

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA ROSA LUZ

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE E DA FICOLINA-2 NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.

CURITIBA
2013

PAOLA ROSA LUZ

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE E DA FICOLINA-2 NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara José de Messias-Reason

Co-orientadora: Dr.^a Angelica B. W. Boldt

CURITIBA
2013

Não me esperem para colheita, pois estarei a semear”
(Ernesto Che Guevara)

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores, profissionais ou voluntários espalhados pelo mundo, que estão envolvidos de alguma forma no estudo ou atividades relacionadas à erradicação ou tratamento das doenças negligenciadas, em especial à Doença de Chagas. Em seu trabalho, muitas vezes anônimo, prestam serviço inestimável à saúde humana e são merecedores de todo o reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Registro aqui meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho. Gostaria de agradecer primeiramente a todos os pacientes, razão deste estudo, e aos controles saudáveis pela participação voluntária, exemplos de altruísmo e solidariedade.

Não poderia deixar de agradecer imensamente a minha dedicada orientadora, Dr^a. Iara José de Messias-Reason, não apenas pela orientação primorosa, mas principalmente por sua amizade, parceria e paciência durante essa longa jornada. Muito obrigada pelas palavras de apoio e carinho nos momentos mais difíceis, quando cheguei a duvidar se conseguiria chegar até aqui.

À querida amiga e co-orientadora Dr^a. Angelica B. W. Boldt, exemplo de mulher e pesquisadora, com quem tenho aprendido e crescido acadêmica e pessoalmente, pela participação ativa nas análises e interpretação dos resultados. Agradeço pela amizade e presença constantes durante os quase seis anos desenvolvendo este trabalho, sem as quais certamente a trajetória seria muito mais penosa.

À fundamental colaboração da equipe do Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico, o qual faz juz ao seu nome, realizando um atendimento exemplar aos pacientes, e sem a qual não seria possível a realização deste trabalho. Obrigada Dr^a. Márcia Iurico Miyazaki, Rehlindes Teleginski Rodrigues e Luisa Fanes pela participação ativa no recrutamento dos pacientes, pelo auxílio na análise dos prontuários e por terem me acolhido com tanta simpatia e carinho.

À indispensável participação do biólogo Ery Pedro Tavares nas coletas das amostras dos pacientes.

Ao meu estimado colega e pesquisador Dr. Renato Mitsunori Nisihara, do Laboratório de Imunopatologia do HC, pela imprescindível ajuda na realização dos imunoenaios para quantificação de MBL e no desenvolvimento da parte estatística.

À Prof^a Dr^a. Shirley Ramos da Rosa Utiyama pelas valiosas sugestões, conselhos, amizade e constante ajuda com aspectos burocráticos da pós-graduação.

Aos demais técnicos e colegas do Laboratório de Imunopatologia do HC pelo apoio e bom convívio. Agradeço especialmente à Grazielle Moraes Losso, Isabela

Goeldner da Silva, Caroline Grisbach, Denise Endo da Costa, Stefanie Epp Bochmann, Alberto Cardoso M. Lima, Karla Almeida, Angélica Matias Costa, Sandra J. S. Catarino e Hellen C. W. Mendes pelo companheirismo e força nos momentos de desânimo, e pelos inúmeros momentos de descontração e amizade.

Ao departamento de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas, em especial ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza por autorizar o uso do sequenciador, além do empréstimo de materiais; e ao técnico Valter Baura pelo auxílio, disponibilidade, dicas valiosas sobre a técnica de sequenciamento e boa vontade na inclusão das amostras na rotina do laboratório.

Ao Dr. Nelson Chiminacio Neto, médico residente do Serviço de Ecocardiografia do HC-UFPR, pela disponibilidade em doar seu tempo auxiliando na análise dos prontuários clínicos e interpretação de laudos de exames dos pacientes, além de compartilhar seus conhecimentos e experiência em Cardiologia.

Ao colega MSc Henrique Ravanhol Frigeri por compartilhar sua experiência na análise de seqüências de DNA e seus conhecimentos em Bioinformática.

Às alunas do Curso de Medicina da UFPR Ana Cláudia Marchi Barros e Marcela Clarissa Padeski Ferreira pelo auxílio na revisão dos prontuários médicos dos pacientes.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, em especial ao Professor Dr. Roberto Pontarolo, pelo constante acompanhamento, disponibilidade e boa vontade na resolução das questões burocráticas do curso.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que tornaram esta jornada mais prazerosa, especialmente à Adélia Grzybowski e Brenda Bley Folly cuja convivência extrapolou os limites acadêmicos, tornando-se amigas mais que especiais.

Ao querido Dr J. Kun (*in memorian*) por ter cordialmente aceitado ser meu orientador do estágio no exterior e por ter me recebido carinhosamente no Instituto de Medicina Tropical de Tübingen. Sempre disposto e bem humorado, mesmo após a descoberta da doença que o levou do nosso convívio. Guardo com carinho as lembranças dos 4 meses que tive o prazer de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Aos demais colegas do Instituto de Medicina Tropical de Tübingen, especialmente à Elisandra Granjeiro de Carvalho, Eman Abou Ouf, Hoang Van Tong, Andrea Weierich, Olusola Ojurongbe, Thirumalaisamy P. Velavan, Albert

Lalremruata, Félix Koukouikila-Koussounda, Evelyn Bötter e Maria Paparoupa por toda ajuda, não apenas na execução ou análises dos experimentos, mas principalmente pela amizade, companheirismo, paciência com minhas inúmeras perguntas e pelas dicas de sobrevivência fora do país.

Aos meus familiares que sempre acreditaram na minha capacidade. Em especial aos meus pais, Carlos Eduardo Luz e Valquiria Rosa Luz, que ofereceram todo apoio necessário para que eu pudesse me dedicar exclusivamente à vida acadêmica.

Ao meu amor, Antônio Robson Dias Filho, pelo incentivo, admiração, companheirismo e paciência com as inúmeras horas dedicadas à elaboração desta tese no último ano.

Finalmente, agradeço a Deus, força que nos impulsiona a enfrentar novos desafios e que proporciona os encontros com aqueles que fazem nossa trajetória mais feliz, o caminho menos árduo e as conquistas valerem a pena.

“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida.”

Carlos Chagas (1928)

RESUMO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é considerada uma doença negligenciada, afetando cerca de 10 milhões de indivíduos em todo o mundo. Não existem medicamentos eficazes para combater a infecção crônica, nem tão pouco marcadores de prognóstico e evolução da DC. A lectina ligante de manose (MBL) e a ficolina-2 são moléculas de reconhecimento de padrões moleculares, que se ligam a epítomos presentes em diferentes patógenos, incluindo o *T. cruzi*, promovendo a fagocitose e a lise mediada pela ativação do complemento. As concentrações séricas de MBL são geneticamente determinadas por polimorfismos de nucleotídeo simples no gene *MBL2*, os quais afetam significativamente a expressão da proteína. Os polimorfismos -221 (H/L) e -550 (X/Y), presentes no promotor de *MBL2*, +4 (P/Q) na região 5' não traduzida e as variantes A/D/B/C do exon 1 foram investigados através de sequenciamento gênico em 196 pacientes chagásicos crônicos com as diferentes formas clínicas da DC. Investigaram-se ainda os polimorfismos -986G>A, -602G>A e -4A>G presentes no promotor do gene *FCN2*, além da variante A258S no exon 8 do referido gene, em 243 pacientes com DC crônica, através de PCR em Tempo Real. Como controles, 196 indivíduos saudáveis foram investigados para *MBL2* e 305 para *FCN2* (sendo 135 para o exon 8). Os níveis plasmáticos de ficolina-2 foram quantificados, através de ELISA, em 160 desses pacientes e 71 controles. Um efeito protetor contra a DC sintomática foi observado para o haplótipo *MBL2**LYQC ($p=0.034$, OR=0.22 IC 95% 0.049-0.98). Genótipos funcionais relacionados com a deficiência de MBL (*YC/YC* e *YA/YC*) foram ausentes nas formas sintomáticas da DC ($p=0,015$), enquanto que *XA/YO* e *YO/YO* foram associados com a gravidade da forma cardíaca ($p=0.0048$, OR=0.10, IC 95% 0.02-0.54), sugerindo um efeito protetor da deficiência de MBL na progressão da DC crônica. Pacientes chagásicos apresentaram níveis de ficolina-2 diminuídos em relação aos controles ($p<0.0001$). Entre os pacientes com a forma cardíaca da DC, foram observadas diferenças significativas nos níveis de ficolina-2 entre as classes funcionais de insuficiência cardíaca ($p=0.039$). Níveis diminuídos de ficolina-2 foram associados com a variante *FCN2**258S nos pacientes ($p=0.034$). Além disso, heterozigotos *FCN2**-4A/G foram menos frequentes em pacientes cardíacos do que em controles (OR=0.56, IC 95% =0.33-0.94, $p=0.034$), sendo que a mesma tendência foi observada ao comparar cardíacos com indeterminados (OR=0.55; IC 95%= 0.29-1.04; $p=0.077$). No entanto, heterozigotos *FCN2**-4A/G com as variantes *FCN2**258S do exon 8 e homozigotos *FCN2**258S foram mais frequentes na forma cardiodigestiva, tanto em relação aos controles (OR=14.1, IC 95% = 3.5-56.8, $p=0.0001$) como aos indeterminados (OR=3.2, IC 95% = 1.1-9.4, $p=0.037$). A partir destes resultados pode-se sugerir que a genotipagem dos polimorfismos de *MBL2* e da variante *FCN2**A258S, bem como as concentrações séricas de MBL e ficolina-2 podem ser úteis como possíveis biomarcadores a fim de monitorar a atividade e progressão da DC.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Cardiomiopatia chagásica crônica. Lectina ligante de manose. Ficolina-2. Complemento. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is considered an important neglected tropical disease, affecting approximately ten million people around the world. There are no effective drugs to combat chronic infection or markers of prognosis and evolution of CD. Mannan binding lectin (MBL) and Ficolin-2 are soluble pattern-recognition molecules which bind to sugar moieties of different pathogens, including *T. cruzi*, promoting phagocytosis and lysis by activation of the lectin pathway of complement. A role for MBL in the host resistance against *T. cruzi* infection and in myocardial inflammation has been reported in experimental as well as clinical studies. MBL levels are genetically determined by single nucleotide polymorphisms in *MBL2* gene, which affect significantly serum levels of the protein. We investigated *MBL2* polymorphisms -221 (H/L), -550 (X/Y) in the promoter, +4 (P/Q) in the 5' untranslated region and the exon 1 variants (A/D/B/C) by sequencing in 196 chronic CD patients presenting, indeterminate, cardiac, digestive and associated clinical forms. We also investigated *FCN2* polymorphisms (-986G>A, -602G>A, and -4A>G in the promoter and A258S in exon 8) using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) based real-time PCR assay in 243 patients, presenting the different clinical manifestations of chronic CD. As controls, 196 healthy individuals were investigated for *MBL2* and 305 for *FCN2* (being 135 for exon 8). In addition, ficolin-2 levels were quantified by ELISA in 160 chronic CD patients and 71 healthy individuals. A protective effect against symptomatic CD was observed for the *MBL2**LYQC haplotype (p=0.0342; OR=0.2185; CI 95% 0.0488 – 0.9787). In addition, functional *MBL2** genotypes related to MBL deficiency (YC/YC and YA/YC) were absent in CD symptomatic forms (p=0.015) when compared with controls while XA/YO and YO/YO were related to the severity of cardiac commitment (p=0.0048 OR=0.10, CI 95% 0.02-0.54), suggesting a protective effect of MBL deficiency against chronic chagasic cardiomyopathy. CD patients presented lower ficolin-2 plasma levels than controls (p <0.0001). Among the different groups of cardiac commitment, individuals with the less severe form had higher ficolin-2 levels (p=0.039). Lower ficolin-2 levels were found associated with the 258S variant in the patients (p=0.034). A lower frequency of -4A/G heterozygotes was observed in cardiac patients than in controls (OR=0.56, 95%CI= 0.33-0.94, p=0.034). Heterozygote *FCN2** -4A/G genotypes with the 258S variant and 258S homozygotes were nevertheless more frequent among cardiodigestive patients when compared to controls (OR=14.1,95% CI=3.5-56.8, p=0.0001) and to indeterminate patients (O.R.=3.2,95%CI=1.1-9.4, p=0.037). We also found an association of 258S variant with cardiodigestive CD form compared to the controls (OR=2.24,95%CI=1.1-4.5, p=0.037). These results suggest that *MBL2* genotyping and *FCN2** A258S variant, as well as MBL and ficolin-2 levels may be useful as possible biomarkers of activity and progression of CD.

Keywords: Chagas disease. Chronic chagasic cardiomyopathy. Mannan-binding lectin. Ficolin-2. Complement. *Trypanosoma cruzi*.

LISTAS DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1 - CARLOS CHAGAS.....	18
FIGURA 2 - INSETO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS.....	19
FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
FIGURA 4 - EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DE CHAGAS	26
FIGURA 5 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO	31
FIGURA 6 - GENE <i>MBL2</i>	37
FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE MBL E FICOLINAS	40
FIGURA 8 - GENE <i>FCN2</i>	40
FIGURA 9 - DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS <i>FCN2</i> ATRAVÉS DA ANÁLISE DAS CURVAS DE MELTING.....	53
QUADRO 1 – ESTADIAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DA AHA	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- DADOS DEMOGRÁFICOS E PARÂMETROS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS.....	48
TABELA 2	- SEQUÊNCIA DE PRIMERS USADOS NA GENOTIPAGEM DE <i>MBL2</i>	50
TABELA 3	- RELAÇÃO DE PRIMERS E SONDAS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA GENOTIPAGEM DE <i>FCN2</i>	53
TABELA 4	- FREQUENCIAS DOS HAPLÓTIPOS DO PROMOTOR E EXON1 DO GENE <i>MBL2</i> NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES.....	57
TABELA 5	- GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.....	58
TABELA 6	- HAPLÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.....	59
TABELA 7	- GENÓTIPOS <i>MBL2</i> NA FORMA CARDÍACA DA DC DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	63
TABELA 8	- CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES...	64
TABELA 9	- FREQUENCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DE <i>FCN2</i> EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES	67
TABELA 10	- FREQUENCIA DOS GENÓTIPOS <i>FCN2</i> NOS PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES	68

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	- GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL NOS PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES	60
GRÁFICO 2	- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES	61
GRÁFICO 3	- GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS CLASSES FUNCIONAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA...	62
GRÁFICO 4	- CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES	65
GRÁFICO 5	- CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS DIFERENTES CLASSES FUNCIONAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	66
GRÁFICO 6	- CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES	70
GRÁFICO 7	- CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES DE ACORDO COM A PRESENÇA DA VARIANTE <i>258S</i>	71
GRÁFICO 8	- CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FICOLINA-2 EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	- <i>American Heart Association</i>
CCC	- Cardiomiopatia chagásica crônica
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidratos
Cy-5	- cianina-5
DAF	- Fator acelerador de decaimento
DC	- Doença de Chagas
ddNTP	- Didesoxinucleotídeo trifosfatado
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfatado
DTH	- Hipersensibilidade do tipo tardia
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
FAM	- 6-carboxi-fluoresceína
<i>FCN2</i>	- Gene da Ficolina-2
FEVE	- Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FRET	- <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
Funasa	- Fundação Nacional de Saúde
HC	- Hospital de Clínicas
IC	- Insuficiência cardíaca
IFI	- Imunofluorescência indireta
KDa	- Quilodaltons
MAC	- <i>Membrane Attack Complex</i>
MASP	- <i>MBL-Associated Serine Protease</i>
MBL	- <i>Mannan Binding Lectin</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR-SSP	- <i>Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer</i>
SMF	- <i>Sistema Mononuclear Fagocítico</i>
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	17
2.1.1 Histórico	17
2.1.2 Agente Etiológico e Vetor	19
2.1.3 Ciclo de vida.....	20
2.1.4 Transmissão	22
2.1.5 Epidemiologia.....	23
2.1.6 Sintomatologia e Formas Clínicas.....	24
2.1.7 Aspectos Imunopatológicos da DC	27
2.1.7.1 Patogênese da Cardiomiopatia Chagásica Crônica	28
2.2 O SISTEMA COMPLEMENTO	30
2.2.1 Vias de Ativação.....	31
2.2.2 O Sistema Complemento na Doença de Chagas	33
2.3 A LECTINA LIGANTE DE MANOSE	35
2.3.1 Estrutura e Funções	35
2.3.2 Polimorfismo do gene <i>MBL2</i>	37
2.4 FICOLINA-2.....	39
2.4.1 Estrutura e Funções	39
2.4.2 Polimorfismos de <i>FCN2</i>	40
2.5 <i>MBL2</i> E <i>FCN2</i> E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS	41
2.5.1 MBL e Ficolina-2 na Doença de Chagas	44
3 HIPÓTESE	44
4 OBJETIVOS	44
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	44
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	45
5 MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	45
5.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA.....	45
5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA.....	46
5.3.1 Pacientes.....	46

5.3.2 Grupo Controle.....	47
5.4 METODOLOGIA.....	48
5.4.1 Coleta de sangue	48
5.4.2 Quantificação de MBL e Ficolina-2.....	48
5.4.3 Extração do DNA genômico	49
5.4.4 Genotipagem de <i>MBL2</i>	49
5.4.4.1 Análise dos genótipos e haplótipos de <i>MBL2</i>	51
5.4.5 Genotipagem de <i>FCN2</i>	52
5.4.6 Determinação da gravidade da forma cardíaca.....	54
5.4.7 Análise Estatística	54
6 RESULTADOS.....	55
6.1 HAPLÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS E CONTROLES.....	55
6.2 GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.....	55
6.3 GENÓTIPOS <i>MBL2</i> E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.....	59
6.4 GENÓTIPOS <i>MBL2</i> EM PACIENTES NA FORMA CARDÍACA DA DC SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL.....	61
6.5 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.....	63
6.5.1 Concentrações plasmáticas de ficolina-2 em pacientes chagásicos nas diferentes classes funcionais de insuficiência cardíaca.....	65
6.5.2 Correlação entre níveis de MBL e ficolina-2.....	66
6.5.3 Genótipos de <i>FCN2</i> nos pacientes chagásicos e controles	66
6.5.4 Frequências genótípicas e haplotípicas de <i>FCN2</i>	67
6.5.5 Genótipos e Haplótipos do Promotor de <i>FCN2</i> em relação aos níveis de Ficolina-2.....	69
7 DISCUSSÃO	72
8 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento possui importância fundamental na homeostasia e na defesa imunológica do organismo. Interações entre diferentes proteínas séricas do hospedeiro podem ativar o sistema complemento através das vias clássica, alternativa e das lectinas.

Tanto MBL (lectina ligante de manose) como ficolina-2 são proteínas responsáveis pela ativação da via das lectinas, desempenhando importante papel na primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções, antes da produção de anticorpos específicos. Ambas se ligam a carboidratos presentes na superfície de diversos patógenos, promovendo a opsonização, fagocitose e sua destruição mediada pela ativação do complemento (TURNER, 2003). Existe uma grande variação interindividual nas concentrações séricas de MBL e ficolina-2. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *MBL2* e *FCN2* foram associados a reduções nos níveis séricos da proteína, o que pode levar à diminuição da ativação do sistema complemento e/ou da eficiência fagocítica (MADSEN et al., 1998); (HUMMELSHOJ et al., 2005). Cerca de 13% da população mundial possui haplótipos que determinam baixa produção de MBL e 22% simplesmente não a produz (VERDU et al., 2006). Baixas concentrações de MBL estão associadas a maior susceptibilidade a infecções por vírus, bactérias, fungos e protozoários. Em alguns casos, a deficiência de MBL parece ser vantajosa, especialmente em infecções causadas por patógenos intracelulares, os quais usam a opsonização por componentes do complemento e seus respectivos receptores nos fagócitos para infectar o hospedeiro (TURNER, 2003). Além disso, existem evidências do seu papel pró-inflamatório e participação na injúria tecidual, influenciando na gravidade de várias doenças, inclusive cardiovasculares (JORDAN, MONTALTO e STAHL, 2001; BUSCHE et al., 2008).

A Doença de Chagas (DC) é uma das doenças de mais larga distribuição na América Latina, afetando milhões de indivíduos, com relevantes implicações médicas, sociais e econômicas (JUNQUEIRA JUNIOR, 2006; HOTEZ et al., 2008). O *Trypanosoma cruzi*, agente causal da DC, é um patógeno intracelular obrigatório que infecta principalmente macrófagos, fibroblastos, células do miocárdio, glias e células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) (LEVINSON e JAWETZ, 2006; LIEKE et al., 2006).

A infecção chagásica ocorre predominantemente nos primeiros anos de vida e os indivíduos que sobrevivem ao período agudo da infecção permanecem infectados pelo resto da vida. Muitos medicamentos foram testados contra o *T. cruzi*, porém, sem sucesso (DIAS, 1999). As drogas utilizadas atualmente no tratamento etiológico são efetivas apenas na fase aguda da infecção e o tratamento é frequentemente interrompido devido aos efeitos colaterais (MAYA et al., 2010). Há mais de 25 anos não são produzidos novos medicamentos (DOS SANTOS, SOARES e DE CARVALHO, 2004; DNDI, 2007). A DC é considerada uma doença incapacitante, que na sua fase crônica acomete indivíduos em idade produtiva de trabalho, apresentando repercussões importantes de ordem socioeconômica e previdenciária. A magnitude do custo social da doença torna-se evidente quando se considera o elevado número de pessoas infectadas. Destaca-se o elevado custo social incidente sobre a imensa parcela da força de trabalho dedicado à produção agrícola. Em alguns dos centros metropolitanos, a prevalência de trabalhadores acometidos pela doença é de 4 a 7% (VINHAES e DIAS, 2000). Além disso, os indivíduos chagásicos são muitas vezes estigmatizados pelo diagnóstico da doença, chegando a ser rejeitados em exames admissionais (IANNI e MADY, 1997). A DC é um exemplo primário do peso significativo e sofrimento imposto pelas doenças negligenciadas, altamente prevalentes nas Américas (FRANCO-PAREDES et al., 2007).

Existe uma ampla variação na evolução das formas clínicas da DC, que compreende casos de inalterabilidade por toda vida à progressão continuada da doença, culminando com a morte do indivíduo. Porém, há muita controvérsia sobre que fatores influenciam essa evolução. A lectina ligante de manose (MBL) e a ficolina-2 são moléculas de reconhecimento de padrões moleculares, que se ligam a epítomos presentes em diferentes patógenos, incluindo o *T. cruzi*, promovendo a fagocitose e a lise mediada pela ativação do complemento. Embora o envolvimento da resposta imunológica na fisiopatogenia da DC tenha sido demonstrado em numerosos estudos, são raros àqueles em que investigou-se a participação da MBL e não há estudos sobre ficolina-2 em pacientes chagásicos.

Os avanços alcançados no controle da transmissão vetorial é um fator determinante da redução do número de chagásicos, contudo, é preciso avançar no controle da doença existente entre os milhões de infectados (YASUDA, 2000). Estratégias no sentido de se definir grupos de risco, passíveis de intervenção

terapêutica e/ou readaptação profissional, são fundamentais e devem ser encorajadas (RIBEIRO e ROCHA, 1998; YASUDA, 2000).

Considerando-se a ausência de marcadores prognósticos capazes de indicar os caminhos da evolução da DC, bem como o reconhecido papel de MBL e ficolina-2 na resposta imunológica inata contra infecções, o presente trabalho visa investigar a influência dos polimorfismos funcionais de *MBL2* e *FCN2* na progressão clínica de indivíduos chagásicos. A elucidação dos processos imunopatológicos envolvidos na DC é essencial não somente para melhorar o entendimento da sua patogênese, como também os métodos de prevenção e terapêuticos, conduzindo a possíveis medidas que possam modificar a história natural da doença em benefício dos milhões de chagásicos existentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Histórico

“Em 1907, eu-lo no vale do Rio das Velhas, no lugarejo histórico de Lassance, cumprindo o seu rigoroso programa de luta antipalúdica que o mais perfeito sucesso viria coroar. A sua casa e o seu laboratório eram apenas um vagão de estrada de ferro... Distante da família, longe do conforto, em que se criara, lutava frente a frente contra o terrível mal, porfiando com inexcedível zelo na preservação da saúde dos obreiros por cuja vida os responsabilizara. Movido por nobilíssimo sentimento de compaixão humana, ia sempre muito além do que lhe exigiam as obrigações da rotina profilática. Percorria aquelas paragens desoladas, levando a incontáveis vítimas de muitos males o remédio salvador e a palavra amiga, guiado seu cérebro privilegiado de pesquisador pelos impulsos generosos de seu coração de médico” (DIAS, E., 1989).

A citação acima se refere à trajetória de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (FIGURA 1), médico sanitarista e genial cientista brasileiro que, em 1909, concluiu as pesquisas destinadas a debelar a tripanossomíase americana, posteriormente denominada Doença de Chagas, em sua homenagem.

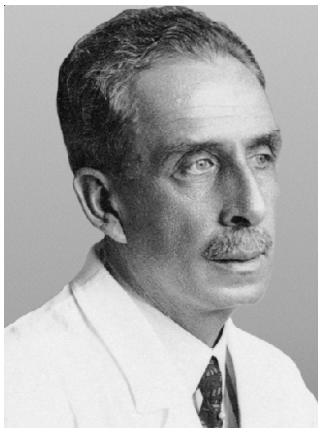


FIGURA 1 – CARLOS CHAGAS
FONTE: Capa do J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.38 nº 4 (2002)

Recém formado em Medicina, com uma tese sobre o controle da malária, integrou-se à equipe do pesquisador Oswaldo Cruz chefiando os trabalhos de combate à malária em Lassence, Minas Gerais, onde estava sendo construída a Estrada de Ferro Central do Brasil. Como bom cientista, sua curiosidade levou-o a examinar animais e pessoas, buscando informações sobre as principais doenças da região. Carlos Chagas encontrou insetos popularmente conhecidos como “barbeiros” infectados com uma espécie de protozoário, ainda desconhecida, e os enviou para Oswaldo Cruz, que em seu laboratório no Rio de Janeiro, conseguiu infectar micos, comprovando a suspeita de que este protozoário deveria ser uma espécie nova que circularia entre barbeiros, mamíferos e, talvez, humanos. A partir daí, Carlos Chagas procurou incessantemente aquele protozoário no sangue de pessoas e animais residentes em casas infestadas por barbeiros. Foi assim que no dia 14 de abril de 1909, ao examinar uma criança febril de dois anos de idade, chamada Berenice, Carlos Chagas encontrou no sangue da menina aquele mesmo protozoário descoberto nos barbeiros e em diversas espécies de animais examinados. A sintomatologia observada na criança coincidia com àquela observada nos animais experimentalmente infectados em laboratório (NEVES, 2005; FIOCRUZ, 2007).

O trabalho de Carlos Chagas é único na história da medicina. Este notável pesquisador não somente identificou o agente etiológico, como também seus reservatórios, além de estudar a morfologia e biologia do parasito nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Seu trabalho abrange ainda diversos outros aspectos da doença, tais como: anatomia patológica, epidemiologia, etiologia,

formas clínicas, meios de transmissão, patogenia, profilaxia e sintomatologia (NEVES, 2005). Foi ele ainda o primeiro a discutir a importância social da nova doença, entre as endemias que assolavam o país. Fazendo uso das palavras do seu mentor:

"O descobrimento desta moléstia constitui o mais belo exemplo do poder da lógica a serviço da ciência. Nunca até agora, nos domínios das pesquisas biológicas, se tinha feito um descobrimento tão complexo e brilhante e, o que mais, por um só pesquisador" (Oswaldo Cruz, 1909).

2.1.2 Agente Etiológico e Vetor

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado causador da DC, assim denominado por Carlos Chagas em homenagem a Oswaldo Cruz, é um parasita intracelular que infecta uma variedade de tipos celulares, mas principalmente macrófagos e fibroblastos (LIEKE et al., 2006). É transmitido por um inseto hematófago vulgarmente conhecido por "barbeiro", "chupão", "fincão", "chupanças", "bicudos" ou "procotós", os quais são muito conhecidos das populações rurais de várias regiões do Brasil. São hemípteros de tamanho relativamente grande, geralmente pretos ou acinzentados, e possuem manchas vermelhas, amarelas ou alaranjadas ao redor de seu abdome (DIAS, 1999). A seguir, pode-se observar um exemplar do gênero *Triatoma*, bem como a classificação taxonômica do inseto (FIGURA 2):



Classe: Insecta
Ordem: Hemiptera
Família: Reduviidae
Subfamília: Triatominae
Gênero: *Triatoma*

FIGURA 2 - INSETO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS
FONTE: MAGUIRE (2006)

O barbeiro pode alimentar-se de qualquer tipo de sangue seja de aves, mamíferos ou mesmo animais de sangue frio. Com a proximidade do homem, acompanhada muitas vezes, da destruição de seu ambiente natural, o barbeiro passa a construir seus ninhos em paredes de choupanas e a se alimentar de sangue humano à noite, picando principalmente a região da face, ao redor da boca e dos olhos, daí o termo “barbeiro” ou “chupão”. A picada do inseto não é dolorosa, pois o barbeiro possui na saliva uma substância que anestesia o local onde introduz sua probóscide, porém provoca uma pequena coceira (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

Existem mais de 100 espécies de barbeiros amplamente difundidas nas Américas, sendo encontrados desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina (DIAS, J. C. P., 1989). Segundo dados do Ministério da Saúde (2010), das 140 espécies conhecidas, 69 foram identificadas no Brasil, das quais 30 já foram capturadas em ambiente domiciliar. Com a interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* quatro outras espécies têm especial importância na transmissão da DC para o homem: *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*.

2.1.3 Ciclo de vida

O *T. cruzi* possui em seu ciclo biológico, nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, várias formas evolutivas (FIGURA 3). O ciclo de vida envolve o inseto do gênero *Triatoma* como vetor; seres humanos e animais como hospedeiros reservatórios, os quais incluem gatos e cachorros domésticos; além de espécies selvagens como tatu, guaxinim e rato. Nos hospedeiros vertebrados e em cultura de tecidos são encontradas intracelularmente as formas amastigotas e, extracelularmente, as formas tripomastigotas, presentes no sangue circulante.

O ciclo no barbeiro começa com a ingestão de tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro reservatório. No estômago do inseto, essas se transformam em formas arredondadas, com flagelo circundando o corpo, denominadas esferomastigotas, que por sua vez transformam-se, no intestino, em epimastigotas. No intestino médio, as formas epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, sendo responsáveis pela manutenção da infecção no vetor. No reto, as

epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas. As formas infectantes para os vertebrados denominam-se tripomastigotas metacíclicas, as quais encontram-se na porção final do intestino do vetor e são eliminadas juntamente com suas fezes. Considerando o mecanismo natural de infecção pelo *T. cruzi*, as formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sanguíneo, penetram através do local da picada e interagem com células do SMF da pele ou mucosas do hospedeiro. Neste local ocorre a transformação das tripomastigotas em amastigotas, que então se multiplicam por divisão binária simples. Em seguida, ocorre a diferenciação das amastigotas em tripomastigotas, as quais são liberadas da célula hospedeira para o interstício e atingem a corrente sanguínea. A partir daí podem invadir outras células de qualquer tecido ou órgão e cumprir novo ciclo celular, quando não destruídas por mecanismos imunológicos do hospedeiro. Para completar o ciclo, tripomastigotas podem ser novamente ingeridas por triatomíneos, onde cumprirão seu ciclo extracelular (NEVES, 2005).

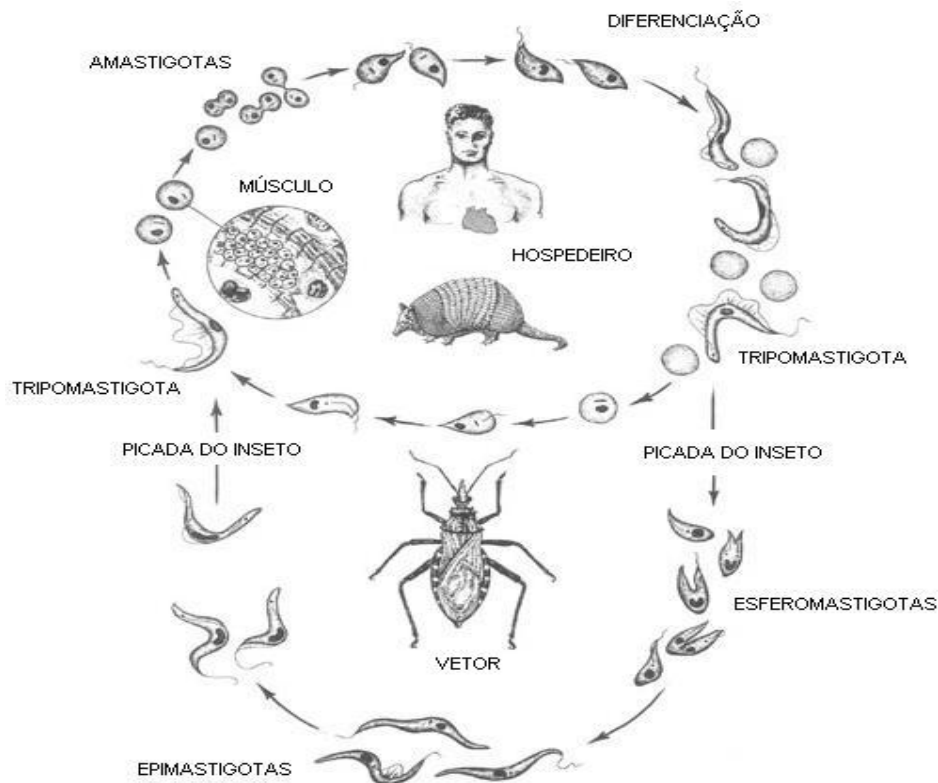


FIGURA 3 – CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*
 FONTE: http://www.bact.wisc.edu/foodsafety/parasite/t_cruzi_lcycle.jpg

A tripomastigota metacíclica constitui a forma mais natural de infecção para o hospedeiro. Entretanto, foi demonstrado que amastigotas circulam no sangue de mamíferos infectados e estas podem invadir suas células (KAHN et al., 1995). Muitos tipos celulares podem ser infectados, entretanto, células do miocárdio, células gliais e células do SMF são os alvos mais frequentes (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

2.1.4 Transmissão

A DC era primitivamente restrita aos pequenos mamíferos das matas e campos das Américas, tais como tatus, gambás e roedores, os quais convivem com barbeiros silvestres, e por onde circula o *T. cruzi* sem ocasionar prejuízo aos mesmos. A chegada do homem e os processos de colonização ocasionando desequilíbrios ecológicos (devido ao desmatamento e queimadas) desalojaram os barbeiros do seu ambiente silvestre, fazendo com que os mesmos invadissem as habitações rústicas e pobres dos lavradores e colonos e, conseqüentemente, levando a doença ao homem e aos mamíferos domésticos (DIAS e DIAS, 1989).

Os triatomíneos, hematófagos estritos, encontraram naquelas habitações uma condição ideal de abrigo e oferta de alimento abundante, tornando a transmissão vetorial o mecanismo primário de difusão da doença. Esta adaptação dos vetores à domicialização é considerada o fator primordial da ocorrência e da expansão da DC humana (VINHAES e DIAS, 2000).

O mecanismo de transmissão de maior importância epidemiológica é o vetorial (NEVES, 2005). Entretanto, a infecção também pode ser transmitida através de transfusão sanguínea e do transplante, que é considerado o segundo modo mais comum de transmissão do *T. cruzi*. O terceiro modo é a transmissão vertical ou congênita (SCHMUNIS, 2007). Existem ainda outras vias de transmissão secundárias tais como: amamentação, acidentes de laboratório e, ocasionalmente, pela via oral - através da ingestão acidental de água ou alimentos contendo fezes de barbeiro contaminadas (DIAS, 1999; PUNUKOLLU et al., 2007).

Existem relatos do encontro de tripomastigotas em sangue menstrual de mulheres chagásicas e no esperma de cobaias infectados. Além disso, já se conseguiu demonstrar infecção experimental, após depositar o *T. cruzi* em vagina de

ratas. Entretanto, a via de transmissão sexual nunca foi comprovada na espécie humana (NEVES, 2005).

2.1.5 Epidemiologia

A infecção chagásica estende-se através das Américas do Norte, Central e do Sul, distribuindo-se em 21 países. Durante muito tempo a DC foi considerada uma endemia exclusiva das Américas e por esse motivo, foi inicialmente denominada “tripanossomíase americana” (LEVINSON e JAWETZ, 2006). Atualmente sabe-se que a DC é um problema mundial, com diversos casos notificados em países considerados não endêmicos, tais como Espanha, Estados Unidos, Canadá e Austrália, os principais destinos dos imigrantes latinos. Problemas econômicos e políticos estimulam a migração, propagando a DC dos países endêmicos para os países desenvolvidos (BARCELÓ, 2006). Em áreas não endêmicas, as principais vias de transmissão ocorrem por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e através da via congênita (REYES, 1993; SCHMUNIS, 2007; PIRON et al., 2008).

As medidas de controle adotadas modificaram consideravelmente a epidemiologia da doença, no que diz respeito à sua incidência e formas de transmissão (LEDERBOUR, DIAS e VINHAES, 2004). Após mais de 20 anos desde a implementação destas ações de controle de maneira sistemática e regular, a Organização Pan-Americana da Saúde certificou o Brasil, em 2006, como a primeira nação da América Latina livre da transmissão da DC pela espécie *Triatoma infestans*, restando apenas o estado da Bahia com potencial de transmissão (OPAS/OMS, 2006). No Paraná, de acordo com dados da Funasa, a espécie *T. infestans* foi encontrada pela última vez, em 1991. Embora o *T. infestans*, responsável por grande parte dos casos crônicos existentes tenha sido exterminado, é importante considerar que existem outras espécies de vetores silvestres, de menor importância epidemiológica, as quais aproximam-se dos domicílios humanos, como é o caso do *Panstrongylus megistus* no Paraná. Além disso, casos autóctones que até recentemente vinham sendo detectados de maneira isolada na Amazônia, vêm aumentando gradativamente nos últimos anos, o que significa que a endemia pode ainda se expandir geograficamente (FERREIRA, FREITAS e COSTA, 2007; KOPP et al., 2009).

Apesar da significativa diminuição da infecção e mortalidade nas últimas décadas, alcançada através das iniciativas do controle vetorial e do monitoramento de doadores em bancos de sangue, estima-se que existam 16 a 18 milhões de indivíduos infectados, desde o sul dos Estados Unidos até a Patagônia. Calcula-se ainda que a população sob risco de contaminação na América Latina seja de aproximadamente noventa milhões (TDR, 2005; MAGUIRE, 2006). O inquérito sorológico nacional, realizado no final da década de 70, estimou a existência de cinco milhões de brasileiros infectados pelo *T. cruzi*, na área endêmica que se estende do Piauí ao Rio Grande do Sul (VINHAES e DIAS, 2000), sendo relatada uma prevalência de 4,0% no Paraná (CAMARGO et al., 1984). A mortalidade precoce e invalidez causada pela DC, a qual frequentemente ocorre na população mais produtiva, jovens adultos, resulta em uma perda econômica devastadora nas Américas. Em 1995, esta foi estimada em US\$8,156 milhões, o que equivale a 2,5% da dívida externa da América Latina. Estimativas antigas sugerem que trezentos milhões de dólares foram perdidos no Brasil entre 1979 e 1981 baseados no número total de casos da doença naquele período (MONCAYO, 1997; 2003). Dados mais recentes demonstram que globalmente, a DC está associada com 14.000 mortes por ano e 0,7 milhões de incapacitados, constituindo a sexta mais importante doença tropical negligenciada do mundo (HOTEZ et al., 2007).

A ausência de políticas públicas voltadas para o desenvolvimento de ações para os casos crônicos impede a implantação de estratégias para notificar, quantificar e qualificar as informações. Da mesma forma, a falta de notificação compulsória impossibilita qualquer estimativa mais acurada de prevalência e incidência, desconhecendo-se assim a real dimensão do problema atual (FERREIRA, FREITAS e COSTA, 2007).

2.1.6 Sintomatologia e Formas Clínicas

De modo geral, reconhece-se a presença de três estádios na DC: agudo, crônico indeterminado e crônico determinado. A fase aguda, geralmente oligossintomática, inicia-se após o período de incubação de cerca de sete a dez dias, não sendo reconhecida na maioria das vezes. É mais grave em crianças menores de dois anos, nas quais a letalidade pode chegar a 10% (RIBEIRO e

ROCHA, 1998). Os sintomas, quando presentes, surgem no próprio local em que ocorreu a contaminação pelas fezes do inseto e consistem em: edema facial e presença de um nódulo próximo à picada, conhecido como chagoma ou sinal de Romanã, acompanhados de febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

A febre, um dos sintomas mais freqüentes nessa fase da doença, às vezes o único, é baixa e contínua, com duração prolongada por semanas. Queixas de "mal estar", falta de apetite, edemas da face e do corpo, o aceleração dos batimentos cardíacos e o frequente aumento do fígado e do baço, surgem alguns dias após a penetração do parasita, indicando sua disseminação pelo organismo. O quadro anteriormente descrito é mais comum em crianças com idade entre um e cinco anos. Em indivíduos adultos, geralmente, esses sinais ficam muito atenuados e a fase inicial da doença passa despercebida, confundindo-se com uma gripe ou mal estar passageiro. Em geral, a fase aguda da infecção dura algumas semanas, sendo que a febre e os demais sintomas tendem a desaparecer espontaneamente. Porém, em certos casos graves, sobretudo em crianças, pode ocorrer o óbito devido a um ataque intensivo dos parasitas ao coração e sistema nervoso central (DIAS e DIAS, 1989). No início da infecção a parasitemia é mais elevada. Quando o hospedeiro desenvolve resposta imune eficaz, a parasitemia diminui e a infecção tende a se cronificar (NEVES, 2005). Cerca de quatro a dez semanas após a infecção inicial, o indivíduo entra na fase crônica indeterminada, também conhecida como fase latente, a qual se caracteriza pela ausência de sintomas, além de radiografia e eletrocardiograma normais. A maioria dos indivíduos permanece nessa forma indefinidamente, outros, geralmente após intervalo de dez a 20 anos, evoluem para alguma das formas crônicas determinadas da doença, apresentando danos cardíaco e/ou digestivo irreversíveis e, menos frequentemente, neurológicos. O músculo cardíaco é o tecido mais frequente e intensamente afetado. Além disso, o dano neuronal provoca arritmias cardíacas e perda do tônus muscular do cólon e esôfago, levando à formação de megacólon e megaesôfago, respectivamente (RIBEIRO e ROCHA, 1998; LEVINSON e JAWETZ, 2006). Na FIGURA 4 encontra-se uma representação esquemática da evolução clínica da DC.

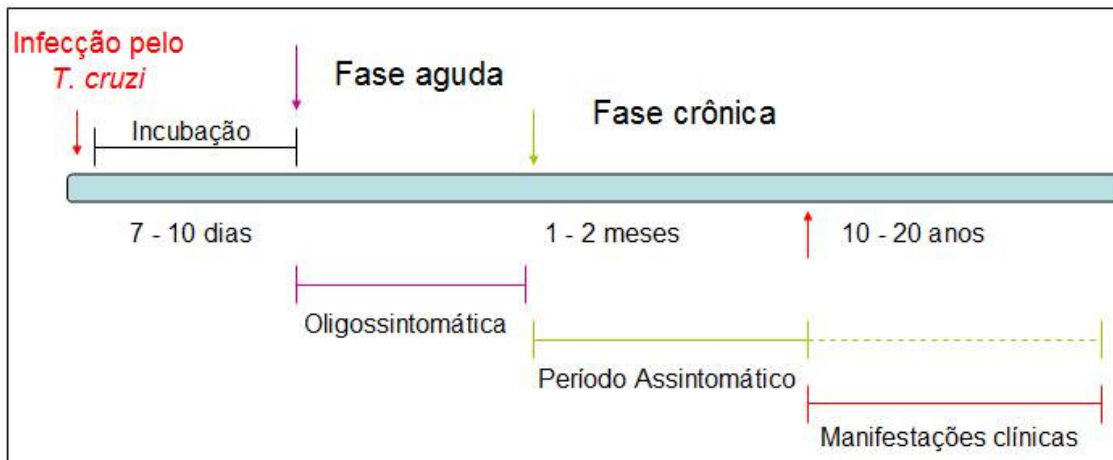


FIGURA 4 – EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DE CHAGAS
 FONTE: O AUTOR

Segundo Ribeiro e Rocha (1998), estima-se que cerca de 50% dos indivíduos infectados se encontrem no estágio indeterminado. Embora os pacientes nesta condição apresentem de modo geral bom prognóstico, cerca de 2 a 5% evoluem anualmente para uma das formas sintomáticas da DC. Em cinco a dez anos de evolução clínica, cerca de um terço dos pacientes indeterminados podem ser cardiopatas. A maioria apresentando cardiopatia leve, porém, alguns indivíduos desenvolvem formas mais graves (RIBEIRO e ROCHA, 1998). Nos estágios finais, ocorre acentuado aumento do coração com grave insuficiência cardíaca (IC), fenômenos tromboembólicos e arritmias graves (ROSSI e MENGEL, 1992). A IC é o estado fisiopatológico em que o coração é incapaz de bombear sangue a uma taxa satisfatória às necessidades dos tecidos metabolizadores, ou pode fazê-lo apenas a partir de uma pressão de enchimento elevada (BRAUNWALD e BRISTOW, 2000).

As mortes causadas por DC ocorrem comumente devido a arritmias e falha cardíaca. A morte súbita representa um risco constante em qualquer estágio clínico e pode ocorrer em um a dois terços dos pacientes que vão a óbito devido à DC. Embora a maioria destes pacientes tenha apresentado evidências clínicas de IC prévia, cerca de um terço a um quinto das mortes súbitas entre chagásicos ocorrem em pacientes assintomáticos. Assim, esta pode ser a primeira manifestação clínica da doença, retirando a vida de pessoas jovens, produtivas e em condições aparentemente saudáveis (ROSSI e MENGEL, 1992; RIBEIRO e ROCHA, 1998).

2.1.7 Aspectos Imunopatológicos da DC

Existem fortes evidências da participação tanto da resposta imune humoral como celular na patogênese da DC. A fase aguda caracteriza-se pela intensa multiplicação do parasita e invasão às células do hospedeiro. Num estudo experimental em ratos, sugeriu-se que as formas tripomastigotas sanguíneas penetram ativamente nos macrófagos (KIPNIS, CALICH e DA SILVA, 1979). À medida que o ciclo de invasão e ruptura celular se repete, o histiotropismo se desloca do SMF para células musculares lisas e cardíacas, e para o sistema nervoso. A disseminação do parasita pelos tecidos do hospedeiro provoca áreas de inflamação multifocal em diversos órgãos, predominantemente no coração e sistema nervoso, seguido de miosite focal e comprometimento dos plexos nervosos intestinais, nos casos mais graves. Ao mesmo tempo em que a infecção se estende aos diferentes tecidos, a parasitemia aumenta e a resposta imune é iniciada com a produção de anticorpos e intensa reatividade celular no sítio inicial de inoculação. Durante a fase aguda, existe uma relação evidente entre as lesões inflamatórias e a presença do *T. cruzi*, pois ao romperem as células do hospedeiro estes podem ativar mediadores químicos da inflamação (DIAS e DIAS, 1989).

Nas lesões agudas, observa-se a presença de depósitos de imunoglobulinas na superfície do *T. cruzi* em áreas de acúmulo de polimorfonucleares, sugerindo uma reação humoral do tipo II com a formação local de imunocomplexos. Embora a multiplicação do parasita seja evidente durante o período agudo da infecção, a intensa miocardite nesta fase exhibe sinais ultraestruturais de danos causados pela imunidade mediada por células com predomínio de monócitos, histiócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Estas atingem cardiomiócitos parasitados e não parasitados, além do endotélio de capilares miocárdiais, levando à microangiopatia. Tanto na forma indeterminada quanto na cardíaca observou-se que o sistema imunológico está igualmente mobilizado, com produção de anticorpos *T. cruzi* específicos e dirigidos a antígenos próprios (ANDRADE et al., 1992; DE ANDRADE et al., 1996).

A resposta imunológica do hospedeiro reduz consideravelmente a carga parasitária, protegendo o hospedeiro contra a infecção massiva; além de promover a modulação da inflamação, caracterizando o fim da fase aguda. Porém, a inflamação persiste na fase indeterminada, de forma branda e focal (ANDRADE, 1999). Com o

fim da fase aguda, os protozoários que não foram eliminados pela resposta humoral podem permanecer viáveis no interior das células infectadas, e assim, a infecção crônica prossegue (BRAUN e DE TITTO, 1985).

2.1.7.1 Patogênese da Cardiomiopatia Chagásica Crônica

Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar a patogênese da cardiopatia chagásica crônica (CCC).

Diversas investigações independentes têm demonstrado que a miocardite difusa com miocitólise e fibrose reparativa, marcantes na CCC, são características de reação de hipersensibilidade tardia (DTH), com infiltrados inflamatórios compostos principalmente de células mononucleares, onde predominam as células linfóides (TORRES, 1960); (ROSSI e BESTETTI, 1995). Junto com a demonstração da deposição de imunoglobulinas e complemento no tecido cardíaco, estes achados constituem importante evidência do envolvimento de fatores imunológicos na patogênese da CCC (CUNHA-NETO et al., 2006). Apesar da evidente participação da resposta imune na injúria tecidual do miocárdio, a natureza do(s) antígeno(s) essencial (is) que incita(m) essa resposta lesiva permanece indefinida (MARIN-NETO et al., 2007).

Antígenos e DNA provenientes do *T. cruzi* bem como células T CD8+ específicas foram encontrados no tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos (FONSECA et al., 2005), fornecendo evidências do recrutamento e expansão de células T - *T. cruzi* específicas para o miocárdio, possivelmente relacionadas à persistência do parasita. Porém, o material proveniente dos parasitas encontrado no miocárdio de pacientes chagásicos crônicos é bastante escasso em comparação com a intensidade da miocardite. Além disso, DNA de *T. cruzi* tem sido também detectado em tecido cardíaco de pacientes com a forma indeterminada. Por fim, a intensidade da parasitemia não está diretamente relacionada com a evolução clínica dos pacientes. Por exemplo, os ninhos de Gaspar Vianna, estrutura semelhante a um cisto, formada pelo agrupamento das formas amastigotas no interior das células do hospedeiro, podem permanecer livres de inflamação, apesar do intenso parasitismo. Portanto, outros fatores, além da persistência do parasita, devem atuar

fazendo com que apenas um subgrupo de indivíduos apresentem danos progressivos no miocárdio (CUNHA-NETO et al., 2006; MARIN-NETO et al., 2007).

Tem sido bastante discutida a hipótese da autoimunidade, na qual se afirma que a quebra da tolerância imunológica e conseqüente dano cardíaco seriam secundários a uma resposta originalmente protetora. Vários mecanismos responsáveis por desencadear a autoimunidade, após a infecção pelo *T. cruzi* têm sido sugeridos: a exposição de antígenos seqüestrados após o dano tecidual, seguida por sensibilização em ambiente inflamatório; o mimetismo molecular, no qual células T e B reconhecem antígenos do parasita que compartilham epítomos similares a componentes específicos do miocárdio, gerando uma resposta autoimune cruzada; e a ativação policlonal levando a produção de autoanticorpos (MARIN-NETO et al., 2007). O soro de pacientes chagásicos contém autoanticorpos específicos para vários autoantígenos expressos em tecidos cardíacos, nervosos, entre outros. No trabalho de Goin *et al.* (1997) o soro de mais de 80% dos pacientes apresentaram anticorpos antineurônio. No mesmo estudo, anticorpos funcionais contra receptores adrenérgicos e muscarínicos encontrados no soro de chagásicos, com a forma cardíaca arritmica, induziu arritmia em coelhos. O soro de pacientes chagásicos crônicos contém anticorpos que possuem reatividade cruzada com proteínas humana e do *T. cruzi*, muitas das quais são evolutivamente conservadas. Anticorpos com reatividade cruzada entre a proteína P0 ribossomal do *T. cruzi* e o receptor β 1-adrenérgico foram detectados em pacientes chagásicos (FERRARI et al., 1995). Além disso, anticorpos cross-reativos entre a cadeia pesada da miosina e a proteína B14 do *T. cruzi* são mais freqüentes no soro de pacientes com a forma cardíaca do que em pacientes na forma indeterminada (CUNHA-NETO et al., 1995).

A resposta *T. cruzi* específica devido à persistência do parasita nos tecidos e a autoimunidade não são incompatíveis ou mutuamente exclusivas e, provavelmente, a combinação de ambas as respostas estejam envolvidas na patogênese da DC. Entretanto, os mecanismos imunopatológicos envolvidos na CCC permanecem pouco compreendidos e bastante controversos. Determinar se a autoimunidade e o mimetismo molecular, tanto quanto a resposta imune dirigida ao parasita, são causas ou conseqüências do dano tecidual na DC cardíaca é a chave para compreender a patogênese da CCC (MARIN-NETO et al., 2007).

2.2 O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é parte integrante da resposta imunológica, sendo considerado um dos principais mediadores da defesa inata do hospedeiro, além de induzir a inflamação e contribuir na remoção de complexos imunes e células apoptóticas. É formado por mais de 30 proteínas plasmáticas e associadas à membrana que interagem entre si, constituindo um complexo sistema reconhecido como um dos principais mecanismos efetores na defesa contra infecções (UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2004a; b). Várias destas proteínas são proteases inativas (zimógenos ou pró-enzimas) as quais se tornam ativas somente após sua clivagem, geralmente por outra protease específica, desencadeando uma série de reações enzimáticas sequenciais em cascata (DIAS DA SILVA e KIPNIS, 1984; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2008).

O sistema complemento é mediador de muitas interações celulares e humorais que ocorrem no hospedeiro incluindo quimiotaxia, fagocitose, adesão celular e diferenciação de células B, auxiliando a coordenar e dirigir a resposta imunológica (CARROLL, 2004). Uma vez ativado, é capaz de induzir várias atividades biológicas através da interação de seus produtos com receptores celulares específicos ou pela inserção de complexos protéicos à membrana celular, formando o complexo de ataque à membrana (MAC). O MAC é o produto final da cascata do complemento resultando em lise e destruição da célula-alvo (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003; UTIYAMA, MESSIAS-REASON e KOTZE, 2004a).

Além do efeito benéfico para o hospedeiro, o complemento apresenta uma relevante participação na etiologia de diferentes doenças imunologicamente mediadas, nas quais uma ativação imprópria, ou excessiva, pode promover grave destruição tecidual decorrente do processo inflamatório. O papel do complemento na patogênese de inúmeras doenças inflamatórias tem sido evidenciado em estudos experimentais e clínicos (WALPORT, 2001).

2.2.1 Vias de Ativação

Três diferentes vias podem iniciar a cascata do complemento (FIGURA 5): clássica, alternativa e das lectinas (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1997; FUJITA, 2002; JANEWAY JR e TRAVERS, 2002).

A via clássica promove a interação entre a imunidade inata e adaptativa. Sua ativação ocorre quando moléculas de C1q ligam-se a imunoglobulinas IgG ou IgM, proteínas de fase aguda, moléculas modificadas e células apoptóticas ou necróticas. Quando a molécula de C1q se liga ao seu substrato ocorre uma mudança de conformação, que resulta na ativação das serinas proteases C1r e C1s associadas à estrutura colagenosa de C1q. A proteína C1s ativa C4 e C2 formando o complexo C4b2a, denominado de C3 convertase.

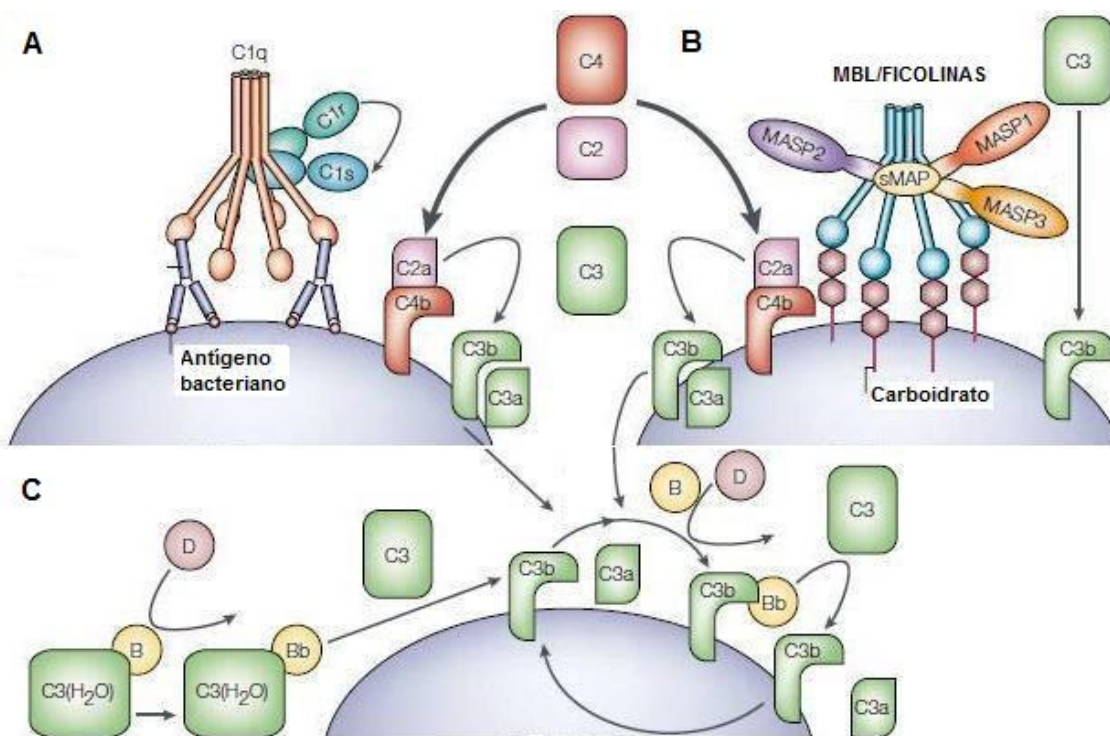


FIGURA 5 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

FONTE: FUJITA (2002)

LEGENDA: A - Via Clássica; B - Via das Lectinas; C - Via Alternativa.

A ativação da via alternativa ocorre, independentemente de anticorpo, quando C3, o qual pode ser ativado através de hidrólise espontânea e contínua, reconhece moléculas presentes na superfície dos patógenos. Quando ativada, a molécula de C3 liga-se ao fator B, que por sua vez sofre ativação e clivagem pelo fator D, originando o complexo C3bBb, funcionalmente idêntico a C3 convertase da via clássica.

Já a ativação pela via das lectinas ocorre em resposta ao reconhecimento de carboidratos comuns à superfície dos patógenos através da MBL ou ficolinas. A via das lectinas foi a mais recentemente descrita, sendo a menos caracterizada das três vias (DEGN, THIEL e JENSENIUS, 2007).

Os eventos precoces da ativação das três vias do complemento convergem na formação da enzima C3 convertase. Tanto na via clássica como das lectinas, a C3 convertase é formada a partir do C4b ligado a membrana e complexado com C2a. Na via alternativa uma C3 convertase homóloga é formada a partir do C3b ligado à membrana alvo e complexado com Bb. Tanto a convertase da via clássica quanto da via alternativa, formadas e unidas à superfície do patógeno, clivam C3 gerando grandes quantidades de C3b, molécula efetora principal na opsonização, e C3a, peptídeo mediador da inflamação. Essas reações enzimáticas onde as proteínas inativas do complemento são clivadas, geralmente produzem dois fragmentos: um maior, com atividade de serina-protease que é retido na superfície do patógeno assegurando a ativação da próxima proteína também nesta superfície; e um pequeno fragmento peptídico, o qual é liberado do sítio da reação e atua como mediador solúvel da inflamação (JANEWAY JR e TRAVERS, 2002).

As moléculas de C3b atuam como opsoninas, unindo-se covalentemente ao patógeno e sinalizando-o para a destruição pelos fagócitos portadores de receptores específicos. Moléculas de C3b também se ligam a C3 convertase para formar a C5 convertase, que catalisa a clivagem proteolítica de C5, produzindo o pequeno peptídeo C5a, importante mediador da inflamação, bem como o fragmento maior, C5b. Tanto na via clássica quanto na das lectinas, a C5 convertase é formada pela ligação de C3b a C4b-2a, produzindo C4b-2a-3b; e na via alternativa, pela ligação de C3b a C3b-Bb produzindo C3b-Bb-3b. O C5 liga-se ao sítio de C3b da C5 convertase e é clivado pela atividade da serina protease C2a ou Bb, gerando então, C5b e C5a. Esta reação é mais limitada que a clivagem de C3, já que C5 só pode

ser clivado quando se liga a C3b no complexo C5 convertase (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1997).

O fragmento C5b inicia os eventos tardios de ativação do complemento, onde os componentes terminais irão formar o MAC. Quando C5 é clivado, ocorre a liberação de C5b que se liga ao C6. O complexo C5b6 por sua vez liga-se a uma molécula de C7. Alterações de conformação promovem a exposição de um sítio hidrofóbico em C7, através do qual o MAC se insere na bicamada lipídica. O C8 liga-se a C5b do complexo C5b67 associado à membrana, inserindo-se também na bicamada lipídica. Na seqüência, cerca de 10 a 16 moléculas de C9 polimerizam-se e formam um poro de 10nm na bicamada lipídica, destruindo a integridade da membrana e interferindo no gradiente eletrolítico da célula, levando à sua lise osmótica (JANEWAY JR e TRAVERS, 2002).

2.2.2 O Sistema Complemento na Doença de Chagas

Existem muitas evidências sobre o envolvimento do sistema complemento na infecção pelo *T. cruzi* e do seu importante papel na evolução clínica da DC, visto que o mesmo constitui uma das primeiras linhas de defesa imunológica a entrar em contato com as formas infectantes do parasita. Foi demonstrado por meio de estudo *in vivo* que a ativação do complemento é fundamental para o controle da DC, sendo que a sua depleção está associada com alta parasitemia e mortalidade precoce em camundongos (BUDZKO, PIZZIMENTI e KIERSZENBAUM, 1975).

A ação lítica do complemento sobre formas tripomastigotas foi demonstrada por Kipnis *et al.* (1987). Embora as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* sejam lisadas pela ação combinada de anticorpos específicos e complemento, uma proporção de parasitas sobrevivem devido a diversos mecanismos de escape à lise pelo complemento. Em estudos pioneiros da década de 80 foi demonstrado que tanto as formas tripomastigotas metacíclicas, presentes na porção final do tubo digestivo do parasita, quanto as sanguíneas ou derivadas de culturas, produzem moléculas que interferem na enzima C3 convertase, que desempenha papel central na ativação das vias clássica e alternativa, permitindo o escape dos parasitas à ação lítica do complemento (KIPNIS *et al.*, 1986; KIPNIS *et al.*, 1988). Joiner *et al.* (1988) realizaram a caracterização bioquímica de um fator produzido pelas formas

tripomastigotas do *T. cruzi* capaz de acelerar o decaimento da C3 convertase (JOINER et al., 1988). Norris *et al.* (1991) purificaram esta glicoproteína, a gp160, e demonstraram sua atividade regulatória. A gp160 restringe a ativação do complemento através da sua ligação ao C3b e inibição da formação de C3 convertase. Essa proteína é ancorada na membrana do parasita através de uma ligação glicosil fosfatidil inositol, similar à proteína regulatória do complemento humana, denominada fator de aceleração do decaimento (DAF) (NORRIS et al., 1991). Tambourgi *et al.* (1993) evidenciaram que o DAF do *T. cruzi* possui similaridades genéticas e funcionais ao DAF humano.

Ferreira *et al.* (2004) demonstraram que a via clássica, bem como a ligação de MBL à manose, pode ser inibida *in vitro* pela calreticulina do *T. cruzi*. Relatou-se ainda que as formas tripomastigotas circulantes na fase aguda da doença expressam em sua membrana uma trans-sialidase que catalisa a transferência de ácido siálico a partir de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas de superfície do *T. cruzi*. Além disso, a enzima trans-neuroaminidase do *T. cruzi* pode promover a de-sialilação, ou seja, retirar ácido siálico da superfície de células endoteliais e do miocárdio de mamíferos, bem como de eritrócitos (LIBBY, ALROY e PEREIRA, 1986). Superfícies de membrana celulares associadas a resíduos de ácido siálico restringem a ativação da via alternativa do complemento (AIELLO et al., 2002).

Durante sua diferenciação em formas infectantes, a qual ocorre no sistema digestivo do inseto vetor, o *T. cruzi* torna-se resistente à lise pela via alternativa do complemento. Foi relatado que a forma predominante de C3 encontrada na superfície das formas epimastigotas é o C3b, enquanto que nas tripomastigotas é o fragmento iC3b na forma inativa e que, portanto, não participa da formação de MAC (JOINER et al., 1986). Os autores também demonstraram que C3b falha em ligar-se ao fator B, o qual é responsável pela amplificação da via alternativa, enquanto apresenta ligação acentuada ao fator H, um inibidor da ativação do complemento. Além disso, as formas amastigotas acumulam em sua superfície grande quantidade de componentes terminais do complemento, o que aumenta consideravelmente sua infectividade, sem causar a morte do parasita. Iida *et al.* (1989) relataram que formas amastigotas possuem em sua superfície uma proteína que se liga ao complexo C5b-9 inibindo sua inserção na membrana dos parasitas, protegendo-os da lise mediada pelo complemento. Aiello *et al.* (2002) postularam um possível papel para o complemento na patogênese da CCC. Segundo estes pesquisadores, a persistência

do parasita na fase crônica pode causar de-sialilação do miocárdio e de células endoteliais pela enzima trans-neuroaminidase do *T. cruzi*, levando à ativação do complemento e depósito de MAC na superfície destas células. Os autores demonstraram um aumento na deposição de MAC no miocárdio de pacientes com CCC e sugerem que este fato está associado à inflamação ativa e a fibrose característica das lesões presentes na CCC (AIELLO et al., 2002). Já no trabalho de Messias-Reason *et al.* (2003) demonstrou-se um papel imunogenético do complemento na DC. Os autores observaram que as variantes C3 F e BF S da via alternativa são marcadores de susceptibilidade e proteção à cardiopatia chagásica, respectivamente.

2.3 A LECTINA LIGANTE DE MANOSE

2.3.1 Estrutura e Funções

A lectina ligante de manose, MBL (*mannose-binding lectin*) é uma proteína solúvel dependente de cálcio, pertencente à família das colectinas que desempenha importante papel na primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções, por se tratar de uma molécula de reconhecimento padrão do sistema imune inato (TURNER, 2003). As colectinas são assim denominadas por serem moléculas compostas de uma região colagenosa e um domínio de lectina do tipo-C, responsável pelo reconhecimento de carboidratos (CRD) (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003). A MBL é uma proteína oligomérica, cujos monômeros polimerizam-se podendo formar desde dímeros até hexâmeros. Cada monômero, ou subunidade, consiste de três cadeias polipeptídicas idênticas de aproximadamente 32 KDa, contendo uma região N-terminal rica em cisteína, uma região colagenosa, uma região hidrofóbica e um domínio de reconhecimento de carboidratos (TAYLOR et al., 1989). O tipo mais comum de MBL circulante parece constituir-se de oligômeros formados por duas a oito subunidades, com massa molecular aparente de 200-700 kDa. A MBL se liga a diversos açúcares tais como manose, fucose, glucose e N-acetil-D-glucosamina, comuns às superfícies dos patógenos, podendo interagir com uma ampla variedade de vírus, bactérias, fungos, leveduras e

protozoários (TURNER, 2003). Evidências funcionais indicam que os diferentes oligômeros podem ter atividades biológicas diferentes (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003).

Um papel para a MBL na defesa do hospedeiro foi primeiramente proposto em 1987 quando Ikeda *et al.* (1987) observaram sua capacidade de ativar a via clássica do complemento. Recentemente foi descoberto que MBL ativa o sistema complemento ao formar um complexo com serina proteases denominadas MASPs, as quais receberam este nome devido à associação com MBL (*MBL-associated serine proteases*). Três proteases, MASP-1, MASP-2 e MASP-3 são atualmente conhecidas por associarem-se à MBL (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003). MASP-1 e MASP-2 são similares aos componentes C1r e C1s da via clássica. Quando o complexo MBL/MASP-2 liga-se à superfície do patógeno ocorre uma mudança conformacional que ativa MASP-2, clivando C4 e C2 para gerar C4bC2b, a C3 convertase (THIEL *et al.*, 1997). A via das lectinas, então, inicia a ativação do complemento similarmente à via clássica, formando a C3 convertase e clivando C3 em C3b e C3a (PRODINGER, 1999). Até pouco tempo atrás a significância biológica de MASP-1 era considerada controversa, apresentando alguma atividade na clivagem de C3 (MATSUSHITA e FUJITA, 1992). Porém, recentemente foi demonstrado que MASP-1 não apenas desempenha importante papel na ativação de MASP-2, como é seu ativador exclusivo, sendo responsável por 60% da clivagem de C2 (HEJA *et al.*, 2012). MASP-1 é crucial para a ativação da via das lectinas em humanos, enquanto que MASP-1 e MASP-3 não são requeridas para o funcionamento da via alternativa, como tem sido sugerido em estudos com camundongos (DEGN *et al.*, 2012). Até o momento, nenhum substrato foi identificado para MASP-3 (DAHL *et al.*, 2001).

Existem evidências de que MBL possui pelo menos quatro diferentes funções: (i) ativação do complemento, (ii) promoção da opsonofagocitose (independente de complemento), por interagir diretamente com receptores de superfície celular; (iii) modulação da inflamação e (iv) promoção de apoptose (TURNER, 2003). Sua importante atividade funcional explica por que a deficiência de MBL foi primeiramente identificada em associação com uma disfunção opsônica em crianças com infecção de repetição (SUPER *et al.*, 1989). A reconstituição da atividade opsônica em indivíduos deficientes foi demonstrada pelos autores através da infusão de MBL purificada.

2.3.2 Polimorfismo do gene *MBL2*

O gene *MBL2* está localizado no cromossomo 10q11.2-q21 (SASTRY et al., 1989) e compreende uma região que inclui 10 kb, onde existem ao menos 87 sítios polimórficos (BERNIG et al., 2004). A concentração de MBL no plasma varia significativamente entre diferentes indivíduos e é determinada geneticamente por SNPs no primeiro exon e na região promotora do gene que codifica a MBL (MADSEN et al., 1995), (FIGURA 6).

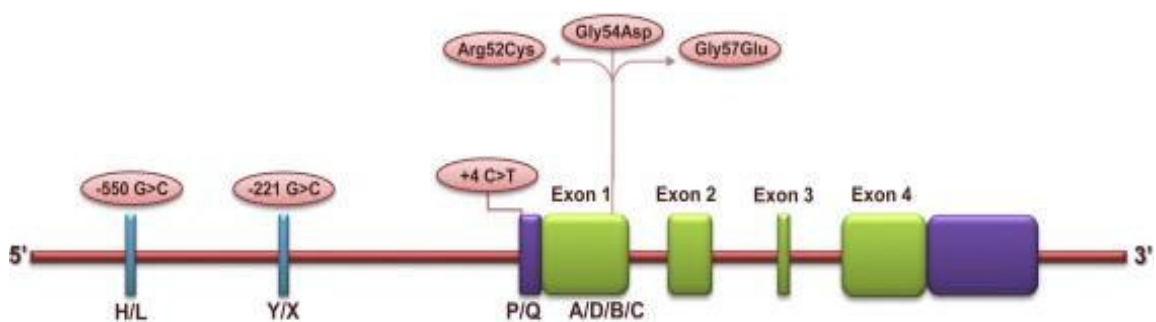


FIGURA 6 – GENE *MBL2*
 FONTE: CARVALHO *et.al* (2010)

Polimorfismos presentes na região promotora do gene *MBL2* (*H/L*, *X/Y*, *P/Q*, nas posições -550, -221 e +4, respectivamente) são conhecidos por afetar a concentração sérica de MBL (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003; TURNER, 2003). Além dos polimorfismos da região promotora, existem quatro variantes estruturais de *MBL2* no exon 1, sendo que a variante *MBL2*^{*A} é a mais comum. Três SNP's localizados nos códons 52 (Arg52Cys, alelo *D*), 54 (Gly54Asp, alelo *B*) e 57 (Gly57Glu, alelo *C*) do exon 1 resultam em falha na produção da proteína multimérica completa e funcional. Além disso, indivíduos heterozigotos para estas mutações apresentam uma diminuição substancial na concentração sérica da proteína, sendo a mesma indetectável em homozigotos, caracterizando a deficiência de MBL nesses indivíduos. A polimerização inadequada da MBL impede sua ligação à manose e, conseqüentemente, a ativação da via das lectinas de maneira efetiva. Entretanto, esta talvez possa funcionar como opsonina ou mediador da citotoxicidade celular (SUPER et al., 1992).

O desequilíbrio de ligação entre os seis referidos SNPs, três na região promotora (*H/L*, *X/Y* e *P/Q*) e três no exon 1 (*A/B*, *A/C* e *A/D*), determina a existência de sete haplótipos associados com concentrações de MBL sérica decrescentes: *MBL2*HYPA* > *LYQA* > *LYPA* > *LXPA* >> *HYPD* = *LYPB* = *LYQC*. Os diferentes polimorfismos descritos resultam em extrema variação na concentração de MBL de até mil vezes em indivíduos aparentemente saudáveis (valores <20–10.000 ng/ml em europeus). É importante notar que indivíduos saudáveis, mesmo com genótipos idênticos, podem apresentar variações de até três vezes nos níveis de MBL (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006). Outros fatores podem afetar os níveis de produção de MBL, tais como hormônios do crescimento (HANSEN et al., 2001) e da tireóide (RIIS et al., 2005) e durante resposta de fase aguda (THIEL et al., 1992). Porém, é importante ressaltar que este aumento não é superior a três vezes, sendo bastante inferior comparado aos valores determinados pela variação genética (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003).

Aproximadamente um terço da população Européia possui genótipos conferindo baixos níveis de MBL e cerca de 5% possui níveis considerados deficientes. A alta frequência de variantes alélicas que conferem a sua deficiência permite sugerir que, em certas condições, MBL pode exacerbar ao invés de amenizar a doença (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006). Porém, Verdu *et al.* (2006) afirmam que a alta frequência de alelos associados com a diminuição, ou ausência, da produção de MBL resultam exclusivamente da migração humana e deriva genética. Segundo os autores, a neutralidade de *MBL2* suporta fortemente a noção de que o polimorfismo deste gene não determina, em nível populacional, um forte efeito na saúde, sugerindo que esta lectina é altamente redundante na defesa em humanos.

2.4 FICOLINA-2

2.4.1 Estrutura e Funções

A ficolina-2, também referida como ficolina-L, reconhece polissacarídeos e glicoconjugados ricos em N-acetilglucosamina (GlcNAc) presentes na membrana plasmática de microrganismos, levando a ativação da via das lectinas (CHEN et al., 2006). Apesar de constituírem a via das lectinas, esta denominação não é totalmente adequada, uma vez que as ficolinas não são capazes de se ligar diretamente aos carboidratos, sendo os compostos acetilados seus ligantes preferenciais (KRARUP et al., 2004). O reconhecimento pela ficolina-2 não se restringe apenas a açúcares acetilados uma vez que o mesmo estende-se a grupos acetilados de modo geral, tais como moléculas de ácido lipoteóico, constituinte da parede celular de bactérias Gram positivas, peptidoglicanos, além de lipopolissacarídeos presentes na superfície de bactérias Gram negativas, β -1,3-glucanos em fungos e glicoconjugados constituintes do envelope do vírus influenza A. Outros possíveis ligantes incluem elastina, corticosteróides e DNA (CEDZYNSKI et al., 2007). Além disso, a ficolina-2 tem a capacidade de interagir com a proteína C reativa, estabilizando a ligação com bactérias e ativando a via das lectinas sobre condições inflamatórias (baixos níveis de cálcio e pH) (NG et al., 2007). Outras funções incluem sua ligação à células apoptóticas tardias, corpos apoptóticos e células necróticas, favorecendo sua fagocitose pelos macrófagos (JENSEN et al., 2007).

As ficolinas são proteínas multiméricas constituídas por quatro ou mais subunidades unidas por pontes dissulfeto (GARRED et al., 2010). Na FIGURA 7, a estrutura das moléculas de ficolina e MBL pode ser comparada.

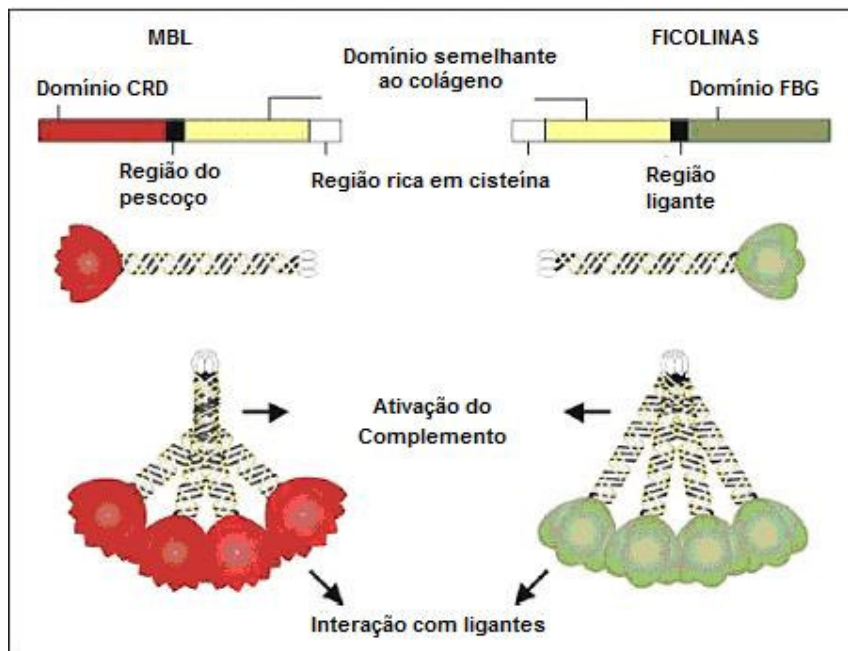


FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE MBL E FICOLINAS

FONTE: GARRED *et al.* (2010)

LEGENDA: CRD - domínio de reconhecimento de carboidratos; FBG - domínio semelhante ao fibrinogênio.

2.4.2 Polimorfismos de *FCN2*

Ficolina-2 é expressa principalmente no fígado. O gene *FCN2* localiza-se no braço longo do cromossomo 9 (9q34), o qual contém oito exons (FIGURA 8).

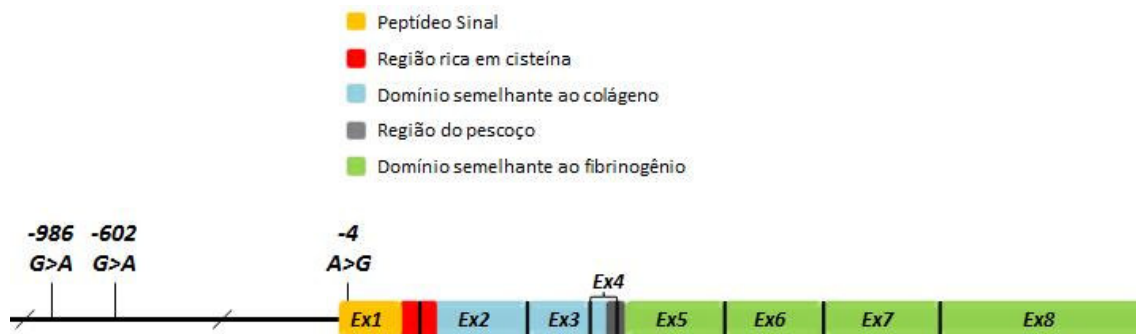


FIGURA 8 - GENE *FCN2*

FONTE: GRISBACH (2011)

Três SNPs localizados na região promotora de *FCN2* (posições -986, -602 e -4 contados a partir do sítio de início da transcrição) estão fortemente associados a variações nos níveis séricos da proteína (HUMMELSHOJ et al., 2005; CEDZYNSKI et al., 2007). Porém, há outros polimorfismos situados na região codificadora associados com a modificação da capacidade de ligação ao sítio-alvo (HUMMELSHOJ et al., 2005; HERPERS et al., 2006). Polimorfismos na porção estrutural do gene, por exemplo, influenciam sua afinidade por diferentes carboidratos acetilados (MUNTHER-FOG et al., 2007).

De acordo com pesquisas atuais, os haplótipos -986, -602, -4 mais comuns são: *GGA*, *AAA*, *AGG* e *AGA* (MUNTHER-FOG et al., 2007; MESSIAS-REASON, KREMSNER e KUN, 2009). Estudos recentes revelam que a presença do nucleotídeo adenina (A) nas posições -986 e -602 e de guanina (G) na posição -4 está associada a altas concentrações de ficolina-2 no soro de maneira aditiva (MUNTHER-FOG et al., 2007). Dessa forma, os haplótipos *AAA* e *AGG* estão associados a altos níveis séricos de ficolina-2, *AGA* está associado a concentrações intermediárias e o haplótipo *GGA* está associado a baixos níveis (MUNTHER-FOG et al., 2007; RUSKAMP et al., 2009; GARRED et al., 2010). De acordo com Munthe-Fog *et al.* (2007), concentrações de ficolina-2 inferiores a 3 µg/ml são consideradas baixas, o intervalo 3-6 µg/ml compreende concentrações intermediárias e níveis maiores que 6 µg/ml são considerados altos. Em caucasianos a mediana da concentração da ficolina-2 é de 5 µg/ml com uma variação interindividual de 1-12 µg/ml (HUMMELSHOJ et al., 2005; MUNTHER-FOG et al., 2007).

2.5 *MBL2* E *FCN2* E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

O processo de opsonização e fagocitose de um patógeno intracelular, bem como sua destruição ou sobrevivência no interior das células fagocíticas é crucial para o estabelecimento da doença. Tanto *MBL* quanto ficolina-2 desempenham um papel central na interação inicial entre patógenos e fagócitos, mediando a opsonização e a fagocitose, diretamente, ou pela ativação do sistema complemento (JACK, KLEIN e TURNER, 2001).

A maioria dos estudos tem explorado o papel da MBL em relação à aquisição de uma doença infecciosa (susceptibilidade) e a natureza do curso clínico a mesma associada (gravidade) (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006). Genótipos de *MBL2* que codificam baixos níveis sorológicos de MBL têm sido associados, por exemplo, com susceptibilidade a infecções causadas por microorganismos extracelulares (SUMMERFIELD et al., 1995). Por outro lado, a deficiência pode ser benéfica para o hospedeiro, e está associada com proteção em infecções causadas por alguns microorganismos intracelulares, tais como *Leishmania chagasi* (SANTOS et al., 2001) e *Mycobacterium leprae* (DORNELLES, PEREIRA-FERRARI e MESSIAS-REASON, 2006; MESSIAS-REASON et al., 2007). Estes patógenos utilizam MBL e outros fatores do complemento ativados pela via das lectinas, como a opsonização através de C3 e o receptor de C3 presente em monócitos/macrófagos, para facilitar sua entrada nas células-alvo. Esta idéia é corroborada pelos achados de Garred *et al.* (1994), os quais relataram uma frequência maior de suficiência de MBL em pacientes Etíopes com hanseníase do que nos controles. Dornelles, Pereira-Ferrari e Messias-Reason (2006) sugeriram um papel protetor da deficiência de MBL contra o desenvolvimento das formas graves e multibacilares na hanseníase. Segundo os autores, indivíduos com baixos níveis de MBL teriam uma diminuição da fagocitose mediada pela MBL, o que dificultaria a internalização destes microorganismos (TURNER, 2003). Muitos pesquisadores sugerem que a alta frequência de genótipos associados à deficiência está associada com vantagens biológicas, como por exemplo, nos casos em que a MBL pode exacerbar ao invés de amenizar a doença (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006).

A inflamação mediada por complemento é reconhecida por desempenhar um importante papel na injúria tecidual. MBL e MASPs são proteínas séricas sintetizadas principalmente pelos hepatócitos e, assim como ocorre com outras moléculas de defesa, espera-se uma produção exacerbada dessas proteínas durante processos inflamatórios (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003). De fato, um papel pró-inflamatório ativo da MBL em diferentes doenças crônicas infecciosas, como a hepatite C (ALVES PEDROSO et al., 2008) e inflamatórias, como a cardiopatia reumática (SCHAFRANSKI et al., 2004; SCHAFRANSKI et al., 2008), tem sido evidenciado. Nestes casos, altos níveis de MBL parecem estar envolvidos tanto com gravidade, quanto pior prognóstico e resposta reduzida ao tratamento.

Vários autores têm destacado a importância do papel pró-inflamatório da MBL em distúrbios cardíacos inflamatórios. Segundo Chan *et al.* (2006) a MBL aumenta a injúria tecidual no processo inflamatório que ocorre na reperfusão pós-isquêmica. Foi demonstrado que a MBL desempenha um papel crítico na isquemia e injúria pós-reperfusão do miocárdio, em modelos experimentais (JORDAN, MONTALTO e STAHL, 2001; BUSCHE *et al.*, 2008). Níveis altos de MBL foram associados com risco aumentado de isquemia, infarto do miocárdio e morte súbita em pacientes com artrite reumatóide (TROELSEN *et al.*, 2007), além de aumentar o risco de cardite aguda e crônica em pacientes com febre reumática (SCHAFRANSKI *et al.*, 2008). Recentemente, também foi proposto um papel para MBL no infarto do miocárdio em estudos clínicos (GRUNDMANN, BODE e MOSER, 2010; TRENDELENBURG *et al.*, 2010).

Embora os estudos de associação envolvendo o gene *FCN2* sejam mais recentes e menos numerosos quando comparado aos relatos sobre MBL, foi demonstrado que a falha ou expressão anormal de ficolinas desempenha um papel relevante na patogênese de uma série de doenças humanas (revisto por Zhang *et al.* (2008). A deficiência de ficolina-2 está associada, por exemplo, ao risco aumentado de alergia e infecções respiratórias em crianças (ATKINSON *et al.*, 2004; CEDZYNSKI *et al.*, 2009). Genótipos que conferem baixos níveis sorológicos de ficolina-2 também foram associados com a susceptibilidade e desenvolvimento da artrite reumatóide (VANDER CRUYSSSEN *et al.*, 2007). Alguns autores ainda sugerem que ficolina-2 esteja envolvida na gravidade da nefropatia por IgA (ROOS *et al.*, 2006). Além disso, observou-se associação entre polimorfismos funcionais de *FCN2* e o risco de febre reumática (MESSIAS-REASON *et al.*, 2009). Por outro lado, identificou-se uma associação entre proteção à hanseníase e haplótipos responsáveis por níveis normais desta proteína no plasma (MESSIAS-REASON, KREMSNER e KUN, 2009). Em estudo recente com malária, em crianças africanas, foram observados níveis de ficolina-2 mais elevados na fase aguda da doença (FAIK *et al.*, 2010).

2.5.1 MBL e Ficolina-2 na Doença de Chagas

Recentemente, um papel para MBL na regulação da resistência do hospedeiro e na inflamação do miocárdio durante a infecção experimental com *T. cruzi* foi descrito (ROTHFUCHS et al., 2012). Segundo os autores, a infecção com uma cepa cardiotrópica de *T. cruzi* aumentou a expressão tecidual de MBL tanto a nível de RNAm como de proteínas. Além disso, foi observada uma maior carga parasitária no sangue e/ou tecido de camundongos com deficiência de MBL quando comparado aos controles selvagens. Já a participação da MBL na fisiopatologia da DC clínica foi primeiramente investigada pelo grupo de pesquisa do LIPM-HC/UFPR, onde se observou níveis de MBL elevados em pacientes com IC em relação aos pacientes sem essa condição (LUZ et al., 2009). Em estudo recente realizado no norte do Chile, o genótipo baixo produtor *MBL2*B* foi mais comum nos pacientes chagásicos do que em indivíduos saudáveis, sugerindo o envolvimento do sistema complemento na defesa contra o *T. cruzi* (WEITZEL et al., 2012). Não há trabalhos envolvendo ficolina-2 na DC até o momento.

3. HIPÓTESE

O polimorfismo dos genes *MBL2* e *FCN2* estão associados com a progressão clínica da Doença de Chagas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar a possível associação entre o polimorfismo gênico de *MBL2* e *FCN2* na evolução clínica da Doença de Chagas.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Determinar os polimorfismos presentes na região promotora (-221 e -550), 5' não traduzida (+4) e no exon 1 (códon 52, 54 e 57) do gene *MBL2* em pacientes chagásicos crônicos;
- Determinar os polimorfismos presentes na região promotora (-986, -602 e -4) e no exon 8 (+6424) do gene *FCN2* nos referidos pacientes e controles;
- Determinar as concentrações plasmáticas de ficolina-2 em pacientes chagásicos e controles;
- Relacionar o polimorfismo de *MBL2* e *FCN2*, respectivamente, com as concentrações de MBL e ficolina-2;
- Relacionar o polimorfismo de *MBL2* e *FCN2* com as formas clínicas da DC;
- Relacionar o polimorfismo de *MBL2* e *FCN2* com a gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi submetido à análise e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), tendo sido devidamente aprovado em reunião no dia 31 de julho de 2007 e registrado sob o número 1457.122/2007-06 (ANEXO 1).

5.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo transversal, do tipo caso-controle.

5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

5.3.1 Pacientes

Aceitaram fazer parte do estudo 260 pacientes consecutivos, atendidos no Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico do Hospital de Clínicas - UFPR.

Atualmente existem cerca de 600 pacientes registrados no referido Ambulatório, único serviço especializado em Curitiba e região para este fim. São realizadas em média, cerca de quatorze a vinte consultas por semana para acompanhamento de rotina destes pacientes. Nesta ocasião, foi realizado tanto o convite para participar do estudo, como a coleta, após cada paciente ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (ANEXO 2).

A amostra da pesquisa foi recrutada a partir desta população de pacientes, no período de coleta compreendido entre junho de 2007 a abril de 2010, obedecendo-se aos seguintes critérios de inclusão: indivíduos comprovadamente chagásicos (através de evidências clínicas, dados epidemiológicos e testes sorológicos), nascidos (ou que residiram durante a infância) em áreas endêmicas, maiores de dezoito anos, independente da forma clínica apresentada.

Com relação aos critérios de exclusão, foram rejeitados para o estudo: indivíduos menores de dezoito anos, pacientes com evidências de cardiopatia de etiologia não chagásica, indivíduos com histórico de hemotransfusão, indivíduos sob tratamento etiológico da DC no momento da coleta ou submetidos ao transplante de células-tronco para tratamento da CCC, em fase de pesquisa. Dos 260 pacientes que aceitaram fazer parte do estudo, 10 indivíduos foram excluídos das análises por não atenderem aos critérios de inclusão estabelecidos ou falta de dados, 54 devido à problemas metodológicos na genotipagem de *MBL2* (n=196) e 7 em *FCN2* (n=243).

Como é inviável determinar o tempo exato de evolução da DC, por se tratar de uma doença silenciosa, na qual a maioria dos pacientes descobre sua situação acidentalmente, geralmente ao fazer doação de sangue, todos esses critérios foram utilizados a fim de minimizar as variáveis existentes e assegurar que a amostra apresentasse o mesmo padrão de infecção, ou seja, indivíduos de área endêmica,

infectados possivelmente pelas vias vetorial e/ou congênita, na infância, e que não estivessem na ocasião do estudo sob tratamento.

A caracterização dos pacientes foi realizada com base na análise do histórico clínico, o qual foi levantado através de consulta ao questionário epidemiológico utilizado pelo ambulatório, e/ou proveniente dos prontuários médicos dos pacientes, quando necessário. Os principais dados demográficos e clínicos dos pacientes encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1 – DADOS DEMOGRÁFICOS E PARÂMETROS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

Parâmetros	Formas Clínicas da DC				
	Indeterminada	Cardíaca	Digestiva	Associada	Total
N (%)	88 (36.7)	96 (40.0)	23 (9.6)	33 (13.7)	240 (110.0)
Idade (Média)	54.6 [34-76]	58.9 [34-90]	59.3 [36-84]	58.2 [37-73]	57.8 [34-90]
Gênero (%)					
<i>Feminino</i>	34 (38.6)	48 (50.0)	18 (78.3)	14 (42.4)	114 (47.7)
<i>Masculino</i>	54 (61.4)	48 (50.0)	5 (21.7)	19 (57.6)	126 (52.3)
Etnia* (%)					
<i>Euro-brasileiro</i>	77 (87.5)	65 (67.7)	15 (65.2)	26 (78.8)	183 (76.2)
<i>Afrodescendente</i>	8 (9.1)	25 (26.0)	7 (30.4)	6 (18.2)	46 (19.2)
<i>Oriental</i>	--	1 (1.0)	1 (4.3)	--	2 (0.8)
<i>Indígena</i>	3 (3.4)	5 (5.2)	--	1 (3.0)	9 (3.8)

NOTA: (*) a classificação dos pacientes segundo a etnia foi realizada pelo autor deste estudo, obedecendo ao critério de coloração da pele e traços físicos, além de levar em consideração a etnia dos seus ascendentes (pais e avós).

5.3.2 Grupo Controle

O grupo de comparação constitui-se de adultos voluntários sadios com sorologia negativa para Doença de Chagas, selecionados entre os doadores do Banco de Sangue do mesmo hospital, os quais sempre que possível foram pareados em relação ao sexo, etnia e faixa etária, frente à amostra de pacientes.

5.4 METODOLOGIA

5.4.1 Coleta de sangue

Após o devido esclarecimento e assinatura do TCLE foram coletados de cada paciente, aproximadamente 10 ml de seu sangue venoso, o qual foi dividido em dois tubos: com e sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 3.500 rpm para separação do plasma e soro, respectivamente. As amostras coletadas em tubo sem anticoagulante foram distribuídas em 4 alíquotas de soro, de aproximadamente 500 ul cada. Já as amostras coletadas com o anticoagulante, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), foram distribuídas em 3 alíquotas de plasma, além de ter sido separado o creme leucocitário ou “buffy-coat”. Todas as amostras foram armazenadas à temperatura de -80°C até o momento das análises laboratoriais.

5.4.2 Quantificação de MBL e Ficolina-2

Tanto a determinação das concentrações de MBL como de ficolina-2 foram realizadas através do ensaio de imunoadsorção ligado à enzima, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricantes. A quantificação de MBL foi realizada no Laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR em amostras de soro (AntibodyShop®, Dinamarca). Já a dosagem de ficolina-2 foi realizada no Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Medicina Tropical de Tübingen, Alemanha, em amostras de plasma (Hycult® Biotech, Uden, Holanda).

Através da representação gráfica da absorbância (linear), medida em espectrofotômetro a 450 nm, *versus* as concentrações correspondentes de MBL e ficolina-2 em amostras padrões, cujas concentrações são conhecidas, obtém-se uma curva padrão. Todos os reagentes, inclusive os padrões, foram fornecidos pelos fabricantes.

5.4.3 Extração do DNA genômico

A extração de DNA foi realizada a partir de leucócitos do sangue periférico (“buffy-coat”) através de kits comerciais (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, GE), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos) e diluídas a 100ng/ul quando possível e armazenadas a temperatura de -20°C até a etapa de amplificação. Tanto a extração quanto a quantificação do DNA foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular (LIPM)-HC/UFPR.

5.4.4 Genotipagem de *MBL2*

Para a determinação dos polimorfismos gênicos, ou genotipagem, de *MBL2* utilizou-se a técnica de sequenciamento genômico. Foram investigados os seguintes SNPs: -550 C>G (dbSNP rs11003125) e -221 G>C (dbSNP rs7096206), localizados na região promotora; +4 C>T (P/Q) na região 5’ não traduzida (dbSNP rs7095891); SNPs do exon 1 localizados nos códons 52, 54 e 57, respectivamente, Arg52Cys (dbSNP rs5030737), Gly54Asp (dbSNP rs1800450) e Gly57Glu (dbSNP rs1800451).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) genérica com os primers diretos PromF e rev +270 (TABELA 2), gerando um fragmento com cerca de 1000 pb, foi realizada nas seguintes condições: concentração média de 100 ng/ul de DNA genômico, utilizando-se 0,5 µM de cada iniciador (IDT, Estados Unidos) na presença de 2,0 mM de MgCl₂, 1,0 uM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e 0,5 U/ul de enzima Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O protocolo utilizado inicia-se pela desnaturação por 3 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a uma temperatura de anelamento de 68°C, mais 1 minuto e 30 segundos a 72°C no último passo de alongamento ou extensão da fita de DNA. Cada reação de PCR foi acompanhada do branco, que nada mais é do que soluções de reação completas, porém, sem o DNA.

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DE PRIMERS USADOS NA GENOTIPAGEM DE *MBL2*

Primer	Seqüência (5' → 3')
PromF	GCCAGAAAGTAGAGAGGGTATTTAGCAC
Ex1F	CAGGTGTCTAGGCACAGATGAACC
Rev+270	CCAACACGTACCTGGTTCCC

A quantificação do produto amplificado foi realizada por comparação com marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SybrSafe (Invitrogen) e visualização em transiluminador. Após a detecção do fragmento desejado é feita a purificação do produto amplificado com o intuito de remover o excesso de primers, dNTPs e outros resíduos indesejáveis. Para tal, adicionou-se 0,5ul de ExoSap-It (GE Healthcare, Uppsala, Suíça) por amostra e incubou-se durante 1 hora a 37°C, seguidos por 15 minutos a 80°C, em termociclador. Em seguida foi realizada nova eletroforese em gel de agarose, juntamente com um marcador de peso e massa molecular, a fim de verificar a recuperação do produto amplificado e determinar a quantidade a ser utilizada na reação de sequenciamento, a qual foi preparada conforme o protocolo a seguir: 1 ul de reagente Big Dye Terminator Versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2ul de tampão que acompanha o kit, 1,5 ul de água Mili-Q, 0,5ul de primer (10uM), de 3 a 5 ul de produto amplificado (cerca de 100 ng), dependendo da qualidade da banda obtida a partir do DNA molde, totalizando um volume final de reação de 10 ul. As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo Therm-1000 (Axygen, Union City, CA) nas seguintes condições de amplificação: desnaturação por 1 minuto a 96°C, seguida por 35 ciclos de 15 segundos a 96°C e 4 minutos a uma temperatura de anelamento de 65°C. Para cada indivíduo, foi realizada pelo menos uma PCR com o primer PromF e outra com o Ex1F. O primer reverso rev+270 foi utilizado para confirmação de seqüências duvidosas ou de baixa qualidade, quando necessário. Após a reação de PCR foi feita uma nova purificação do produto amplificado através da precipitação com acetato de amônio, de acordo com o protocolo a seguir:

O volume do produto da reação de sequenciamento foi completado para 20 ul, utilizando-se água Mili-Q. Foram adicionados 2 µL de acetato de amônio (AcNH₄) 7,5M e 60 µL de etanol absoluto. Após a homogeneização através de inversões repetidas (cerca de 30 vezes), centrifugou-a rapidamente (spin) e incubou-a em

freezer à -20 °C por 30 a 40 minutos. Centrifugou-se então a placa por 30 minutos à 3.700 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e lavado com 150 µl de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa sobre papel toalha. Para evaporação total do álcool colocou-se a placa em estufa a 37°C durante aproximadamente 3 minutos ou em temperatura ambiente *overnight*. Todos os procedimentos descritos acima foram realizados no LIPM-HC/UFPR.

Após a precipitação com acetato de amônio e antes da análise em sequenciador, adicionou-se 15 µl de formamida (Applied Biosystems) em cada amostra e incubou-se por 3 minutos à 95°C para haver desnaturação das duplas fitas de DNA. O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger *et al.* (1977), utilizando a incorporação de didesoxinucleotídeos fluorescentes (ddNTPs) em sequenciador automatizado, modelo ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao Laboratório de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Para o alinhamento das seqüências geradas e determinação dos genótipos de *MBL2*, os dados resultantes do sequenciamento foram analisados com o auxílio dos softwares Geneious Basic® v5.6.6 (Biomatters Ltd, Auckland, Nova Zelândia) e SeqScape® v2.7 (Applied Biosystems).

5.4.4.1 Análise dos genótipos e haplótipos de *MBL2*

Com o objetivo de relacionar as concentrações de MBL com os genótipos *MBL2*, estes foram agrupados em 6 diplótipos compostos pelas variantes *X/Y* da região promotora e *A/B/C/D* do exon 1 (sendo que *A/B*, *A/C* ou *A/D* também são representadas por *A/O*), de acordo com sua influência sobre os níveis séricos de *MBL2*, ou seja, *YA/YA* e *XA/YA* relacionada com alta concentração, *YA/YO* com concentração intermediária e *XA/XA*, *XA/YO* e *YO/YO* com baixa concentração de MBL no plasma (MINCHINTON *et al.*, 2002; BOLDT *et al.*, 2006).

5.4.5 Genotipagem de *FCN2*

A genotipagem de *FCN2* foi realizada durante um estágio de quatro meses, através de um convênio CAPES/DAAD, no Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de Tübingen, Alemanha.

Foram investigados os seguintes SNPs localizados na região promotora de *FCN2*: -986G>A (dbSNP rs3124952), -602G>A (dbSNP rs3124953) e -4A>G (dbSNP rs17514136); e +6424G>T no exon 8 (dbSNP rs7851696) através da PCR em Tempo Real, utilizando-se sondas do tipo FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (CARDULLO et al., 1988). Nesse sistema, duas sondas são empregadas: uma sonda denominada âncora e outra de detecção, marcadas com fluoróforos nas extremidades 3' e 5', respectivamente. A primeira funciona como o doador de fluorescência e a segunda como acceptor. Durante a reação de PCR, após o acoplamento de ambas as sondas, o doador é excitado pela luz emitida pelo equipamento (Rotor Gene 3000, Corbett Research, Sydney, Austrália). A energia dessa excitação é transferida para sonda acceptora que passa então a emitir fluorescência. Durante a fase de alongamento da PCR, ocorre o aumento da temperatura e o subsequente desacoplamento das mesmas, devido à atividade de exonuclease da Taq polimerase. A quantidade de fluorescência emitida pelo acceptor é detectada ao final de cada ciclo e é diretamente proporcional a quantidade de DNA gerada pela PCR.

A sonda acceptora pode ser desenhada de modo a ser perfeitamente complementar, tanto ao genótipo mutante quanto ao "selvagem". Quando há um "mismatch", ou seja, uma variação de um único nucleotídeo, a sonda continuará hibridando ao DNA alvo, porém não mais perfeitamente. Nesse caso, a temperatura de melting (T_m), na qual metade da ligação entre o DNA e a sonda é desfeita, será menor em relação à T_m da sonda perfeitamente anelada, já que menos calor é necessário para separar as fitas devido ao "mismatch". Ao final da reação de PCR é feita uma análise das curvas de Melting, cuja interpretação possibilita a prática e rápida genotipagem, já que para cada alelo haverá uma T_m específica (FIGURA 9). As sondas utilizadas nesse trabalho foram 6-carboxi-fluoresceína (FAM) como doador e cianina-5 (Cy-5) como acceptor (TABELA 3).

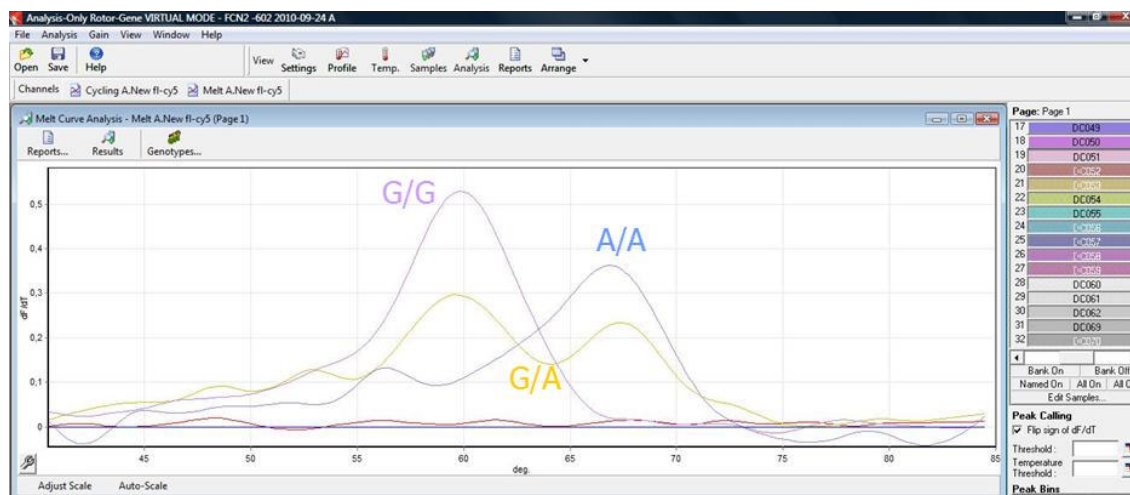


FIGURA 9 - DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS *FCN2* ATRAVÉS DA ANÁLISE DAS CURVAS DE MELTING

NOTA: no exemplo real, curvas de Melting obtidas para os três genótipos possíveis da posição -602 de *FCN2* (homozigotos G/G e A/A e heterozigoto G/A).

TABELA 3 - RELAÇÃO DE PRIMERS E SONDAS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA GENOTIPAGEM DE *FCN2*

SNP	Primer/sonda	Seqüência (5'→3')	T _m (°C)
-986	Rs3124952 F	GGGTCACAGTTTAAATCCTTCTACT	56,4
	Rs3124952 A	CGTATACCTAAAGCCCCCAGA	56,9
	Rs3124952 mut	CCTCCCACTACCACCACCgCACCC—FL	67,4
	Anc rs3124952	Cy5-gCCACCTgCCgCCATCg—PH	71,9
-602	Rs3124953 S	CAAGGTCTCCCCTTCAGATG	55,6
	Rs3124953 R	CATGAGCAGACTTGGGACT	52,8
	Rs3124953 wt	CCTCCTgTTCATgTgCCCC—FL	67,0
	Anc rs3124953	Cy5-gTgCTCTACATACTgCCCCAggAAACAg—PH	60,0
-4	Rs17514136 F	GGAAGCGGCTGTCACTC	54,6
	Rs17514136 A	CCCTTACCTggACAggTgT	55,1
	Rs17514136 wt	AgCAAAGACCAgAAgAgATggA—FL	56,2
	Anc rs17514136	Cy5-CTggACAgAgCTgTgggggTC—PH	63,5
+6424	Rs 7851696 F	TGCCTGTAACGATGCTCA	53,0
	Rs 7851696 R	TGTATCCTTTCCCGACTT	52,5
	Rs 7851696 wt	GAAACATCACAGACAATTTCC—FL	55,1
	Anc rs 7851696	Cy5-GTGTAAAGATCATTGTCTGGTCTTTGGT—PH	63,4

Optou-se por essa metodologia para a genotipagem de *FCN2* por ser uma técnica rápida e confiável, a qual foi padronizada por colaboradores do grupo de pesquisa do LIPM-HC/UFPR (OJURONGBE et al., 2012).

5.4.6 Determinação da gravidade da forma cardíaca

O estadiamento dos pacientes chagásicos, de acordo com a gravidade da cardiopatia, foi realizado segundo a classificação de IC da América Heart Association (AHA), adaptada para DC, conforme recomendado pelo Consenso Brasileiro de 2005 (QUADRO 1). Com esta finalidade, foram avaliados parâmetros eletrocardiográficos, radiológicos e ecocardiográficos dos pacientes, através de consulta aos prontuários médicos.

Estádios	ECG	ECO	IC
A	<i>Alterado</i>	<i>Normal</i>	<i>Ausente</i>
B1	<i>Alterado</i>	<i>Alterado FEVE>45%</i>	<i>Ausente</i>
B2	<i>Alterado</i>	<i>Alterado FEVE<45%</i>	<i>Ausente</i>
C	<i>Alterado</i>	<i>Alterado</i>	<i>Compensável</i>
D	<i>Alterado</i>	<i>Alterado</i>	<i>Refratária</i>

QUADRO 1 – ESTADIAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DA AHA

FONTE: Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005)

NOTA: ECG = eletrocardiograma; ECO = ecocardiograma; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IC = insuficiência cardíaca.

5.4.7 Análise Estatística

A condição de Normalidade das variáveis estudadas foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Tendo sido rejeitada a hipótese de Normalidade, as comparações entre médias foram feitas através dos testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A estatística descritiva em relação às concentrações de MBL e ficolina-2 circulantes foi apresentada em mediana e percentis. As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas através de contagem direta. As hipóteses de equilíbrio de Hardy-Weinberg e da homogeneidade entre as distribuições genotípicas (teste exato de diferenciação entre populações de Raymond e Rousset) foram verificadas com a versão do pacote de software ARLEQUIN 3 (<http://anthro.unige.ch/arlequin/>). Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes do qui-quadrado

com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Quando apropriado, foi calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foram utilizados os programas “Statistical package for social science (SPSS) - versão 13.0 for Windows” e “GraphPad Prism – versão 3.0”.

6 RESULTADOS

6.1 HAPLÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS E CONTROLES

A genotipagem de *MBL2* através do sequenciamento de DNA foi realizada em 196 pacientes, dentre os 243 pacientes incluídos no estudo. Já os genótipos das amostras utilizadas como controle (n=196) foram previamente sequenciados em outro trabalho do grupo de pesquisa do LIPM-HC/UFPR.

Foram encontrados oito diferentes haplótipos de *MBL2* nos pacientes e controles investigados (TABELA 4). Observou-se o haplótipo raro *LYPD* em apenas um dos pacientes, o qual apresentou a forma cardiodigestiva da DC. A frequência de cada haplótipo foi semelhante nos dois grupos estudados. Os haplótipos mais frequentemente encontrados foram *HYP A*, *LYQA* e *LXPA* e os menos freqüentes foram *LYQC* e *HYPD* em ambas populações analisadas.

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DO PROMOTOR E EXON1 DO GENE *MBL2* NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES

Haplótipos <i>MBL2</i>	Pacientes		Controles		Sintomática		Indeterminada		Cardíaca		Digestiva		Associada	
	n	(Frequência)	n	(Frequência)	n	(Frequência)	n	(Frequência)	n	(Frequência)	n	(Frequência)	n	(Frequência)
h1 <i>HYP A</i>	121	(0.309)	106	(0.27)	74	(0.306)	44	(0.306)	46	(0.311)	11	(0.275)	17	(0.315)
h2 <i>HYP D</i>	15	(0.038)	13	(0.033)	9	(0.037)	5	(0.035)	5	(0.034)	2	(0.05)	2	(0.037)
h3 <i>LYP A</i>	37	(0.094)	44	(0.112)	22	(0.091)	15	(0.104)	14	(0.095)	2	(0.05)	6	(0.111)
h4 <i>LYP B</i>	51	(0.13)	62	(0.158)	29	(0.12)	22	(0.153)	18	(0.122)	5	(0.125)	6	(0.111)
h5 <i>LYQ A</i>	84	(0.214)	84	(0.214)	53	(0.219)	30	(0.208)	34	(0.23)	8	(0.2)	11	(0.204)
h6 <i>LXP A</i>	76	(0.194)	69	(0.176)	52	(0.215)	23	(0.16)	31	(0.209)	11	(0.275)	10	(0.185)
h7 <i>LYQ C</i>	7	(0.018)	14	(0.036)	2	(0.008)	5	(0.035)	0	0	1	(0.025)	1	(0.018)
h8 <i>LYP D</i>	1	(0.0025)	0	0	1	(0.004)	0	0	0	0	0	0	1	(0.018)
N Total	196		196		121		72		74		20		27	

NOTA: sintomática = cardíaca + digestiva + associada.

6.2 GENÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

A distribuição dos genótipos de *MBL2* apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as posições investigadas, tanto nos pacientes como nos controles. Também não houve diferença significativa nas distribuições genotípicas dos pacientes e controles utilizando-se o teste exato de diferenciação populacional ($P = 0.87296 \pm 0.01959$).

Observou-se o total de 27 diferentes genótipos de *MBL2* considerando-se pacientes e controles avaliados. Entre os pacientes foram observados 24 e nos controles 26 diferentes genótipos. O genótipo *LYPB/LYPD* só esteve presente nos pacientes enquanto que *LYQC/LYQC*, *HYPB/LYQC* e *HYPD/LYPA* foram observados apenas nos controles. A distribuição dos genótipos *MBL2* completos nas diferentes formas clínicas e controles encontram-se na TABELA 5.

O alelo *C* (representado na TABELA 4 pelo haplótipo *LYQC*) foi mais comum nos controles do que nas formas sintomáticas da DC (14/392 ou 3,57% vs. 2/242 ou 0,82%, $p=0,036$, O.R.=0,23, IC95%= 0,05-0,99). A variante *C* também não foi observada na forma cardíaca isolada, porém foi detectada em 5 pacientes na forma indeterminada, o que foi estatisticamente significativo (0/148 ou 0%) vs. 5/144 ou 3,47%, $p=0,028$). Evidenciou-se, portanto, um efeito protetor do haplótipo *LYQC* contra as formas sintomáticas da DC em relação aos controles, assim como também se observou uma tendência ao comparar pacientes sintomáticos com indeterminados (2/121 ou 1,65% vs. 5/72 ou 6,94%; $p=0,107$; O.R.= 0,232; IC 95,0%: 0,044-1,210).

TABELA 5 – GENÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

Genótipos <i>MBL2</i>	Pacientes Totais		Controles		Sintomática		Indeterminada		Cardíaca		Digestiva		Associada	
	n=196	(Freq)	n=196	(Freq)	n=121	(Freq)	n=72	(Freq)	n=74	(Freq)	n=20	(Freq)	n=27	(Freq)
g1 <i>HYP A/HYP A</i>	22	(0,112)	18	(0,092)	14	(0,116)	7	(0,097)	8	(0,109)	2	(0,1)	4	(0,149)
g2 <i>HYP A/HYP D</i>	5	(0,025)	4	(0,020)	3	(0,025)	2	(0,028)	2	(0,027)	0	(0)	1	(0,037)
g3 <i>HYP A/LYP A</i>	11	(0,056)	8	(0,041)	6	(0,050)	5	(0,069)	4	(0,054)	1	(0,05)	1	(0,037)
g4 <i>HYP A/LYP B</i>	15	(0,077)	21	(0,107)	10	(0,083)	5	(0,069)	5	(0,068)	2	0,1	3	(0,111)
g5 <i>HYP A/LYQ A</i>	20	(0,102)	24	(0,122)	11	(0,091)	9	(0,125)	8	(0,109)	1	(0,05)	2	(0,074)
g6 <i>HYP D/LYP B</i>	1	(0,005)	2	(0,010)	1	(0,008)	0	(0)	1	(0,014)	0	(0)	0	(0)
g7 <i>HYP D/LYQ A</i>	6	(0,031)	4	(0,020)	3	(0,025)	2	(0,028)	2	(0,027)	1	(0,05)	0	(0)
g8 <i>HYP A/LXP A</i>	26	(0,133)	11	(0,056)	16	(0,132)	9	(0,125)	11	(0,149)	3	(0,15)	2	(0,074)
g9 <i>HYP D/LXP A</i>	3	(0,015)	1	(0,005)	2	(0,017)	1	(0,014)	0	(0)	1	(0,05)	1	(0,037)
g10 <i>LXP A/LXP A</i>	8	(0,041)	7	(0,036)	7	(0,058)	1	(0,014)	4	(0,054)	1	(0,05)	2	(0,074)
g11 <i>LXP A/LYP A</i>	10	(0,051)	12	(0,061)	6	(0,050)	4	(0,056)	4	(0,054)	1	(0,05)	1	(0,037)
g12 <i>LXP A/LYP B</i>	9	(0,046)	12	(0,061)	5	(0,041)	4	(0,056)	3	(0,041)	2	(0,1)	0	(0)
g13 <i>LXP A/LYQ A</i>	10	(0,051)	16	(0,082)	7	(0,058)	3	(0,042)	5	(0,068)	1	(0,05)	1	(0,037)
g14 <i>LXP A/LYQ C</i>	2	(0,010)	3	(0,015)	2	(0,017)	0	(0)	0	(0)	1	(0,05)	1	(0,037)
g15 <i>LYP A/LYP A</i>	1	(0,005)	3	(0,015)	0	(0)	1	(0,014)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
g16 <i>LYP A/LYP B</i>	3	(0,015)	2	(0,010)	1	(0,008)	2	(0,028)	1	(0,014)	0	(0)	0	(0)
g17 <i>LYP A/LYQ A</i>	9	(0,046)	12	(0,061)	9	(0,074)	0	(0)	5	(0,068)	0	(0)	4	(0,148)
g18 <i>LYP A/LYQ C</i>	2	(0,010)	2	(0,010)	0	(0)	2	(0,028)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
g19 <i>LYP B/LYP B</i>	2	(0,010)	5	(0,026)	1	(0,008)	1	(0,014)	1	(0,014)	0	(0)	0	(0)
g20 <i>LYP B/LYP D</i>	1	(0,005)	0	(0)	1	(0,008)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(0,037)
g21 <i>LYP B/LYQ A</i>	17	(0,087)	11	(0,056)	9	(0,074)	8	(0,111)	6	(0,081)	1	(0,05)	2	(0,074)
g22 <i>LYP B/LYQ C</i>	1	(0,005)	4	(0,020)	0	(0)	1	(0,014)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
g23 <i>LYQ A/LYQ A</i>	10	(0,051)	8	(0,041)	7	(0,058)	3	(0,042)	4	(0,054)	2	(0,1)	1	(0,037)
g24 <i>LYQ A/LYQ C</i>	2	(0,010)	1	(0,005)	0	(0)	2	(0,028)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
g25 <i>LYQ C/LYQ C</i>	0	(0)	1	(0,005)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
g26 <i>HYP A/LYQ C</i>	0	(0)	2	(0,010)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
g27 <i>HYP D/LYP A</i>	0	(0)	2	(0,010)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

NOTA: em destaque, genótipos cuja distribuição diferiram significativamente entre os grupos; sintomática = cardíaca + digestiva + associada.

6.3 GENÓTIPOS *MBL2* E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

A quantificação de MBL plasmática foi realizada em 152 pacientes, com as diferentes formas clínicas, dos quais 120 foram genotipados para *MBL2*. A determinação dos valores de MBL nos pacientes e controles foi realizada em estudo prévio (LUZ, 2008). Como discutido no referido trabalho, não houve diferença entre as concentrações séricas de MBL entre pacientes, de um modo geral, e controles.

Conforme explicado no item 5.3.4.1 da metodologia, os genótipos *MBL2* foram agrupados em 6 diplótipos, de acordo com sua influência sobre os níveis séricos de MBL (*YA/YA* e *XA/YA* relacionados com alta concentração de MBL; *YA/YO* concentração intermediária; *XA/XA*, *XA/YO* e *YO/YO* com baixa concentração sérica da proteína), (TABELA 6).

A associação conhecida entre as variantes *X/Y* e *A/B/C/D* e os níveis de MBL (MINCHINTON et al., 2002; BOLDT et al., 2006) foi também observada no presente trabalho, tanto em controles quanto em pacientes (GRÁFICO 1), exceto para o genótipo *XA/XA*, cujos níveis não se mostraram deficientes. Entretanto, foi relatado que um SNP localizado no exon 4 (3130G>C) influencia significativamente os níveis funcionais de MBL em indivíduos com o haplótipo *LXPA*, conferindo níveis mais baixos da proteína (190 ng/ml vs 700 ng/ml em portadores da variante 3130C), (WIERTSEMA et al., 2006). Portanto, é possível que 3130G, ou outra variante em desequilíbrio de ligação com a mesma, estejam determinado os níveis mais elevados de MBL observados em pacientes chagásicos com o genótipo *XA/XA*. Não foram observados indivíduos com genótipo *XA/XA* nos controles.

TABELA 6 - HAPLÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

Haplótipos <i>MBL2</i>	Pacientes Total n=196	F(%)	Sintomáticos n=121	F(%)	Indeterminados n=72	F(%)	Controles n=183	F(%)
YA	242	62	149	62	89	62	223	61
XA	76	19	52	21	23	16	63	17
YO	74	19	40	17	32	22	80	22

NOTA: sintomáticos = cardíaca + digestiva + associada; F = frequência.

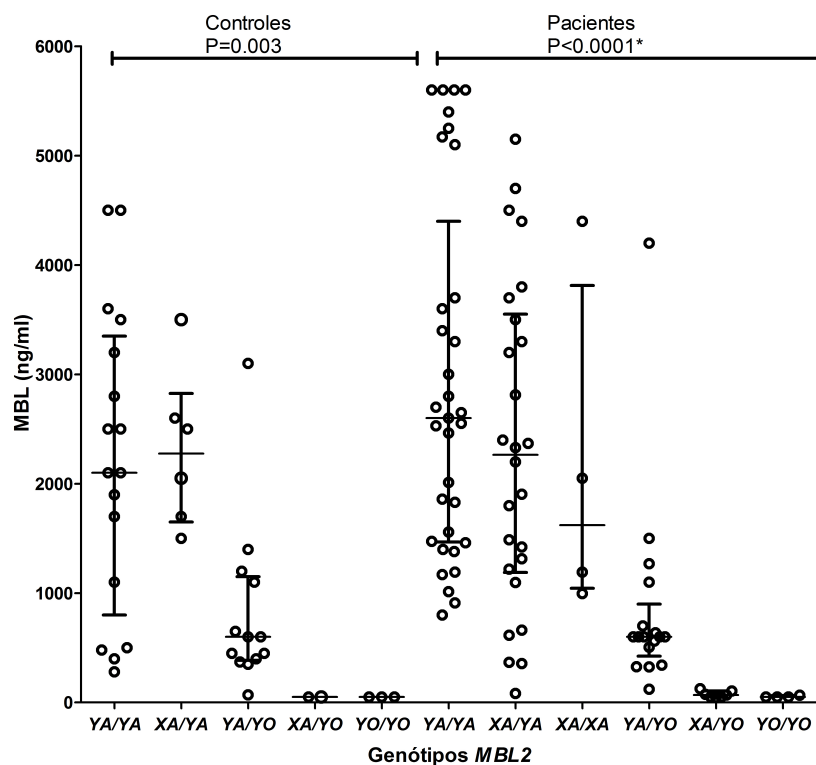


GRÁFICO 1 – GENÓTIPOS *MBL2* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL NOS PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

NOTA: (*) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Interessantemente, observou-se que os genótipos *YC/YC* e *YA/YC* não ocorreram em nenhuma das formas sintomáticas da DC em relação aos controles (0/121 ou 0% vs. 10/196 ou 5,10%; $p=0,015$), resultado que também foi significativo quando comparou-se apenas os indivíduos com as formas cardíacas da DC em relação aos pacientes indeterminados (0/74 ou 0% vs. 5/72 ou 6,94%, $p=0,027$), o que comprova a significância observada a nível alélico (GRÁFICO 2).

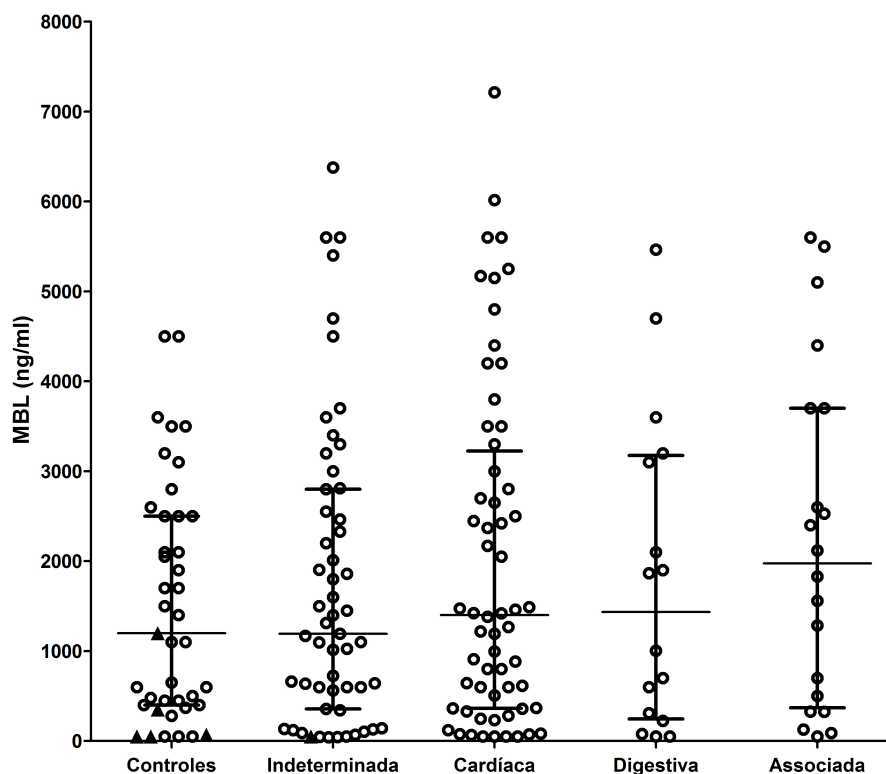


GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES.

NOTA: losangos representam os genótipos *YC/YC* e *YA/YC* de *MBL2*.

6.4 GENÓTIPOS *MBL2* EM PACIENTES NA FORMA CARDÍACA DA DC SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL

Dos 101 pacientes chagásicos com a forma cardíaca que foram genotipados para *MBL2*, (74 com a forma isolada e 27 apresentando a forma cardiodigestiva), 99 foram distribuídos em subgrupos segundo a classificação funcional da AHA, adaptada para DC (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005), (QUADRO 1, p.54). Ao avaliar os pacientes segundo este critério, observou-se que indivíduos nas classes B1, C e D apresentaram níveis maiores de MBL em relação aos pacientes no estágio A ($p < 0,0001$). Não foram observados pacientes na classe B2, dentre os indivíduos com concentrações de MBL conhecidas (GRÁFICO 3).

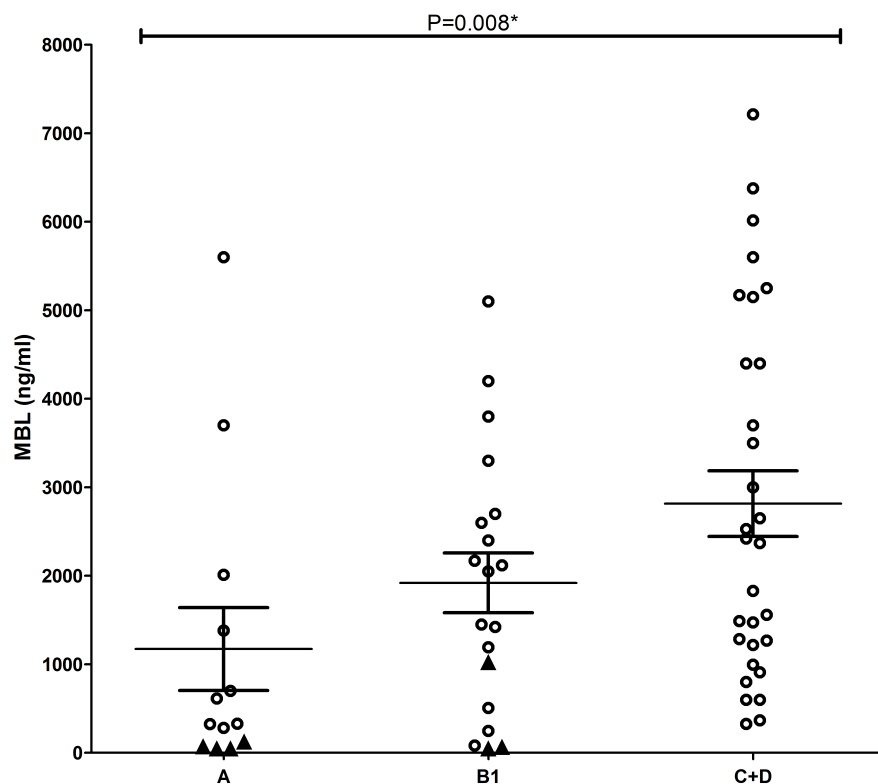


GRÁFICO 3 - GENÓTIPOS *MBL2* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS CLASSES FUNCIONAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

NOTA: (*) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; losangos representam indivíduos com genótipos que conferem deficiência de MBL.

A ausência de indivíduos na classe B2 deve-se ao fato de que raramente encontram-se pacientes com FEVE menor que 45% que não apresentem sintomas de IC. Já indivíduos na classe D são raros por se tratarem de pacientes debilitados, muitas vezes em espera do transplante cardíaco, sendo improvável encontrá-los em consulta de acompanhamento ambulatorial. Por esse motivo, optou-se pelos agrupamentos das classes C e D para esta análise. O valor de P indicado no GRÁFICO 3 refere-se à diferença observada entre os valores séricos de MBL entre as classes funcionais A, B1 e C+D ($p=0,008$).

Como também pode ser evidenciado no GRÁFICO 3, todos os genótipos associados com deficiência de MBL (*XA/YO* e *YO/YO*) foram mais prevalentes na classe A do que nas classes "B1, C e D" (6/27 ou 22,22% vs. 2/72 ou 2,77%, $p=0,0048$; O.R.=0,10, IC 95%=0,02-0,54).

Oito dos nove pacientes deste estudo portando um dos genótipos que conferem deficiência de MBL apresentaram baixos níveis séricos da proteína, sendo cinco na classe A, dois na B1 e um indivíduo cuja classificação funcional não foi determinada (todos com níveis de MBL <100ng/ml). Apenas um paciente na classe B1 não apresentou níveis de MBL considerados deficientes (mediana = 1.025 ng/ml). Como foi relatado anteriormente, não foram observados pacientes na classe B2 com concentrações de MBL conhecidas.

Na TABELA 7, podem-se observar os genótipos de *MBL2* encontrados nos pacientes com as formas cardíacas isolada ou associada, em relação à classificação funcional de IC.

TABELA 7 - GENÓTIPOS *MBL2* NA FORMA CARDÍACA DA DC DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Genótipos <i>MBL2</i>	Classe Funcional					Total
	A n (%)	B1 n (%)	B2 n (%)	C n (%)	D n (%)	
YA/YA	11 (39,29)	11 (40,74)	1 (33,33)	19 (50,00)	--	42 (42,42)
XA/YA	2 (7,14)	6 (22,22)	2 (66,67)	10 (26,32)	2 (66,67)	22 (22,22)
YA/YO	9 (32,14)	5 (18,52)	--	6 (15,79)	1 (33,33)	21 (21,21)
XA/XA	--	2 (7,41)	--	3 (7,89)	--	5 (5,05)
XA/YO	3 (10,71)	2 (7,41)	--	--	--	5 (5,05)
YO/YO	3 (10,71)	1 (3,70)	--	--	--	4 (4,04)
N Total	28	27	3	38	3	99

6.5 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

As concentrações plasmáticas de ficolina-2 foram determinadas em 155 dos 243 pacientes genotipados para *FCN2* (além de dois pacientes cuja forma clínica não foi especificada) e em 71 controles sadios (TABELA 8). Concentrações plasmáticas aumentadas de ficolina-2 foram observadas nos indivíduos controles quando comparados aos diferentes grupos de pacientes e pacientes totais (GRÁFICO 4).

TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES

Ficolina-2 (ng/ml)		
Formas Clínicas	N	Mediana (min – max)
Indeterminada	55	2887,99 (n.d. – 18880,72)
Cardíaca	52	2371,25 (973,96 – 13527,98)
Digestiva	18	3727,03 (1104,30 – 13252,71)
Associada	28	2194,40 (423,21 – 7375,65)
Sintomáticos	98	2501,56 (423,21 – 13527,98)
Total	155	2538,00 (973,90 – 18880,72)
Controles	71	4251,98 (1135,08 – 13610,65)
Valor de p^*		<0,001

NOTA: (*) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; n.d.= não detectável;
Sintomáticos = cardíaca + digestiva + associada.

Como pode ser observado no GRÁFICO 4, indivíduos do grupo controle apresentaram valores de ficolina-2 significativamente mais elevados em relação aos pacientes totais (mediana: 4.252 ng/ml vs. 2.538 ng/ml, $p < 0.0001$). Observou-se ainda uma tendência à significância quando comparados pacientes sintomáticos com aqueles na forma indeterminada ($p=0.10$).

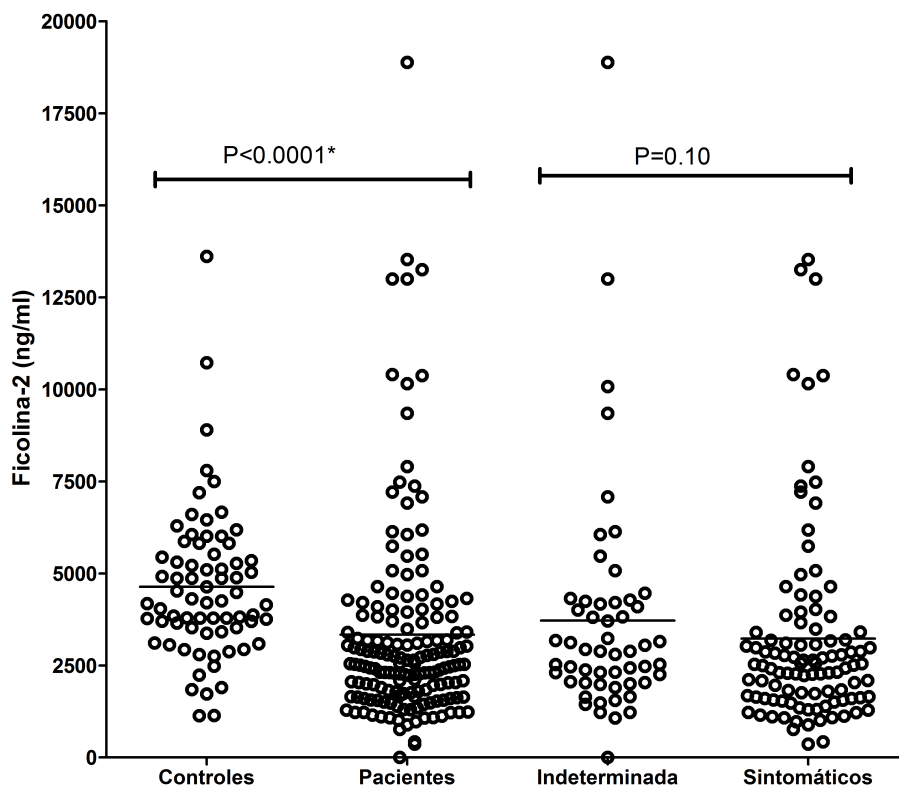


GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FICOLINA-2 NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES

NOTA: (*) Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

6.5.1 Concentrações plasmáticas de ficolina-2 em pacientes chagásicos nas diferentes classes funcionais de insuficiência cardíaca

Quando os indivíduos com a forma cardíaca da DC (incluindo as formas isolada e cardiodigestiva), foram distribuídos nas diferentes classes funcionais de IC, observou-se uma diferença significativa dos valores de ficolina-2 entre as cinco diferentes classes (A, B1, B2, C e D; $p=0,008$). Além disso, os pacientes na classe B (B1+B2) apresentaram níveis mais altos de ficolina-2 do que os pacientes com insuficiência cardíaca (C+D) (2981 ng/ml vs. 2094 ng/ml; $p=0.039$), (GRÁFICO 5).

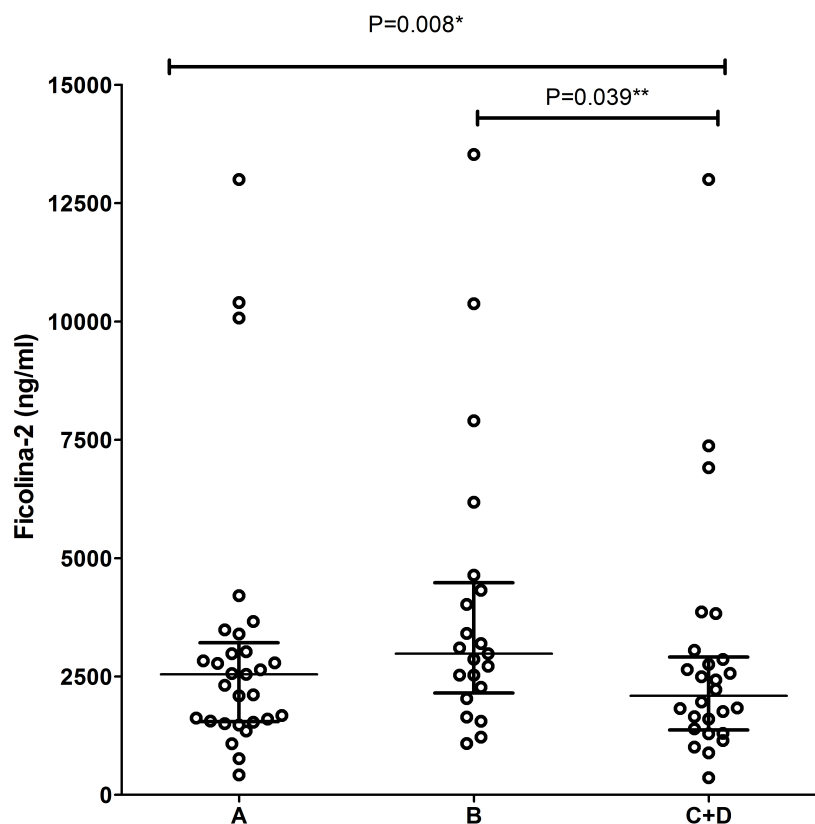


GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS DIFERENTES CLASSES FUNCIONAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

NOTA: a distribuição dos níveis de ficolina-2 foi apresentada em mediana e interquartil; B=B1+B2; (*) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; (**) Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

6.5.2 Correlação entre níveis de MBL e ficolina-2

Observou-se em pacientes indeterminados uma fraca, porém significativa, correlação entre os níveis circulantes de MBL e ficolina-2 ($R^2=0.38$; $p=0.004$).

6.5.3 Genótipos de *FCN2* nos pacientes chagásicos e controles

Cinco haplótipos compreendendo as variantes localizadas na região promotora -986G>A, -602G>A, -4A>G e a substituição do aminoácido A258S localizada no exon 8 (+6424) foram identificados em 243 pacientes: AAAA, AGAA, AGGA, GGAA e GGAS. O grupo controle foi previamente genotipado ($n=305$) em estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa do LIPM-HC/UFPR.

6.5.4 Frequências genóticas e haplotípicas de *FCN2*

As distribuições dos alelos e genótipos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as posições avaliadas em pacientes e controles. Não houve diferença significativa nas distribuições genóticas dos pacientes e controles utilizando-se o teste exato de diferenciação populacional ($P = 0.87296 \pm 0.01959$). Também não houve diferenças significativas entre os haplótipos de *FCN2* nos diferentes grupos avaliados.

Como pode ser observado na TABELA 9, a frequência alélica da variante *FCN2**A258S foi associada com a forma cardiodigestiva quando comparadas aos controles (14/66 ou 21.2% vs. 29/270 ou 10.7%, O.R.=2.24, IC 95%=1.1-4.5, $p=0.037$).

TABELA 9 - FREQUENCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DE *FCN2* EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

Alelos <i>FCN2</i> (N)	Controles 610	Pacientes 486	Indeterm. 176	Sintom. 304	Cardíacos 192	Digestiva 46	Associada 66
-986 G>A	50.0 ± 2.5	43.4 ± 2.3	46.0 ± 3.8	41.4 ± 2.8	40.6 ± 3.6	43.5 ± 7.4	42.4 ± 6.1
-602 G>A	19.3 ± 2.0	17.9 ± 1.7	19.3 ± 3.0	16.8 ± 2.1	16.7 ± 2.7	15.2 ± 5.4	18.2 ± 4.8
-4 A>G	23.4 ± 2.2	20.6 ± 1.8	20.5 ± 3.0	20.7 ± 2.3	19.3 ± 2.9	23.9 ± 6.4	22.7 ± 5.2
A258S	10.7 ± 1.9*	15.2 ± 1.6	13.6 ± 2.6	16.1 ± 2.1	14.6 ± 2.6	15.2 ± 5.4	21.2 ± 5.1
Haplótipos <i>FCN2</i> (N)							
AAAA	19.3 ± 2.0	17.9 ± 1.7	19.3 ± 3.0	16.8 ± 2.1	16.7 ± 2.7	15.2 ± 5.3	18.2 ± 4.8
AGGA	23.4 ± 2.2	20.6 ± 1.8	20.5 ± 3.0	20.7 ± 2.3	19.3 ± 2.9	23.9 ± 6.4	22.7 ± 5.2
AGAA	7.3 ± 1.3	4.9 ± 1.0	6.3 ± 1.8	3.9 ± 1.1	4.7 ± 1.5	4.3 ± 3.0	1.5 ± 1.5
GGA	52.0 ± 2.0	56.6 ± 2.3	54.0 ± 3.8	58.6 ± 2.8	59.4 ± 3.6	56.5 ± 7.4	57.6 ± 6.1
GGAA	41.1 ± 3.0	41.4 ± 2.2	40.3 ± 3.7	42.4 ± 2.8	44.8 ± 3.6	41.3 ± 7.3	36.4 ± 6.0
GGAS	10.7 ± 1.9*	15.2 ± 1.6	13.6 ± 2.6	16.1 ± 2.1	14.6 ± 2.6	15.2 ± 5.4	21.2 ± 5.1

NOTA: em negrito, diferenças significantes (ver texto); N = número de cromossomos, Indeterm.-indeterminados; Sintom.=sintomático; Associada = Cardíacos + Digestiva.

Na TABELA 10, a frequência dos genótipos para todas as posições investigadas pode ser observada em pacientes nas diferentes formas clínicas e controles.

TABELA 10 – FREQUENCIA DOS GENÓTIPOS *FCN2* NOS PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

Genótipos <i>FCN2</i>	Controles 305	Pacientes 243	Indeterminados 88	Sintomáticos 152	Cardíacos 96	Digestiva 23	Associada 33
AAAA/AAAA	10 (3.3)	6 (2.5)	3 (3.4)	3 (2.0)	2 (2.1)	0	1 (3.0)
AAAA/AGAA	6 (2.0)	7 (2.9)	3 (3.4)	4 (2.6)	3 (3.1)	0	1 (3.0)
AAAA/AGGA	22 (7.2)	14 (5.8)	7 (8.0)	6 (4.0)	3 (3.1)	2 (8.7)	1 (3.0)
AAAA/GGAA	20 (14.8)*	36 (14.8)	11 (12.5)	25 (16.4)	15 (15.6)	4 (17.4)	6 (18.2)
AAAA/GGAS	7 (5.2)*	18 (7.4)	7 (8.0)	10 (6.6)	7 (7.3)	1 (4.3)	2 (6.1)
AAA/GGA	57 (18.7)	54 (22.2)	18 (20.5)	35 (23.0)	22 (22.9)	5 (21.7)	8 (24.2)
AGAA/AGAA	0	1 (0.4)	1 (1.1)	0	0	0	0
AGAA/AGGA	9 (3.0)	4 (1.6)	3 (3.4)	1 (0.7)	1 (1.0)	0	0
AGAA/GGAA	7 (5.2)*	9 (3.7)	1 (1.1)	7 (4.6)	5 (5.2)	2 (8.7)	0
AGAA/GGAS	2 (1.5)*	2 (0.8)	2 (2.3)	0	0	0	0
AGA/GGA	27 (8.9)	11 (4.5)	3 (3.4)	7 (4.6)	5 (5.2)	2 (8.7)	0
AGGA/AGGA	18 (5.9)	12 (4.9)	2 (2.3)	10 (6.6)	7 (7.3)	2 (8.7)	1 (3.0)
AGGA/GGAA	31 (23.0)*	36 (14.8)	15 (17.0)	21 (13.8)	12 (12.5)	3 (13.0)	6 (18.2)
AGGA/GGAS	3 (2.2)*	22 (9.1)	7 (8.0)	15 (9.9)	7 (7.3)	2 (8.7)	6 (18.2)
AGG/GGA	79 (25.9)	58 (23.9)	22 (25.0)	36 (23.7)	19 (19.8)	5 (21.7)	12 (36.4)
GGAA/GGAA	18 (13.3)*	47 (19.3)	19 (21.6)	28 (18.4)	20 (20.8)	3 (13.0)	5 (15.2)
GGAA/GGAS	17 (12.6)*	26 (10.7)	6 (6.8)	20 (13.2)	14 (14.6)	4 (17.4)	2 (6.1)
GGAS/GGAS	0*	3 (1.2)	1 (1.1)	2 (1.3)	0	0	2 (6.1)
GGA/GGA	77 (25.2)	76 (31.3)	26 (29.5)	50 (32.9)	34 (35.4)	7 (30.4)	9 (27.3)

NOTA: em negrito, genótipos heterozigotos -4A/G, cuja somatória das frequências diferem entre pacientes cardíacos e controles; células sombreadas: genótipos *AGGA/GGAS* e *GGAS/GGAS* (homozigotos para *A258S*), cuja somatória das frequências diferem entre pacientes com a forma cardiodigestiva e indeterminados ou controles; **A258S* foi investigado através de sequenciamento em um subgrupo de 135 controles; n=número de indivíduos; entre parênteses, frequências observadas.

Como apresentado na TABELA 10, observou-se menor frequência de heterozigotos *FCN2**-4A/G (compreendendo os genótipos AAA/AGG, AGA/AGG e AGG/GGA do promotor) nos pacientes cardíacos do que em controles (23/96 ou 23,9% vs. 110/305 ou 36.1%, O.R.= 0.56, IC 95%= 0.33-0.94, p=0.034). A mesma tendência foi encontrada quando se comparou a frequência desses genótipos entre pacientes cardíacos e indeterminados (23/96 ou 23,9% vs 18/88 ou 20,5%, O.R.=0.55; IC 95%= 0.29-1.04; p=0.077). Além disso, genótipos heterozigotos -4 A/G com a variante *FCN2**258S no exon 8 (AGGA/GGAS) e homozigotos *FCN2**258S (GGAS/GGAS) foram mais frequentes entre pacientes com a forma associada do que nos controles (8/33 ou 24.2% vs. 3/135 ou 2.2%, O.R.=14.1, IC 95% =3.5-56.8, p=0.0001) e indeterminados (8/33 ou 24.2% vs. 8/88 ou 9.1%, O.R.=3.2, IC 95% =1.1-9.4, p=0.037).

6.5.5 Genótipos e Haplótipos do Promotor de *FCN2* em relação aos níveis de Ficolina-2

Baixos níveis de ficolina-2 foram encontrados em associação com a variante *FCN2**258S nos pacientes (2419 ng/ml vs. 2748 ng/ml nos genótipos sem *FCN2**258S, p=0.034). Enquanto que genótipos heterozigotos *FCN2**-4A/G foram, em geral, amplamente distribuídos de acordo com os níveis de ficolina-2 nos diferentes grupos, aqueles com o genótipo 258S (AGGA/GGAS) bem como homozigotos *FCN2**258S/S (GGAS/GGAS), foram claramente associados com concentrações abaixo de 3000 ng/ml (Wilcoxon signed rank test, p=0.04), (GRÁFICOS 6 e 7).

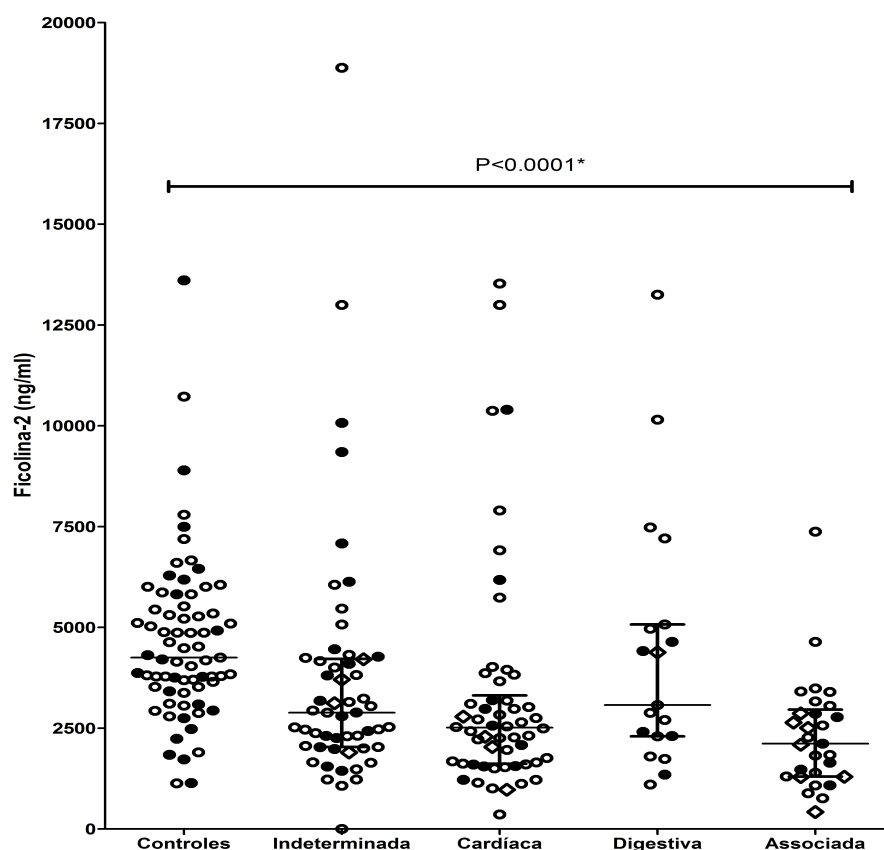


GRÁFICO 6 - CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DC E CONTROLES

NOTA: (*) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; círculos escuros: indivíduos com genótipo *FCN2*4A/G*; losangos: indivíduos com genótipos *FCN2*4A/G* e *FCN2*258A/S* (*AGGA/GGAS*) ou *FCN2*258S/S* homozigotos (*GGAS/GGAS*); a distribuição dos níveis de ficolina-2 nos diferentes genótipos foi apresentada pela mediana e interquartis.

Não foram observadas diferenças entre os níveis de ficolina-2 e os genótipos da região promotora (-986, -602 e -4), em pacientes ou controles, quando cada uma das posições estudadas foi avaliada separadamente. Entretanto, observou-se diferença estatisticamente significante ($p=0,0014$) quando pacientes e controles foram comparados de acordo com os haplótipos estendidos do promotor, conforme ilustrado no GRÁFICO 8. Como pode ser claramente evidenciado no referido gráfico, essa diferença deve-se ao fato de que os níveis de ficolina-2 foram mais elevados, de modo geral, nos indivíduos da amostra controle, para todos os genótipos observados.

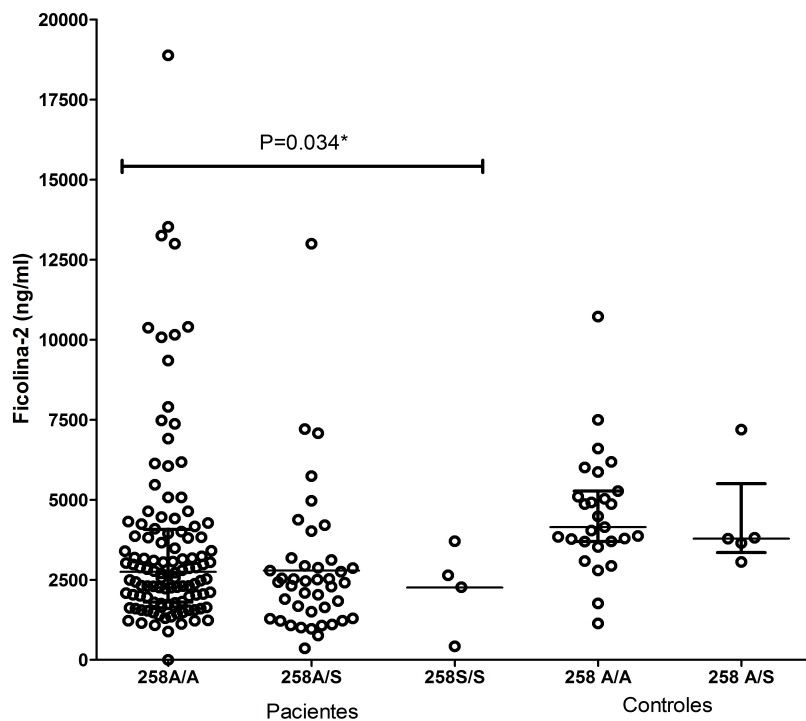


GRÁFICO 7 – CONCENTRAÇÕES DE FICOLINA-2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES DE ACORDO COM A PRESENÇA DA VARIANTE 258S

NOTA: (*) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; a distribuição dos genótipos foi apresentada pela mediana e interquartis.

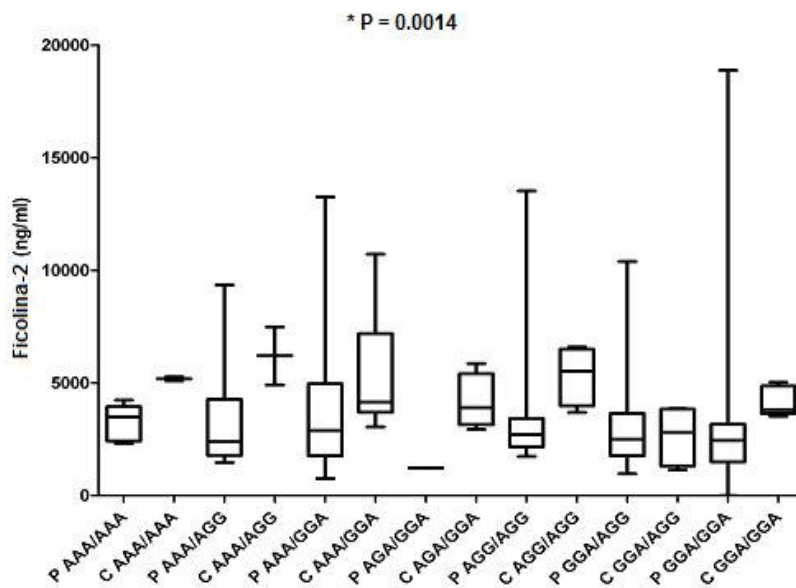


GRÁFICO 8 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FICOLINA-2 EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO DO PROMOTOR DE *FCN2* EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

NOTA: (*) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; P=pacientes, C=controles.

7 DISCUSSÃO

A ativação do sistema complemento, especialmente através da via das lectinas, é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções. É importante ressaltar que o complemento constitui uma das primeiras linhas de defesa imunológica a entrar em contato com as formas infectantes de parasitas, antes da formação dos anticorpos. Já foi demonstrado que tanto ficolina-2 como MBL se ligam às formas infectantes do *T. cruzi* (CESTARI et al., 2009), atuando diretamente no controle da parasitemia (CESTARI e RAMIREZ, 2010). Apesar do papel benéfico do complemento no início da infecção para o controle da carga parasitária, sua ativação excessiva durante a fase crônica da doença pode ser prejudicial ao hospedeiro. Aliada ao processo inflamatório progressivo multifocal que é característico da DC, a ativação exacerbada do complemento pode contribuir para o dano tecidual e consequentes lesões dos órgãos acometidos pela doença.

Apesar de aproximadamente 50% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* permanecerem na forma indeterminada por toda vida, a cada ano cerca de 2-5% dos pacientes assintomáticos irão progredir para algumas das formas sintomáticas, podendo apresentar danos cardíacos, digestivos e menos freqüentemente, neurológicos, irreversíveis (RIBEIRO e ROCHA, 1998). Uma teoria plausível é que indivíduos que permanecem assintomáticos são capazes de reduzir o número de parasitas na fase inicial da infecção, além de modular a resposta imunológica, limitando o desenvolvimento da DC. Por outro lado, indivíduos que desenvolvem a doença cardíaca, embora capazes de controlar a disseminação do parasita, talvez exibam mecanismos imunoregulatórios não eficientes, levando ao estabelecimento de um processo inflamatório persistente (DUTRA e GOLLOB, 2008).

Até o momento, não existe marcador laboratorial disponível a fim de monitorar a progressão para as diferentes formas clínicas da DC, nem tão pouco, indicadores prognósticos de gravidade da doença. Este é o primeiro trabalho na literatura a sugerir um papel dos polimorfismos de *FCN2* e níveis de ficolina-2 na DC e o primeiro a investigar os polimorfismos de *MBL2* em pacientes chagásicos do Brasil. Um único estudo de associação envolvendo genótipos *MBL2* em chagásicos foi publicado até o momento no Chile (WEITZEL et al., 2012).

Através dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que o alelo C, o qual confere deficiência de MBL, está associado com proteção ao desenvolvimento das formas sintomáticas da DC quando comparado aos controles. Além disso, evidenciou-se um efeito protetor desse polimorfismo em *MBL2* contra o desenvolvimento das formas sintomáticas da DC tanto a nível haplotípico (*LYQC*), quanto genotípico (*YC/YC* e *YA/YC*). O mesmo efeito protetor para o alelo C, bem como para os genótipos *YC/YC* e *YA/YC*, além de uma tendência para o haplótipo *LYQC*, foi observado ao comparar os pacientes chagásicos na forma cardíaca com aqueles na forma indeterminada, o que reforça as associações observadas em relação aos controles, por se tratarem de indivíduos que foram comprovadamente infectados pelo *T. cruzi*, mas não desenvolveram a doença. A deficiência de MBL causada pela substituição Gly54Asp (alelo B) resulta, em parte, da formação reduzida de oligômeros maiores (WALLIS e CHENG et al., 1999). Além disso, foi demonstrado em estudo funcional que a ativação do complemento usando MBL recombinante foi menor em rMBL/C, seguida por rMBL/B, porém, a ativação do complemento através da rMBL/D foi similar a rMBL/A (RAJAGOPALAN et al., 2009), o que explica por quê *MBL2**C estaria protegendo os pacientes chagásicos contra o desenvolvimento das formas sintomáticas da DC.

Ao avaliar os pacientes com a forma cardíaca da DC, segundo a classificação funcional de IC, observou-se ainda que os genótipos *XA/YO* e *YO/YO*, os quais estão associados com a deficiência de MBL, foram mais prevalentes na classe A (pacientes cuja única manifestação cardíaca é alteração no eletrocardiograma, o que indica menor grau de acometimento cardíaco) do que nas classes B1, C e D, nas quais observam-se alterações ecocardiográficas, além de eletrocardiográficas. Pode-se inferir, portanto, que os genótipos que conferem deficiência de MBL estão associados com proteção à CCC mais grave. A ausência dos genótipos deficientes nas categorias B2, C e D nos permite sugerir também que estes indivíduos possuem níveis séricos de MBL mais elevados em relação àqueles do grupo A. De fato, dos nove pacientes deste estudo com um dos genótipos deficientes apresentaram baixos níveis de MBL, todos com níveis de MBL <100ng/ml. Estes dados corroboram com os resultados descritos previamente em outro estudo do LIPM-HC/UFPR (LUZ et al., 2009), onde se observou que indivíduos das classes B1, C e D apresentaram níveis mais altos de MBL em relação aos pacientes no estágio A, confirmando que as

diferenças observadas nos níveis de MBL dos pacientes com DC desse estudo são, de fato, geneticamente determinados.

Enquanto um papel protetor do haplótipo *MBL2*LYQC* e dos genótipos *YA/YO* e *YO/YO* foi observado em pacientes chagásicos, estes foram associados com susceptibilidade à infecção por *Plasmodium sp.* em adultos assintomáticos (BOLDT et al., 2009). Além disso, *MBL2*LYQC* foi também associado com malária grave em crianças (BOLDT et al., 2006). Weitzel et al. (2012) não encontraram os genótipos *MBL2*C* e *MBL2*D* em paciente chagásicos no Chile. Porém, *MBL2*B* foi mais comum em pacientes do que controles saudáveis (43.5% vs 31%, OR ajustado = 2.3, 95% CI = 1.01–5.4, P = 0.047) (WEITZEL et al., 2012). Entretanto, nenhuma associação entre sintomáticos e indeterminados, ou com a CCC foi observada para os genótipos *MBL2*C*. É importante considerar que as frequências de *MBL2* diferem entre as populações (DOMMETT, KLEIN e TURNER, 2006; VERDU et al., 2006). Boldt et al (2006), encontrou a variante *MBL2*B* em 44% de ameríndios da tribo Guarani. As populações Mapuche e Chiriguano da Argentina, que são etnicamente relacionadas aos Guarani, apresentaram 42 e 46% de frequência deste alelo, respectivamente (MADSEN et al., 1998). A alta frequência encontrada em pacientes chilenos deve-se, provavelmente, à miscigenação ameríndia, a qual é bem menor na amostra do presente estudo (13% em pacientes vs. 15,8% em controles) e, portanto, o efeito deste alelo não foi detectado. Além disso, a frequência da variante C no Chile pode ser inferior, devido a menor miscigenação africana. Além da influência do componente étnico, deve-se considerar que o estudo do Chile foi realizado em uma amostra menos representativa, contendo 125 pacientes (sendo 64 cardíacos e 61 indeterminados) e apenas 45 controles.

Muitas evidências apontam um papel fisiopatológico para MBL em distúrbios cardíacos, tanto em estudos experimentais quanto clínicos. Níveis altos de MBL sérica foram associados, por exemplo, com risco aumentado de isquemia, infarto do miocárdio e morte súbita em pacientes com artrite reumatóide (TROELSEN et al., 2007). Foi relatado que genótipos de *MBL2* associados a altos níveis de MBL aumentam também o risco de cardite aguda e crônica em pacientes com febre reumática (SCHAFRANSKI et al., 2008). Recentemente foi sugerido um papel para MBL no mecanismo fisiopatológico no infarto do miocárdio (TRENDELENBURG et al., 2010). No referido estudo, os autores sugerem que baixos níveis de MBL, devido a polimorfismos genéticos, promoveriam menor dano tecidual e dessa forma,

indivíduos com deficiência teriam menores taxas de arritmias. Foram avaliados 890 pacientes e observou-se que a deficiência de MBL reduziu significativamente a mortalidade (0.79% vs. 5.51%) dos indivíduos. Contraditoriamente a maioria dos estudos relatados, Saevarsdottir *et al.* (2005) observaram que pacientes com alta concentração de MBL apresentaram uma menor probabilidade de infarto do miocárdio, devido a sua importante função na remoção fagocítica de debris celulares e complexos auto-ímmunes.

Corroborando com os achados clínicos relacionados com o papel de MBL, existem ainda diversos estudos experimentais. Rothfuchs *et al.* (2012) sugeriram recentemente um papel para MBL na regulação da resistência do hospedeiro na inflamação do miocárdio, em modelo murino. No referido estudo, camundongos deficientes para MBL, infectados com uma cepa cardiotrópica de *T. cruzi*, apresentaram maior miocardite e fibrose cardíaca comparados com camundongos selvagens (ROTHFUCHS *et al.*, 2012). Anteriormente, Busche *et al.* (2008) observaram que a MBL desempenha um papel crítico na isquemia e injúria após reperfusão do miocárdio isquêmico, na diabetes experimental, sendo que a ausência de MBL parece inibir a remodelação hipertrófica e a perda de células progenitoras cardíacas após duas semanas de hiperglicemia. Chan *et al.* (2006) também demonstraram que a MBL aumenta a injúria tecidual na reperfusão pós-isquêmica e um papel protetor da deficiência contra os referidos danos foi observado. Além disso, Jordan *et al.* (2001) evidenciaram que a MBL se liga a células endoteliais da musculatura esquelética na reperfusão pós-isquêmica, causando excessiva ativação do complemento.

Kahn *et al.* (1996) caracterizaram a interação entre MBL e o *T. cruzi*, *in vitro*, demonstrando que a principal glicoproteína de superfície das formas amastigotas, a SA85-1, é ligante da MBL humana. Os autores também observaram que a adesão de formas amastigotas de *T. cruzi* a macrófagos é facilitada pelo receptor de manose (KAHN *et al.*, 1995; KAHN *et al.*, 1996). Posteriormente, Cestari *et al.* detectaram a rápida ligação de MBL e ficolina-2 na superfície de *T. cruzi* e observaram que a depleção dessas moléculas do soro causa falha na morte dos parasitas, evidenciando que a via das lectinas claramente desempenha um importante papel na defesa do hospedeiro contra a DC (CESTARI *et al.*, 2009). Além disso, demonstrou-se que receptores de manose localizados na superfície de

cardiomiócitos estão envolvidos na ligação e internalização do *T. cruzi* (MEIRELLES et al., 1999; SOEIRO et al., 1999).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, aliados a todas as evidências aqui apresentadas, as quais em sua grande maioria corroboram com os nossos achados, é plausível considerar a hipótese de que altos níveis de MBL, determinados geneticamente, poderiam facilitar a internalização do *T. cruzi*, aumentando assim a invasão pelo parasita. Além disso, a MBL poderia se ligar ao miocárdio de indivíduos chagásicos expressando antígenos de *T. cruzi*, ou antígenos próprios do hospedeiros com epítomos similares aos do parasita (através do mimetismo molecular), ou neoantígenos que são expostos devido à lesão tecidual contendo ligantes de MBL, incitando de modo contínuo a ativação do complemento, através da via das lectinas, contribuindo assim para inflamação progressiva que ocorre na CCC e conseqüente injúria tecidual. Da mesma forma, a deficiência de MBL poderia proteger contra a invasão celular pelo *T. cruzi* e minimizar os danos causados pela ativação exacerbada do complemento. Através destes resultados sugere-se que a quantificação sérica de MBL e genotipagem de *MBL2* podem ser úteis como marcadores prognóstico na DC. Além disso, tais evidências permitem especular o uso de inibidores da via das lectinas, juntamente com o bloqueio da via clássica, como terapia preventiva a fim de reduzir a injúria tecidual na CCC e outras doenças inflamatórias crônicas, onde o papel da ativação do complemento tem sido evidenciado (JORDAN et al., 2001).

Similarmente à MBL, ficolina-2 se liga a açúcares encontrados na superfície de muitos patógenos, incluindo o *T. cruzi*, promovendo sua fagocitose e lise através do sistema complemento. Este foi o primeiro estudo a avaliar a influência da concentração plasmática de ficolina-2 e genótipos *FCN2* em pacientes chagásicos. Indivíduos do grupo controle apresentaram valores de ficolina-2 significativamente mais elevados em relação aos pacientes totais. Observou-se também uma tendência à significância quando comparados indivíduos sintomáticos com aqueles na forma indeterminada. É importante considerar que apesar de aumentados em relação aos pacientes, os níveis de ficolina-2 observados nos controles encontram-se dentro dos valores considerados fisiologicamente normais em indivíduos saudáveis (SALLENBACH et al., 2011). Corroborando com estes achados, outro estudo também relatou concentrações diminuídas de ficolina-2 em relação aos controles, em pacientes com bronquiectasia (KILPATRICK, FUJITA e MATSUSHITA, 1999).

Diferenças nos valores de ficolina-2 têm sido relatadas em algumas doenças quando comparados a indivíduos controles. Foram observados, por exemplo, níveis de ficolina-2 aumentados na malária aguda, em relação aos níveis após o tratamento (FAIK et al., 2010). Interessantemente, os níveis de ficolina-2 são maiores na hepatite B, tanto na infecção aguda quanto na crônica (HOANG et al., 2011). Porém, são menores em indivíduos infectados com *Schistosoma haematobium* comparados aos controles (OUF et al., 2012).

As distribuições dos alelos e genótipos de *FCN2* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as posições avaliadas em pacientes e controles, e não diferiram daquelas já relatadas em populações européias (HUMMELSHOJ et al., 2005; OJURONGBE et al., 2012). Entretanto, observou-se menor frequência de heterozigotos *FCN2**-4 A/G (AAA/AGG, AGA/AGG e AGG/GGA) nos pacientes com a forma cardíaca da DC do que em controles. Além disso, houve uma tendência na mesma direção entre pacientes cardíacos e indeterminados. O haplótipo AGG do promotor, cuja presença ocorre obrigatoriamente em heterozigotos *FCN2**-4A/G, também foi associado com proteção contra a infecção por HBV em vietnamitas (HOANG et al., 2011), mas com susceptibilidade a esquistossomose em nigerianos (OUF et al., 2012). Em outros trabalhos do grupo de pesquisa do LIPM-HC/UFPR o haplótipo *FCN2**AGA foi associado à proteção contra a hanseníase e a febre reumática (MESSIAS-REASON, KREMSNER e KUN, 2009; MESSIAS-REASON et al., 2009), enquanto em outro estudo esse haplótipo foi associado com susceptibilidade à leishmaniose cutânea (ASSAF et al., 2012). Ficolina-2 parece ter, assim como MBL, um papel duplo na resposta imunológica, o que explicaria os resultados contrastantes encontrados em estudos de associação com diferentes doenças infecciosas.

Não foi observada qualquer relação entre genótipos ou haplótipos do promotor de *FCN2* e as diferentes formas clínicas da DC. Apesar da reconhecida importância da MBL e ficolina-2 no reconhecimento dos patógenos bem como da ativação da via das lectinas nos processos inflamatórios crônicos, deve-se considerar o fato de que a evolução clínica diferencial da DC pode ocorrer devido à diferenças qualitativas na resposta inicial à infecção pelo *T. cruzi*, as quais podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como à exposição à diferentes linhagens do parasita ou fatores genéticos do hospedeiro (DUTRA e GOLLOB, 2008). Entretanto, o alelo *FCN2**258S, também conhecido como *FCN2*-C, foi associado

neste estudo com a forma cardiodigestiva da DC. Essa variante foi anteriormente descrita por alterar a capacidade de ligação das moléculas de ficolina-2 à GlcNAc (HUMMELSHOJ et al., 2005). A variante *FCN2*258S* foi também encontrada por outros autores em associação com início precoce da colonização por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (HAERYNCK et al., 2012). Em contraste com os achados do presente estudo, homozigotos para esta variante foram associados com proteção contra a leishmaniose cutânea (ASSAF et al., 2012) e a presença desse alelo, com proteção contra a infecção pelo citomegalovírus, mas não infecções bacterianas, após transplante ortotópico de fígado (DE ROOIJ et al., 2010; DE ROOIJ et al., 2011). A variante *FCN2*258S* também não foi associada com infecções do trato respiratório em crianças alemãs (RUSKAMP et al., 2009), nem com doença pneumocócica invasiva (CHAPMAN et al., 2007), artrite reumatóide (VANDER CRUYSSSEN et al., 2007) e doença de Behçet no Japão (CHEN et al., 2006).

Interessantemente, *FCN2*258S* aumenta a capacidade de ligação da ficolina-2 à GlcNAc (HUMMELSHOJ et al., 2005). Sabe-se que motivos *O-linked* GlcNAc (*O-GlcNAc*) constituem um epítipo comum entre a cruzipaina, o principal antígeno do *T. cruzi*, e miosina ou outras proteínas cardíacas contendo *O-GlcNAc*- (ACOSTA et al., 2011). A maior capacidade de ligação de GlcNAc dessa variante talvez esteja relacionada com a ativação do complemento e deposição destrutiva de MAC em tecidos musculares cardíaco e liso de pacientes com manifestações cardiodigestivas. A deposição aumentada de MAC já foi relatada em indivíduos com CCC, em relação a pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática ou controles (AIELLO et al., 2002). Nossa hipótese, portanto, é que devido a capacidade aumentada da variante *FCN2*258S* em ligar-se à GlcNAc, haveria nesses indivíduos maior deposição de ficolina-2 no tecido, levando a ativação do complemento e aos consequentes danos no miocárdio e/ou no sistema gastrointestinal, o que poderia, em parte, também explicar a atividade inflamatória exacerbada e a resultante fibrose tecidual que ocorrem na CCC. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, observou-se que os indivíduos chagásicos com a *FCN2*258S* variante apresentam um risco cerca de três vezes maior de desenvolver a forma cardiodigestiva, em relação aos pacientes indeterminados. Baixos níveis de ficolina-2 foram encontrados em associação com a variante *FCN2*258S* nos pacientes com DC e refletem, em parte, a alta frequência da variante *FCN2*258S* nos indivíduos

com a forma cardiodigestiva. A associação entre baixos valores de ficolina-2 e a variante *FCN2*258S* foi previamente observada em outros grupos: indivíduos dinamarqueses saudáveis (MUNTHE-FOG et al., 2007), crianças polonesas com infecções recorrentes (CEDZYNSKI et al., 2007), gaboneses com malária (mas não em controles) (FAIK et al., 2010), pacientes vietnamitas infectados por HBV e controles (HOANG et al., 2011). A razão da associação dessa variante com baixos níveis de ficolina-2 não está clara, mas possivelmente está relacionada com um efeito na polimerização da molécula, como ocorre para MBL. É possível que, devido a sua maior capacidade de ligação, indivíduos com essa variante não precisem sintetizar níveis elevados de ficolina-2. É possível ainda que a redução dos níveis de ficolina-2 observada em pacientes chagásicos neste estudo ocorra devido ao processo de doença *per se*, já que foi demonstrado que ficolina-2 pode se ligar a antígenos do *T. cruzi* (CESTARI et al., 2009), à pentraxina 3 (MA et al., 2009) e à proteína C-Reativa (NG et al., 2007), o que poderia afetar seus níveis circulantes. Por outro lado, níveis reduzidos de ficolina-2 também podem ocorrer devido à polimorfismos não avaliados no presente estudo.

Não foram observadas associações entre os valores de ficolina-2 e genótipos *FCN2* para as posições avaliadas do promotor, tanto em pacientes como em controles. É importante considerar que o gene *FCN2* é altamente polimórfico e as frequências das numerosas variações do DNA, existentes tanto nas regiões codificantes como não codificantes, diferem nos diferentes grupos étnicos (FAIK et al., 2010), incluindo as variantes funcionais dos SNPs investigados no presente estudo (OJURONGBE et al., 2012). Embora não tenha sido observada nenhuma associação entre os genótipos do promotor de *FCN2* e níveis da proteína, é interessante notar que as concentrações de ficolina-2 nos controles foram em média o dobro do encontrado nos pacientes totais, obedecendo ao mesmo padrão entre pacientes e controles para todos os haplótipos do promotor.

Os resultados obtidos permitem-nos sugerir que tanto os níveis de MBL como de ficolina-2 poderiam ser utilizados como marcadores de atividade da DC. Além disso, a genotipagem dos polimorfismos de *MBL2* e *FCN2* associados com a DC neste estudo permite sugeri-los como possíveis marcadores de prognóstico e evolução clínica em pacientes chagásicos. Porém, estudos adicionais são necessários a fim de reforçar essa hipótese.

8 CONCLUSÕES

- O haplótipo *MBL2* LYQC*, bem como os genótipos *MBL2* YA/YC* e *MBL2* YC/YC* foram associados com proteção contra as formas sintomáticas da DC;
- O alelo *MBL2*C* foi associado com proteção ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica;
- Os genótipos *MBL2* XA/YO* e *YO/YO*, os quais conferem deficiência de MBL, foram associados com proteção contra o desenvolvimento das formas mais graves da cardiomiopatia chagásica crônica;
- As variações nos níveis de MBL dos pacientes e controles mostraram-se associados aos genótipos *MBL2*;
- Os níveis de ficolina-2 estão significativamente diminuídos em pacientes chagásicos em relação aos controles;
- Os níveis de ficolina-2 não foram associados aos genótipos *FCN2* em pacientes ou controles;
- Na forma cardíaca da DC, níveis significativamente mais altos de ficolina-2 foram observados em pacientes sem insuficiência cardíaca do que em pacientes com essa condição;
- A variante *FCN2*258S* presente no exon 8 foi associada com a forma cardiodigestiva da DC;
- Não foi observada qualquer relação entre genótipos ou haplótipos do promotor de *FCN2* e as diferentes formas clínicas da DC e controles;
- Não houve associação entre genótipos ou haplótipos de *FCN2* em pacientes com a forma cardíaca da DC nas diferentes classes funcionais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. e POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. USA: W. B. Saunders Company. 1997
- ACOSTA, D. M., SOPRANO, L. L., FERRERO, M., LANDONI, M., ESTEVA, M. I., COUTO, A. S. e DUSCHAK, V. G. A striking common O-linked N-acetylglucosaminyl moiety between cruzipain and myosin. *Parasite Immunol*, v.33, n.7, Jul, p.363-70. 2011.
- AIELLO, V. D., REIS, M. M., BENVENUTI, L. A., HIGUCHI MDE, L., RAMIRES, J. A. e HALPERIN, J. A. A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. *J Pathol*, v.197, n.2, Jun, p.224-9. 2002.
- ALVES PEDROSO, M. L., BOLDT, A. B., PEREIRA-FERRARI, L., STEFFENSEN, R., STRAUSS, E., JENSENIUS, J. C., IOSHII, S. O. e MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clin Exp Immunol*, v.152, n.2, May, p.258-64. 2008.
- ANDRADE, S. G., RASSI, A., MAGALHAES, J. B., FERRIOLLI FILHO, F. e LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.86, n.6, Nov-Dec, p.624-6. 1992.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.94 Suppl 1, p.71-80. 1999.
- ASSAF, A., HOANG, T. V., FAIK, I., AEBISCHER, T., KREMSNER, P. G., KUN, J. F. e VELAVAN, T. P. Genetic evidence of functional ficolin-2 haplotype as susceptibility factor in cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*, v.7, n.3, p.e34113. 2012.
- ATKINSON, A. P., CEDZYNSKI, M., SZEMRAJ, J., ST SWIERZKO, A., BAK-ROMANISZYN, L., BANASIK, M., ZEMAN, K., MATSUSHITA, M., TURNER, M. L. e KILPATRICK, D. C. L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol*, v.138, n.3, Dec, p.517-20. 2004.
- BARCELÓ, A. Chagas' disease--an epidemic that can no longer be ignored. *Lancet*, v.368, n.9536, Aug 19, p.619. 2006.
- BERNIG, T., TAYLOR, J. G., FOSTER, C. B., STAATS, B., YEAGER, M. e CHANOCK, S. J. Sequence analysis of the mannose-binding lectin (MBL2) gene reveals a high degree of heterozygosity with evidence of selection. *Genes Immun*, v.5, p. 461-476. 2004.
- BOLDT, A. B., CULPI, L., TSUNETO, L. T., DE SOUZA, I. R., KUN, J. F. e PETZLERLER, M. L. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. *Hum Immunol*, v.67, n.9, Sep, p.722-34. 2006.

BOLDT, A. B., LUTY, A., GROBUSCH, M. P., DIETZ, K., DZEING, A., KOMBILA, M., KREMSNER, P. G. e KUN, J. F. Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. *Genes Immun*, v.7, n.5, Jul, p.393-400. 2006.

BOLDT, A. B., MESSIAS-REASON, I. J., LELL, B., ISSIFOU, S., PEDROSO, M. L., KREMSNER, P. G. e KUN, J. F. Haplotype specific-sequencing reveals MBL2 association with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection. *Malar J*, v.8, p.97. 2009.

BRAUN, M. e DE TITTO, E. [Immune response to *Trypanosoma cruzi*. An approach to the pathogenesis of Chagas' disease]. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*, v.35, n.1, p.1-47. 1985.

BRAUNWALD, E. e BRISTOW, M. R. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation*, v.102, n.20 Suppl 4, Nov 14, p.IV14-23. 2000.

BUDZKO, D. B., PIZZIMENTI, M. C. e KIERSZENBAUM, F. Effects of complement depletion in experimental chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, v.11, n.1, Jan, p.86-91. 1975.

BUSCHE, M. N., WALSH, M. C., MCMULLEN, M. E., GUIKEMA, B. J. e STAHL, G. L. Mannose-binding lectin plays a critical role in myocardial ischaemia and reperfusion injury in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*, v.51, n.8, Aug, p.1544-51. 2008.

CAMARGO, M. E., DA SILVA, G. R., DE CASTILHO, E. A. e SILVEIRA, A. C. **Serological survey of the prevalence of Chagas' infection in Brazil, 1975/1980.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.26, n.4, Jul-Aug, p.192-204. 1984.

CARDULLO, R. A., AGRAWAL, S., FLORES, C., ZAMECNIK, P. C. e WOLF, D. E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.85, n.23, Dec, p.8790-4. 1988.

CARROLL, M. C. The complement system in B cell regulation. *Mol Immunol*, v.41, n.2-3, Jun, p.141-6. 2004.

CARVALHO, A., CUNHA, C., PASQUALOTTO, A. C., PITZURRA, L., DENNING, D. W. e ROMANI, L. Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases. *Int J Infect Dis*, v.14, n.6, Jun, p.e460-8. 2010.

CEDZYNSKI, M., ATKINSON, A. P., ST SWIERZKO, A., MACDONALD, S. L., SZALA, A., ZEMAN, K., BUCZYLKO, K., BAK-ROMANISZYN, L., WISZNIEWSKA, M., MATSUSHITA, M., SZEMRAJ, J., BANASIK, M., TURNER, M. L. e KILPATRICK, D. C. L-ficolin (ficolin-2) insufficiency is associated with combined allergic and infectious respiratory disease in children. *Mol Immunol*, v.47, n.2-3, Dec, p.415-9. 2009.

CEDZYNSKI, M., NUYTINCK, L., ATKINSON, A. P., ST SWIERZKO, A., ZEMAN, K., SZEMRAJ, J., SZALA, A., TURNER, M. L. e KILPATRICK, D. C. Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. *Clin Exp Immunol*, v.150, n.1, Oct, p.99-104. 2007.

CESTARI, I. e RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS One*, v.5, n.3, p.e9721. 2010.

CESTARI, I. S., KRARUP, A., SIM, R. B., INAL, J. M. e RAMIREZ, M. I. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol*, v.47, n.2-3, Dec, p.426-37. 2009.

CHAN, R. K., IBRAHIM, S. I., TAKAHASHI, K., KWON, E., MCCORMACK, M., EZEKOWITZ, A., CARROLL, M. C., MOORE, F. D., JR. e AUSTEN, W. G., JR. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Immunol*, v.177, n.11, Dec 1, p.8080-5. 2006.

CHAPMAN, S. J., VANNBERG, F. O., KHOR, C. C., SEGAL, S., MOORE, C. E., KNOX, K., DAY, N. P., DAVIES, R. J., CROOK, D. W. e HILL, A. V. Functional polymorphisms in the FCN2 gene are not associated with invasive pneumococcal disease. *Mol Immunol*, v.44, n.12, May, p.3267-70. 2007.

CHEN, X., KATOH, Y., NAKAMURA, K., OYAMA, N., KANEKO, F., ENDO, Y., FUJITA, T., NISHIDA, T. e MIZUKI, N. Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behcet's disease. *J Dermatol Sci*, v.43, n.3, Sep, p.201-5. 2006.

CUNHA-NETO, E., BILATE, A. M., HYLAND, K. V., FONSECA, S. G., KALIL, J. e ENGMAN, D. M. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*, v.39, n.1, Feb, p.41-54. 2006.

CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., DE MESSIAS, I., STOLF, N., BELLOTTI, G., PATARROYO, M. E., PILLEGGI, F. e KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.92, n.8, Apr 11, p.3541-5. 1995.

DAHL, M. R., THIEL, S., MATSUSHITA, M., FUJITA, T., WILLIS, A. C., CHRISTENSEN, T., VORUP-JENSEN, T. e JENSENIUS, J. C. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, v.15, n.1, Jul, p.127-35. 2001.

DE ANDRADE, A. L., ZICKER, F., DE OLIVEIRA, R. M., ALMEIDA SILVA, S., LUQUETTI, A., TRAVASSOS, L. R., ALMEIDA, I. C., DE ANDRADE, S. S., DE ANDRADE, J. G. e MARTELLI, C. M. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, v.348, n.9039, Nov 23, p.1407-13. 1996.

DE ROOIJ, B. J., VAN DER BEEK, M. T., VAN HOEK, B., VOSSEN, A. C., ROGIER TEN HOVE, W., ROOS, A., SCHAAPHERDER, A. F., PORTE, R. J., VAN DER REIJDEN, J. J., COENRAAD, M. J., HOMMES, D. W. e VERSPAGET, H. W. Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol*, v.55, n.4, Oct, p.800-7. 2011.

DE ROOIJ, B. J., VAN HOEK, B., TEN HOVE, W. R., ROOS, A., BOUWMAN, L. H., SCHAAPHERDER, A. F., PORTE, R. J., DAHA, M. R., VAN DER REIJDEN, J. J., COENRAAD, M. J., RINGERS, J., BARANSKI, A. G., HEPKEMA, B. G., HOMMES, D. W. e VERSPAGET, H. W. Lectin complement pathway gene profile of donor and recipient determine the risk of bacterial infections after orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, v.52, n.3, Sep, p.1100-10. 2010.

DEGN, S. E., JENSEN, L., HANSEN, A. G., DUMAN, D., TEKIN, M., JENSENIUS, J. C. e THIEL, S. Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 Is Crucial for Lectin Pathway Activation in Human Serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 Is Required for Alternative Pathway Function. *J Immunol*, v.189, n.8, Oct 15, p.3957-69. 2012.

DEGN, S. E., THIEL, S. e JENSENIUS, J. C. New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. *Immunobiology*, v.212, n.4-5, p.301-11. 2007.

DIAS DA SILVA, W. e KIPNIS, T. L. Complement system: an ingenious biochemical mechanism, a co-participant in the natural defense and a mediator of cell interaction. *AMB Rev Assoc Med Bras*, v.30, n.3-4, Mar-Apr, p.67-72. 1984.

DIAS, E. **MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Doença de Chagas: Textos de apoio.** Disponível em: <<http://www4.prossiga.br/Chagas/doenca/sec/dc-cd-571/dc-cd-571-02.html>> Acesso em: 06 maio 2007.

DIAS, J. C. P. **MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Doença de Chagas: Textos de apoio.** Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/22doenca_chagas.pdf> Acesso em: 06 maio 2007.

_____. **O tratamento específico da Doença de Chagas.** Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/cns/temas/tribuna/tratamento.htm>> Acesso em: 06 maio 2007.

DIAS, J. C. P. e DIAS, E. **MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Doença de Chagas: Textos de apoio.** Disponível em: <<http://www4.prossiga.br/Chagas/doenca/sec/dc-cd-571/dc-cd-571-05.html>> Acesso em: 06 maio 2007.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases *iniaciative*. Doenças Negligenciadas.** Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx> Acesso em: 24 ago 2007.

DOMMETT, R. M., KLEIN, N. e TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*, v.68, n.3, Sep, p.193-209. 2006.

DORNELLES, L. N., PEREIRA-FERRARI, L. e MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. *Clin Exp Immunol*, v.145, n.3, Sep, p.463-8. 2006.

DOS SANTOS, R. R., SOARES, M. B. e DE CARVALHO, A. C. **Bone marrow cells transplant in the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy.** *Rev Soc Bras Med Trop*, v.37, n.6, Nov-Dec, p.490-5. 2004.

DUTRA, W. O. e GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*, v.21, n.3, Jun, p.287-92. 2008.

FAIK, I., OYEDEJI, S. I., IDRIS, Z., DE MESSIAS-REASON, I. J., LELL, B., KREMSNER, P. G. e KUN, J. F. Ficolin-2 levels and genetic polymorphisms of FCN2 in malaria. *Hum Immunol*, v.72, n.1, Jan, p.74-9. 2010.

FERRARI, I., LEVIN, M. J., WALLUKAT, G., ELIES, R., LEBESGUE, D., CHIALE, P., ELIZARI, M., ROSENBAUM, M. e HOEBEKE, J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp Med*, v.182, n.1, Jul 1, p.59-65. 1995.

FERREIRA, H. C., FREITAS, L. A. M. S. e COSTA, M. A. R. **Ecologia e a saúde: casos crônicos da doença de Chagas - A importância da notificação.** Disponível em: <<http://www.endemias.com/artigo.pdf>> Acesso em: 14 maio 2008.

FERREIRA, V., VALCK, C., SANCHEZ, G., GINGRAS, A., TZIMA, S., MOLINA, M. C., SIM, R., SCHWAEBLE, W. e FERREIRA, A. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, v.172, n.5, Mar 1, p.3042-50. 2004.

FIOCRUZ. **Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC. Doença de Chagas.** Disponível em: <<http://www.ipec.fiocruz.br/pepes/dc/dc.html>> Acesso em: 06 maio 2007.

FONSECA, S. G., MOINS-TEISSERENC, H., CLAVE, E., IANNI, B., NUNES, V. L., MADY, C., IWAI, L. K., SETTE, A., SIDNEY, J., MARIN, M. L., GOLDBERG, A. C., GUILHERME, L., CHARRON, D., TOUBERT, A., KALIL, J. e CUNHA-NETO, E. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect*, v.7, n.4, Apr, p.688-97. 2005.

FRANCO-PAREDES, C., VON, A., HIDRON, A., RODRIGUEZ-MORALES, A. J., TELLEZ, I., BARRAGAN, M., JONES, D., NAQUIRA, C. G. e MENDEZ, J. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC Int Health Hum Rights*, v.7, n.1, Aug 28, p.7. 2007.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v.2, n.5, May, p.346-53. 2002.

GARRED, P., HARBOE, M., OETTINGER, T., KOCH, C. e SVEJGAARD, A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet*, v.21, n.2, Apr, p.125-31. 1994.

GARRED, P., HONORE, C., MA, Y. J., RORVIG, S., COWLAND, J., BORREGAARD, N. e HUMMELSHOJ, T. The genetics of ficolins. *J Innate Immun*, v.2, n.1, Dec, p.3-16. 2010.

GOIN, J. C., LEIROS, C. P., BORDA, E. e STERIN-BORDA, L. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *Faseb J*, v.11, n.1, Jan, p.77-83. 1997.

GRISBACH, C. Polimorfismos do promotor de *FCN2* na população euro-brasileira. (Monografia de Conclusão de Curso). Genética, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2011. 55 p.

GRUNDMANN, S., BODE, C. e MOSER, M. Mannose-binding lectin: an ancient molecule with new implications in myocardial infarction. *Eur Heart J*, v.31, n.10, May, p.1163-4. 2010.

HAERYNCK, F., VAN STEEN, K., CATTART, T., LOEYS, B., VAN DAELE, S., SCHELSTRAETE, P., CLAES, K., VAN THIELEN, M., DE CANCK, I., MAHACHIE JOHN, J. M. e DE BAETS, F. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. *Hum Immunol*, v.73, n.11, Nov, p.1175-83. 2012.

HANSEN, T. K., THIEL, S., DALL, R., ROSENFALCK, A. M., TRAINER, P., FLYVBJERG, A., JORGENSEN, J. O. e CHRISTIANSEN, J. S. GH strongly affects serum concentrations of mannan-binding lectin: evidence for a new IGF-I independent immunomodulatory effect of GH. *J Clin Endocrinol Metab*, v.86, n.11, Nov, p.5383-8. 2001.

HEJA, D., KOCSIS, A., DOBO, J., SZILAGYI, K., SZASZ, R., ZAVODSZKY, P., PAL, G. e GAL, P. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.109, n.26, Jun 26, p.10498-503. 2012.

HERPERS, B. L., IMMINK, M. M., DE JONG, B. A., VAN VELZEN-BLAD, H., DE JONGH, B. M. e VAN HANNEN, E. J. Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. *Mol Immunol*, v.43, n.7, Mar, p.851-5. 2006.

HOANG, T. V., TOAN, N. L., SONG LE, H., OUF, E. A., BOCK, C. T., KREMSNER, P. G., KUN, J. F. e VELAVAN, T. P. Ficolin-2 levels and FCN2 haplotypes influence hepatitis B infection outcome in Vietnamese patients. *PLoS One*, v.6, n.11, p.e28113. 2011.

HOLMSKOV, U., THIEL, S. e JENSENIUS, J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*, v.21, p.547-78. 2003.

HOTEZ, P. J., MOLYNEUX, D. H., FENWICK, A., KUMARESAN, J., SACHS, S. E., SACHS, J. D. e SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*, v.357, n.10, Sep 6, p.1018-27. 2007.

HOTEZ, P. J., BOTTAZZI, M. E., FRANCO-PAREDES, C., AULT, S. K. e PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of latin america and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*, v.2, n.9, p.e300. 2008.

HUMMELSHOJ, T., MUNTHE-FOG, L., MADSEN, H. O., FUJITA, T., MATSUSHITA, M. e GARRED, P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum Mol Genet*, v.14, n.12, Jun 15, p.1651-8. 2005.

IANNI, B. M. e MADY, C. **The indeterminate form of Chagas's disease. Myths vs facts.** *Arq Bras Cardiol*, v.68, n.3, Mar, p.147-8. 1997.

IIDA, K., WHITLOW, M. B. e NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J Exp Med*, v.169, n.3, Mar 1, p.881-91. 1989.

IKEDA, K., SANNOH, T., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. e YAMASHINA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem*, v.262, p.7451-7454. 1987.

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

JANEWAY JR, C. e TRAVERS, P. **Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença.** Porto Alegre: Artes Médicas. 2002

JENSEN, M. L., HONORE, C., HUMMELSHOJ, T., HANSEN, B. E., MADSEN, H. O. e GARRED, P. Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol*, v.44, n.5, Feb, p.856-65. 2007.

JOINER, K., SHER, A., GAITHER, T. e HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc Natl Acad Sci*, v.83, n.17, p.6593-7. 1986.

JOINER, K. A., DASILVA, W. D., RIMOLDI, M. T., HAMMER, C. H., SHER, A. e KIPNIS, T. L. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J Biol Chem*, v.263, n.23, Aug 15, p.11327-35. 1988.

JORDAN, J. E., MONTALTO, M. C. e STAHL, G. L. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation*, v.104, n.12, Sep 18, p.1413-8. 2001.

JUNQUEIRA JUNIOR, L. F. **Echoes from the 22nd annual applied research meeting on chagas disease and the 10th annual applied research meeting on leishmaniasis**. Rev Soc Bras Med Trop, v.39, n.6, Nov-Dec, p.565-6. 2006.

KAHN, S. J., WLEKLINSKI, M., ARUFFO, A., FARR, A., CODER, D. e KAHN, M. Trypanosoma cruzi amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. J Exp Med., v.182, n.5, Nov 1, p.1243-58. 1995.

KAHN, S. J., WLEKLINSKI, M., EZEKOWITZ, R. A., CODER, D., ARUFFO, A. e FARR, A. The major surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. Infect Immun, v.64, n.7, Jul, p.2649-56. 1996.

KILPATRICK, D. C., FUJITA, T. e MATSUSHITA, M. P35, an opsonic lectin of the ficolin family, in human blood from neonates, normal adults, and recurrent miscarriage patients. Immunol Lett, v.67, n.2, Apr 1, p.109-12. 1999.

KIPNIS, T. L., CALICH, V. L. e DA SILVA, W. D. Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages. Parasitology, v.78, n.1, Feb, p.89-98. 1979.

KIPNIS, T. L., JOINER, K. A., SILVA, W. D. D., RIMOLDI, M. T., HAMMER, C. H. e SHER, A. Identification of membrane components of Tripanosoma cruzi modulators of complement system. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.83., n.1, p.571-5. 1988.

KIPNIS, T. L., SUCUPIRA, M. e DA SILVA, W. D. Transformation of Trypanosoma cruzi trypomastigote bloodstream forms by immune IgM and its Fab mu fragment into activators of the alternative complement pathway. Braz J Med Biol Res, v.20, n.1, p.105-14. 1987.

KIPNIS, T. L., TAMBOURGI, D. V., SUCUPIRA, M. e DIAS-DA-SILVA, W. Effect of Trypanosoma cruzi membrane components on the formation of the classical pathway C3 convertase. Braz J Med Biol Res, v.19, n.2, p.271-8. 1986.

KOPP, R. L., THOMAZ-SOCCOL, V. K., DO ROCIO, D., MEMBRIVE, N., BARATA, J. M. S., JURBERG, J., STEINDEL, M., KOPP, D. C. T., CASTRO, E. A. D. e LUZ, E. Phenetic analysis of Panstrongylus megistus Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the State of Paraná-Brazil. Braz. arch. biol. technol, v.52, n.2, p.349-357. 2009.

KRARUP, A., THIEL, S., HANSEN, A., FUJITA, T. e JENSENIUS, J. C. L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. J Biol Chem, v.279, n.46, Nov 12, p.47513-9. 2004.

LEDERBOUR, C. C., DIAS, J. C. P. e VINHAES, M. C. Relatório Final. II Reunião Anual de Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas. Uberaba, MG, 22 A 24 de outubro de 2003. . Brasília: 10/12/2003, p.1-5. 2004

LEVINSON, W. e JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. Porto Alegre: Artmed. 2006. 632 p.

LIBBY, P., ALROY, J. e PEREIRA, M. E. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J Clin Invest*, v.77, n.1, Jan, p.127-35. 1986.

LIEKE, T., STEEG, C., GRAEFE, S. E., FLEISCHER, B. e JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, v.145, n.2, Aug, p.357-64. 2006.

LUZ, P. R. Determinação das concentrações séricas da lectina ligante de manose (MBL) e da proteína C-Reativa (CRP) em portadores da Doença de Chagas crônica. (Dissertação de Mestrado). Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. 98 p.

LUZ, P. R., MIYAZAKI, M. I., NETO, N. C., NISHIHARA, R. M. e MESSIAS-REASON, I. J. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int J Cardiol*, v.143, n.3, Sep 3, p.448-50. 2009.

MA, Y. J., DONI, A., HUMMELSHOJ, T., HONORE, C., BASTONE, A., MANTOVANI, A., THIELENS, N. M. e GARRED, P. Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. *J Biol Chem*, v.284, n.41, Oct 9, p.28263-75. 2009.

MADSEN, H. O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J. A., LAMM, L. U., RYDER, L. P. e SVEJGAARD, A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol*, v.155, n.6, Sep 15, p.3013-20. 1995.

MADSEN, H. O., SATZ, M. L., HOGH, B., SVEJGAARD, A. e GARRED, P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol*, v.161, n.6, Sep 15, p.3169-75. 1998.

MAGUIRE, J. H. Chagas' disease--can we stop the deaths? *N Engl J Med*, v.355, n.8, Aug 24, p.760-1. 2006.

MARIN-NETO, S. J. A., CUNHA-NETO, E., MACIEL, B. C. e SIMÕES, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*, v.115, p.1109-1123. 2007.

MATSUSHITA, M. e FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med*, v.176, n.6, Dec 1, p.1497-502. 1992.

MAYA, J. D., ORELLANA, M., FERREIRA, J., KEMMERLING, U., LOPEZ-MUNOZ, R. e MORELLO, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res*, v.43, n.3, p.323-31. 2010.

MEIRELLES, M. N., PEREIRA, M. C., SINGER, R. H., SOEIRO, M. N., GARZONI, L. R., SILVA, D. T., BARBOSA, H. S., ARAUJO-JORGE, T. C., MASUDA, M. O., CAPELLA, M. A., LOPES, A. G. e VERMELHO, A. B. Trypanosoma cruzi-cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.94 Suppl 1, p.149-52. 1999.

MESSIAS-REASON, I. J., BOLDT, A. B., MORAES BRAGA, A. C., VON ROSEN SEELING STAHLKE, E., DORNELLES, L., PEREIRA-FERRARI, L., KREMSNER, P. G. e KUN, J. F. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. J Infect Dis, v.196, n.9, Nov 1, p.1379-85. 2007.

MESSIAS-REASON, I. J., KREMSNER, P. G. e KUN, J. F. Functional haplotypes that produce normal ficolin-2 levels protect against clinical leprosy. J Infect Dis, v.199, n.6, Mar 15, p.801-4. 2009.

MESSIAS-REASON, I. J., SCHAFRANSKI, M. D., KREMSNER, P. G. e KUN, J. F. Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. Clin Exp Immunol, v.157, n.3, Sep, p.395-9. 2009.

MESSIAS-REASON, I. J., URBANETZ, L. e PEREIRA DA CUNHA, C. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. Tissue Antigens, v.62, n.4, Oct, p.308-12. 2003.

MESSIAS REASON, I. J., SCHAFRANSKI, M. D., JENSENIUS, J. C. e STEFFENSEN, R. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. Hum Immunol, v.67, n.12, Dec, p.991-8. 2006.

MINCHINTON, R. M., DEAN, M. M., CLARK, T. R., HEATLEY, S. e MULLIGHAN, C. G. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. Scand J Immunol, v.56, n.6, Dec, p.630-41. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Doença de Chagas. Brasília-DF, p.810. 2010.

MONCAYO, A. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. World Health Stat Q, v.50, n.3-4, p.195-8. 1997.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.98, n.5, Jul, p.577-91. 2003.

_____. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.98, n.5, Jul, p.577-91. 2003.

MUNTHE-FOG, L., HUMMELSHOJ, T., HANSEN, B. E., KOCH, C., MADSEN, H. O., SKJODT, K. e GARRED, P. The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels. *Scand J Immunol*, v.65, n.4, Apr, p.383-92. 2007.

MURPHY, K., TRAVERS, P. e WALPORT, M. **Immunobiology**: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 2008

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**: Atheneu. 2005. 494 p.

NG, P. M., LE SAUX, A., LEE, C. M., TAN, N. S., LU, J., THIEL, S., HO, B. e DING, J. L. C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. *EMBO J*, v.26, n.14, Jul 25, p.3431-40. 2007.

NORRIS, K. A., BRADT, B., COOPER, N. R. e SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol*, v.147, n.7, Oct 1, p.2240-7. 1991.

OJURONGBE, O., OUF, E. A., VAN TONG, H., TOAN, N. L., SONG LE, H., LUZ, P. R., MESSIAS-REASON, I. J., NURJADI, D., ZANGER, P., KUN, J. F., KREMSNER, P. G. e VELAVAN, T. P. Reliable and rapid characterization of functional FCN2 gene variants reveals diverse geographical patterns. *BMC Med Genet*, v.13, p.37. 2012.

OUF, E. A., OJURONGBE, O., AKINDELE, A. A., SINA-AGBAJE, O. R., VAN TONG, H., ADEYEBBA, A. O., KREMSNER, P. G., KUN, J. F. e VELAVAN, T. Ficolin-2 levels and FCN2 genetic polymorphisms as a susceptibility factor in schistosomiasis. *J Infect Dis*, v.206, n.4, Aug 15, p.562-70. 2012.

PIRON, M., VERGES, M., MUNOZ, J., CASAMITJANA, N., SANZ, S., MAYMO, R. M., HERNANDEZ, J. M., PUIG, L., PORTUS, M., GASCON, J. e SAULEDA, S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*, v.48, n.9, Sep, p.1862-8. 2008.

PRODINGER, W. M. Complement receptor type two (CR2,CR1): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping. *Immunol Res*, v.20, n.3, p.187-94. 1999.

PUNUKOLLU, G., GOWDA, R. M., KHAN, I. A., NAVARRO, V. S. e VASAVADA, B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*, v.115, n.3, Feb 14, p.279-83. 2007.

RAJAGOPALAN, R., SALVI, V. P., JENSENIUS, J. C. e RAWAL, N. New insights on the structural/functional properties of recombinant human mannan-binding lectin and its variants. *Immunol Lett*, v.123, n.2, Apr 27, p.114-24. 2009.

REYES, P. A. Chagas' disease in north America. *Am Heart J*, v.126, n.6, Dec, p.1496. 1993.

RIBEIRO, A. L. e ROCHA, M. O. **Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis.** Rev Soc Bras Med Trop, v.31, n.3, May-Jun, p.301-14. 1998.

RIIS, A. L., HANSEN, T. K., THIEL, S., GRAVHOLT, C. H., GJEDDE, S., GORMSEN, L. C., JORGENSEN, J. O., WEEKE, J. e MOLLER, N. Thyroid hormone increases mannan-binding lectin levels. Eur J Endocrinol, v.153, n.5, Nov, p.643-9. 2005.

ROOS, A., RASTALDI, M. P., CALVARESI, N., OORTWIJN, B. D., SCHLAGWEIN, N., VAN GIJLSWIJK-JANSSEN, D. J., STAHL, G. L., MATSUSHITA, M., FUJITA, T., VAN KOOTEN, C. e DAHA, M. R. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. J Am Soc Nephrol, v.17, n.6, Jun, p.1724-34. 2006.

ROSSI, M. A. e BESTETTI, R. B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. Cardiology, v.86, n.1, p.1-7. 1995.

ROSSI, M. A. e MENGEL, J. O. **The pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis: the role of autoimmune and microvascular factors.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.34, n.6, Nov-Dec, p.593-9. 1992.

ROTHFUCHS, A. G., ROFFE, E., GIBSON, A., CHEEVER, A. W., EZEKOWITZ, R. A., TAKAHASHI, K., STEINDEL, M., SHER, A. e BAFICA, A. Mannose-Binding Lectin Regulates Host Resistance and Pathology during Experimental Infection with *Trypanosoma cruzi*. PLoS One, v.7, n.11, p.e47835. 2012.

RUSKAMP, J. M., HOEKSTRA, M. O., POSTMA, D. S., KERKHOF, M., BOTTEMA, R. W., KOPPELMAN, G. H., ROVERS, M. M., WIJGA, A. H., DE JONGSTE, J. C., BRUNEKREEF, B. e SANDERS, E. A. Exploring the role of polymorphisms in ficolin genes in respiratory tract infections in children. Clin Exp Immunol, v.155, n.3, Mar, p.433-40. 2009.

SAEVARSDOTTIR, S., OSKARSSON, O. O., ASPELUND, T., EIRIKSDOTTIR, G., VIKINGSDDOTTIR, T., GUDNASON, V. e VALDIMARSSON, H. Mannan binding lectin as an adjunct to risk assessment for myocardial infarction in individuals with enhanced risk. J Exp Med, v.201, n.1, Jan 3, p.117-25. 2005.

SALLENBACH, S., THIEL, S., AEBI, C., OTTH, M., BIGLER, S., JENSENIUS, J. C., SCHLAPBACH, L. J. e AMMANN, R. A. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). Pediatr Allergy Immunol, v.22, n.4, Jun, p.424-30. 2011.

SANGER, F., NICKLEN, S. e COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

SANTOS, I. K., COSTA, C. H., KRIEGER, H., FEITOSA, M. F., ZURAKOWSKI, D., FARDIN, B., GOMES, R. B., WEINER, D. L., HARN, D. A., EZEKOWITZ, R. A. e EPSTEIN, J. E. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, v.69, n.8, Aug, p.5212-5. 2001.

SASTRY, K., HERMAN, G. A., DAY, L., DEIGNAN, E., BRUNS, G., MORTON, C. C. e EZEKOWITZ, R. A. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med*, v.170, p.1175-1189. 1989.

SCHAFRANSKI, M. D., PEREIRA FERRARI, L., SCHERNER, D., TORRES, R., JENSENIUS, J. C. e DE MESSIAS-REASON, I. J. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. *Mol Immunol*, v.45, n.14, Aug, p.3827-31. 2008.

SCHAFRANSKI, M. D., STIER, A., NISHIHARA, R. e MESSIAS-REASON, I. J. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol*, v.138, n.3, Dec, p.521-5. 2004.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.102, n.2, Oct 30, p.75-85. 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, M. D. S. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 8: 29 p. 2005.

SOEIRO, M. N., PAIVA, M. M., BARBOSA, H. S., MEIRELLES M. N. e ARAUJO-JORGE, T. C. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell Struct Funct*, v.24, n.3, Jun, p.139-49. 1999.

SUMMERFIELD, J. A., RYDER, S., SUMIYA, M., THURSZ, M., GORCHEIN, A., MONTEIL, M. A. e TURNER, M. W. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet*, v.345, n.8954, Apr 8, p.886-9. 1995.

SUPER, M., GILLIES, S. D., FOLEY, S., SASTRY, K., SCHWEINLE, J. E., SILVERMAN, V. J. e EZEKOWITZ, R. A. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. *Nat Genet*, v.2, n.1, Sep, p.50-5. 1992.

SUPER, M., THIEL, S., LU, J., LEVINSKY, R. J. e TURNER, M. W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*, v.2, n.8674, Nov 25, p.1236-9. 1989.

TAMBOURGI, D. V., KIPNIS, T. L., DA SILVA, W. D., JOINER, K. A., SHER, A., HEATH, S., HALL, B. F. e OGDEN, G. B. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect Immun*, v.61, n.9, Sep, p.3656-63. 1993.

TAYLOR, M. E., BRICKELL, P. M., CRAIG, R. K. e SUMMERFIELD, J. A. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem. J.*, p.262:763. 1989.

TDR. Tropical Disease Research: progress 2003-2004. Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases 2005.

THIEL, S., HOLMSKOV, U., HVIID, L., LAURSEN, S. B. e JENSENIUS, J. C. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol*, v.90, n.1, Oct, p.31-5. 1992.

THIEL, S., VORUP-JENSEN, T., STOVER, C. M., SCHWAEBLE, W., LAURSEN, S. B., POULSEN, K., WILLIS, A. C., EGGLETON, P., HANSEN, S., HOLMSKOV, U., REID, K. B. e JENSENIUS, J. C. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, v.386, n.6624, Apr 3, p.506-10. 1997.

TORRES, C. M. Myocytolysis and fibrosis of the myocardium in Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.58, Nov, p.161-82. 1960.

TRENDELENBURG, M., THEROUX, P., STEBBINS, A., GRANGER, C., ARMSTRONG, P. e 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. *Eur Heart J*, v.31, n.10, May, p.1181-7. 2010.

TROELSEN, L. N., GARRED, P., MADSEN, H. O. e JACOBSEN, S. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.56, n.1, Jan, p.21-9. 2007.

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

UTIYAMA, S. R. R., MESSIAS-REASON, I. T. e KOTZE, L. M. S. Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.36, n.3, p.183-188. 2004a.

_____. O sistema complemento nas doenças: genética e patogenia. *Rev Bras Reumatol*, v.44, n.4, p.277-286. 2004b.

VANDER CRUYSSSEN, B., NUYTINCK, L., BOULLART, L., ELEWAUT, D., WAEGEMAN, W., VAN THIELEN, M., DE MEESTER, E., LEBEER, K., ROSSAU, R. e DE KEYSER, F. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, v.46, n.12, Dec, p.1792-5. 2007.

VERDU, P., BARREIRO, L. B., PATIN, E., GESSAIN, A., CASSAR, O., KIDD, J. R., KIDD, K. K., BEHAR, D. M., FROMENT, A., HEYER, E., SICA, L., CASANOVA, J. L., ABEL, L. e QUINTANA-MURCI, L. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet*, v.15, n.17, Sep 1, p.2650-8. 2006.

VINHAES, M. C. e DIAS, J. C. **Chagas disease in Brazil**. *Cad Saude Publica*, v.16 Suppl 2, p.7-12. 2000.

WALLIS, R. e CHENG, J. Y. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. *J Immunol*, v.163, n.9, Nov 1, p.4953-9. 1999.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, v.344, n.14, Apr 5, p.1058-66. 2001.

WEITZEL, T., ZULANTAY, I., DANQUAH, I., HAMANN, L., SCHUMANN, R. R., APT, W. e MOCKENHAUPT, F. P. Mannose-binding lectin and Toll-like receptor polymorphisms and Chagas disease in Chile. *Am J Trop Med Hyg*, v.86, n.2, Feb, p.229-32. 2012.

WIERTSEMA, S. P., HERPERS, B. L., VEENHOVEN, R. H., SALIMANS, M. M., RUVEN, H. J., SANDERS, E. A. e RIJKERS, G. T. Functional polymorphisms in the mannan-binding lectin 2 gene: effect on MBL levels and otitis media. *J Allergy Clin Immunol*, v.117, n.6, Jun, p.1344-50. 2006.

YASUDA, M. A. S. **XVI Annual meeting of Applied Research in Chagas Disease and IV meeting of Applied Research in Leishmaniasis**. Uberaba, 27-29 October 2000. Abstracts. São Paulo, p.27-119. 2000

ZHANG, X. L. e ALI, M. A. Ficolins: structure, function and associated diseases. *Adv Exp Med Biol*, v.632, p.105-15. 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - PLANILHA DE DADOS DE PACIENTES	94
APÊNDICE 2 - PLANILHA DE GENÓTIPOS DE PACIENTES	100
APÊNDICE 3 - PLANILHA DE DADOS DOS CONTROLES PARA <i>MBL2</i>	109
APÊNDICE 4 - PLANILHA DE DADOS DOS CONTROLES PARA <i>FCN2</i>	113

CODIFICAÇÕES

Para "SEXO":
1 = masculino
2 = feminino

Para "ETNIA"
1 = euro-brasileiro
2 = afrodescendente
3 = oriental
4 = indígena

Para "DOENÇA"
1 = indeterminada
2 = cardíaca
3 = digestiva
4 = associada

ND = não determinado
SI = sem informação

APÊNDICE 1 – PLANILHA DE DADOS DE PACIENTES

Código	Doença	Sexo	Idade	Etnia	MBL (ng/ml)	FCN2 (ng/ml)
DC001JAM	4	1	61	1	1285	ND
DC002ND	2	1	49	0	7214	ND
DC003EFL	1	0	51	0	1025	ND
DC004RS	4	0	56	1	2119	ND
DC005JRF	1	1	63	0	6379	ND
DC006MPA	4	1	63	0	89	ND
DC007MFA	2	1	52	0	2422	ND
DC008JMS	2	1	52	0	2448	ND
DC010AMN	2	0	73	0	6016	ND
DC011MCF	1	0	52	0	134	ND
DC012IOS	2	0	71	0	363	1622,36
DC013JTS	1	0	53	0	143	6058,44
DC014VMZ	2	1	34	1	83	ND
DC015ASL	1	0	57	0	1192	ND
DC016MN	2	0	50	0	2170	ND
DC018AS	1	0	60	0	641	ND
DC019CCS	1	0	43	0	2330	ND
DC020MEL	1	0	47	0	2812	ND
DC021CSP	1	0	54	0	1170	ND
DC022LFM	2	0	59	0	232	ND
DC023VT	2	1	52	0	2369	ND
DC024AAS	4	1	64	0	127	ND
DC025JLO	2	1	51	1	74	ND
DC026JCD	1	1	62	0	2012	ND
DC027MDS	2	1	71	0	2651	ND
DC028ABA	2	1	48	0	911	ND
DC029JPS	3	1	63	0	5465	ND
DC030MFP	2	0	50	0	248	ND
DC031RL	4	1	55	0	2529	ND
DC032AR	2	1	61	1	282	ND
DC033AMP	2	0	43	0	368	ND
DC034IML	2	0	57	0	1219	ND
DC035EO	1	1	58	1	1451	ND
DC036BR	1	1	55	0	1014	ND
DC037NR	3	0	57	0	224	ND
DC038JM	N.I.	1	46	0	964	ND
DC039COM	1	0	52	0	130	ND
DC040PNF	1	0	60	0	1399	ND
DC041MT	3	0	44	0	1865	ND
DC042MHF	1	0	58	0	1097	ND
DC043JCM	2	1	67	0	1488	ND
DC044FCM	2	1	53	0	885	ND

Código	Doença	Sexo	Idade	Etnia	MBL (ng/ml)	FCN2 (ng/ml)
DC045MAS	2	0	49	0	1460	ND
DC046AMO	2	0	55	0	330	ND
DC048LRS	2	1	62	0	1381	ND
DC049NRS	1	0	52	0	2552	4243,39
DC050AFS	2	1	50	1	645	13000,00
DC051OS	2	1	67	0	5172	ND
DC052JAN	2	0	73	1	1269	2755,08
DC053MAL	2	1	49	0	1474	2427,51
DC054ALS	2	1	65	0	2803	1600,30
DC055RMR	4	0	50	0	327	2860,56
DC056EM	4	0	49	1	1559	886,06
DC057EC	1	0	53	0	69	ND
DC058MRM	1	0	44	0	637	3821,80
DC059ECF	1	1	55	0	1314	3050,22
DC060WRC	4	1	66	0	1830	1822,99
DC061MRS	2	0	53	0	121	ND
DC062IFM	2	1	54	0	1422	2033,54
DC063MRC	2	1	64	0	67	ND
DC064JCD	1	1	40	0	726	ND
DC065CA	2	1	51	0	358	ND
DC066OH	1	0	53	0	122	5518,78
DC067ABC	3	1	53	0	310	ND
DC068JAB	2	1	63	0	76	ND
DC069MRK	1	0	58	0	1859	2474,06
DC070PCA	1	1	59	0	2464	2378,28
DC071MGC	1	0	69	0	1904	1642,93
DC072DCV	4	0	51	0	325	2115,83
DC073NMR	1	0	56	0	562	ND
DC074ISS	1	0	42	0	356	4167,14
DC075JMP	2	1	56	0	506	4022,20
DC076JSO	2	0	64	0	1420	ND
DC077VST	1	0	61	0	661	1655,01
DC078SPL	2	1	50	0	615	2315,00
DC079VLC	2	1	46	0	1192	ND
DC080AC	1	1	60	0	342	ND
DC081MRP	2	1	65	0	996	ND
DC082OS	2	0	51	1	600	ND
DC083VAP	2	1	57	0	<50	ND
DC084MMP	2	0	43	0	800	ND
DC085HKB	1	0	59	0	2200	ND
DC086MAA	3	0	81	0	<50	4642,25
DC087MSS	4	1	51	1	4400	2566,94
DC089AAB	2	1	64	1	5150	1149,16
DC090CLA	4	0	54	0	5600	3411,88

Código	Doença	Sexo	Idade	Etnia	MBL (ng/ml)	FCN2 (ng/ml)
DC092AJO	2	0	49	1	2700	1221,53
DC093GRA	2	0	61	0	4400	2495,68
DC094JPP	1	0	74	0	3200	2465,49
DC095WVS	4	1	72	0	5500	1836,81
DC096MBS	2	1	63	0	4200	ND
DC097MDB	3	0	54	0	3600	4380,52
DC098NTO	1	0	42	0	<50	4210,39
DC099VRC	1	0	51	0	1500	ND
DC100MJS	3	1	70	1	4700	5074,10
DC101MLB	1	0	65	1	<50	10074,23
DC102JBS	4	1	50	0	5100	4642,25
DC103MVA	2	0	45	0	<50	ND
DC104JA	2	1	78	0	2050	ND
DC105JO	1	1	50	0	2800	ND
DC106ORN	4	0	68	0	2600	2272,98
DC107RAB	3	0	36	1	1900	4416,14
DC108CH	3	0	55	1	3100	7209,62
DC109JCC	1	1	59	0	3400	ND
DC110CMB	2	0	57	0	600	ND
DC111MBF	3	0	51	0	2100	4966,37
DC112MFC	2	0	53	0	<50	ND
DC113FA	1	0	53	0	90	7082,38
DC114FAS	1	1	56	1	105	ND
DC115IFS	3	0	55	0	1005	13252,71
DC116JRS	3	1	71	0	79	2307,27
DC117LDP	2	0	62	0	3800	ND
DC118MRR	4	0	55	0	500	764,46
DC119JH	1	1	76	0	5600	ND
DC120JRA	2	1	57	0	5600	ND
DC121AJC	1	1	34	0	4500	ND
DC122CAO	3	0	60	0	3200	7479,23
DC123JA	4	1	55	1	3700	3487,29
DC124MIS	2	0	49	0	4800	ND
DC125SPN	2	1	85	0	3500	3105,72
DC126RSL	2	1	49	1	5250	ND
DC128MD	4	1	73	0	3700	7375,65
DC129PMS	1	1	55	0	600	ND
DC130CLA	3	0	48	0	<50	10154,47
DC131AVB	2	1	48	0	<50	ND
DC132ER	4	1	69	0	2400	1642,93
DC133MAD	3	0	47	0	700	2410,93
DC134CB	4	1	37	0	<50	423,21
DC136PSR	1	1	66	0	5600	1550,02
DC137CMB	1	1	40	0	3700	2033,54

Código	Doença	Sexo	Idade	Etnia	MBL (ng/ml)	FCN2 (ng/ml)
DC138MIR	2	0	52	0	5600	ND
DC139JP	1	1	38	0	600	2303,42
DC140ACD	1	0	42	0	<50	ND
DC141IAS	1	0	47	0	<50	ND
DC142JPT	1	1	43	0	600	ND
DC143MSR	1	0	67	0	<50	ND
DC144MFP	3	0	61	1	600	1801,15
DC145AGS	2	0	90	1	3000	ND
DC146ANP	1	0	62	1	5400	ND
DC147MCS	1	1	64	1	3600	ND
DC148RGP	1	0	62	0	4700	ND
DC150SFM	1	0	43	0	1600	4276,90
DC151ISF	4	0	46	0	700	2775,65
DC152AAF	2	0	61	1	800	ND
DC153NOS	1	0	57	0	1100	ND
DC154CSN	1	0	54	0	1800	2887,99
DC155MAL	2	0	57	0	2500	2224,79
DC156IVP	1	1	53	0	3000	1226,73
DC157BFR	1	0	52	1	3300	ND
DC158DAC	2	0	60	0	3500	1761,13
DC159NMS	2	0	60	1	3300	ND
DC160JFS	2	1	58	1	4200	ND
DC161AFO	2	0	58	0	ND	3664,29
DC162ASA	1	0	57	0	ND	13000,00
DC163ERS	1	0	36	0	ND	3706,83
DC164IO	1	1	54	0	ND	5074,10
DC165JPS	2	1	84	1	ND	2646,29
DC166JAD	4	1	63	0	ND	2641,51
DC167CN	3	1	55	0	ND	1737,67
DC168JMD	2	1	48	1	ND	1534,42
DC169JCS	1	1	40	0	ND	2315,00
DC170PRM	1	1	41	0	ND	1899,36
DC171TGC	1	0	57	0	ND	2938,50
DC172MSJ	4	0	38	0	ND	2092,31
DC173SCG	2	1	46	0	ND	973,96
DC174MS	1	1	40	0	ND	1226,73
DC175MFF	1	0	55	3	ND	2059,36
DC176NC	4	1	63	0	ND	1289,15
DC177LDM	1	0	64	0	ND	1482,31
DC178MM	1	1	58	0	ND	2001,91
DC179LOS	4	0	71	0	ND	1305,71
DC180RAS	4	1	61	0	ND	1475,95
DC181VPS	2	1	54	0	ND	2833,57
DC182ZFM	1	0	51	0	ND	1071,50

Código	Doença	Sexo	Idade	Etnia	MBL (ng/ml)	FCN2 (ng/ml)
DC183ZPC	2	0	62	3	ND	2530,91
DC184AIM	2	0	62	0	ND	1678,39
DC185DVS	2	0	63	1	ND	ND
DC186JAB	4	1	72	1	ND	1396,02
DC187JBM	2	1	56	0	ND	2271,83
DC188OMS	1	0	64	0	ND	4005,97
DC189CCP	1	1	59	0	ND	9349,26
DC190MPS	2	0	67	0	ND	1222,40
DC191JAS	2	1	60	1	ND	3829,07
DC192HFT	2	0	58	0	ND	2789,04
DC193JTC	2	0	43	0	ND	7901,69
DC194NPS	2	1	54	1	ND	13527,98
DC196FBL	1	1	49	0	ND	6133,25
DC197JAS	2	1	77	3	ND	3026,59
DC198ELP	1	0	56	0	ND	18880,72
DC199LGF	2	1	54	1	ND	6180,63
DC200JLM	4	1	55	3	ND	3398,96
DC201JPM	1	1	58	0	ND	2528,76
DC202OB	1	1	61	0	ND	4460,18
DC203HGS	2	0	60	0	ND	2980,87
DC204JSR	1	0	55	3	ND	3121,80
DC205MHS	1	0	53	0	ND	3152,64
DC206MJO	2	0	65	0	ND	10400,00
DC207IN	1	0	60	1	ND	0,00
DC208IB	1	0	61	0	ND	4095,43
DC209JPA	4	1	59	0	ND	3165,13
DC210NBS	4	0	49	0	ND	3055,79
DC211VLS	1	0	51	3	ND	2799,15
DC212AMS	2	0	62	1	ND	3865,04
DC213MGC	3	0	69	1	ND	1348,71
DC214MAP	1	0	67	0	ND	2887,58
DC215PMB		1	66	0	ND	1784,70
DC216OSB	1	0	52	0	ND	1442,86
DC217ALP	1	0	55	0	ND	1987,10
DC218MSP	3	0	84	0	ND	1104,30
DC219AOF	2	1	77	1	ND	1120,86
DC220JAP	2	1	56	0	ND	1651,90
DC221EMS	2	0	59	0	ND	2563,48
DC222KI	2	0	64	2	ND	1506,33
DC223EFS	4	1	54	0	ND	1297,25
DC224IMP	2	0	59	0	ND	2286,48
DC225MAJ		0	72	0	ND	1234,92
DC226NVA	2	0	67	0	ND	1554,73

Código	Doença	Sexo	Idade	Etnia	MBL (ng/ml)	FCN2 (ng/ml)
DC227IJB	2	0	68	0	ND	3184,03
DC228LSO	4	0	66	0	ND	2507,43
DC229MAG	1	0	54	0	ND	5469,05
DC230MRO	3	0	63	1	ND	3073,55
DC231VMS	3	1	56	0	ND	
DC232NBR	1	0	67	0	ND	2257,33
DC233GAC	2	0	45	1	ND	2546,02
DC234MLS	2	1	62	1	ND	1963,18
DC236MAS	1	0	55	0	ND	2312,44
DC237NS	3	0	65	1	ND	2301,26
DC238MFS	3	0	61	3	ND	2882,25
DC239MAF	1	0	40	0	ND	2432,95
DC240SSF	1	0	62	1	ND	2029,92
DC241LTX	3	0	59	0	ND	2705,56
DC242AFP	1	0	59	0	ND	3235,42
DC243JO	2	1	63	1	ND	2083,62
DC244EMA	1	0	51	0	ND	3811,32
DC245AOS	4	0	69	0	ND	1079,78
DC246LOA	2	0	68	0	ND	3196,74
DC247MLS	2	0	42	3	ND	1561,45
DC248JPS	2	1	65	0	ND	3948,42
DC249MIP	1	0	45	0	ND	2524,47
DC250ICA	2	0	62	3	ND	2980,87
DC251CRS	4	0	56	0	ND	2866,65
DC252FMS	1	0	58	0	ND	3181,05
DC253AAF	2	0	51	3	ND	2258,49
DC254FMP	2	0	75	1	ND	2719,99
DC255BDV	2	1	47	0	ND	1602,49
DC256JCS	2	1	82	0	ND	10374,24
DC257MLM	1	0	60	0	ND	4320,29
DC258CPL	2	1	76	0	ND	1009,97

APÊNDICE 2 – PLANILHA DE GENÓTIPOS *MBL2* E *FCN2* DE PACIENTES

Código	Doença	Genótipo <i>MBL2</i>	<i>FCN2</i> (-986)	<i>FCN2</i> (-602)	<i>FCN2</i> (-4)	<i>FCN2</i> (+6424)
DC001JAM	4	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> D	AG	GG	AG	GG
DC002ND	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	AG	GT
DC003EFL	1	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> D	AG	GG	AA	GT
DC004RS	4	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GG
DC005JRF	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	AG	GG
DC006MPA	4	ND	AG	GG	AG	GG
DC007MFA	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	AG	AA	GT
DC008JMS	2	ND	AG	AG	AA	GG
DC010AMN	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GT
DC011MCF	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC012IOS	2	ND	GG	GG	AA	GG
DC013JTS	1	ND	AG	AG	AA	GG
DC014VMZ	2	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	AA	AG	AG	GG
DC015ASL	1	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	AG	AG	AA	GG
DC016MN	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC018AS	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AA	GG
DC019CCS	1	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AA	AG	AG	GG
DC020MEL	1	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AA	AG	AA	GG
DC021CSP	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GG
DC022LFM	2	<i>HYP</i> D/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GG
DC023VT	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AA	GG
DC024AAS	4	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> D	GG	GG	AA	GT
DC025JLO	2	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AA	GG
DC026JCD	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GT
DC027MDS	2	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GG
DC028ABA	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	AG	AA	GT
DC029JPS	3	ND	AG	GG	AA	GG
DC030MFP	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AG	GG
DC031RL	4	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	AG	GT
DC032AR	2	<i>LYP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GT
DC033AMP	2	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GT
DC034IML	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GT
DC035EO	1	<i>HYP</i> D/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	GG	GG
DC036BR	1	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GT
DC037NR	3	ND	AG	GG	AG	GT
DC038JM	SI	<i>HYP</i> D/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GT
DC039COM	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AA	GG	AA	GG
DC040PNF	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GG
DC041MT	3	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC042MHF	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	AG	AA	AA	GG
DC043JCM	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AA	GG	GG	GG
DC044FCM	2	ND	AG	GG	AA	GG

Código	Doença	Genótipo MBL2	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
DC045MAS	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	AG	AA	GG
DC046AMO	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AA	GG
DC048LRS	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	AG	GG	AA	GG
DC049NRS	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AA	AA	AA	GG
DC050AFS	2	ND	AG	GG	AA	GG
DC051OS	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	AG	GT
DC052JAN	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	AG	AA	GT
DC053MAL	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GT
DC054ALS	2	ND	AG	GG	AG	GG
DC055RMR	4	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GG
DC056EM	4	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GG
DC057EC	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	AG	AA	GG
DC058MRM	1	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> D	GG	GG	AA	GG
DC059ECF	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	AA	AG	AA	GG
DC060WRC	4	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC061MRS	2	ND	AG	GG	AG	GG
DC062IFM	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AG	GT
DC063MRC	2	<i>HYP</i> D/ <i>LYP</i> B	AG	AG	AA	GG
DC066OH	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND	ND	ND	ND
DC068JAB	2	ND	ND	ND	ND	ND
DC069MRK	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC070PCA	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	AG	AG	AA	GG
DC071MGC	1	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GT
DC072DCV	4	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GG
DC073NMR	1	<i>HYP</i> D/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GG
DC074ISS	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GG
DC075JMP	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	AG	AA	GT
DC076JSO	2	ND	GG	GG	AG	GG
DC077VST	1	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC078SPL	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	AG	AA	GG
DC079VLC	2	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GG
DC080AC	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GG
DC081MRP	2	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC082OS	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AA	GG
DC083VAP	2	ND	AA	GG	GG	GG
DC084MMP	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GT
DC085HKB	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC086MAA	3	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GG
DC087MSS	4	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AA	GG	GG	GG
DC089AAB	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC090CLA	4	ND	AG	AG	AA	GG
DC092AJO	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GT
DC093GRA	2	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC094JPP	1	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	AG	AA	GT

Código	Doença	Genótipo MBL2	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
DC095WVS	4	ND	AG	AG	AA	GT
DC096MBS	2	ND	GG	GG	AA	GT
DC097MDB	3	HYP A/LYQA	AG	GG	AG	GT
DC098NTO	1	ND	AG	GG	AG	GT
DC099VRC	1	HYP A/HYPD	AG	GG	AG	TT
DC100MJS	3	LXPA/HYP A	GG	GG	AA	GG
DC101MLB	1	LYPB/LYQC	AA	GG	AG	GG
DC102JBS	4	HYP A/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC103MVA	2	LXPA/LYPB	GG	GG	AA	GT
DC104JA	2	LXPA/LXPA	AA	GG	GG	GG
DC105JO	1	LYQA/LYQA	GG	GG	AA	GG
DC106ORN	4	LYPA/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC107RAB	3	LXPA/HYP A	AG	GG	AG	GG
DC108CH	3	LXPA/LYQA	AG	AG	AA	GT
DC109JCC	1	HYP A/LYQA	GG	GG	AA	GG
DC110CMB	2	HYP A/LYPB	AG	AG	AA	GG
DC111MBF	3	LXPA/HYP A	GG	GG	AA	GT
DC112MFC	2	LXPA/LYPB	GG	GG	AA	GT
DC113FA	1	ND	AA	AG	AG	GT
DC114FAS	1	LXPA/LYPB	GG	GG	AA	GG
DC115IFS	3	LXPA/LXPA	AG	AG	AA	GG
DC116JRS	3	LXPA/LYQC	AA	AG	AG	GG
DC117LDP	2	LXPA/LYQA	GG	GG	AA	GG
DC118MRR	4	ND	AG	AG	AA	GT
DC119JH	1	HYP A/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC120JRA	2	HYP A/LYQA	AA	AG	AG	GG
DC121AJC	1	LXPA/HYP A	AG	GG	AG	GT
DC122CAO	3	LXPA/LYPA	AG	AG	AA	GG
DC123JA	4	LYPA/LYQA	AA	AA	AA	GG
DC124MIS	2	ND	AG	AG	AA	GG
DC125SPN	2	ND	GG	GG	AA	GG
DC126RSL	2	HYP A/LYQA	GG	GG	AA	GG
DC128MD	4	LXPA/HYP A	AG	AG	AA	GG
DC129PMS	1	LYQA/LYPB	AG	AG	AA	GT
DC130CLA	3	LXPA/LYPB	AG	AG	AA	GG
DC131AVB	2	ND	GG	GG	AA	GG
DC132ER	4	LXPA/HYP A	AG	GG	AG	GG
DC133MAD	3	ND	AA	AG	AG	GT
DC134CB	4	LYPB/LYPD	GG	GG	AA	TT
DC136PSR	1	HYP A/HYP A	AG	GG	AG	GG
DC137CMB	1	ND	AA	GG	GG	GG
DC138MIR	2	HYP A/HYP A	GG	GG	AA	GG
DC139JP	1	LYQA/LYPB	AA	GG	GG	GG
DC140ACD	1	ND	GG	GG	AA	GT

Código	Doença	Genótipo MBL2	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
DC141IAS	1	LXPA/LYPB	AG	GG	AG	GT
DC142JPT	1	LYPA/LYPB	AA	GG	AG	GG
DC143MSR	1	LYPB/LYPB	AG	GG	AG	GG
DC144MFP	3	LYQA/LYPB	AG	AG	AA	GG
DC145AGS	2	HYP A/LYQA	GG	GG	AA	GT
DC146ANP	1	HYP A/HYP A	AG	GG	AG	GG
DC147MCS	1	HYP A/HYP A	AG	AG	AA	GT
DC148RGP	1	LXPA/LYQA	GG	GG	AA	GG
DC150SFM	1	ND	AA	AG	AG	GG
DC151ISF	4	HYP A/LYPB	AG	GG	AG	GG
DC152AAF	2	ND	AG	GG	AG	GG
DC153NOS	1	HYP A/LYPB	GG	GG	AA	GT
DC154CSN	1	LXPA/LYPA	AG	GG	AG	GG
DC155MAL	2	ND	GG	GG	AA	GG
DC156IVP	1	ND	GG	GG	AA	GG
DC157BFR	1	HYP A/LYQA	AG	AG	AA	GT
DC158DAC	2	LXPA/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC159NMS	2	LXPA/HYP A	GG	GG	AA	GT
DC160JFS	2	HYP D/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC161AFO	2	HYP A/HYP A	AA	AA	AA	GG
DC162ASA	1	LXPA/HYP A	AG	AG	AA	GT
DC163ERS	1	HYP A/LYPB	GG	GG	AA	TT
DC164IO	1	ND	AG	AG	AA	GG
DC165JPS	2	ND	GG	GG	AA	GG
DC166JAD	4	ND	GG	GG	AA	TT
DC167CN	3	HYP D/LYQA	AA	GG	GG	GG
DC168JMD	2	ND	AG	AG	AA	GG
DC169JCS	1	HYP A/LYQA	AA	AA	AA	GT
DC170PRM	1	ND	AG	GG	AG	GT
DC171TGC	1	ND	GG	GG	AA	GT
DC172MSJ	4	LYQA/LYPB	AG	GG	AG	GT
DC173SCG	2	LYPA/LYQA	AG	GG	AG	GT
DC174MS	1	LXPA/HYP A	AG	GG	AA	GT
DC175MFF	1	LYQA/LYPB	GG	GG	AA	GG
DC176NC	4	LYPA/LYQA	AG	GG	AG	GT
DC177LDM	1	ND	GG	GG	AA	GG
DC178MM	1	HYP A/HYP A	GG	GG	AA	GG
DC179LOS	4	ND	AG	AG	AA	GG
DC180RAS	4	HYP A/HYP A	AA	AG	AG	GG
DC181VPS	2	LXPA/HYP A	AA	GG	GG	GG
DC182ZFM	1	HYP A/LYPB	AG	AG	AA	GT
DC183ZPC	2	HYP A/LYPA	AA	AA	AA	GG
DC184AIM	2	ND	AG	AG	AA	GT
DC185DVS	2	ND	AA	AG	GG	GG

Código	Doença	Genótipo MBL2	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
DC186JAB	4	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC187JBM	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	AA	AA	TT
DC188OMS	1	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> C	AA	AG	AA	GG
DC189CCP	1	ND	AA	AG	AG	GG
DC190MPS	2	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC191JAS	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> D	AG	AG	AA	GG
DC192HFT	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GT
DC193JTC	2	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC194NPS	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	AA	GG	GG	GG
DC196FBL	1	ND	AG	GG	AG	GG
DC197JAS	2	ND	AG	AG	AA	GG
DC198ELP	1	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> C	GG	GG	AA	GG
DC199LGF	2	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC200JLM	4	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AA	GG
DC201JPM	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	GG	GT
DC202OB	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GG
DC203HGS	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AA	GG	AG	GG
DC204JSR	1	<i>LYP</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GT
DC205MHS	1	ND	GG	GG	AA	GG
DC206MJO	2	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	AG	GG
DC207IN	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> C	GG	GG	AA	GG
DC208IB	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC209JPA	4	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC210NBS	4	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	AA	AG	AA	GG
DC211VLS	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> C	AG	GG	AG	GG
DC212AMS	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	AA	GG	GG	GG
DC213MGC	3	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	GG	AG	GG
DC214MAP	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GG
DC215PMB	SI	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> A	AA	AG	AG	GG
DC216OSB	1	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	AA	AG	GG
DC217ALP	1	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC218MSP	3	<i>LXP</i> A/ <i>HYP</i> D	GG	GG	AA	GT
DC219AOF	2	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	AG	AG	AA	GG
DC220JAP	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AA	GG
DC221EMS	2	<i>LYQ</i> A/ <i>LYP</i> B	AG	GG	AG	GG
DC222KI	2	<i>LYP</i> B/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AA	GT
DC223EFS	4	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	AG	GG	AG	GT
DC224IMP	2	ND	AG	GG	AG	GT
DC225MAJ	SI	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AA	GG
DC226NVA	2	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AG	GG
DC227IJB	2	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	GG	GG	AA	GT
DC228LSO	4	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	AG	GG	AG	GT
DC229MAG	1	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	GG	GG	AG	GG
DC230MRO	3	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	GG	GG	AA	GG

Código	Doença	Genótipo MBL2	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
DC231VMS	3	LYQA/LYQA	GG	GG	AA	GT
DC232NBR	1	LYQA/LYPB	AA	AG	AG	GG
DC233GAC	2	HYP A/LYQA	GG	GG	AA	GT
DC234MLS	2	LYQA/LYPB	GG	GG	AG	GG
DC236MAS	1	ND	AG	GG	AG	GG
DC237NS	3	HYP A/LYPA	AG	GG	GG	GG
DC238MFS	3	HYP A/LYPB	GG	AA	AA	GT
DC239MAF	1	ND	AA	AG	AG	GG
DC240SSF	1	LYPA/LYPA	AG	GG	AG	GG
DC241LTX	3	HYP A/HYP A	AA	GG	GG	GG
DC242AFP	1	LXPA/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC243JO	2	HYP A/HYPD	AG	GG	AG	GG
DC244EMA	1	ND	AA	AG	AG	GG
DC245AOS	4	LXPA/LYQC	GG	GG	AG	GT
DC246LOA	2	LYPA/LYQA	AG	GG	AG	GG
DC247MLS	2	LYPA/LYQA	AA	AG	AG	GG
DC248JPS	2	LXPA/HYP A	AA	AG	AA	GG
DC249MIP	1	LXPA/HYP A	AG	AG	AA	GT
DC250ICA	2	LYQA/LYQA	AA	GG	GG	GG
DC251CRS	4	LXPA/LXPA	AG	GG	AG	GT
DC252FMS	1	LYQA/LYPB	AA	GG	AG	GG
DC253AAF	2	HYP A/LYPB	GG	GG	AA	GG
DC254FMP	2	ND	AA	AG	AA	GG
DC255BDV	2	ND	AG	AG	AA	GG
DC256JCS	2	LXPA/LYPA	GG	GG	AA	GG
DC257MLM	1	HYP A/LYQA	AG	AG	AA	GG
DC258CPL	2	LXPA/LYPA	GG	GG	AA	GT
DC259JAC	1	ND	ND	ND	ND	ND
DC260IO	2	ND	ND	ND	ND	ND

APÊNDICE 3 – PLANILHA DE DADOS DOS CONTROLES PARA *MBL2*

Código	Idade	Sexo	Etnia	Genótipo <i>MBL2</i>	MBL (ng/ul)
20	78	0	0	<i>LYPB/LYQA</i>	ND
26	61	0	0	<i>HYPB/LYPB</i>	ND
28	63	0	0	<i>HYPB/LYPB</i>	ND
37	55	0	0	<i>LYPB/LYQC</i>	ND
40	51	0	0	<i>LXPA/LYQA</i>	ND
41	64	0	0	<i>LXPA/LYPA</i>	ND
42	68	0	0	<i>LYPA/LYQA</i>	ND
44	60	0	0	<i>HYPB/LYPB</i>	ND
54	52	0	0	<i>HYPB/HYPB</i>	ND
55	51	0	0	<i>HYPB/LYPB</i>	ND
59	59	0	0	<i>LYPA/LYPA</i>	ND
60	52	0	0	<i>HYPB/LYQA</i>	ND
65	59	0	0	<i>HYPB/LYQA</i>	ND
241	32	1	0	<i>LXPA/LYPA</i>	ND
243	29	1	0	<i>HYPD/LYPA</i>	ND
245	38	1	0	<i>HYPD/LXPA</i>	ND
249	43	1	0	<i>HYPB/HYPB</i>	ND
251	34	1	1	<i>HYPD/LYQA</i>	ND
255	30	1	1	<i>LYPA/LYQA</i>	ND
257	29	1	1	<i>LXPA/LYQA</i>	ND
259	27	1	0	<i>HYPB/HYPD</i>	ND
261	40	1	0	<i>HYPB/HYPB</i>	ND
261	40	1	0	<i>HYPB/HYPB</i>	ND
263	34	1	0	<i>HYPB/LXPA</i>	ND
265	28	1	1	<i>HYPB/LYQA</i>	ND
267	28	1	0	<i>LYPB/LYQA</i>	ND
269	27	1	0	<i>HYPB/LYQA</i>	ND
273	32	1	0	<i>LXPA/LYPB</i>	ND
279	42	0	0	<i>LYPB/LYQC</i>	ND
281	36	0	0	<i>HYPB/LYQA</i>	ND
281	36	0	0	<i>HYPB/LYQA</i>	ND
283	41	1	0	<i>LXPA/LYQA</i>	ND
285	38	0	0	<i>LXPA/LXPA</i>	ND
286	34	0	0	<i>HYPD/LYPA</i>	ND
287	63	1	0	<i>LXPA/LYPA</i>	ND
290	38	1	0	<i>HYPB/LXPA</i>	ND
291	45	0	0	<i>LYPA/LYQC</i>	ND
292	29	1	0	<i>LXPA/LYPA</i>	ND
293	25	0	0	<i>LYPA/LYQA</i>	ND
294	52	0	0	<i>LYPA/LYQA</i>	ND
295	37	0	1	<i>LXPA/LXPA</i>	ND

Código	Idade	Sexo	Etnia	Genótipo <i>MBL2</i>	MBL (ng/ul)
296	27	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
297	29	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
298	22	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
299	22	0	0	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
300	37	1	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
301	23	1	1	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> D	ND
302	44	1	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
303	33	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> C	ND
304	46	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
305	31	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
306	27	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
307	39	1	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
308	47	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> C	ND
309	28	1	1	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> C	ND
310	27	1	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
311	27	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
312	43	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
313	23	0	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
314	33	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
315	35	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
316	38	0	0	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
317	38	1	1	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
318	29	0	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
319	52	0	0	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
319	52	0	0	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
320	29	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
321	30	1	1	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
322	36	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
003G	43	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	ND
005G	41	0	0	<i>HYP</i> D/ <i>LYP</i> B	ND
007G	41	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
009G	43	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	ND
011G	60	1	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
013G	43	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
014 MSS	62	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
016 MRT	54	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
019 NAC	40	0	1	<i>LYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
019G	35	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
021G	27	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	ND
023 IMR	55	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
023G	26	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
025G	34	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
027G	43	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
029G	39	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	ND

Código	Idade	Sexo	Etnia	Genótipo <i>MBL2</i>	MBL (ng/ul)
033G	31	1	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
035G	36	0	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
037G	32	0	0	<i>HYP</i> D/ <i>LYQ</i> A	ND
043G	34	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
045G	58	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
047G	27	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
049G	29	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
055G	36	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
059G	40	1	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYQ</i> A	ND
061G	37	1	0	<i>LYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
063G	35	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
067G	20	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
069G	31	1	1	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
071G	30	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
073G	23	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> D	ND
075G	21	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
079G	41	0	0	<i>LYP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
081G	42	1	0	<i>LYQ</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
085G	44	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
087G	26	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
089G	38	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
091G	52	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
091G	52	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
095G	30	1	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> A	ND
097G	27	1	0	<i>HYP</i> D/ <i>LYQ</i> A	ND
101G	19	0	0	<i>LYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
103G	33	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
107G	57	1	0	<i>HYP</i> D/ <i>LYP</i> B	ND
111G	41	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
113G	54	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
113G	54	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
113G	54	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
115G	46	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
115G	46	0	0	<i>LXP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
117G	47	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LXP</i> A	ND
121G	56	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
125G	27	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
127G	41	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	ND
129G	36	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
131G	60	0	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYP</i> B	ND
131G	60	0	0	<i>LYP</i> B/ <i>LYP</i> B	ND
137G	43	0	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYP</i> B	ND
139G	53	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>LYQ</i> A	ND
145G	39	1	0	<i>HYP</i> A/ <i>HYP</i> A	ND

Código	Idade	Sexo	Etnia	Genótipo <i>MBL2</i>	MBL (ng/ul)
147G	32	1	0	<i>HYP A/LXP A</i>	ND
149G	32	1	0	<i>HYP A/HYP A</i>	ND
151G	39	1	0	<i>LXP A/LYQ A</i>	ND
153G	53	1	0	<i>HYP A/LYQ A</i>	ND
155G	32	1	0	<i>LXP A/LYQ A</i>	ND
017G	32	0	0	<i>HYP A/HYP A</i>	ND
187G	51	1	0	<i>HYP A/LYP A</i>	ND
189G	43	0	0	<i>LYP B/LYP B</i>	ND
191G	25	0	0	<i>HYP A/LYP B</i>	ND
195G	45	1	1	<i>HYP A/HYP A</i>	ND
199G	38	0	0	<i>HYP A/LYP B</i>	ND
233Gm	25	0	0	<i>LXP A/LYQ A</i>	ND
294/311	53	0	0	<i>LYP A/LYQ A</i>	ND
319C	52	0	0	<i>LYQ A/LYQ A</i>	ND
319/311	53	0	0	<i>LYQ A/LYQ A</i>	ND
D127	56	0	1	<i>LXP A/LXP A</i>	ND
D129	35	0	1	<i>LYQ A/LYQ A</i>	ND
D141	56	0	1	<i>HYP A/HYP A</i>	ND
D157	61	1	0	<i>HYP A/LYP B</i>	ND
D160	36	0	1	<i>LXP A/LYP A</i>	ND
D170	62	1	0	<i>HYP A/LXP A</i>	ND
D179	55	1	0	<i>HYP A/LYP B</i>	ND
D185	56	1	0	<i>LXP A/LYQ A</i>	ND
D193	58	1	0	<i>LYP B/LYP B</i>	ND
D201	63	1	0	<i>LYQ A/LYQ A</i>	ND
D202	61	1	0	<i>HYP A/LYQ A</i>	ND
D213	63	1	0	<i>HYP A/LYQ A</i>	ND
D214	57	1	0	<i>HYP A/LXP A</i>	ND
D249	55	1	0	<i>LXP A/LYP B</i>	ND
D270	57	1	0	<i>HYP A/LYQ A</i>	ND

APÊNDICE 4 – PLANILHA DE DADOS DOS CONTROLES PARA FCN2

Código	Sexo	Idade	Etnia	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
001 MIN	0	34	0	AG	GG	AG	ND
002 PRL	0	23	0	AG	AG	AA	ND
003 EAO	0	39	0	AA	GG	AG	ND
005 AWB	0	30	0	AG	GG	AA	ND
006 ARA	1	37	0	AA	AG	AG	ND
008 GML	0	23	0	AG	AG	AA	ND
009 GRT	1	22	0	GG	GG	AA	ND
010 JLP	0	21	0	AG	GG	AG	ND
011 KSP	0	20	0	GG	GG	AA	ND
014 MSS	0	54	0	AA	AA	AA	ND
015 MNL	0	25	0	AG	AG	AA	ND
016 MRT	0	46	0	GG	GG	AA	ND
017 RPO	1	24	0	GG	GG	AA	ND
019 NAC	0	32	1	AG	AG	AA	ND
020 SRV	0	28	1	GG	GG	AA	ND
023 IMR	0	47	0	GG	GG	AA	ND
024 RJJ	0	19	0	AG	GG	AA	ND
025 PMM	0	22	0	AG	GG	AG	ND
029 NMP	1	22	0	AG	GG	AG	ND
031 NTT	0	23	0	AG	GG	AA	ND
032 APC	0	21	0	AG	GG	AA	ND
034 DDD	0	30	0	AG	GG	AG	ND
036 WBO	1	22	0	AG	AG	AA	ND
037 VSG	0	45	0	AG	AG	AA	ND
038 LMA	1	25	0	GG	GG	AA	ND
039 MBC	1	24	1	GG	GG	AA	ND
040 MEM	0	22	0	AG	GG	GG	ND
041 CCM	1	21	0	AA	AG	AG	ND
042 LSF	1	28	0	AA	GG	GG	ND
043 MBX	0	50	0	AG	GG	AG	ND
044 FCO	1	20	0	AA	AA	AA	ND
046 NGM	0	19	0	AG	GG	AA	ND
047 WPB	0	26	0	AG	GG	AG	ND
048 MPO	0	48	1	AG	GG	AG	ND
049 EGS	1	38	1	AG	AG	AA	ND
051 LAS	1	55	1	AA	GG	AG	ND
052 VLS	0	45	0	AG	GG	AG	ND
053 JCL	1	35	0	AG	GG	AG	ND
054 JVP	0	39	0	AG	GG	AG	ND
057 CBF	1	54	0	AG	GG	AA	ND
058 MBO	0	21	0	AG	GG	AA	ND

Código	Sexo	Idade	Etnia	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
060 LNN	1	23	0	GG	GG	AA	ND
067 GTT	1	43	0	AA	AA	AA	ND
073 MAM	1	37	0	AG	AG	AA	ND
075 MAS	0	40	0	AG	GG	AG	ND
076 MDS	0	33	0	AG	AG	AA	ND
078 MMS	0	32	1	AA	AA	AA	ND
080 MGA	0	26	0	AG	GG	AG	ND
081 BCB	1	23	0	AA	AA	AA	ND
082 CTS	0	20	0	AA	GG	AG	ND
083 VPG	0	25	0	AA	GG	GG	ND
084 GRR	1	61	0	AG	AG	AA	ND
085 CFR	0	60	0	AG	AG	AA	ND
086 APR	0	31	0	AG	AG	AA	ND
087CG	0	22	0	AA	AG	AG	ND
088IGS	0	25	0	AA	AA	AA	ND
128 DVF	0	49	0	AA	GG	AG	ND
132 MHH	0	69	0	AG	AG	AA	ND
134 TKK	0	53	0	AG	AG	AA	ND
135 TOO	0	64	0	AG	GG	AG	ND
137 JFF	0	71	0	AG	GG	AA	ND
BS001	1	45	0	AA	AA	AA	ND
BS002	0	34	0	AG	GG	AG	ND
BS003	0	36	1	AG	GG	AG	ND
BS004	1	30	0	AG	AG	AA	ND
BS005	0	22	0	GG	GG	AA	ND
BS006	0	46	0	GG	GG	AA	ND
BS007	1	34	0	AA	GG	GG	ND
BS008	1	41	0	GG	GG	AA	ND
BS009	0	41	0	GG	GG	AA	ND
BS010	1	38	0	AA	AG	AG	ND
BS011	1	55	0	GG	GG	AA	ND
BS012	0	27	1	AG	GG	AA	ND
BS013	1	45	0	AG	GG	AG	ND
BS014	1	39	0	GG	GG	AA	ND
BS015	0	35	1	GG	GG	AA	ND
BS016	1	46	0	GG	GG	AA	ND
BS017	0	19	0	GG	GG	AA	ND
BS018	1	37	0	AA	GG	AG	ND
BS019	0	31	0	AG	GG	AG	ND
BS020	1	51	0	AG	AG	AA	ND
BS021	0	20	0	AA	AG	AA	ND
BS022	1	55	0	AG	AG	AA	ND
BS025	0	54	0	GG	GG	AA	ND
BS026	0	28	1	AG	AG	AA	ND

Código	Sexo	Idade	Etnia	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
BS027	1	55	0	GG	GG	AA	ND
BS028	1	50	0	AG	GG	AG	ND
BS029	0	52	1	GG	GG	AA	ND
BS031	0	52	0	AG	GG	AG	ND
BS034	1	38	0	AG	AG	AA	ND
BS035	0	43	0	AG	AG	AA	ND
BS036	1	46	2	GG	GG	AA	ND
BS038	1	57	0	ND	ND	ND	ND
BS041	1	36	1	AA	GG	GG	ND
BS042	1	53	1	AA	AG	AG	ND
BS046	0	53	0	AG	AG	AG	ND
BS047	1	34	1	GG	GG	AA	ND
BS048	1	35	0	AA	AG	AG	ND
BS049	1	38	0	GG	GG	AA	ND
BS052	0	46	0	GG	GG	AA	ND
BS053	1	49	0	AG	GG	GG	ND
BS054	1	53	1	ND	ND	ND	ND
BS057	1	51	0	AG	GG	ND	ND
BS059	1	32	3	GG	GG	AG	ND
BS060	0	51	0	AG	GG	AG	ND
BS061	0	46	0	AG	GG	AG	ND
BS062	1	40	0	AG	AG	AA	ND
BS063	1	49	0	AG	AG	AA	ND
BS064	1	53	0	AA	AG	AG	ND
BS065	0	51	0	ND	ND	ND	ND
BS066	0	43	3	AG	GG	AG	ND
BS067	1	48	0	AA	GG	GG	ND
BS068	0	37	0	AG	AG	AA	ND
BS069	1	42	1	AG	GG	AG	ND
BS070	1	37	1	GG	GG	AA	ND
BS072	1	44	1	GG	GG	AA	ND
BS075	0	45	3	GG	GG	AA	ND
BS076	1	57	0	GG	GG	AA	ND
BS078	0	61	0	AG	GG	GG	ND
BS079	1	38	1	GG	GG	AA	ND
BS080	0	46	3	AG	GG	AG	ND
BS081	1	43	3	AG	AG	AA	ND
BS082	0	46	0	AA	GG	GG	ND
BS083	0	42	0	GG	GG	AA	ND
BS084	0	33	0	AG	AG	AA	ND
BS085	1	52	0	GG	GG	AA	ND
BS086	1	37	0	GG	GG	AA	ND
BS088	0	36	1	AG	AG	AA	ND
BS090	1	43	0	AG	GG	AG	ND

Código	Sexo	Idade	Etnia	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
BS091	0	56	0	ND	ND	ND	ND
BS092	1	61	0	GG	GG	AA	ND
BS094	1	37	0	GG	GG	AA	ND
BS095	SI	SI	SI	ND	ND	ND	ND
BS096	0	49	0	GG	GG	AA	ND
BS097	1	41	1	AG	GG	AG	ND
BS098	1	29	0	AG	GG	AA	ND
BS099	1	50	0	AG	GG	GG	ND
BS100	1	37	0	AG	GG	AG	ND
BS102	1	47	0	GG	GG	AA	ND
BS104	0	56	0	AA	AG	AG	ND
BS105	0	38	0	AA	GG	GG	ND
BS106	1	35	0	AA	GG	GG	ND
BS111	1	40	0	AG	GG	AG	ND
BS113	1	54	0	AG	GG	AG	ND
BS114	1	55	0	GG	GG	AA	ND
BS116	1	36	0	AG	GG	AG	ND
BS119	1	37	1	AG	AG	AA	ND
BS120	1	45	0	GG	GG	AA	ND
BS121	0	52	1	AA	AG	AG	ND
BS122	1	46	0	AA	AG	AG	ND
BS124	0	35	0	AA	AG	AG	ND
BS125	1	54	0	AA	AG	AG	ND
BS126	1	40	0	AA	GG	AA	ND
BS127	1	42	0	AG	AG	AA	ND
BS129	0	39	0	AG	GG	AA	ND
BS130	1	35	0	AG	GG	AG	ND
BS133	1	33	0	GG	GG	AG	ND
BS134	0	52	0	GG	GG	AA	ND
BS135	1	42	0	AA	AG	AG	ND
BS136	1	43	1	AA	GG	AG	ND
BS140	0	33	1	AA	GG	GG	ND
BS141	1	50	0	AG	AG	AA	ND
BS142	0	47	0	AG	GG	AG	ND
BS145	0	32	0	AG	GG	AG	ND
BS147	0	35	0	AA	AG	AG	ND
BS151	0	39	0	GG	GG	AA	ND
BS156	1	30	0	AG	GG	AA	ND
BS157	1	34	0	AG	AG	AA	ND
BS175	0	48	0	ND	ND	ND	ND
BS177	0	55	0	ND	ND	ND	ND
BS182	0	57	0	ND	ND	ND	ND
BS210	0	50	0	ND	ND	ND	ND
BS212	0	52	0	ND	ND	ND	ND

Código	Sexo	Idade	Etnia	FCN2 (-986)	FCN2 (-602)	FCN2 (-4)	FCN2 (+6424)
BS221	0	49	1	ND	ND	ND	ND
BS226	1	57	0	ND	ND	ND	ND
BS244	1	56	0	ND	ND	ND	ND
D023	0	59	0	ND	ND	ND	ND
D061	0	64	0	AG	GG	AA	ND
D062	0	35	0	AG	GG	AA	GG
D062	0	35	0	AG	GG	AA	GG
D066	1	38	0	AG	AG	AA	GT
D067	1	24	0	AG	GG	AA	GG
D078	1	21	0	AG	GG	AG	GG
D079	0	50	0	AA	GG	GG	GG
D081	1	26	0	AG	GG	AG	GG
D082	1	18	0	AA	GG	AG	GG
D123	1	28	0	AG	AG	AA	GG
D126	1	29	0	AA	AA	AA	GG
D127	0	56	1	AG	GG	AG	GG
D130	1	35	0	AG	AG	AG	ND
D131	1	24	0	AG	AG	AG	ND
D135	1	40	0	GG	GG	AG	ND
D142	1	28	0	AA	AG	AG	ND
D143	1	33	0	AA	GG	GG	ND
D144	1	28	0	GG	GG	AA	GG
D145	1	45	0	AG	GG	AG	ND
D146	1	35	0	AA	GG	GG	ND
D147	1	47	0	GG	GG	AA	ND
D148	1	26	1	AA	AA	AA	ND
D150	1	32	1	AG	AG	AA	ND
D152	1	44	0	GG	GG	AA	ND
D153	1	33	1	AG	AG	AA	ND
D157	1	61	0	AA	AG	AG	ND
D162	1	21	0	AG	GG	AG	ND
D163	1	40	0	AG	AG	AA	GG
D171	1	41	0	AG	AG	AA	ND
D172	1	40	0	GG	GG	AA	ND
D173	1	49	0	AG	GG	AG	ND
D176	1	44	0	AG	AG	AA	ND
D179	1	55	0	GG	GG	AA	ND
D180	1	SI	0	GG	GG	AA	GG
D185	1	56	0	GG	GG	AA	ND
D187	1	39	0	GG	GG	AA	ND
D189	1	42	0	AG	GG	AA	ND

ANEXOS

ANEXO 1	-	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS (CEP/HC-UFPR)	119
ANEXO 2	-	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	120

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS (CEP/HC-UFPR)



CEP/HC/UFPR



10 Anos

Curitiba, 02 de agosto de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Iara José de Messias Reason
Paola Rosa Luz
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INATA NA DOENÇA DE CHAGAS" foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2007. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções 196/96 CNS, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0133.0.208.000-07
REGISTRO CEP/HC: 1457.122/2007-06

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 02 de abril de 2008.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Renato Tambara Filho'.

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Por você ser portador da Doença de Chagas está sendo convidado a participar de um estudo intitulado "Investigação de Marcadores da Resposta Imune Inata na Doença de Chagas". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa é investigar os níveis individuais de produção de uma proteína, chamada MBL, que participa do sistema de defesa do corpo contra infecções e sua relação com a evolução da Doença de Chagas.

c) Caso você participe da pesquisa, será utilizada apenas uma parte do sangue que você irá coletar para realizar a quantificação de MBL.

d) Os riscos que envolvem sua participação no estudo estão relacionados apenas com a coleta de sangue. Como em qualquer exame, você poderá experimentar alguns desconfortos relacionados à coleta, os quais podem ser: dor no local da punção ou hematoma.

e) Contudo, participando deste estudo, você estará contribuindo para o melhor conhecimento do sistema de defesa do corpo contra a Doença de Chagas, o que pode auxiliar tanto na prevenção, quanto no tratamento da doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes chagásicos.

f) A bióloga Paola Rosa Luz CRBio-PR 41479-07D, (sob a orientação da Dra. Iara Messias), telefone 41 3019-8093 ou 41 8416-7764, responsável por este estudo, estará sempre a sua disposição para quaisquer dúvidas ou esclarecimentos.

g) Está garantido o direito a todas as informações que você deseja, antes, durante e após o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar-se a participar do estudo e a retirar seu consentimento a qualquer momento, mesmo já tendo aceitado participar. Sua desistência não implicará na interrupção do atendimento, que está assegurado.

i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

j) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são da responsabilidade do paciente.

l) Sua participação no estudo é voluntária, de forma que você não receberá qualquer valor em dinheiro.

m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo. _____

Assinatura do paciente

Pesquisadora: Paola Rosa Luz

Curitiba, ___ / ___ / ___.