapa 5 o substrato é degradado pela enzima, resultando na coloração da amostra.

**FONTE:** Ministério da Saúde, 1998.

A determinação dos níveis séricos de C3 foi feita através de ensaio automatizado de imunoturbidimetria (Beckman Coulter, analisador AU, EUA), utilizando a imunoprecipitação e a dispersão da luz para quantificar a presença de antígeno/anticorpo na solução, com valores de referência variando de 87 a 200 mg/dL, de acordo com o protocolo do fabricante (Beckman Coulter, ref: OSR6159) (FIGURA 6).



**FIGURA 6.** Imunoturbidimetria. Os imunoprecipitados (antígeno-anticorpo), formados na solução, espalham a luz na proporção da sua concentração. Os turbidímetros avaliam a diminuição da luz transmitida (aumento da absorvância) por meio das partículas suspensas em solução devido a formação de imunoprecipitados formados na reação antígeno-anticorpo.

**FONTE:** Labtest, 2009.

#### 4.6. Análise estatística

A distribuição da normalidade de cada variável foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os níveis de MBL e C3 foram comparados entre os grupos usando análise de regressão múltipla, incluindo variáveis com  $p \leq 0,2$  na análise univariada etnia e idade para MBL; e para C3, etnia. Associações foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman para variáveis não paramétricas. A análise estatística foi realizada usando o programa STATA 12.0 (StataCorp, College Station, Texas, EUA), e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O programa GraphPad Prism (versão 6.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para gerar gráficos de boxplot apresentados através de mediana e percentil 5-95%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme norma do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da UFPR, os resultados e discussão da dissertação serão apresentados no formato de artigo a ser submetido à revista indexada na área.

Dos 48 (48/119, 40,3%) pacientes que apresentaram o diagnóstico de IAM, 20,8% (10/48) apresentaram IAMCSST e 18,75 IAMSSST (9/48). Na análise da concentração sérica de MBL entre pacientes sintomáticos para DAC e controles foram encontrados níveis mais elevados de MBL no grupo de pacientes ( $p=0,002$ ), independentemente da presença de IAM ( $p=0,006$ ), assim como níveis mais altos foram encontrados em pacientes com IC do que em controles ( $p=0,018$ ). Considerando MBL  $>2000$  ng/mL, o grupo de pacientes apresentou maior frequência de produtores de MBL altos do que os controles [48/119 (40,3%) vs 21/93 (22,6%)  $p=0,017$ ], assim como na IC [17/37 (45,9%)  $p=0,015$ ], IAM [22/48 (45,8%)  $p=0,012$ ]. Em relação à frequência de indivíduos com deficiência de MBL ( $\leq 100$  ng/mL), não foi observada diferença significativa na comparação do grupo de pacientes e controles (12,6% vs 15,0%  $p=0,688$ ).

Na análise dos níveis séricos de C3 não houve diferença significativa entre o grupo de pacientes e controles (mediana: 143 e 155 mg/dL, respectivamente;  $p=0,142$ ). Foram também observados níveis de C3 similares quando comparados pacientes com presença ou ausência de IAM (mediana: 143,0 mg/dL para ambos;  $p=0,957$ ); presença ou ausência de IC (mediana: 143 e 143,5 mg/dL, respectivamente;  $p=0,737$ ). Em relação aos parâmetros cardiometabólicos, os níveis de C3 foram positivamente correlacionados com IMC ( $p=0,0036$   $r=0,266$ ) e triglicérides ( $p=0,0016$   $r=0,302$ ). Além disso, o perfil hematológico também foi correlacionado positivamente com os níveis de C3, incluindo eritrócitos ( $p=0,0028$   $r=0,305$ ) e plaquetas ( $p=0,008$   $r=0,274$ ). Também foram observados valores de  $p$  próximos à significância adotada ( $<0,05$ ), quando concentrações de C3 foram correlacionadas à concentração de hemoglobina ( $p=0,084$   $r=0,179$ ), ao hematócrito ( $p=0,071$   $r=0,187$ ) e à contagem de leucócitos ( $p=0,084$   $r=0,179$ ).

Os resultados e discussão desta dissertação estão apresentados em formato de artigo, conforme a seguir.

**Mannose Binding Lectin and complement C3: risk factors for coronary artery disease?**  
**Running title: MBL and complement C3 in atherosclerosis**

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Immunopathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná (HC-UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Medicine, Positivo University, Curitiba, PR, Brazil.

†These authors have contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Dr. Iara J de Messias-Reason. Endereço: Rua General Carneiro, 181- Alto da Glória - CEP 80.060-900 - Curitiba/PR, Brasil. E-mail: [iara.reason@hc.ufpr.br](mailto:iara.reason@hc.ufpr.br)

**Abstract**

**Background:** The process of tissue injury in coronary artery disease (CAD) has been associated with activation of the complement system, partly due to the action of mannose-binding lectin (MBL) and C3, which are highly expressed in atherosclerotic lesions. These molecules can therefore be considered candidates as markers for the risk of CAD development. **Aim of the study:** To evaluate the serum levels of MBL and C3 in symptomatic patients undergoing coronary angiography and to compare it with healthy controls. **Methods:** MBL and C3 serum concentration were determined by ELISA and immunoturbidimetry, respectively, in up to 119 patients undergoing coronary angiography, 48 with diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) and 71 without AMI. A total of 93 healthy controls were included in the study. **Results:** MBL serum concentration was significantly higher in individuals with suspected CAD than in the controls ( $p=0.002$ ), irrespective of the presence of AMI ( $p=0.006$ ). Patients with heart failure (HF) also had higher MBL levels than controls ( $p=0.018$  OR: 3.60 95%CI: 1.24-10.41). In addition, high concentration of MBL ( $>2000$  ng/mL) was more frequent in the patient group ( $p=0.017$ ; OR=2.2; 95%CI=1.2-4.3). C3 levels were not significantly associated with any of the patient groups (unobstructive/obstructive CAD, AMI, nor HF), but instead were correlated with cardiometabolic parameters such as body mass index (BMI) and triglycerides. **Conclusions:** higher concentrations of MBL in patients might act as a risk factor and participate in the pathophysiology of atherosclerotic disease. On the other hand, C3 levels were correlated with cardiovascular risk factors but not with heart diseases.

**Keywords:** coronary artery disease, complement system, mannose-binding lectin, MBL, C3

**Acknowledgments**

We thank nurses from the Department of Hemodynamics at Clinical Hospital of Federal University of Paraná for the support on CAD patient's recruitment. We also thank Lorena Bavia for measuring MBL serum levels in patients; and Vanessa Picceli for helping with blood sample separation.

## **Funding**

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to IM-R (CNPq).

## **Declaration of absence of conflicts of interest**

Authors declare no competing interests.

## **1. INTRODUCTION**

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of deaths worldwide. Approximately 17.9 million people died of CVDs in 2016, representing 31% of all deaths with 7.4 million estimated to be due to coronary artery disease (CAD)<sup>1</sup>. The main cause at CAD is atherosclerosis<sup>2</sup>, related to its degree of arterial obstruction<sup>3</sup>, which ranges from progressive thickening to the rupture of the plaque<sup>4</sup>. Therefore, the search for biomarkers which can assist in the assessment of cardiovascular risk, monitoring and early treatment of CVDs is an emerging need and could offer beneficial impact on the morbidity and mortality of this condition<sup>5</sup>.

The complement is an essential part of the innate response and consists of more than 50 plasma and cell membrane receptor/regulator proteins that can be activated through three pathways: classical (CP), lectin (LP), and alternative (AP)<sup>6</sup>. Subsequent to its activation, the complement can perform several biological functions including opsonization and phagocytosis of intruders, inflammation, cell lysis, and removal of immune complexes<sup>7</sup>. The role of complement in atherogenesis is not yet fully understood. It is known that it is activated in atherosclerosis plaques, acting as a pro-atherogenic and atheroprotective agent, leading to the clearance of apoptotic cells and cellular debris at the same time causes the formation of anaphylatoxins which may influence the progression of atherogenesis and destabilization of the atherosclerotic plaque, leading to acute coronary syndrome (ACS)<sup>8</sup>. In addition, complement activation can have a pro-inflammatory role by promoting expression of adhesion molecules in the vascular endothelium, chemotaxis, activation of leukocytes, release of reactive oxygen species, secretion of cytokines and chemokines<sup>9,10</sup>. Since a disturbance on these effects can lead to inflammation and tissue damage, the activation of complement may be directly involved in the vascular inflammatory process during atherogenesis, from the beginning of fatty-streak formation to the mature plaque instability<sup>11</sup>.

The activation of the LP can occur essentially through the interaction of mannose-binding lectin (MBL) with mannose, N-acetylglucosamine, fucose, glucose, among other residues on the surface of pathogens<sup>7,12</sup>. In addition, cell debris, which may result from myocardial ischemia and necrosis caused by AMI, are also targets of MBL, suggesting that MBL may have a role in the development of CAD<sup>13,14</sup>. MBL is an important acute-phase protein<sup>15</sup> and may act in the modulation of the inflammatory process in atherosclerosis, being present in ruptured atherosclerosis plaques<sup>16</sup>. In addition, MBL levels and other LP components such as MBL-associated serine proteases (MASPs) and Mannose-binding lectin-associated protein of 44 kDa (MAp44) were associated with cardiovascular risk factors, including dyslipidemia, obesity and hypertension<sup>17</sup>.

The complement C3 plays a central role in the activation of complement by forming the C3 and C5 convertases as well as the anaphylatoxins that lead to the increase of the permeability of blood vessels due to the degranulation of mast cells, in addition to smooth muscle contraction<sup>18</sup>. C3 has been found highly expressed in atherosclerotic lesions and reported as an independent risk factor to predict CAD<sup>19</sup>. Moreover, high C3 serum levels were associated with severe CAD and the risk of AMI<sup>20,21</sup>. An initial role for C3 in acute myocardial infarction (AMI) was demonstrated in an animal model by Hill and Ward in 1973. The authors showed an inflammatory role of C3 fragments in the damaged rats myocardium<sup>22</sup>. Subsequently, several studies have pointed out mechanisms of the innate response including the complement having an essential role in the pathophysiology of CVDs<sup>23,24,25,26,27</sup>.

In this study, we aimed to evaluate whether MBL and C3 serum levels are associated with cardiovascular risk factors in patients with suspected CAD undergoing coronary angiography.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Ethics statement**

The study was approved by the Ethics Committee of the HC/UFPR (n. 1.663.023) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients.

### **2.2 Study design**

This cross-sectional cohort study included patients referred to perform cineangiocoronariography from both emergency room or elective procedure at the Department



of Hemodynamics at Clinical Hospital [Federal University of Paraná (HC/UFPR)] in Curitiba, Southern Brazil. Recruitment began in July 2016 and ended in February 2017. The cohort included patients under investigation for CAD, enrolled in the study by convenience. Inclusion criteria included: symptomatic or suspected CAD individuals undergoing cineangiography, older than eighteen years. Patients with kidney, neoplastic or autoimmune diseases, recent or chronic infection, as well as pregnant women, were excluded from the study.

The control group comprised a total of 151 blood donors, 93 from the *Biobanco do Hospital de Clinicas* (UFPR) for MBL; and 58 from HEMEPAR (*Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná*) for C3. Blood donors were all seronegative for *Trypanosoma cruzi*, hepatitis B, hepatitis C, HIV and human T-cell lymphotropic viruses 1 and 2; and without clinical complaints. The mean age of the controls for MBL was 61 years (55-83), with 45 females (69.9%) and 28 (30.1%) males. In relation to ancestry, defined as self-declared, 76 (81.7%) were Euro-Brazilians; and 17 (18.2%), Afro-Brazilians in the control group; while for patients 111 (93.2%) were Euro-Brazilians; and 8 (6.7%) Afro-Brazilians. The control group for C3 evaluation included 58 blood donors with mean age 51 years (19-86), 34 (58.6%) females and 24 (41.4%) males. In relation to the ancestry, defined as self-declared, 58 (100%) were Euro-Brazilians.

### 2.3 Clinical and laboratory evaluation of patients

A standard questionnaire was applied, including sex, ancestry, weight, height, current morbid history, continuous drug use, habits such as tobacco smoking [ $\geq 100$  cigarettes in lifetime and who continues to smoke (MS, 2015)], sedentary [ $< 30$  minutes of moderate physical activity every day of the week <sup>21,28</sup> followed by blood pressure measurement. Systemic arterial hypertension (SAH) was defined as systolic blood pressure (SBP)  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure (DBP)  $\geq 90$  mmHg; while normotensive SBP  $\leq 120$  mmHg and DBP  $\leq 80$  mmHg, and prehypertension 121-139 mmHg and 81-89 mmHg<sup>29</sup>.

The classification of heart failure (HF) was defined as normal when the left ventricular ejection fraction (LVEF)  $\geq 50\%$ ; preserved for LVEF ranging from 40 to 49%; and reduced for LVEF  $< 40\%$ <sup>30</sup>.

At admission, the following data were obtained from medical records: 12-lead electrocardiogram (ECG), transthoracic echocardiogram, coronary angiography, cardiac

enzymes [creatine kinase (CK), creatine kinase-MB isoenzyme (CK-MB) and troponin]; lipid profile [HDL-C cholesterol (high density lipoprotein), LDL-C cholesterol (low density lipoprotein), triglycerides and total cholesterol]; transaminases GOT (glutamic-oxalacetic transaminase) and GPT (glutamic-pyruvic transaminase), glucose levels, C-reactive protein (CRP), prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR).

Parameters of lipid profile were stratified according to the V Brazilian Consensus on Dyslipidemia<sup>31</sup>. The body mass index (BMI) was classified as underweight, eutrophic or normal range, overweight, obesity class I, obesity class II and obesity class III<sup>32</sup>.

#### **2.4 Coronary artery disease and acute myocardial infarction**

All patients underwent cineangiocoronariography (cine-ACG) to assess the presence and degree of arterial obstruction, named here as “suspected CAD”. Patients were referred for evaluation due to symptoms including angina, shortness of breath, heart palpitations, dizziness, nausea, extreme weakness, and sweating<sup>33</sup>. The catheterization was performed after local anesthesia (2% lidocaine) for the introduction of an arterial catheter in deep femoral access and subsequent image acquisition (INNOVA 3100-IQ, GE, France). Then, the catheter was removed, and the arterial access remained, allowing the blood collection for subsequent measurement of MBL and C3 levels. The blood was centrifuged for 10 minutes at 3,500 rpm and samples of serum were aliquoted and stored at -80 °C.

Patients who needed treatment underwent percutaneous coronary intervention (PCI), in order to restore the antegrade coronary flow through balloon catheter, without prior administration of fibrinolytic therapy<sup>34</sup>.

The degree of arterial stenosis was classified as: no CAD (< 10%), unobstructive CAD (10-50% left main stenosis - LM, 10-70% coronary [not LM], obstructive CAD (> 50% LM stenosis, > 70% coronary [not LM]), and unknown status<sup>35</sup>.

Patients were also diagnosed according to the presence or absence of AMI, defined by the presence of acute myocardial injury with clinical evidence of acute myocardial ischemia and with detection of a rise and/or fall of cTn values with at least one value above the 99th percentile upper reference limit (URL) and at least one of the following: symptoms of myocardial ischemia; new ischemic ECG changes; development of pathological Q waves; imaging evidence of new loss of viable myocardium or new regional wall motion abnormality in a

pattern consistent with an ischemic etiology; identification of a coronary thrombus by angiography or autopsy<sup>36</sup>.

## 2.5 Determination of MBL and C3 serum concentration

The quantification of MBL serum levels was performed in all patients and controls using ELISA method according to an adapted protocol from PERTERSEN et al.<sup>37</sup> The plate was read at 405 nm (BioTek ELx800 Universal Microplate Reader). Briefly, mannose was diluted, applied to an ELISA plate (Nunc maxisorb). Albumin was used as the blocking buffer. Serum samples were diluted 1:50 in dilution buffer (20 mM Tris Base, 1 M NaCl, 0.05% triton X, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg human albumin / mL, pH 7.4). Subsequently, monoclonal mouse-anti-human MBL IgG [1:1000 (Antibodyshop cat. 04262T, Copenhagen, Denmark)] and secondary alkaline-phosphatase conjugated rabbit-anti-mouse [1:1300 (SIGMAFast pNPP cat. 2770, St. Louis, USA)] were used as MBL detection assay. According to MBL levels, patients were grouped as follows: deficient producers when  $\leq 100$  ng/mL; medium producers between 101 and 2000 ng/mL; and high producers when  $> 2000$  ng/mL<sup>37,38</sup>. C3 serum levels were determined using automated immunoturbidimetric assay (Beckman Coulter, AU analyzer, USA) with reference values ranging from 87 to 200 mg/dL, according to manufacturer's protocol<sup>39</sup>.

## 2.6 Statistical analysis

The normality distribution of each variable was assessed using Shapiro-Wilk test. MBL and C3 levels were compared between groups using multiple regression analysis to adjust variables when univariate analysis showed  $p \leq 0.2$ , the covariates age and ancestry for MBL; and ancestry, for C3 were included. Pairwise associations were performed using Spearman's rank correlation test for nonparametric variables. Statistical analysis was undertaken using the STATA 12.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA) and p-values  $< 0.05$  were considered statistically significant. The GraphPad Prism program (version 6.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to generate graphics of boxplot presented with median and 5-95% percentile.

## 3. Results

The mean age of the patients (n=119) was 65 years (37 to 85), 57 (47.9%) were females and 62 (52.1%) males. MBL and C3 serum concentration were determined in 48 patients with AMI, and 71 without AMI (**Table 1**). Considering any degree of artery injury in cine-ACG, 72.2%

(86/119) of the patients had confirmed diagnosis of CAD, being 74.4% (65/86) with obstructive CAD, and 24.4% (21/86) with unobstructive CAD.

In relation to the control groups, the mean age was 63 years (19 to 86) [65 (69.9%) females and 28 (30.1%) males] for MBL and 51 years [34 (58.6%) females and 24 (41.4%) males] for C3.

### 3.1 MBL levels

MBL serum levels were significantly higher in patients with suspected CAD (n=119) when compared to the controls (p=0.002 OR 3.3 95% CI 1.57-6.97), regardless of the presence of AMI (p=0.006 OR 3.0 95% CI: 1.4-6.7). Patients with HF also had significantly higher MBL levels than controls (p=0.018 OR 3.6 95% CI: 1.2-10.4). On the other hand, when compared in the patient group, presence vs. absence of AMI (p=0.441), HF (p=0.957) (**Figure 1**), and CAD (unobstructive/obstructive) (p=0.188), as well as angina and comorbidities were not associated with MBL levels (**Suppl Table 1**). Patients with suspected CAD presented significantly elevated frequency of high MBL producers (MBL >2000 ng/mL) than controls [p=0.017 OR 2.2 95% CI: 1.2-4.3]. Also, patients with HF [p=0.015 OR: 3.2 95%CI: 1.3-8.0], AMI [p=0.012 OR 2.7 95% CI: 1.2-5.8], CAD (unobstructive/obstructive) [p=0.007 OR 2.6 95% CI: 1.3-5.1] and SAH [p=0.012 OR 2.32 95% CI: 1.2-4.5] when compared with controls. No difference for high MBL producers was observed regarding the presence or absence of AMI, HF, CAD (unobstructive/obstructive) and SAH. Regarding the frequency of individuals with MBL deficiency ( $\leq 100$  ng/mL), no significant difference was observed when comparing controls and patients or other clinical variables (**Table 2**).

Considering all patients, BMI and age showed a negative correlation with MBL serum levels (p=0.023 and r = -0.207; p=0.045 and r= -0.184, respectively). On the other hand, troponin (p=0.826); CK (p=0.973); CK-MB (p=0.579) and PCR (p=0.589) showed no correlation.

### 3.2 C3 levels

C3 levels did not differ significantly between patients with suspected CAD and controls (median: 143.0 and 155.0 mg/dL, respectively; p=0.142). Similar C3 levels were also observed comparing patients with the presence or absence of AMI (median: 143.0 mg/dL for both; p=0.957); presence or absence of HF (median: 143.0 and 143.5 mg/dL, respectively; p=0.737) (**Figure 2**), CAD (unobstructive/obstructive), angina and comorbidities (**Suppl Table 1**). Regarding cardiometabolic parameters, C3 levels were positively correlated with BMI

( $p=0.0036$   $r=0.266$ ) and triglycerides ( $p=0.0016$   $r=0.302$ ). Additionally, with C3 levels were correlated positively with hematological profile including erythrocytes ( $p=0.0028$   $r=0.305$ ) and platelets ( $p=0.008$   $r=0.274$ ), and a trend correlation for hemoglobin ( $p=0.084$   $r=0.179$ ), hematocrit ( $p=0.071$   $r=0.187$ ) and leukocytes ( $p=0.084$   $r=0.179$ ). On the other hand, troponin ( $p=0.129$ ); CK ( $p=0.825$ ); CK-MB ( $p=0.521$ ) and PCR ( $p=0.106$ ) showed no correlation with C3 levels.

C3 serum levels showed a negative correlation in relation to age ( $p=0.0023$   $r=-0.278$ ) in the patient's group, but not in controls ( $p=0.233$ ). MBL and C3 levels were not correlated in the patients ( $p=0.322$ ).

#### 4. Discussion

A possible role for MBL in the atherogenic process and in the pathophysiology of CAD has been considered by different authors<sup>25,41,42</sup>. In fact, the chronic endothelial dysfunction associated with an ongoing inflammatory state in CAD corroborates with the increased MBL levels observed in these patients, C3 on the other hand seems to be involved with lipid metabolism and prothrombotic state.

The previously described association between MBL and CVDs in patients with acute coronary syndrome<sup>42,43,44</sup>, could be associated with an exacerbation of complement activity during ischemia and reperfusion process<sup>45</sup>, increasing the risk of vascular complications in diabetic patients<sup>46</sup>. It is known that MBL serum levels can increase up to 3 times its genetically predetermined concentration during inflammatory processes<sup>2,47,48</sup> corroborating our findings showing that high MBL levels may be associated with the pro-inflammatory state in symptomatic patients under investigation for CAD. It was shown that MBL has an affinity for cholesterol crystals and apoptotic necrotic cells present in the atherosclerotic plaque<sup>9,49</sup>, and may bind to leukocytes through complement receptor thereby modulating inflammation<sup>50,51</sup>. Taken together, these data could also justify the increased risk of CAD in patients having medium or high MBL levels, but not in MBL deficiency.

Nevertheless, conflicting results regarding MBL and the development of AMI demonstrate a controversial role in the formation of the atherosclerosis plaque with MBL, presenting a prothrombotic and antiatherogenic role<sup>52</sup>. High MBL levels could represent a possible protective factor by promoting clearance of apoptotic cells and cell debris from atherosclerotic plaques<sup>25,53</sup>. On the other side, MBL deficiency-associated genotypes present higher risk for

the development of CAD by allowing the evolution of the atherosclerotic plaque<sup>8,54</sup>. In the present study, no influence of MBL deficiency/low levels and AMI or cardiometabolic parameters was observed, as also reported by Dahl et al.<sup>15</sup> and Albert et al.<sup>55</sup> It is important to note that MBL levels are influenced by polymorphisms in *MBL2* gene<sup>56</sup>, thus, the genetic background of the different cohorts may have contributed to the observed results.

The activation of the complement system in HF occurs due to clinical or subclinical ischemia caused to the myocardial tissue<sup>57</sup>, leading to the presence of damaged cells and necrotic tissue, triggering the binding of MBL to hypoxic cells and activation of the VL<sup>57,58,59,60</sup>, corroborating our findings, where the MBL level was higher in the group of patients with HF compared to the control. Schoos et al.<sup>44</sup> (2013) suggest an association between elevated MBL levels and increased stroke volume and increased end-diastolic volume in patients with post-STEMI. On the other hand, Prohászka et al.<sup>61</sup> (2013) found no significant difference in the level of MBL when analyzing patients with HF and controls. In addition, the lack of association between MBL deficiency/low concentration and congestive HF has already been observed<sup>62</sup>.

The inverse correlation between BMI and MBL observed in this study may possibly reflect the cross-talking between MBL and adipose tissue-related in atherosclerotic disease, which is characterized by a low-grade chronic inflammatory status, to which the complement may be related. General patients' group (suspected CAD) presented a negative correlation between age and MBL levels that may be due to the decrease of immune system efficiency naturally observed during aging<sup>63,64</sup> by immunosenescence process. Previous studies showed that immunity undergoes severe deterioration with age, impacting both innate and adaptive immunity<sup>65,66</sup>, with potential implications for age-associated chronic inflammatory conditions, including atherosclerosis and metabolic syndrome<sup>65</sup>. Possibly in view of complex and progressive clinical disorders MBL and C3 may have an age-dependent inflammatory response.

Corroborating with our findings, C3 has already been associated with cardiometabolic variables related to the development of CAD, such as BMI, arterial blood pressure and triglycerides levels<sup>67-70</sup>. Since C3 are also produced by adipocytes, these correlations may be the result of a proportional production of C3 by the adipose tissue<sup>71</sup>. These findings suggest that some cardiometabolic factors could be able to trigger the activation of the complement cascade independently of the established pathways. Higher C3 levels have been associated with CAD and its severity, in patients with AMI and stable angina compared to controls<sup>72</sup> and as a predictor of AMI in men<sup>73</sup>. Controversially in animal models, C3 deficiency has been associated with the

development of atherosclerosis and its progression<sup>74,75</sup>. No association of C3 with CAD, AMI or angina was observed in the present study. However, one needs to consider that these studies estimated C3 from peripheral blood samples and immunohistochemical analysis of lesions in mice, while in the present work this was assessed from the vascular injury, a fact that may have contributed to these conflicting results. It is conceivable that excessive C3 production due to inflammation may mask its local consumption during complement activation in atherosclerosis. In addition, low sample size of the present cohort might also have contributed to the lack of association between C3 levels and CAD.

The positive correlation observed between C3 levels with erythrocyte and platelets could indicate a connection between inflammatory and hematologic factors in CVDs, including CAD. Interestingly, it was demonstrated that erythrocytes are involved in the formation of a C3b-like protein that possibly triggers complement activation at ischemic sites<sup>76</sup>. Also in immune hemolytic anemias, the amount of C3 per erythrocyte had a crucial role in determining disease activity<sup>77</sup>, demonstrating the interaction between these parameters. In addition, C3 may contribute to thrombotic complications due to platelet activation<sup>78</sup>. The interaction between complement and hematological parameters in atherosclerosis, including CAD patients, need to be further investigated.

This study has some limitations. Sample size could represent a bias for the correlation and association analysis, since our samples were categorized. Adequate statistical analysis was used to minimize these effects. Although we could not gather information about door-to-balloon time, an important measure of myocardium ischemic injury, there was no difference for C3 or MBL levels considering arterial stenosis degree and cardiac enzymes. In addition, the evaluation of clinical (blood pressure, BMI and previous diseases) and laboratory (blood glucose, cholesterol, triglycerides and blood count) parameters was not performed in controls since blood banks do not routinely run these analyses. Additional studies targeting *MBL2* polymorphisms, as well as C3 activation products, may contribute to a better understanding of such complement components in patients with CAD.

The involvement of the lectin pathway activation in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury and CAD is still not clear nor considering the mentioned divergences on MBL and C3 levels in such conditions. The mechanism by which MBL and C3 may influence CAD is complex and needs further investigation in order to evaluate possible strategies for prophylaxis, diagnosis and therapy.

## 5. Conclusion

In conclusion, we demonstrated here that high levels of MBL are associated with the risk for atherosclerotic disease, AMI and HF. On the other hand, MBL levels were not associated with the severity of arterial occlusion in AMI, nor correlate with cardiac enzymes (CK, CK-MB and troponin). C3 serum levels were not associated with CAD, but they were positively correlated with cardiometabolic and hematological parameters that may contribute to its development.

## 6. Author Contributions

IJMR, JMR, KCFL and FAA contributed with conception and design of the study; LS, ARA and RN executed laboratory procedures; FAA and KCFL performed the statistical analysis; FAA, JMR and KCFL wrote the original draft of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision and approved the submitted version.

## 7. Acknowledgments

We thank nurses from the Department of Hemodynamics at Clinical Hospital of Federal University of Paraná for the support on CAD patient's recruitment. We also thank Lorena Bavia for measuring MBL serum levels in patients; and Vanessa Picceli for helping with blood sample separation.

## 8. Funding

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to IM-R (CNPq).

## 9. References

1. Cardiovascular Diseases. ([https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1)). Accessed 14 June 2020.
2. Da Luz PL, Favarato D. Doença Coronária Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 1999; 72 (1); 5-21.
3. De Pinho RA, De Araújo MC, De Ghisi GLM, Benetti M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2010; 94(4):549–55.
4. Goldschmidt-Clermont PJ, Creager MA, Lorsordo DW, Lam GKW, Wassef M, Dzau VJ. Atherosclerosis 2005: Recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation.* 2005; 112(21):3348–53.



5. Litwin SE. Which Measures of Obesity Best Predict Cardiovascular Risk? Editorials published in the *Journal of the American College of Cardiology* reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008; 52(8):616–9.
6. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*. 2010; 11(9):785–97.
7. Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, Messias-Reason IJ. Serine proteases in the lectin pathway of the complement system. *Proteases in Physiology and Pathology*. 2017; 397-420.
8. Speidl WS, Kastl SP, Huber K, Wojta J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011; 9(3):428–440.
9. Beltrame MH, Catarino SJ, Goeldner I, Boldt ABW, Reason IJ de M. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Frontiers in Pediatrics*. 2015; 2: 148.
10. Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:607.
11. Landi-Librandi AP, Assis-Pandochi AI. O envolvimento do sistema complemento nos processos de aterogênese. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2008; 41(3):312-326.
12. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 2010 7.ed. 7°. Porto Alegre: Artmed.
13. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340:115–26.
14. Seifert OS, Hugo F, Hansson GK, Bhakdi S. Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 1989; 60(6):747–54
15. Dahl M, Tybjærg-hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BJ. A Population-based Study of Morbidity and Mortality in Mannose-binding Lectin Deficiency. *Journal Experimental Medicine*. 2004; 199(10):1391–1399.
16. Matthijsen RA, Winther MPJ, Kuipers D, et al. Macrophage-specific expression of mannose-binding lectin controls atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2009; 119(16): 2188–2195.
17. Frauenknecht V, Thiel S, Storm L, Meier N, Arnold M, Schmid JP et al. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. *Clinical and Experimental Immunology*. 2013; 173(1):112–20.

18. Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement C3a and C5a Induce Different Signal Transduction Cascades in Endothelial Cells. *The Journal of Immunology*. 2002; 169(4):2102–10
19. Ajjan R, Grant PJ, Futers TS, Brown JM, Cymbalista CM, Boothby M et al. Complement C3 and C-reactive protein levels in patients with stable coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 94(5):1048–53.
20. Muscari A, Bozzoli C, Puddu GM, et al. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *American Journal of Medicine*. 1995; 98(4):357–64.
21. Szeplaki G, Prohaszka Z, Duba J., Rugonfalvi-Kiss S, Karadi I, Kokai M, et al. Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. *Atherosclerosis*, 2004; 177(2):383-389.
22. Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of c3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *The Journal of Experimental Medicine*. 1971; 133(4):885–900.
23. Torzewski J, Oldroyd R, Lachmann P, Fitzsimmons C, Proudfoot D, Bowyer D. Complement induced release of monocyte chemotactic protein from human smooth muscle cells a possible initiating event in atherosclerotic lesion formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1996; 16(5):673-677.
24. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340:115–26.
25. Vengen IT, Madsen HO, Garred P, Platou C, Vatten L, Videm V. Mannose-binding lectin deficiency is associated with myocardial infarction: The HUNT2 study in Norway. *PLoS One*. 2012; 7(7):e42113.
26. Cubedo J, Padró T, Badimon L. Coordinated proteomic signature changes in immune response and complement proteins in acute myocardial infarction: The implication of serum amyloid P-component. *International Journal of Cardiology*. 2013; 168(6):5196–5204.
27. Shields KJ, Mollnes TE, Eidet JR, et al. Plasma complement and vascular complement deposition in patients with coronary artery disease with and without inflammatory rheumatic diseases. *PLoS One*. 2017; 12(3):e0174577.
28. Bernstein MS, Morabia A, Sloutskis D. Definition and prevalence of sedentarism in an urban population. *American Journal of Public Health*. 1999; 89(6):862–7.
29. 7th Brazilian Guideline on Hypertension. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2016; 107(3). ([http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05\\_HIPERTENSAO\\_ARTERIAL.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf)). Accessed 14 June 2020.
30. Guideline Brazilian for Chronic and Acute Heart Failure. *Arq Bras Cardiol*. 2018; 111(3):436-539.

- (<http://publicacoes.cardiol.br/portal/abc/portugues/2018/v11103/pdf/11103021.pdf>). Accessed 14 June 2020.
31. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, et al. V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4 Suppl 1):1-20.
  32. Brazilian Association for the Study of Obesity and Metabolic Syndrome Brazilian guidelines on obesity 2016 / ABESO – Brazilian Association for the Study of Obesity and Metabolic Syndrome – 4 ed. - São Paulo, SP.
  33. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC guidelines on the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: the task force for diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European society of cardiology. *European Heart Journal*. 2020; 41(3):407–477.
  34. Feres F, Costa RA, Siqueira D, Ribamar Costa J, Chamié D, Staico R et al. Guideline Brazilian Society of Cardiology and the Brazilian Society of Hemodynamics and Interventional Cardiology on percutaneous coronary intervention. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2017; 109(1):2541–619.
  35. Cesar LA, Ferreira JF, Armaganijan D, Gowdak LH, Mansur AP, Bodanese LC, et al. Diretriz de Doença Coronária Estável. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 2014; 103(2):1-60.
  36. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *Journal of The American College of Cardiology*. 2018; 72(18):2231-64.
  37. Petersen S., Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius J. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Journal of Immunological Methods*. 2001; 257(1-2):107–16.
  38. Cieslinski JZ, Skare TL, Nisihara R, De Messias-Reason IJ, Utiyama SRR. Mannose-binding lectin serum levels in patients with systemic lupus erythematosus: association with thrombocytopaenia and seizure. *Lupus*. 2018; 27(3):372–9.
  39. Chemistry Information Sheet. Beckman Coulter. ([https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/A18469/%25%25/%25\\_A18469-%25%25\\_English.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/A18469/%25%25/%25_A18469-%25%25_English.pdf)). Accessed 14 June 2020.
  40. Pagowska-Klimek I, Cedzynski M. Mannan-Binding Lectin in Cardiovascular Disease. *Biomed Reserch International*, 2014; 2014:616817.
  41. Maiuri MC, Grassia G, Platt AM, Carnuccio R, Ialenti A, Maffia P. Macrophage autophagy in atherosclerosis. *Mediators Inflammation*. 2013; 2016:584715.
  42. Pesonen E, Hallman M, Sarna S, Andsberg E, Haataja R, Meri S et al. Mannose binding lectin as a risk factor for acute coronary syndromes. *Annals of Medicine*. 2009; 41(8):591–8.
  43. Losin IE, Shakhnovich RM, Zykov KA, Ruda MI. Level of mannose-binding lectin and

- phagocytic activity of leukocytes in patients with acute coronary syndrome. *Kardiologia*. 2010; 54(1):27-33.
44. Schoos MM, Munthe-fog L, Skjoedt M, et al. Association between lectin complement pathway initiators, C-reactive protein and left ventricular remodeling in myocardial infarction—A magnetic resonance study. *Molecular Immunology*. 2013; 54(3-4):408–414.
  45. Haahr-Pedersen S, Bjerre M, Flyvbjerg A, et al. Level of complement activity predicts cardiac dysfunction after acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *The Journal of Invasive Cardiology*. 2009; 21(1):13–9.
  46. Zhao Y, Lin W, Li Z, Lin JT, Wang S, Zeng C, et al. High Expression of Mannose-Binding Lectin and the Risk of Vascular Complications of Diabetes: Evidence from a Meta-Analysis. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2015; 17(7):490-97.
  47. Nisihara RM. Concentrações séricas da lectina ligante da manose na Síndrome de Down. 2009.
  48. Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: Past, present and future. *Tissue Antigens*. 2006; 68(3):193–209.
  49. Pilely K, Rosbjerg A, Genster N, Gal P, Pál G, Halvorsen B et al. Cholesterol Crystals Activate the Lectin Complement Pathway via Ficolin-2 and Mannose-Binding Lectin: Implications for the Progression of Atherosclerosis. *The Journal of Immunology*. 2016; 196(12):5064–74.
  50. Kilpatrick DC, Downing I, MacDonald SL, Turner ML. MBL really binds to healthy human cells! *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; 66(5):599–600.
  51. Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192(12):1797–807.
  52. Fumagalli S, Perego C, et al. Lectin Pathway of Complement Activation Is Associated with Vulnerability of Atherosclerotic Plaques. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(288).
  53. Saevarsdottir S, Oskarsson OO, Aspelund T, Eiriksdottir G, Vikingsdottir T, Gudnason V et al. Mannan binding lectin as an adjunct to risk assessment for myocardial infarction in individuals with enhanced risk. 2005; 201(1):117–25.
  54. Vengen IT, Dale AC, Wiseth R, Midthjell K, Videm V. Neopterin predicts the risk for fatal ischemic heart disease in type 2 diabetes mellitus: Long-term follow-up of the HUNT1 study. *Atherosclerosis*. 2009; 207(1):239-244.
  55. Albert MA, Rifai N, Ridker PM. Plasma levels of cystatin-C and mannose binding protein are not associated with risk of developing systemic atherosclerosis. *Vascular Medicine*. 2001; 6(3):145–9.
  56. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: Clinical significance and applications.

- Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2002; 1572(2-3):401–13.
57. Collard CD, Agah A, Buras JA, et al. Endothelial reoxygenation activates the lectin complement pathway: inhibition with anti-human mannanose binding lectin (MBL) therapy. *Mol Immunol.* 1999; 36:278.
  58. Aukrust L, Gullestad KT, Lappegård et al. Complement activation in patients with congestive heart failure: effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment. *Circulation.* 2001; 104 (13):1494–1500.
  59. Frantz S, Hofmann U. Monocytes on the scar's edge. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012; 59(2):164–165.
  60. Hofmann U, Frantz S. How can we cure a heart “in flame? A translational view on inflammation in heart failure. *Basic Research in Cardiology.* 2013; 108(4):356.
  61. Prohászka Z, Munthe-Fog L, Ueland T, Gombos T, Yndestad A, Föhrhéc Z, et al. Association of Ficolin-3 with Severity and Outcome of Chronic Heart Failure. *PLoS One.* 2013; 8(4):e60976.
  62. Trendelenburg M, Theroux P, et al. Influence of functional deficiency of complement mannanose-binding lectin on outcome of patients with acute ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal.* 2010; 31(10):1181-1187.
  63. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: Clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* 2002; 1572(2-3):401–13.
  64. Karbownik-Lewinska M, Stepniak J, Marcinkowska M, Krygier A, Lewinski A. High normal TSH is associated with lower mannan-binding lectin in women of childbearing age. *BMC endocrine disorders.* 2020; 20(1):82.
  65. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(4):507–513.
  66. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 2009; 30(7):325–33.
  67. Onat A, Hergenç G, Can G, Kaya Z, Yüksel H. Serum complement C3: a determinant of cardiometabolic risk, additive to the metabolic syndrome, in middle-aged population. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 2010; 59(5):628–34.
  68. Onat A, Can G, Rezvani R, Cianflone K. Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk. *Clinica Chimica Acta.* 2011; 412(13-14):1171–9.
  69. Palikhe A, Sinisalo J, Seppänen M, Haario H, Meri S, Valtonen V et al. Serum Complement C3/C4 Ratio, a Novel Marker for Recurrent Cardiovascular Events. *American Journal of Cardiology.* 2007; 99(7):890–5.

70. Nilsson B, Hamad OA, Ahlström H, Kullberg J, Johansson L, Lindhagen L et al. C3 and C4 are strongly related to adipose tissue variables and cardiovascular risk factors. *European Journal of Clinical Investigation*. 2014; 44(6):587–96.
71. Phieler J, Garcia-Martin R, Lambris JD, Chavakis T. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. *Seminars in Immunology*. 2013; 25(1):47–53.
72. Yan W, Che L, Jiang J, et al. Depletion of complement system immunity in patients with myocardial infarction. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 14(6):5350–6.
73. Muscari A. Relationship of serum C3 to fasting insulin, risk factors and previous ischaemic events in middle-aged men. *European Heart Journal*. 2000; 21(13):1081–1090.
74. Buono C, Come CE, Witztum JL, et al. Influence of C3 deficiency on atherosclerosis. *Circulation. Complement and Atherosclerosis*. 2002; 105:3025–31.
75. Persson L, Borén J, Robertson AKL, et al. Lack of complement factor C3, but not factor B, increases hyperlipidemia and atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> low-density lipoprotein receptor<sup>-/-</sup> mice. *Arteriosclerosis. Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24(6):1062–1067.
76. Hostetter MK, Johnson GM, Retsinas EM. The erythrocyte as instigator of inflammation. Generation of amidated C3 by erythrocyte adenosine deaminase. *Journal of Clinical Investigation*. 1989; 84(2):665–71.
77. Fischer JT, Petz LD, Garratty G, Cooper NR. Correlations Between Quantitative Assay of Red Cell-bound C3, Serologic Reactions, and Hemolytic Anemia. *Blood*. 1974; 44(3):359–373.
78. Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement Component C3 Binds to Activated Normal Platelets without Preceding Proteolytic Activation and Promotes Binding to Complement Receptor 1. *The Journal of Immunology*. 2010; 184(5):2686–92.

## Table and Figure Legends

**Table 1.** Clinical and laboratory characteristics of patients with suspected CAD, and comparison between patients with and without acute myocardial infarction (AMI).

Parameters		Patients with suspected CAD n=119	Patients with AMI n=48	Patients without AMI n=71	<i>P</i>
<b>Age (years)</b>	Median [min-max]	65 (37-85)	62 (37-85)	66 (46-79)	0.553
<b>Sex*</b>	Female (n)	57	20	37	0.264
	Male (n)	62	28	34	
<b>Ancestry*</b>	Euro-Brazilians (n)	111	43	68	0.200
	Afro-Brazilians (n)	8	5	3	
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	Median [min-max]	27.34 [13.33-48.04]	26.76 [13.33-37.89]	27.34 [13.33-48.04]	0.360
<b>Dyslipidemia (%)</b>	(N), %	(102/119) 85.71%	(43/48) 89.5%	(59/71) 83.1 %	0.326
<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	Median [min-max]	126.5 [44-666]	135 [44-666]	115.5 [45-574]	0.425
<b>Total cholesterol (mg/dL)</b>	Median [min-max]	169 [68-535]	170 [68-535]	168 [72-307]	0.768
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	Median [min-max]	38 [11-97]	36 [11-64]	39[24-97]	0.144
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	Median [min-max]	96 [24-281]	109 [45-248]	90 [24-281]	0.091
<b>Blood glucose (mg/dL)</b>	Median [min-max]	105 [64-412]	106.5 [71-263]	104.0 [64-412]	0.816
<b>Diabetes (%)</b>	(N), %	(44/116) 37.9%	(19/46) 41.3 %	(25/70) 35.7 %	0.544
<b>GOT (UI/L)</b>	Median [min-max]	23.0 [12-293]	27.5 [13-293]	20 [12-277]	0.004
<b>GPT (UI/L)</b>	Median [min-max]	20.0 [8-204]	22 [8-100]	19 [8-204]	0.086
<b>PT (s)</b>	Median [min-max]	12.0 [10.1-39.8]	12 [10.8-39.8]	12.05 [10.1-18.5]	0.624
<b>INR</b>	Median [min-max]	1.1 [0.47-3.46]	1.1 [0.47-3.46]	1.1 [0.9-1.64]	0.719
<b>Creatinine (mg/dL)</b>	Median [min-max]	0.9 [0.6-9.2]	0.9 [0.6-1.4]	0.9 [0.7-9.2]	0.822
<b>CRP (mg/dL)</b>	Median [min-max]	0.41 [0.02-40,990]	0.75 [0.02-40,990]	0.19 [0.04-10,360]	0.084
<b>LVEF (%)</b>	Median [min-max]	58 [27-84]	57.5 [33-84]	59.0 [27-77]	0.836
<b>SAH (%)</b>	(N), %	(93/119) 78.1%	(32/47) 68.1 %	(61/71) 85.9 %	0.023
<b>Tobacco smoking</b>	(N), %	(30/119) 25.2%	(14/48) 28.0 %	(16/71) 22.5 %	0.519
<b>Sedentary</b>	(N), %	(98/119) 82.3%	(41/48) 85.4 %	(57/71) 80.3 %	0.472
<b>Hospitalization days</b>	Median [min-max]	4.0 [0-51]	8 [0-28]	2 [0-51]	0.005
<b>MAP (mmHg)</b>	Median [min-max]	92 [64-140]	92 [64-140]	94 [ 65-133]	0.581
<b>SBP (mmHg)</b>	Median [min-max]	130 [86-209]	133 [91-209]	130 [86-202]	0.269

<b>DBP (mmHg)</b>	Median [min-max]	71 [45-105]	74 [45-105]	70 [45-100]	0.612
<b>Previous CTA/RM</b>	(N), %	(34/119) 28.6%	(15/48) 31.2%	(19/71) 29.6%	0.651

Note: Comparisons were made by univariate logistic regression. BMI (body mass index), HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol), LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol), GOT (Glutamic-oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic-pyruvic transaminase), CRP (C-Reactive Protein), LVEF (left ventricular ejection fraction), SAH (systemic arterial hypertension), PT (prothrombin time), INR (international normalization ratio), MAP (mean arterial pressure), SBP (systolic blood pressure), DBP (diastolic blood pressure), CAD (coronary artery disease), AMI (acute myocardial infarction), CTA (coronary transluminal angioplasty), RM (revascularization of the myocardium).

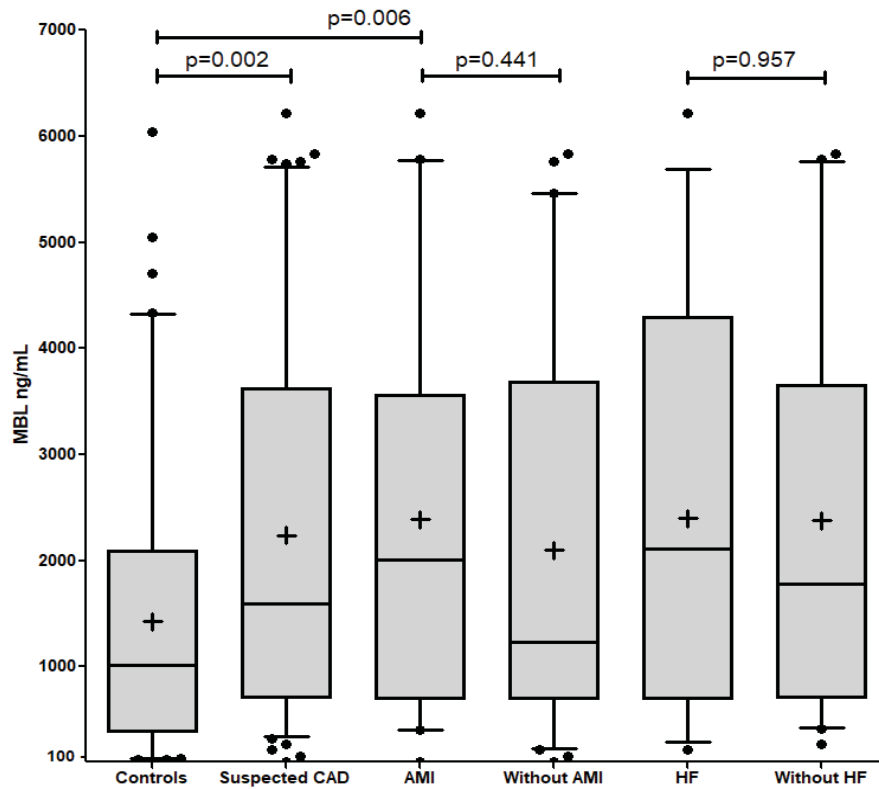


**Table 2.** Distribution of MBL producers in patients and controls.

Groups	Parameter	N (%)	P	p adjusted	OR	95% IC
<b>Suspected CAD vs Controls</b>	MBL $\leq$ 100 ng/mL	15/119 (12.6%) vs 14/93 (15.0%)	0.688	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	48/119 (40.3%) vs 21/93 (22.6%)	<b>0.007</b>	<b>0.017</b>	2.23	1.16-4.31
<b>HF vs without HF</b>	MBL $\leq$ 100 ng/mL)	4/37 (10.8%) vs 6/54 (11.1%)	1.00	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	17/37 (45.9%) vs 23/48 (47.9%)	0.750	NA	NA	NA
<b>Controls vs HF</b>	MBL >2000ng/mL	21/93 (22.6%) vs 17/37 (45.9%)	<b>0.011</b>	<b>0.015</b>	3.2	1.3-8.0
<b>AMI vs without AMI</b>	MBL $\leq$ 100 ng/mL	6/48 (12.5%) vs 9/71 (12.7%)	1.00	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	22/48 (45.8%) vs 26/62 (41.9%)	0.295	NA	NA	NA
<b>Controls vs AMI</b>	MBL >2000ng/mL	21/93 (22.6%) vs 22/48 (45.8%)	<b>0.006</b>	<b>0.012</b>	2.7	1.3-5.1
<b>No CAD vs CAD*</b>	MBL $\leq$ 100 ng/mL	4/33 (12.12%) vs 11/86 (12.79%)	1.00	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	11/33 (33.3%) vs 37/86 (43.02x%)	0.215	NA	NA	NA
<b>Controls vs CAD*</b>	MBL >2000ng/mL	21/93 (22.6%) vs 37/86 (43.02%)	<b>0.004</b>	<b>0.007</b>	2.6	1.3-5.1
<b>SAH vs without SAH</b>	MBL $\leq$ 100 ng/mL	13/93 (13.9%) vs 2/15 (13.3%)	1.000	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	38/93 (40.9%) vs 10/23 (43.5%)	0.733	NA	NA	NA
<b>Controls vs SAH</b>	MBL >2000ng/mL	21/93 (22.6%) vs 38/93 (40.9%)	<b>0.011</b>	<b>0.012</b>	2.3	1.2-4.5

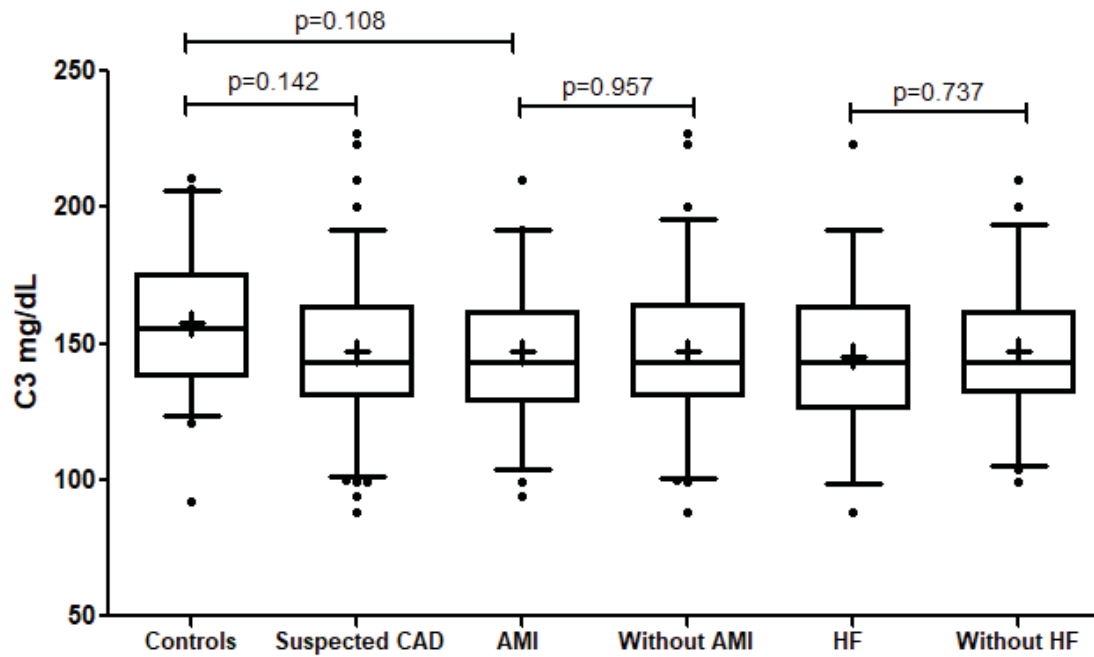
Note: Distribution of deficient ( $\leq$  100 ng/mL) and high (> 2000 ng/mL) MBL producers in controls and patients with CAD (coronary artery disease), HF (heart failure), SAH (systemic arterial hypertension) and AMI (acute myocardial infarction).

Note: \*Unobstructive and Obstructive CAD. Values of p <0.05 indicate statistical significance, being adjusted (adj) for sex and ancestry. NA (not applicable).



**Figure 1.** Distribution of MBL serum levels in CAD patients (n=105) and controls (n=80), and in relation to AMI (presence n=43 vs absence n=63) or HF (presence n=33 vs absence n=48) in patients. AMI (acute myocardial infarction), HF (heart failure).

Note: Comparisons were made by multivariate logistic regression, disregarding individuals with MBL deficiency ( $\leq 100$  ng/mL). Graphic represented with median and 5-95% percentile, showing mean as +.



**Figure 2.** Distribution of C3 serum levels in control and patient groups, and in relation to AMI (presence n=48 vs absence n=70) or HF (presence n=37 vs absence n=54) in patients. AMI (acute myocardial infarction), HF (heart failure).

Note: Comparisons were made by multivariate logistic regression. Graphic represented with median and 5-95% percentile, showing mean as +.

**Supplementary Table 1.** Serum MBL and C3 levels among patients with suspected CAD undergoing coronary angiography and controls.

Groups (n)	Parameter	Median or %	<i>p</i>	<i>p</i> adjusted	OR	95% IC
<b>Suspected CAD (n=119)</b> vs <b>Controls MBL (n=93) and C3 (n=58)</b>	MBL levels (ng/mL)	1229.0 vs 789.0	0.001	0.002	3.30	1.57-6.97
	MBL >2000ng/mL	40.3% (48/119) vs 22.6% (21/93)	0.007	0.017	2.23	1.16-4.31
	C3 levels (mg/dL)	143.0 vs 155.5	0.019	0.142	NA	NA
<b>CAD (n=33)</b> vs <b>Controls MBL (n=93) and C3 (n=58)</b>	MBL levels(ng/mL)	1544.5 vs 789.0	0.0003	0.002	0.42	0.30-0.86
	MBL >2000ng/mL	43.02% (37/86) vs 22.6% (21/93)	0.004	0.010	0.30	0.20-0.74
	C3 levels(mg/dL)	142.5 vs 155.5	0.004	0.055	0.98	0.97-1.00
<b>No CAD (n=33)</b> vs <b>Controls MBL (n=93) and C3 (n=58)</b>	MBL levels(ng/mL)	943.0 vs 789.0	0.159	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	33.3% (11/33) vs 22.6% (21/93)	0.249	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	144.0 vs 155.5	0.281	NA	NA	NA
<b>No CAD (n=33)</b> vs <b>CAD* (n=86)</b>	MBL levels(ng/mL)	943.0 vs 1545.0	0.307	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	33.3% (11/33) vs 43.02% (37/86)	0.215	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	144.0 vs 142.5	0.405	NA	NA	NA
<b>Controls MBL (n=93) and C3 (n=58)</b> vs <b>Normolipemic patients (n=17)</b>	MBL levels(ng/mL)	1229.0 vs 768.0	0.241	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	22.6% (21/93) vs 23.5% (4/17)	0.753	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	155.5 vs 138.0	0.189	NA	NA	NA
<b>BMI Normal (n=35)</b> vs <b>Overweight (n=49)</b>	MBL levels(ng/mL)	1229.0 vs 1591.0	0.440	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	45.7% (16/35) vs 42.8% (21/49)	0.976	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	140.0 vs 142.0	0.517	NA	NA	NA
<b>BMI Normal (n=35)</b> vs <b>Obesity (n=32)</b>	MBL levels(ng/mL)	1229.0 vs 770.0	0.453	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	45.7% (16/35) vs 28.1% (9/32)	0.162	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	140.0 vs 154.5	0.074	NA	NA	NA
<b>SAH Pre-(n=42)</b> vs <b>Normal (n=26)</b>	MBL levels (ng/mL)	1454.0 vs 1479.0	0.986	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	45.2% (19/42) vs 38.5% (10/26)	0.598	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	142.0 vs 139.5	0.580	NA	NA	NA
<b>SAH Normal (n=26)</b> vs <b>Altered (n=93)</b>	MBL levels(ng/mL)	1337.0 vs 1056.0	0.145	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	38.5% (10/26) vs 40.9% (38/93)	0.795	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	142.0 vs 143.0	0.791	NA	NA	NA
<b>Diabetes Presence (n=44) vs Absence (n=72)</b>	MBL levels (ng/mL)	738.0 vs 1420.0	0.683	NA	NA	NA
	MBL >2000ng/mL	36.4% (16/44) vs 43.1% (31/72)	0.614	NA	NA	NA
	C3 levels(mg/dL)	147.0 vs 141.0	0.186	NA	NA	NA

Note: MBL (mannose-binding lectin), AMI (acute myocardial infarction), CAD (coronary artery disease), SAH (systemic arterial hypertension). NA (not applicable). Data presented as median or %, using multivariate analysis to obtain the adjusted p value for sex and ancestry. \* Unobstructive and Obstructive CAD.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a VL do SC desempenha importante papel na aterosclerose. A presença de MBL, previamente identificada em lesões ateroscleróticas, pode representar um potencial marcador de DAC. Também importante nas etapas iniciais da aterogênese, a molécula de C3 demonstrou correlação positiva com fatores de risco clássicos associados à DAC, não apresentando correlação com doença cardíaca. Além disso, C3 apresentou correlação positiva com eritrócitos e plaquetas, o que pode demonstrar relação entre fatores inflamatórios e hematológicos.

## 7. CONCLUSÕES

- A. A concentração sérica de MBL foi significativamente maior em pacientes com DAC, IAM e IC que em controles, sendo os altos produtores de MBL mais frequentes em pacientes, que em controles, sendo os altos produtores de MBL nas frequente em tais grupos de pacientes;
- B. DAC, IAM, ou ATC/RM prévios não influenciaram nas concentrações de MBL;
- C. As comorbidades diabetes, dislipidemia e hipertensão não influenciaram nas concentrações de MBL em pacientes com DAC, considerando DAC, IAM e IC;
- D. As enzimas cardíacas CK, CKMB e troponina, assim como FEVE não influenciaram as concentrações de MBL e C3;
- E. Diabetes e HAS não influenciaram nos níveis de C3 no grupo de pacientes;
- F. Os níveis séricos de C3 não apresentaram diferença significativa entre pacientes com DAC, IAM ou IC e controles, não apresentando associação com doença cardíaca;
- G. Níveis de C3 apresentaram correlação significativa com fatores de risco para o desenvolvimento da DAC como IMC e triglicerídeos;
- H. Os parâmetros hematológicos como eritrócitos e plaquetas apresentaram correlação com os níveis de C3.

## REFERÊNCIAS

- AIHA, R. M.; AI-D, H. A. Complement 3 serum levels as a pro-inflammatory biomarker for insulin resistance in obesity. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v.11, Suppl. 1, p. 229–32, 2017.
- AJJAN, R.; FUTERS, T.; BROWN, J.; CYMBALISTA, C.; BOOTHBY, M.; CARTER, A.; GRANT, P. Complement C3 and C-reactive protein levels in patients with stable coronary artery disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 11, p. 1048–1053, 2005.
- ANDREWS, J.; PURI, R.; KZATAOKA, Y., NICHOLLS, S. J.; PSALTIS, P. J. Therapeutic modulation of the natural history of coronary atherosclerosis: lessons learned from serial imaging studies. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, v. 6, n. 4, 2016.
- BAHIA E. L.; IDRISSE, N.; HAKOBYAN, S.; RAMAGLIA, V.; GELUK, A. et al. Complement activation in leprosy: a retrospective study shows elevated circulating terminal complement complex in reactional leprosy. **Clinical and experimental immunology**, v. 184, n. 3, p. 338–46, 2016.
- BAJIC, G.; DEGN, S. E.; THIEL, S.; ANDERSEN, G. R. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. **The EMBO Journal**, v. 34, p. 2735-2757, 2015.
- BELTRAME, M. H.; CATARINO, S. J.; GOELDNER, I.; BOLDT, A. B. W.; REASON, I. J. M. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease, **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, n. 148, 2015.
- Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de Saúde (TABNET) [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2017. [Acesso em 10/02/2020]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
- CAI, G.; LI, L.; CHEN, Y. HUANG, H.; YU, L.; XU, LIANHONG. Complement C3 gene polymorphisms are associated with lipid levels, but not the risk of coronary artery disease: a case-control study. *Lipids in Health and Disease*, v. 18, n. 217, 2019.
- CAPUANO, V.; D'ARMINIO, T.; SALA, G. L.; MAZZOTTA, G. The third component of the complement (C3) is a marker of the risk of atherogenesis. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 13, n. 4, p. 658–660, 2006.
- CIANFLONE, K.; XIA, Z.; CHEN, L. Y. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1609, p. 127–43, 2003.
- COLLARD, C. D.; LEKOWSKI, R.; JORDAN, J.E.; AGAH, A.; STAHL, G. L. Complement activation following oxidative stress. **Molecular Immunology**, v. 36, p. 941- 948, 1999.

COLLARD, C. D.; MONTALTO, M. C.; REENSTRA, W. R.; BURAS, J. A.; STAHL, G. L. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. **The American Journal of Pathology**, v. 159, p. 1045–1054, 2001.

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M, ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CUBEDO, J.; PADRÓ, T.; BADIMON, L. Coordinated proteomic signature changes in immune response and complement proteins in acute myocardial infarction: The implication of serum amyloid P-component. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 6, p. 5196–5204, 2013.

DAHL, M.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; SCHNOHR, P.; NORDESTGAARD, B. J. A Population-based Study of Morbidity and Mortality in Mannose-binding Lectin Deficiency. **Journal Experimental Medicine**. v. 199, n. 10, p. 1391–1399, 2004.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, 689–705, 2011.

DEGN, S. E.; JENSEN, L.; OLSZOWSKI, T. JENSENIUS, J. C, THIEL, S. Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable byMAP44. *The Journal of Immunology*, v. 191, p. 1334 – 1345, 2013.

DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, R.; SPEECKAERT, M. M. Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences. **Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1–10, 2014.

Diretriz Brasileira de Obesidade. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **ABESO**, 4.ed, São Paulo, SP.

Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo, AC Farmacêutica, 2014.

Diretriz de Doença Coronária Estável. **Arquivo Brasrasileiro de Cardiologia**, v. 103, n. 2, supl.2, p. 1-59, 2014.

DOBÓ, J.; SZAKÁCS, D.; OROSZLÁN, E.; KISS, B.; BOROS, E.; et al. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. **Scientific Reports**, v. 6, n.1, 2016.

ENGSTRÖM, G.; HEDBLAD, B.; JANZON, L.; LINDGÄRDE, F. Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 14, n. 3, p. 392–397, 2007.



ESPARZA-GORDILLO, J.; SORIA, J. M.; BUIL, A.; ALMASY, L.; BLANGERO, J.; FONTCUBERTA, J.; CÓRDOBA, S. R. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. **Immunogenetics**, v. 56, p. 77–82, 2004.

FIDLER, K. J.; WILSON, P.; DAVIES, J. C.; TURNER, M. W.; PETERS, M. J.; et al. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. **Intensive Care Medicine**, v. 30, p. 1438–1445, 2004.

FONSECA, F. A. H.; OLIVEIRA, M. C. Fisiopatologia das síndromes coronarianas agudas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. v. 26, n. 2, p. 74-7, 2016.

FRAUENKNECHT, V.; THIEL, S., STORM, L.; MEIER, N.; ARNOLD, M.; et al. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL) associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 173, p. 112-120, 2013.

FRAZER-ABEL, A.; SEPIASHVILI, L.; MBUGHUNI, M. M.; WILLRICH, M. A. V. Overview of Laboratory Testing and Clinical Presentations of Complement Deficiencies and Dysregulation. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 77, p. 1–75, 2016.

FREY, A.; ERTL, G.; ANGERMANN, C.E.; HOFMANN, U.; STÖRK, S.; FRANTZ, S. Complement C3c as a biomarker in heart failure. **Mediators Inflammation**, 2013.

FREELEY, S.; KEMPER, C.; LE FRIEC, G. The "ins and outs" of complement-driven immune responses. **Immunological Reviews**, v. 274, p. 16–32, 2016.

FUMAGALLI, S.; PEREGO, C.; ZANGARI, R.; DE BLASIO, D. OGGIONI, M.; et al. Lectin Pathway of Complement Activation Is Associated with Vulnerability of Atherosclerotic Plaques. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 288, 2017.

GARDINALLI, M.; CONCISTO, L. CAFARO, C.; AGOSTINI, A. Complement system in coronary heart disease: a review. **Immunopharmacology**, v. 30, p. 105-107, 1995.

GARRED, P.; HONORÉ, C.; MA, Y. J.; MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHOJ, T. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3—The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 2737–2744, 2009.

GARRED, P.; GENSTER, N.; PILELY, K.; -BAYARRI- OLMS, R.; ROSBJERG. A.; et al. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. **Immunological Reviews**, v. 274, p. 74–97, 2016.

GE, X.; XU, C.; LIU, Y. ZHU, K; ZENG, H; SU, J.; et al. Complement activation in the arteries of patients with severe atherosclerosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018.

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J.; CREAGER, M. A. LOSORDO, D.W.; LAM, G.K.W; WASSEF, M; DZAU, V.J. Atherosclerosis 2005: Recent discoveries and novel hypotheses. **Circulation**, v. 112, n. 21, p. 3348-53, 2005.

GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events): a multinational registry of patients hospitalized with acute coronary syndromes. **American Heart Journal**, v. 141, p. 190-9, 2001.

Guia Técnico. Turbidimetria. Labtest, 2016. Disponível em [https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/12/Guia\\_Tecnico\\_Turbidimetria.pdf](https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/12/Guia_Tecnico_Turbidimetria.pdf)/ Acesso em 20 Jul 2020.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, 2005.

HEDAYATI, T.; YADAV, N.; KHANAGAVI, J. Non –ST-Segment Acute Coronary Syndromes. **Cardiology Clinics**, n. 36, p. 37–52, 2018.

HEIN, E.; GARRED, P. The Lectin Pathway of Complement and Biocompatibility. **Immune Responses to Biosurfaces**, p. 77–92, 2015.

HÉJA, D.; KOCSIS, A. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 109, p. 10498–10503, 2012.

HERMANN, J.; LERMAN, A. The endothelium: dysfunction and beyond. **Journal of Nuclear Cardiology**, v.8, p. 197-206, 2001.

HERTLE, E.; VAN GREEVENBROEK, M. M. J.; STEHOUWER, C. D. A. Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. **Diabetologia**, v. 55, p. 881–884, 2012.

HERTLE, E.; GREEVENBROEK, M. M.; ARTS, I. C.; KALLEN, J.V.D; GEIJSELAERS, S.L; FESKENS, E.J.; et al. Distinct associations of complement C3a and its precursor C3 with atherosclerosis and cardiovascular disease. The CODAM study. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 111, n. 6, p. 1102–1111, 2014.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the initiation and evolution of rheumatoid arthritis. **Frontiers in Immunology**, 2018.

HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. - Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. TELELAB. **Ministério da Saúde**, 1998. Disponível em [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf), Acessado em: 28 out. 2020.

IWAKI, D.; KANNO, K.; TAKAHASHI, M.; ENDO, Y.; LYNCH, N.J.; SCHWAEBLE, W.J.; et al. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 8626 – 8632, 2006.

JADCZYK, T.; BARANSKI, K. SYZDOL, M.; NABIELEK, E.; WANHA, W.; KURZELOWSKI, R.; et al. Bioactive Sphingolipids, Complement Cascade, and Free Hemoglobin Levels in Stable Coronary Artery Disease and Acute Myocardial Infarction. **Mediators of Inflammation**, 2018.

JIANG, H.; GUO M.; DONG, L.; CAO, C.; WANG, D; LIANG, X.; et al. Levels of acylation stimulating protein and the complement component 3 precursor are associated with the occurrence and development of coronary heart disease. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1861–1866, 2014.

KATZMARZYK, P. T.; HEYMSFIELD, S. B.; Bouchard, C. Clinical utility of visceral adipose tissue for the identification of cardiometabolic risk in white and African American adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 480-486, 2013.

KELLER, T. T.; VAN LEUVEN, S. I.; MEUWESE, C.M.; WAREHAM, N.J.; LUBEN, R.; STROES, E.S.; et al. Serum Levels of Mannose-Binding Lectin and the Risk of Future Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 2345-2350, 2006.

KIDMOSE, R. T.; LAURSEN, N. S.; DOBÓ, J.; KJAER, T.R.; SIROTKINA, S.; YATIME, L.; et al. Structural basis for activation of the complement system by C4 cleavage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 109, p. 15425–15430, 2012.

KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochimica. Biophysica Acta**, v. 1572, p. 401–413, 2002.

KLIMEK, I. P.; CEDZYŃSKI, M. Mannan-Binding Lectin in Cardiovascular Disease. **BioMedicine Research International**, v. 2014, p.1–13, 2014.

KÖHLER, I.; SARAIVA, P. J. ORLANDO, B.W.; ZAGO, A.J. Comportamentodos arcadores Inflamatórios e de Injúria Miocárdica na Cirurgia Cardíaca. Correlação Laboratorial com Quadro Clínico de Síndrome Pós-Pericardiotomia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 81, n 3, p. 279-284, 2003.

KOCH, A. Acute Respiratory Tract Infections and Mannose-Binding Lectin Insufficiency During Early Childhood. **JAMA**, n. 285, n.10, p. 1316, 2001.

KOSTNER, K. M. Activation of the complement system: a crucial link between inflammation and atherosclerosis? **European Journal of Clinical Investigation**, v. 34, p. 800–2, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – Patologia – **Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2010.

LA BONTE, L. R.; PAVLOV, V. I.; TAN, Y.S.; TAKAHASHI, K.; TAKAHASHI, M. BANDA, N.K.; et al. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 885–891, 2012.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3481-3488, 2005.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M. Inflammation and Atherothrombosis. From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. **Journal of American College of Cardiology**, v. 48, n. 9, p. A33-46, 2006.

LIBBY, P.; LICHTMAN, A. H.; HANSSON, G. K. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1092–1104, 2013.

LIDANI, K. F. Sistema complemento e adipocinas na doença de chagas crônica. UFPR, 2017.

LINES, S.W.; RICHARDSON, V.R.; THOMAS, B.; DUNN, E.J; WRIGHT, M.J.; CARTER, A.M. Complement and cardiovascular disease - The Missing Link in Haemodialysis Patients. **Nephron**, v. 132, n. 1, p. 5-14, 2016.

LING, M.; MURALI, M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, p. 579-590, 2019.

LIPSCOMBE, R. J.; SUMIYA, M.; HILL, A. V. S.; LAU, Y. L.; LEVINSKY, R. J.; SUMMERFIELD, J. A.; TURNER, M. W. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Human Molecular Genetics**, v.1, p. 709-715, 1992.

LITWIN, S. E. Which measures of obesity best predict cardiovascular risk. **Journal of American College of Cardiology**, v. 52, n. 8, p. 616-619, 2008.

LIUZZO, G.; BIASUCCI, L. M.; GALLIMORE, J.R.; GRILLO, R.L.; REBUZZI, A.G.; PEPYS, M.B.; MASERI, A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. **The New England Journal of Medicine**, v.18, n.7, p. 317-324, 1994.

LUKAWSKA, E.; POLCYN-ADAMCZAK, M.; NIEMIR, Z. I. The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 3, p. 297–318, 2018.

DA LUZ, P. L.; FAVARATO, D. Doença coronária crônica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 72, n. 1, p. 5-21, 1999.

MAIURI, M. C.; GRASSIA, G.; PLATT, A.M.; CARNUCCIO, R.; IALENT, A.; MAFFIA, P. Macrophage autophagy in atherosclerosis. **Mediators Inflammation**, 2013.

MARTIN-VENTURAA, J. L.; MARTINEZ-LOPEZA, D.; ROLDAN-MONTEO, R.; GOMEZ-GUERRERRO, C.; BLANCO-COLIO, L.M. Role of complement system in pathological remodeling of the vascular wall. **Molecular Immunology**, v. 114, p. 207–215, 2019.

MATHERN, D. R.; HEEGER, P. S. Molecules Great and Small: The Complement System. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 9, p. 1636–1650, 2015.

MATTHIJSEN, R.A.; WINTHER, M. P. J.; KUIPERS, D.; MADE, I.V.D.; WEBER, C.; HERIAS, V.M.; et al. Macrophage-specific expression of mannose-binding lectin controls atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 119, n. 16, p. 2188–2195, 2009.

MELDRUM, D. R. Tumor necrosis factor in the heart. **American Journal Physiology**, v. 274, p. 577-595, 1998.

MENEES, D. S.; BATES, E. R. Evaluation of patients with suspected coronary artery disease. **Coronary Artery Disease**, v. 21, n. 7, p. 386-390, 2010.

MEIJA, P. DAVIS, A. E. C1 inhibitor suppresses the endotoxic activity of a wide range of lipopolysaccharides and interacts with live gram-negative bacteria. **Schok**, v. 38, p. 220-225, 2012.

MEIJSEN, S.; VAN DIJK, H.; VERSEYDEN, C.; ERKELENS, D.W.; CABEZAS, M.C. Delayed and exaggerated postprandial complement component 3 response in familial combined hyperlipidemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 811–6, 2002.

MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers Immunology**, v. 6, p. 262, 2015.

MORGAN, B. P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. **Science**, v. 32, p. 265-89, 1995.

MOENS, A. L.; CLAEYS, M. J.; TIMMERMANS, J. P.; VRINTS, C. J. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. **International Journal of Cardiology**, v.100, n. 2, p. 179–190, 2005.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Immunobiologia de Janeway. **Artmed**, p. 80-81, 2010.

MUSCARI, A.; BOZZOLI, C.; PUDDU, G. M.; SANGIORGI, Z.; DORMI, A.; ROVINETTI, C.; et al. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. **American Journal of Medicine**, v. 98, p. 357–64, 1995.

MUSCARI, A. MASSARELLI, G.; BASTAGLI, L.; POGGIOPOLLINI, G.; TOMASSETTI, V.; DRAGO, G.; et al. Relationship of serum C3 to fasting insulin, risk factors and previous ischaemic events in middle-aged men. **European Heart Journal**, v. 21, n. 13, p. 1081–1090, 2000.

NADESALINGAM, J.; DODDS, A. W.; REID, K.B.M.; PALANIYAR, N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 1785–1794, 2005.

NETH, O.; HANN, I.; TURNER, M.W.; KLEIN, N.J. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. **Lancet**, v. 358, p. 614–618, 2001.

NILSSON, B.; HAMAD, O. A.; AHLSTROM, H.; KULLBERG, J.; JOHANSSON, L.; HAENNI, A.; et al. C3 and C4 are strongly related to adipose tissue variables and cardiovascular risk factors. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 44, 2014.

OKSJOKI, R.; JARVA, H.; KOVANEN, P. T.; LAINE, P.; MERI, S.; PENTIKÄINEN, M.O. Association between complement factor H and proteoglycans in early human coronary atherosclerotic lesions: implications for local regulation of complement activation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 630–636, 2003.

OKSJOKI, R.; LAINE, P.; HELSKE, S.; VEHEMAAN-KREULA, P.; MÄYRÄNPÄÄ, M.; GASPE, P.; et al. Receptors for the anaphylatoxins C3a and C5a are expressed in human atherosclerotic coronary plaques. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 90–99, 2007.

OKSJOKI, R.; KOVANEN, P. T.; PENTIKAINEN, M. O. Role of complement activation in atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 477–82, 2003.

ONAT, A., CAN, G., REZVANI, R., CIANFLONE, K. Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1171–1179, 2011.

PAGOWSKA-KLIMEK, I.; CEDZYNSKI, M. Mannan-Binding Lectin in Cardiovascular Disease. **Biomed Reserch International, Article**, 2014.

PARHAM, P. O Sistema Imune. **Artmed**, 2001.

PAVLOV, V.I.; SKJOEDT, M.; TAN, Y.S.; ROSBJERG, A.; GARRED, P.; STAHL, G. Endogenous and natural complement inhibitor attenuates myocardial injury and arterial thrombogenesis. **Circulation**, v. 126, p. 2227–2235, 2012.

PESONEN, E.; HALLMAN, M.; SARNA, S.; ANDSBERG, E.; HAATAJA, R.; MERI, S.; et al. Mannose-binding lectin as a risk factor for acute coronary syndromes. **Annals of Medicine**, v. 41, p. 591–598, 2009.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; STEFFENSEN, R.; JENSENIUS, J.C. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. **Journal of Immunological Methods**, n. 257, p. 107–116, 2001.

PHIELER, J.; GARCIA-MARTIN, R.; LAMBRIS, J. D.; CHAVAKIS, T. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 47–53, 2013.

PILELY, K.; ROSBJERG, A.; GENSTER, N.; GAL, P; PÁL, G.; HALVORSEN, B.; et al. Cholesterol crystals activate the lectin complement pathway via ficolin-2 and man-nose-binding lectin: implications for the progression of atherosclerosis. **Journal of Immunology**, v. 196, p. 5064–74, 2016.

PINHO, R. A.; ARAUJO, M. C.; GHISI, G.L.M.; BENETTI, M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, n. 4, 2010.

RAWISH, E.; SAUTER, M. SAUTER, R.; NORDING, H.; LANGER, H.F. Complement, inflammation and thrombosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n.14, 2021

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797, 2010.

ROSS, R. Atherosclerosis-- an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUSH, J. W.; FORD, R. J. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. **Clinical Hemorheology Microcirculation**, v. 37, n. (1-2), p. 185-192, 2007.

SAEVARSDOTTIR, S.; VIKINGSDDOTTIR, T.; VIKINGSSON, A.; MANFREDSDOTTIR, V.; GEIRSSON, A.J.; VALDIMARSSON, H. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. **The Journal of Rheumatology**, v. 28, p. 728–734, 2001.

SCHLAF, G.; DEMBERG, T.; BEISEL, N.; SCHIEFERDECKER, H.L.; GÖTZE, O. Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: some critical notes. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 2-3, p. 231-239, 2001.

SCHATZ-JAKOBSEN, J. A.; PEDERSEN, D. V.; ANDERSEN, G. R. Structural insight into proteolytic activation and regulation of the complement system. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 59–73, 2016.

SCHOOS, M. M; MUNTHER-FOG, L.; SKJOEDT, M.; RIPA, R.S.; LONBORG, J.; KASTRUP, J.; et al. Association between lectin complement pathway initiators, C-reactive protein and left ventricular remodeling in myocardial infarction—A magnetic resonance study. **Molecular Immunology**, v. 54, p. 408–414, 2013.

SEIFERT, P.; HUGO, F.; HANSSON, G.K.; BKAKDI, S. Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. **Laboratory Investigation**, v. 60, p. 747–754, 1989.

SMILEY, J.D.; MOORE, S.E. Immune complex vasculitis: role of the complement and IgG Fc receptor functions. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 289, p. 267-277, 1989.

SHIELDS, K. J.; MOLLNES, T. E.; EIDET J. R.; MIKKELSEN, K.; ALMDAHL, S.M.; BOTAZZI, B.; et al. Plasma complement and vascular complement deposition in patients with coronary artery disease with and without inflammatory rheumatic diseases. **PLoS One**. v. 12, n. 3, 2017.

SINGH, S. S.; CHEUNG, R. C.; WONG, J. H.; NG, T. B. Mannose Binding Lectin: A Potential Biomarker for Many Human Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 33, p. 3847-3860, 2016.

SPEIDL, W. S.; KASTL, S. P.; HUBER, K.; WOJTA, J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 3, p. 428–440, 2011.

SUMMERFILD, J. A.; SUMIYA, M.; LEVIN, M.; TURNER, M. W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **The BMJ**, v. 314, p. 122, 1997.

SUPER, M.; THIEL, S.; LU, J.; LEVINSKY, R. J.; TURNER, M. W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. **Lancet**, v. 2, p.1236–1239, 1989.

SZEPLAKI, G.; PROHASZKA, Z.; DUBA, J.; RUGONFALVI-KISS, S.; KARADI, I.; KOKAI, M. et al. Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. **Atherosclerosis**, v. 177, 383-389, 2004.

TIMMERS, L.; PASTERKAMP, G.; DE HOOG, V. C.; ARSLAN, F.; APPELMAN, Y.; DE KLEIJN, D. P. The innate immune response in reperfused myocardium. **Cardiovascular Research**, v. 94, n. 2, p. 276-283, 2012.

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

TORZEWSKI, J.; OLDROYD, R.; LANHMANN, P.; FITZSIMMONS, C.; PROUDFOOT, D.; BOWYER, D. Complement induced release of monocyte chemotactic protein from human smooth muscle cells a possible initiating event in atherosclerotic lesion formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.16, p.673-677, 1996.

TRENDELENBURG, M.; THEROUX, P.; STEBBINS, A.; GRANGER, C.; ARMSTRONG, P.; PFISTERER, M. Influence of functional deficiency of complement mannose-binding lectin on outcome of patients with acute ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. **European Heart Journal**, v.31, p. 1181-1187, 2010.

TURNER, M. W.; HAMVAS, R. M. Mannose-binding lectin: targetin the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Reviews in Immunogenetic**, v. 2, p. 303-322, 2000.

URSINI, F.; ABENAVOLI, L. The Emerging Role of Complement C3 as A Biomarker of Insulin Resistance and Cardiometabolic Diseases: Preclinical and Clinical Evidence. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 12, n. 1, 2018.

V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção da Aterosclerose. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 101, n. 4, supl. 1, 2013.

VARELA, J. C.; TOMLINSON, S. Complement: an overview for the clinician. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 409–27, jun. 2015.



VENGEN, I. T.; MADSEN, H.O.; GARRED, P.; PLATOU, C.; VATTEN, L.; VIDEM, V. Mannose-Binding Lectin Deficiency Is Associated with Myocardial Infarction: The HUNT2 Study in Norway, v.7, 2012.

ZARANTONELLO, A.; REVEL, M.; GRUNENWALD, A.; ROUMENINA, L.T. C3-dependet effector of complemente. **Immunological Reviews**, v. 313, n.1, 2022

WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1058-1066, 2001.

WAN, S.; LECLERC, J. L.; VINCENT, J. R. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. **The Annals Thoracic Surgery**, v. 63, p. 269-276, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> Acesso em: 10 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/)> Acesso em: 07 maio. 2017.

YAN, W.; CHE, L.; JIANG, J.; YANG, F.; DUAN, Q.; SONG, H.; et al. Depletion of complement system immunity in patients with myocardial infarction. **Molecular Medicine Reports**, v.14, n. 6, p, 5350–6, 2016.

YASOJIMA, K. SCHWAB, C. MCGEER, E. G. MCGEER, P. L. Generation of C-reactive protein and complemente componentes in atherosclerotic plaques. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 1039-1051, 2001

YONGQING, T.; DRENTIN, N.; DUNCAN, R.C.; WIJEYEWICKREMA, L.C.; PIKE, R.N. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 253-262, 2012.

ZARKADIS, I. K.; MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J. D. Phylogenetic aspects of the complemente system. **Developmental Comparative Immunology**, v. 25, p. 745–62, 2001.

ZHOU, X.; FUKUDA, N.; MATSUDA, H.; ENDO M.; WANG, X.; SAITO, K.; et al. Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, n. 305, p. 957–67, 2013.

7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia. v. 107, n. 3, supl. 3, 2016.

## ANEXO I

RG do HC: \_\_\_\_\_ Data Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Pesquisador: \_\_\_\_\_.

SEXO:  M  F

ETNIA: \_\_\_\_\_

- Dor Torácica      Tipo:  A  B  C  D  
 Angina CF-CCS:       I  II  III  IV

**Fatores de Risco:**

- DM  
 HAS  
 Dislipidemia  
 Tabagismo (também presente quando cessado há < 3 meses)  
 Sedentarismo (< 3x/sem e < 30 min)  
 HF de DAC (♂ < 55 anos, ♀ < 65 anos)  
 Obesidade (Peso: \_\_\_\_\_ Kg      Altura: \_\_\_\_\_ m      IMC: \_\_\_\_\_)  
 IRC  
 DAC prévia       IAM prévio       ATC ou RM prévia  
 AVC/AIT       DAOP  
 Outros: \_\_\_\_\_

**Medicações:**

**Obs:**

**Siglas:**

Angina CF-CCS: angina classe funcional- Sociedade Canadense de Cardiologia

DM: diabetes mellitus

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HF: história familiar

DAC: doença arterial coronariana

IMC: índice de massa corporal

IRC: insuficiência renal crônica

IAM: infarto agudo do miocárdio

AVC: acidente vascular cerebral

AIT: ataque isquêmico transitório

ATC: angioplastia transluminal coronariana

RM: revascularização do miocárdio

DAOP: doença arterial obstrutiva periférica

