

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI

SISTEMA COMPLEMENTO E ADIPOCINAS NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA



CURITIBA

2017

KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI

SISTEMA COMPLEMENTO E ADIPOCINAS NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Medicina, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Iara T. de Messias-Reason

Co-orientadora: Dra. Marcia Holsbach Beltrame

CURITIBA

2017

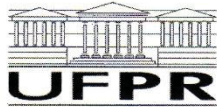
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELA AUTORA

L712 Lidani, Kárita Cláudia Freitas
Sistema complemento e adipocinas na doença de chagas crônica.
/ Kárita Cláudia Freitas Lidani. – Curitiba, 2017.
167 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara T. de Messias-Reason
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Holsbach Beltrame
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do
Paraná.

1. Doença de Chagas. 2. Ativação do complemento. 3. Adipocinas.
I. Messias-Reason, Iara T. de. II. Beltrame, Marcia Holsbach.
III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WC 705



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **KARITA CLAUDIA FREITAS LIDANI** intitulada: **SISTEMA COMPLEMENTO E ADIPOCINAS NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Outubro de 2017.

IARA JOSE DE MESSIAS REASON
Presidente da Banca Examinadora

LORENA BAVIA
Avaliador Externo

ALEXANDRE ALESSI
Avaliador Externo

RAFAEL LUIS KESSLER
Avaliador Externo

LETUSA ALBRECHT
Avaliador Externo

Dedico esse trabalho aos milhões de pacientes com Doença de Chagas pelo mundo, com o desejo de que um dia essa enfermidade seja entendida em sua complexidade biológica, clínica e terapêutica, para que os pacientes tenham qualidade de vida, e a esperança por dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos àqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, seja no âmbito acadêmico-profissional ou pessoal, e que certamente somaram para a construção de uma grande conquista. Agradeço primeiramente à Deus por me trazer serenidade e sabedoria nos momentos mais difíceis, e por me fazer entender diariamente que a vida é o nosso bem mais precioso e que tudo é possível quando se tem fé.

Certamente, nada disso seria possível sem a orientação da Prof. Dra. Iara Messias-Reason, que é muito mais que uma brilhante pesquisadora e orientadora, mas um exemplo de vida. Todo o meu carinho, respeito e admiração pela contribuição que teve na não somente na minha formação acadêmica, sempre me incentivando e mostrando que somos capazes de sermos melhores a cada dia. A sua paciência e amorosidade tornaram esse doutorado uma tarefa menos árdua e me ajudaram a seguir nos momentos difíceis. Muito obrigada Profe!

À minha co-orientadora Dra. Marcia Holsbach Beltrame pela preciosa amizade e por todo apoio para com o meu projeto, sempre com a preocupação de me proporcionar um pensamento científico crítico e embasado. Muito obrigada Co!

Aos profissionais do Ambulatório de Chagas do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo cuidado que tem com os pacientes, que são o motivo desse estudo.

Às amigas Fabiana Antunes Andrade e Thaisa Lucas Sandri, que compartilharam comigo muitas análises de dados e discussões acerca dos resultados, sempre disponíveis, amáveis e participativas, mesmo quando a minha pressa superava minha ansiedade para testar uma hipótese. Obrigada pela parceria!

Ao Prof. Dr. Renato Nisihara, do Laboratório de Imunopatologia Molecular (LIPM) do Hospital de Clínicas pelo auxílio nas dosagens das proteínas e pelas discussões sobre os resultados do meu trabalho.

Aos estudantes e funcionários do LIPM pelo suporte e amizade. Agradeço à Sandra Catarino por ser muito mais que a nossa *Lab Manager*, obrigada pelo seu carinho e amizade. Agradeço à amiga Vanessa Picceli por toda a ajuda com as coletas das amostras e suporte com os experimentos, sempre disposta e com um sorriso no rosto. Também agradeço à Paola Rosa Luz, que iniciou os estudos com Doença de Chagas no LIPM e fez um lindo trabalho, o que tornou possível a utilização de amostras e a continuidade dessa linha de pesquisa. Aos amigos Lorena Bavia e Altair

Ambrósio: muito obrigada pela parceria e amizade, além da brilhante colaboração em um artigo que nos fez viver intensamente os mecanismos de evasão do parasito e permitiu uma excelente convivência. Agradeço à querida amiga Regina Tizzot por seus conselhos, apoio e carinho de sempre.

Ao Dr. Robert Gilman, da *Johns Hopkins University*, por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa durante o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da CAPES. Posso dizer que foram meses de intenso aprendizado e que gerou resultados muito relevantes para o estudo da Doença de Chagas, e me permitiu ter contato com um centro de excelência em pesquisa e medicina. Agradeço também os pesquisadores do grupo pelo conhecimento e amizade compartilhados, especialmente Indira Chakravarti, Mónica Miranda, Yagahira Castro, Zahra Omidiam, e Dr. Ricardo Castillo-Neyra.

À grande amiga e pesquisadora Dra. Alessia Ranciaro, por ser essa pessoa tão generosa e competente, e que tive o prazer de conviver na *University of Pennsylvania* (UPenn), onde fiz a parte genética dos experimentos juntamente com a Dra. Marcia Beltrame. Grazie mille!

Aos meus pais, Cláudio e Terezinha; e minha irmã Carol, agradeço por estarem sempre ao meu lado, com palavras de carinho e afeto independente da situação. Gostaria de um dia poder retribuir todo o bem que me fazem; e todo o orgulho que sinto pela nossa família.

Ao meu amor Rafael, pelo carinho, compreensão e paciência. Agradeço por você ser um companheiro para todas as horas e me oferecer o suporte necessário para que eu possa alcançar meus objetivos. A minha admiração por você é do tamanho do meu amor, o qual não conseguiria mensurar.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes

Isaac Newton

A persistência é o menor caminho do êxito

Charles Chaplin

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Trypanosoma cruzi* que acomete aproximadamente cerca de 5 milhões de pessoas na América Latina. Embora a maioria dos infectados permaneça assintomática na forma indeterminada ao longo da vida, 30-40% dos pacientes podem desenvolver cardiopatia chagásica crônica (CCC). A relação de mediadores do sistema imune com o tecido adiposo tem sido reconhecida como fundamental para o entendimento do processo inflamatório em doenças cardíacas, o que torna a Pentraxina (PTX3), o Fator H (FH) e a ficolina-3 do complemento; e as adipocinas (leptina e adiponectina) potenciais marcadores de risco cardiovascular na DC crônica. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou investigar a associação entre concentrações séricas de PTX3, ficolina-3, leptina e adiponectina; e plasmáticas de FH com as formas clínicas da DC e controles, com avaliação do risco cardiovascular (RCV) a partir do Score de Framingham. Foram incluídos no estudo até 178 pacientes com DC crônica, com avaliação de prontuários para obtenção de parâmetros inflamatórios e cardiometabólicos, além de dados de eletrocardiograma e ecocardiograma; e até 208 controles. Os resultados demonstraram RCV aumentado para os pacientes com DC crônica quando comparados aos controles; assim como para a forma indeterminada quando comparada aos controles. Não foi observada diferença significativa para o RCV entre a forma indeterminada e a cardíaca, porém houve correlação positiva com a fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE). As concentrações de leptina e adiponectina apresentaram-se menores nos pacientes que nos controles, sem correlação entre as concentrações de leptina e adiponectina. Além disso, PTX3 e FH foram associados à parâmetros cardiometabólicos dos pacientes. A concentração sérica de ficolina-3 se mostrou reduzida na insuficiência cardíaca chagásica, com correlação positiva com a FEVE. Os resultados sugerem que a ativação do complemento pode ser um elo entre doença inflamatória e desordens metabólicas, com importante papel imunoregulatório da PTX3, FH, ficolina-3, leptina e adiponectina na DC crônica.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Ativação do complemento. Adipocinas.

ABSTRACT

Chagas disease (DC) is a chronic infectious disease caused by *Trypanosoma cruzi* that affects approximately 5 million people in Latin America. Although most infected individuals remain asymptomatic with the indeterminate form of disease throughout life, 30-40% of them may develop chronic chagasic cardiomyopathy (CCC). The interplay of the immune system with adipose tissue has been recognized as crucial for understanding the inflammatory process in cardiac diseases, being components of complement [Pentraxin (PTX3), H-Factor (FH) and ficolin-3] and adipokines (leptin and adiponectin) potential cardiovascular risk markers in CCC. The present study aimed to investigate the association between serum levels of PTX3, ficolin-3, leptin and adiponectin and plasma levels of FH with the clinical forms of CD and controls, using Framingham risk score to evaluate cardiovascular risk assessment in up to 178 patients with chronic CD and 208 controls. The clinic-laboratorial evaluation included inflammatory and cardiometabolic parameters, as well as data of electrocardiogram and echocardiogram from patients. The results demonstrated increased cardiovascular risk for patients with chronic CD when compared to controls; as well as for the indeterminate form when compared to controls. No significant difference was observed for the cardiovascular risk between the indeterminate and the CCC, but there was a positive correlation with the left ventricular ejection fraction (LVEF). Leptin and adiponectin levels were lower in patients than in the controls, with no correlation between leptin and adiponectin concentrations. In addition, PTX3 and FH were associated with cardiometabolic parameters of patients. Serum concentrations of ficolin-3 were reduced in patients with heart failure, with a positive correlation with LVEF. These results suggest that complement activation may be a link between inflammatory disease and metabolic disorders, with an important immunoregulatory role of PTX3, FH, ficolin-3, leptin and adiponectin in chronic CD.

Key-words: Chagas disease. Complement activation. Adipokines.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARLOS CHAGAS NO SEU LABORATÓRIO EM MANGUINHOS, NA FIOCRUZ.....	24
FIGURA 2 – CASA ONDE CARLOS CHAGAS NASCEU, EM OLIVEIRA (MG).	25
FIGURA 3 – BERENICE: PRIMEIRA PACIENTE COM DOENÇA DE CHAGAS.	25
FIGURA 4 – LINHA DO TEMPO MOSTRANDO OS PRIMEIROS CASOS HUMANOS DA DOENÇA DE CHAGAS (DC) NA AMÉRICA LATINA.	27
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FORMAS DE <i>T. cruzi</i>	29
FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS DE RELEVÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.	30
FIGURA 7 – CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i>	32
FIGURA 8 – INICIATIVAS PARA CONTROLE DOS PRINCIPAIS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS.	33
FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO NÚMERO DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS E SITUAÇÃO DA TRANSMISSÃO VETORIAL, DE 2006 A 2009.	36
FIGURA 10 – CURSO NATURAL DE INFECÇÃO HUMANA PELO <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
FIGURA 11 – RESPOSTA CELULAR E HUMORAL DA IMUNIDADE INATA. ...	45
FIGURA 12 – PRINCIPAIS COMPONENTES DO COMPLEMENTO E SUAS FUNÇÕES EFETORAS.	46
FIGURA 13 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO NA PRESENÇA DE PATÓGENO.....	49
FIGURA 14 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC) E FUNÇÕES DE CADA COMPONENTE	51
FIGURA 15 – <i>Trypanosoma cruzi</i> E SUAS ESTRATÉGIAS PARA EVASÃO DO COMPLEMENTO.....	54
FIGURA 16 – ESTRUTURA DE CRP, SAP E PTX3, COM AS CÉLULAS QUE AS SECRETAM.	56

FIGURA 17 – FH, SEUS LIGANTES E FUNÇÕES NO SISTEMA COMPLEMENTO.....	61
FIGURA 18 – ESTRUTURA DAS FICOLINAS E MBL.....	63
FIGURA 19 – ATUAÇÃO DA LEPTINA NA RESPOSTA IMUNE INATA.	68
FIGURA 20 – AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADIPONECTINA EM MACRÓFAGOS, CÉLULAS ENDOTELIAIS, CARDIOMIÓCITOS E FIBROBLASTOS.	70
FIGURA 21 – RESULTADOS DO TRABALHO APRESENTADOS DE FORMA COMBINADA.....	130

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-3 NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E CONTROLES.....	119
GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-3 EM PACIENTES COM A FORMA CLÍNICA CARDÍACA COM OU SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.	120
GRÁFICO 3 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-3 E FEVE EM PACIENTES COM DC NAS FORMAS CLÍNICAS INDETERMINADA E CARDÍACA.....	120
GRÁFICO 4 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E CONTROLES.	123
GRÁFICO 5 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ADIPONECTINA NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E CONTROLES.....	127
GRÁFICO 6 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LEPTINA E ADIPONECTINA, CONSIDERANDO O GRUPO CONTROLE.....	128

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESTADIAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DA <i>AMERICAN HEART ASSOCIATION</i> , ADAPTADO PARA DC.....	74
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	PROJEÇÕES DAS ESTIMATIVAS DE PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR <i>T.cruzi</i> E DA DOENÇA DE CHAGAS NA FASE CRÔNICA COM A FORMA CARDÍACA E COM A FORMA DIGESTIVA NO BRASIL, NO PERÍODO DE 2000 A 2055.....	35
TABELA 2 –	DADOS A PARTIR DA ESTIMATIVA DEMOGRÁFICA E EPIDEMIOLÓGICA DE 2010.....	42
TABELA 3 –	DADOS DEMOGRÁFICOS DE ACORDO COM AS FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.....	73
TABELA 4 –	DETERMINAÇÃO DO SCORE DE FRAMINGHAM PARA ESTRATIFICAR O RISCO CARDIOVASCULAR.....	76
TABELA 5 –	CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA E ADIPONECTINA EM CONTROLE E PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA- *American Heart Association*

BENEFIT- *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*

C1-INH- Inibidor da C1 esterase

C4BP- proteína de ligação a C4b

CCC- cardiomiopatia chagásica crônica

CCPs- *complement-control-protein*

CFHL1- Complement factor H like 1 gene

CFHR- Complement factor H related protein

CL-K1- coletina 11

CR1-receptor do complemento 1

CRP- proteína C reativa

CT- colesterol total

DAF ou CD55- fator de aceleração do decaimento

DC- Doença de Chagas

DMRI- degeneração macular relacionada à idade

ECG- eletrocardiograma

ECO- ecocardiograma

ELISA- ensaio de imunoadsorção ligado à enzima

FB- fator B

FD- fator D

FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo

FH- Fator H

FI- Fator I

GalNAc- N-acetilgalactosamina

GlcNAc- N-acetil-D-glucosamina

Gp160/TcCRP- *T. cruzi* complement regulatory protein

HAS- hipertensão arterial sistêmica

HDL-C- lipoproteína de alta densidade

HE- Hemaglutinação

IC- insuficiência cardíaca

ICAM-1- molécula de adesão intercelular-1

IFI- Imunofluorescência Indireta

IFN- γ - interferon- γ
IL-1- interleucina-1
IL-10- interleucina-10 (IL-10)
IL-6- interleucina-6
IMC- índice de massa corpórea
LDL-C- lipoproteína de baixa densidade
MAC- complexo de ataque de membrana
MASPs- serino-proteases associadas à MBL
MBL- lectina ligante de manose
MCP-1- proteína quimiotática de monócitos 1
mCRP- Proteína C reativa forma monomérica
MMP-12- metaloproteinases 12 da matriz
OMS- Organização Mundial de Saúde
OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde
PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos
PCR- reação em cadeia da polimerase
PRMs- moléculas de reconhecimento padrões
PTX3- Pentraxina 3
SAP ou PTX2- componente amilóide P
SCRs- *short consensus repeats*
TcCRIT- *Trypanosoma cruzi* complement C2 receptor inhibitor trispanning
TcCRT- *Trypanosoma cruzi* calreticulin
T-DAF- Trypomastigote decay-accelerating factor
TG- triglicerídeos
TNF- α - fator de necrose tumoral
uCRP- proteína C reativa ultrassensível
VA- Via alternativa
VCAM-1- Molécula de adesão celular-vascular-1
VC- Via clássica
VL- Via das lectinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	JUSTIFICATIVA.....	22
1.2	OBJETIVOS	22
1.2.1	Objetivo Principal.....	22
1.2.2	Objetivos Secundários.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	DOENÇA DE CHAGAS	24
2.1.1	Histórico.....	24
2.1.2	Agente etiológico e vetor	28
2.1.3	Ciclo de vida do T. cruzi	30
2.1.4	Transmissão	33
2.1.5	Epidemiologia	34
2.1.6	Sintomatologia e formas clínicas	36
2.1.7	Diagnóstico e Tratamento.....	42
2.1.8	Comorbidades associadas à DC	44
2.2	RESPOSTA IMUNE E O SISTEMA COMPLEMENTO.....	45
2.2.1	Vias de ativação	47
2.3	O SISTEMA COMPLEMENTO NA DOENÇA DE CHAGAS.....	52
2.3.1	Pentraxina 3	55
2.3.1.1	Estrutura e funções.....	55
2.3.1.2	Pentraxina 3 e doenças	57
2.3.2	Fator H.....	58
2.3.2.1	Estrutura e funções.....	58
2.3.2.2	Fator H e doenças	62
2.3.3	Ficolina 3	62
2.3.3.1	Estrutura e funções.....	62
2.3.3.2	Ficolina-3 e doenças.....	64
2.4	INFLAMAÇÃO E TECIDO ADIPOSEO	64
2.4.1	Sistema complemento e o tecido adiposo	65
2.4.2	T. cruzi e o tecido adiposo.....	65
2.5	ADIPOCINAS	67
2.5.1	Leptina.....	67

2.5.1.1	Estrutura e funções.....	67
2.5.1.2	Leptina e doenças	68
2.5.2	Adiponectina.....	69
2.5.2.1	Estrutura e funções.....	69
2.5.2.2	Adiponectina e doenças	70
3	MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1	APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	72
3.2	CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA.....	72
3.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA.....	72
3.3.1	Pacientes.....	72
3.3.2	Grupo Controle	75
3.4	METODOLOGIA.....	75
3.4.1	Determinação do Score de Framingham	75
3.4.2	Coleta de sangue.....	76
3.4.3	Quantificação de PTX3, ficolina-3, FH, leptina e adiponectina	77
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1	RESULTADOS EM FORMATO DE ARTIGO	79
4.2	DEMAIS RESULTADOS.....	119
4.2.1	Ficolina-3	119
4.2.2	Leptina.....	122
4.2.3	Adiponectina.....	126
5	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS.....	132
	APÊNDICE 1- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>FRONTIERS IN</i>	
	<i>MICROBIOLOGY</i>.....	155

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC), uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, após mais um século da sua descoberta continua sendo um dos principais problemas de saúde pública para a maioria dos países da América Latina, afetando cerca de 5 milhões de pessoas (PAHO, 2016; SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006) e causando aproximadamente 50.000 mortes por ano, sendo que outras 65-100 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para infecção (ENGELS; SAVIOLI, 2006; WHO, 2012). Nas últimas décadas a DC tem representado uma preocupação também para locais como Canadá, EUA, Europa, Austrália e Japão devido às constantes migrações de indivíduos provenientes de áreas endêmicas (PAHO, 2016), casos nos quais a transmissão ocorre principalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou congênita. A infecção apresenta duas fases sucessivas. A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia, geralmente assintomática ou oligossintomática com febre, anorexia e taquicardia (PRATA, 2001), sendo que essas manifestações desaparecem espontaneamente em 90% dos casos, e destes, possivelmente 60-70% nunca desenvolverão sinais ou sintomas atribuíveis à DC, representando a forma indeterminada da doença. O restante (30-40%) dos pacientes possivelmente evoluirá para a fase crônica da doença, com comprometimento neurológico, cardíaco, digestivo (megacólon ou megaesôfago) ou cardiodigestivo (VAGO et al., 2000). A cardiopatia chagásica constitui a mais séria complicação, atingindo um terço dos indivíduos com sorologia positiva (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999), e em casos graves o único tratamento é o transplante de coração. A DC crônica é uma doença incapacitante responsável pela mais expressiva morbimortalidade entre as doenças parasitárias (BONNEY, 2014), levando a um gasto global de \$627,5 milhões por ano (LEE et al., 2013). Estima-se um custo médio de 200 dólares por paciente nas fases iniciais da doença, porém na fase sintomática crônica esse valor pode alcançar 4 a 6 mil dólares (ABUHAB et al., 2013). Apesar dos esforços direcionados para o entendimento do tropismo parasitário para determinados tecidos (como o cardíaco), ainda não se tem uma explicação sobre quais processos estão envolvidos com a progressão clínica da forma indeterminada para as formas crônicas sintomáticas.

O sistema complemento, um componente chave da resposta inata, tem sido apontado como elemento fundamental na primeira linha de defesa durante a interação

parasito-hospedeiro, onde a atuação de seus componentes pode ser crucial para a fisiopatologia da DC. O complemento é composto por mais de 35 proteínas solúveis e de membrana com importante papel na fagocitose e opsonização de invasores, inflamação, lise celular, remoção de complexos imunes e células apoptóticas, sendo um importante elo entre a resposta imune inata e adaptativa (THIEL, 2007). Sua ativação se dá a partir de três diferentes vias: clássica (VC), das lectinas (VL) e alternativa (VA), resultando em uma complexa cascata proteolítica que converge para a formação do complexo de ataque de membrana (MAC, C5b-9) que se insere na membrana celular, conduzindo à lise dos alvos. Nesse contexto, os componentes do complemento como: a Pentraxina 3 (PTX3), o Fator H (FH) e a Ficolina-3 podem modular a resposta imune diante da infecção pelo *T. cruzi* e serem potenciais candidatos a marcadores moleculares de acometimento clínico da DC.

A PTX3 é uma molécula multifuncional considerada o protótipo das pentraxinas longas e secretada em locais inflamatórios por várias células, tais como monócitos/macrófagos e células endoteliais (YIP et al., 2005). A PTX3 tem sido evidenciada como um potencial marcador inflamatório em diversos eventos clínicos, como doenças cardiovasculares, reumáticas e infecciosas (BONACINA et al., 2013; HUANG et al., 2016; ZHOU et al., 2013b). A PTX3 pode contribuir tanto para a prevenção quanto para a injúria tecidual, dependendo das moléculas com as quais interage, como o FH (DEBAN et al., 2008) ou mediando a ativação da VC/VL do complemento (INFORZATO et al., 2006), respectivamente (MAGRINI; MANTOVANI; GARLANDA, 2016). O FH é uma proteína reguladora com papel essencial no controle da ativação da VA do complemento, produzida por hepatócitos (principalmente), monócitos, células endoteliais, fibroblastos, mioblastos, células dendríticas e adipócitos (REIS; BARBUTO; ISAAC, 2007; SCHLAF et al., 2001). Além de se ligar à PTX3, o FH tem a capacidade de se ligar à C3, heparina, proteína C reativa (CRP), fibromodulina, adrenomodulina, integrina CR3, receptores celulares de superfície e, até mesmo, à proteína de superfície de diversos patógenos, incluindo *T. cruzi* (FERREIRA et al., 2014). A ficolina-3 (ficolina-H) é expressa principalmente no fígado e nos pulmões, e em menor quantidade no coração, rim, baço, pâncreas, placenta e no tecido cerebral (HUMMELSHOJ et al., 2008; SUGIMOTO et al., 1998), sendo a mais abundante proteína do complemento no soro e considerada um potente ativador da VL *in vitro*. A ficolina-3 forma um complexo com serino-proteases associadas à MBL (MASPs) e cliva C4 para ativar a VL do complemento (KRARUP et al., 2005). A

ficolina-3 tem sido associada a doenças cardiovasculares, com concentrações reduzidas na insuficiência cardíaca avançada (FÜST et al., 2011; PROHÁSZKA et al., 2013; ZHOU et al., 2013a).

Mais recentemente tem sido proposto que partículas lipídicas podem ativar o sistema complemento e modular a resposta inflamatória. No caso da DC, há um particular interesse no entendimento dessa interação devido à desregulação metabólica resultante da infecção pelo *T. cruzi*, pois o tecido adiposo do hospedeiro é um dos locais de armazenamento do parasito (COMBS et al., 2005; KOETHE; HULGAN; NISWENDER, 2013; NAGAJYOTHI et al., 2012). Uma vez que a mortalidade na DC crônica ocorre, em sua maioria, devido ao comprometimento cardiovascular (RASSI JR; RASSI; RASSI, 2001) estudos envolvendo perfil lipídico e reguladores inflamatórios podem ser uma ferramenta eficaz para prever o comprometimento cardíaco. Além disso, a desregulação do metabolismo lipídico do hospedeiro favorece a multiplicação e sobrevivência do *T. cruzi* na infecção crônica (MIAO; NDAO 2014; NAGAJYOTHI et al. 2014; TANOWITZ, AMOLE, HEWLETT 1988), o que pode contribuir para o desenvolvimento de dislipidemia ou aterosclerose. Uma vez que o tecido adiposo sintetiza algumas proteínas do complemento e é um alvo para a ativação do mesmo (VLAICU et al., 2016), as doenças inflamatórias crônicas que promovem distúrbios metabólicos como a DC devem, portanto, ser acompanhadas clinicamente para o risco aterogênico. Além disso, as adipocinas (leptina e adiponectina) secretadas primariamente por adipócitos apresentam grande importância não somente na regulação do metabolismo lipídico como também no processo inflamatório. Diversos estudos têm demonstrado que a leptina aumenta a síntese de moléculas pró-inflamatórias, especialmente na fisiopatologia cardiovascular. De maneira geral, a leptina exerce um papel pró-inflamatório, aumentando a expressão de citocinas e promovendo fagocitose; além de regular positivamente a expressão de moléculas de adesão, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), e induzir o estresse oxidativo em células endoteliais (FANTUZZI, 2005). Por outro lado, a atividade anti-inflamatória da adiponectina parece estar associada a inibição da produção de interleucina-6 (IL-6), acompanhada pela indução das citocinas anti-inflamatórias interleucina-10 (IL-10) e antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1) (KUMADA et al., 2004; WOLF et al., 2004; WULSTER-RADCLIFFE et al., 2004).

1.1 JUSTIFICATIVA

Embora já tenha sido exaustivamente estudada, o exato mecanismo envolvido na fisiopatogenia da DC ainda não foi elucidado. Não existe marcador laboratorial capaz de indicar quais pacientes evoluirão da forma indeterminada para as sintomáticas, tornando-se imprescindível a definição de grupos de risco, passíveis de intervenção terapêutica precoce, bem como a identificação de elementos prognósticos e novas medidas terapêuticas. Considerando a gravidade das manifestações clínicas da DC crônica, particularmente da cardiopatia chagásica, que afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes e onera de maneira expressiva o sistema de saúde, o presente estudo poderá contribuir para o desenho de novas estratégias de diagnóstico, de modo a alterar o desfecho clínico da doença.

Dessa forma, a avaliação de componentes do sistema complemento e adipocinas, tanto em relação às concentrações plasmáticas como os parâmetros cardiometabólicos poderia ser útil no acompanhamento dos pacientes, auxiliando na prevenção de complicações próprias da doença e contribuindo tanto na melhoria de qualidade de vida dos pacientes como diminuindo custos com saúde pública.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Principal

Investigar o papel do sistema complemento e das adipocinas na fisiopatologia da Doença de Chagas Crônica como potenciais marcadores de risco cardiovascular.

1.2.2 Objetivos Secundários

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Determinar o *Score* de Framingham em pacientes com Doença de Chagas crônica e controles;

- b) Comparar o *Score* de Framingham em pacientes com Doença de Chagas crônica e controles;
- c) Determinar as concentrações séricas de PTX3 e ficolina-3; e plasmáticas de FH e em pacientes com Doença de Chagas crônica e controles;
- d) Investigar a associação entre as concentrações séricas de PTX3 e ficolina-3; e plasmáticas de FH com os aspectos clínicos de pacientes com Doença de Chagas crônica;
- e) Investigar a associação entre as concentrações séricas de PTX3 e ficolina-3; e plasmáticas de FH com parâmetros cardiometabólicos e inflamatórios em pacientes com Doença de Chagas crônica;
- f) Determinar as concentrações séricas das adipocinas leptina e adiponectina em pacientes com Doença de Chagas crônica e controles;
- g) Investigar a associação entre as concentrações séricas de leptina e adiponectina e os aspectos clínicos de pacientes com Doença de Chagas crônica;
- h) Investigar a associação entre as concentrações séricas de leptina e adiponectina e parâmetros cardiometabólicos e inflamatórios em pacientes com Doença de Chagas crônica;

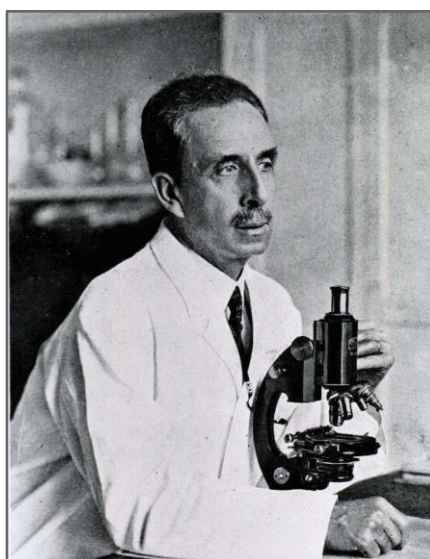
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Histórico

A Doença de Chagas (DC) foi nomeada em homenagem ao seu descobridor, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (CHAGAS, 1909) (FIGURA 1), que nasceu em uma fazenda de café em Oliveira (FIGURA 2), Minas Gerais, em 9 de julho de 1878 (KROPF; SÁ, 2009). Chagas se formou em Medicina em 1903, e foi convidado por Oswaldo Cruz a trabalhar como médico no Ministério de Saúde Pública e Higiene, onde empregou o combate intradomiciliar do vetor para o controle da malária. Devido aos resultados bem sucedidos, Chagas tornou-se membro da Academia Nacional de Medicina do Brasil. Carlos Chagas foi casado com Iris Lobo e teve dois filhos: Evandro e Carlos. Chagas recebeu vários prêmios e títulos, incluindo o Doutor Honoris Causa (Harvard, e instituições em Paris, Lima e Bélgica), dirigiu o Instituto Oswaldo Cruz por 17 anos, e coordenou a campanha contra a epidemia de gripe espanhola no Brasil. Além disso, Chagas foi indicado duas vezes para o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia (em 1913 e 1921), porém por motivos desconhecidos o prêmio não foi concedido (KROPF; SÁ, 2009).

FIGURA 1 – CARLOS CHAGAS NO SEU LABORATÓRIO EM MANGUINHOS, NA FIOCRUZ.



FONTE: Arquivos do Instituto Oswaldo Cruz.

FIGURA 2 – CASA ONDE CARLOS CHAGAS NASCEU, EM OLIVEIRA (MG).



FONTE: Arquivos do Instituto Oswaldo Cruz.

No dia 14 de fevereiro de 1909, Chagas consultou àquela que seria o primeiro caso descrito da DC. Tratava-se de uma criança de 2 anos de idade, Berenice (FIGURA 3), que apresentava febre alta, hepatoesplenomegalia, edema duro no rosto, e a presença do parasito no sangue. Berenice permaneceu na forma indeterminada da doença e faleceu aos 73 anos por outras causas, porém dos 55 aos 71 anos foi reavaliada para estudos clínicos.

FIGURA 3 – BERENICE: PRIMEIRA PACIENTE COM DOENÇA DE CHAGAS.

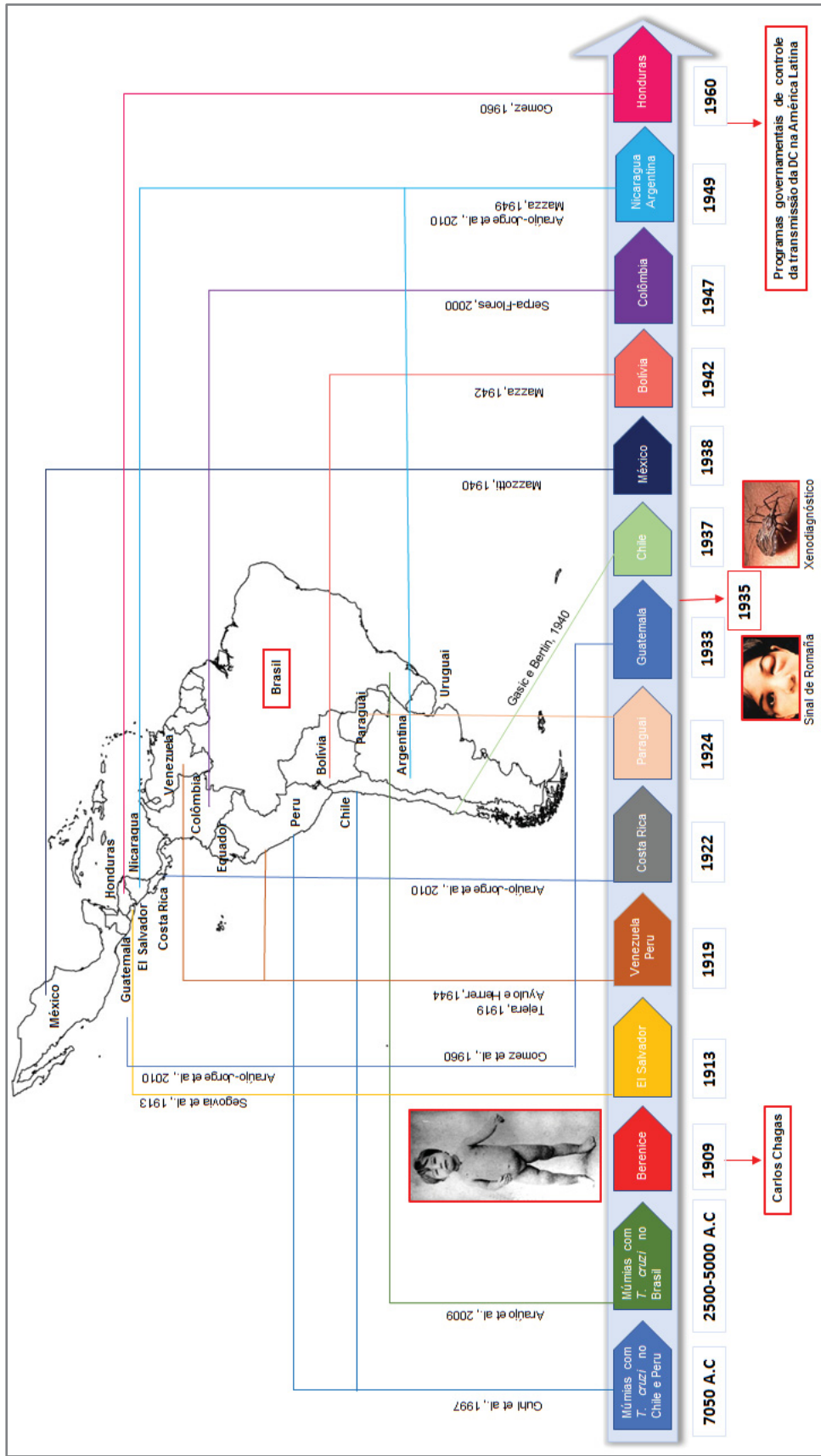


FONTE: Arquivos do Instituto Oswaldo Cruz.

LEGENDA: A. No momento que foi diagnosticada com a doença, em 1909; e B. Aos 55 anos, quando participou de novos estudos clínicos e deu entrevista ao jornal local.

A partir de então, intensificaram-se as pesquisas na América Latina, com os primeiros relatos de casos da DC em 1913 em El Salvador (SEGOVIA et al., 1913); em 1919 no Peru (AYULO; HERRER, 1944) e na Venezuela (TEJERA, 1919); em 1922 na Costa Rica (ARAUJO-JORGE; TELLERIA; RIOS-DALENZ, 2010); em 1924 no Paraguai (ARAUJO-JORGE; TELLERIA; RIOS-DALENZ, 2010); em 1933 na Guatemala (LEON GÓMEZ et al., 1960); em 1937 no Chile (GASIC; BERTIN, 1940); em 1938 no México (MAZZOTTI et al., 1940); em 1942 na Bolívia (MAZZA, 1942); em 1947 na Colômbia (SERPA FLÓREZ, 2000); em 1949 na Nicarágua (ARAUJO-JORGE; TELLERIA; RIOS-DALENZ, 2010) e na Argentina (MAZZA, 1949); e 1960 em Honduras (LEON GÓMEZ et al., 1960). Mais recentemente foi encontrado material genético de *T. cruzi* em múmias no Chile/Peru (AUFDERHEIDE et al., 2004) e Brasil, que datam 7050 anos A.C e 2500-5000 anos A.C, respectivamente, demonstrando que a doença existe na América Latina há mais de 9000 anos (ARAÚJO et al., 2009; GUHL et al., 1997) (FIGURA 4). Mesmo datando do período pré-colombiano a DC não havia sido mencionada antes de 1909, o que torna os achados de Carlos Chagas uma conquista única na história da parasitologia e da medicina, pois praticamente sozinho foi capaz de descrever os aspectos mais importantes de uma doença tropical completamente nova: o inseto vetor, o patógeno e suas diferentes fases de desenvolvimento, os hospedeiros, as manifestações clínicas, a epidemiologia e, até mesmo, a profilaxia da doença.

FIGURA 4 – LINHA DO TEMPO MOSTRANDO OS PRIMEIROS CASOS HUMANOS DA DOENÇA DE CHAGAS (DC) NA AMÉRICA LATINA.



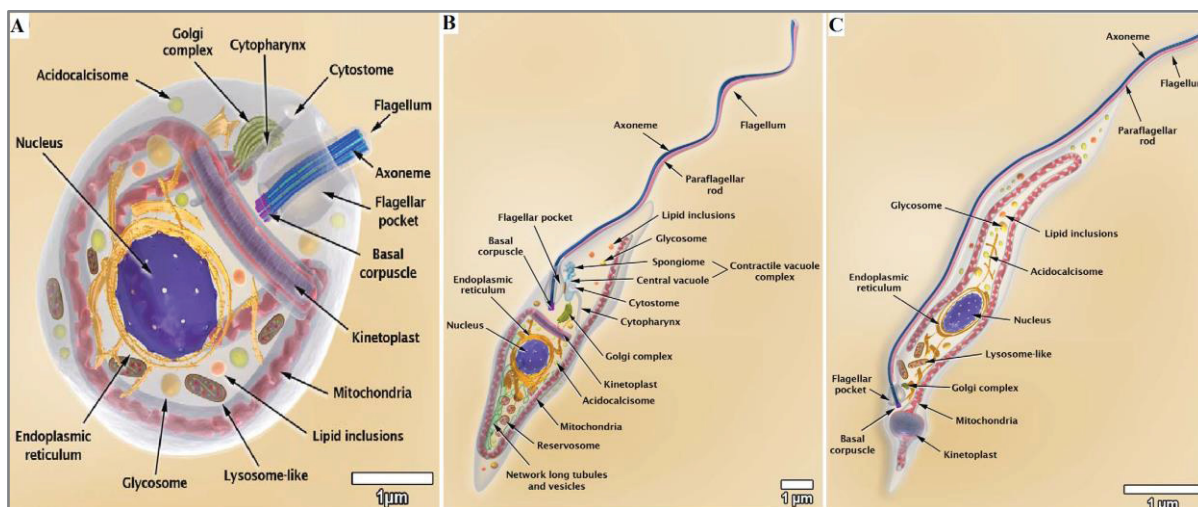
FONTE: o autor (2017).

NOTA: A partir de 1909, com o relato da primeira paciente confirmada com DC (Berenice) no Brasil por Carlos Chagas, foram reportados casos da doença em diversos países como El Salvador, Venezuela, Peru, Costa Rica, Paraguai, Guatemala, Chile, México, Bolívia, Colômbia, Nicarágua, Argentina e Honduras, destacando também importantes estudos na área de paleoparasitologia. Em 1935 o sinal de Romãnia foi associado a forma aguda da DC e o xenodiagnóstico foi proposto. Somente em 1960 iniciaram-se os programas governamentais para controle da DC na América Latina.

De acordo com Lannes-Vieira e colaboradores (2010), o centenário da DC trouxe uma reflexão acerca da história da doença até os dias atuais, que pode ser dividido em 3 importantes fases. A primeira, de 1909 a 1934, caracterizada pelo brilhante trabalho de Chagas, porém com toda a controvérsia da época referente aos questionamentos sobre a definição e legitimação da doença como fato científico e problema social; a segunda fase, de 1935 a 1960, após a morte de Chagas quando Mazza e Romaña confirmaram a forma aguda da doença na Argentina e quando Evandro Chagas e Emmanuel Dias associaram o caráter endêmico e crônico da doença; e, por fim, a terceira fase tem representado um desafio tanto para o controle como para o entendimento da DC no mais diversos aspectos, em que a implantação de políticas nacionais e internacionais de saúde é uma necessidade constante.

2.1.2 Agente etiológico e vetor

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado sendo assim designado por Carlos Chagas em homenagem a Oswaldo Cruz. Trata-se de um parasito intracelular pertencente à Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (LEVINE et al., 1980), que causa a Doença de Chagas ou Tripanossomíase americana e tem a capacidade de infectar praticamente qualquer tipo de célula, mas principalmente macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (LIEKE et al., 2006). Durante seu ciclo evolutivo, o parasito apresenta-se sob as seguintes formas principais: amastigota (forma proliferativa encontrada dentro das células hospedeiras vertebradas), epimastigota (forma proliferativa encontrada no intestino do hospedeiro invertebrado) e tripomastigota (forma infectante originada de amastigotas no hospedeiro vertebrado; e de epimastigotas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado) (FIGURA 5).

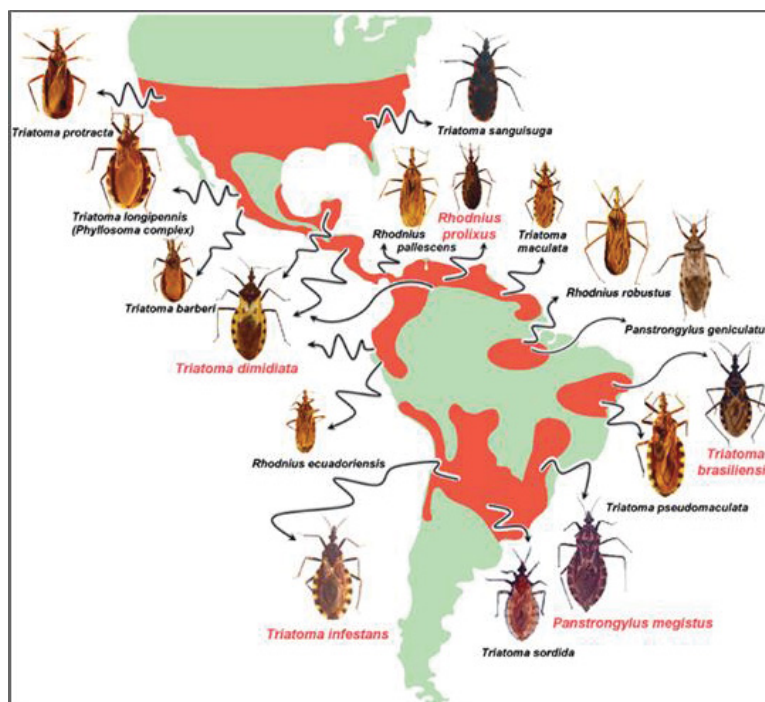
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FORMAS DE *T. cruzi*.

FONTE: TEIXEIRA et al., 2012

LEGENDA: Forma (A) amastigota, (B) epimastigota e (C) tripomastigota

O vetor da DC é um inseto hematófago, popularmente conhecido por “barbeiro”, “chupão”, “fincão”, “chupanças”, “bicudos” ou “procotós”. A transmissão do parasito pode ser realizada por mais de 140 espécies do vetor, e constituem um perigo potencial como vetores da doença os seguintes gêneros: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*; *Meccus*; *Panstrongylus*; *Rhodnius*; *Triatoma*. No caso do Brasil, entre as 62 espécies distribuídas nos espaços intradomicílio e peridomicílio, destacam-se: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma sordida* e *Triatoma vitticeps* (COURA, 2013; GOURBIÈRE et al., 2012) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS DE RELEVÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.



FONTE: GOURBIÈRE et al., 2012.

NOTA: As áreas vermelhas indicam a distribuição geográfica aproximada das espécies; enquanto as espécies destacadas em vermelho são consideradas os vetores mais importantes do parasito.

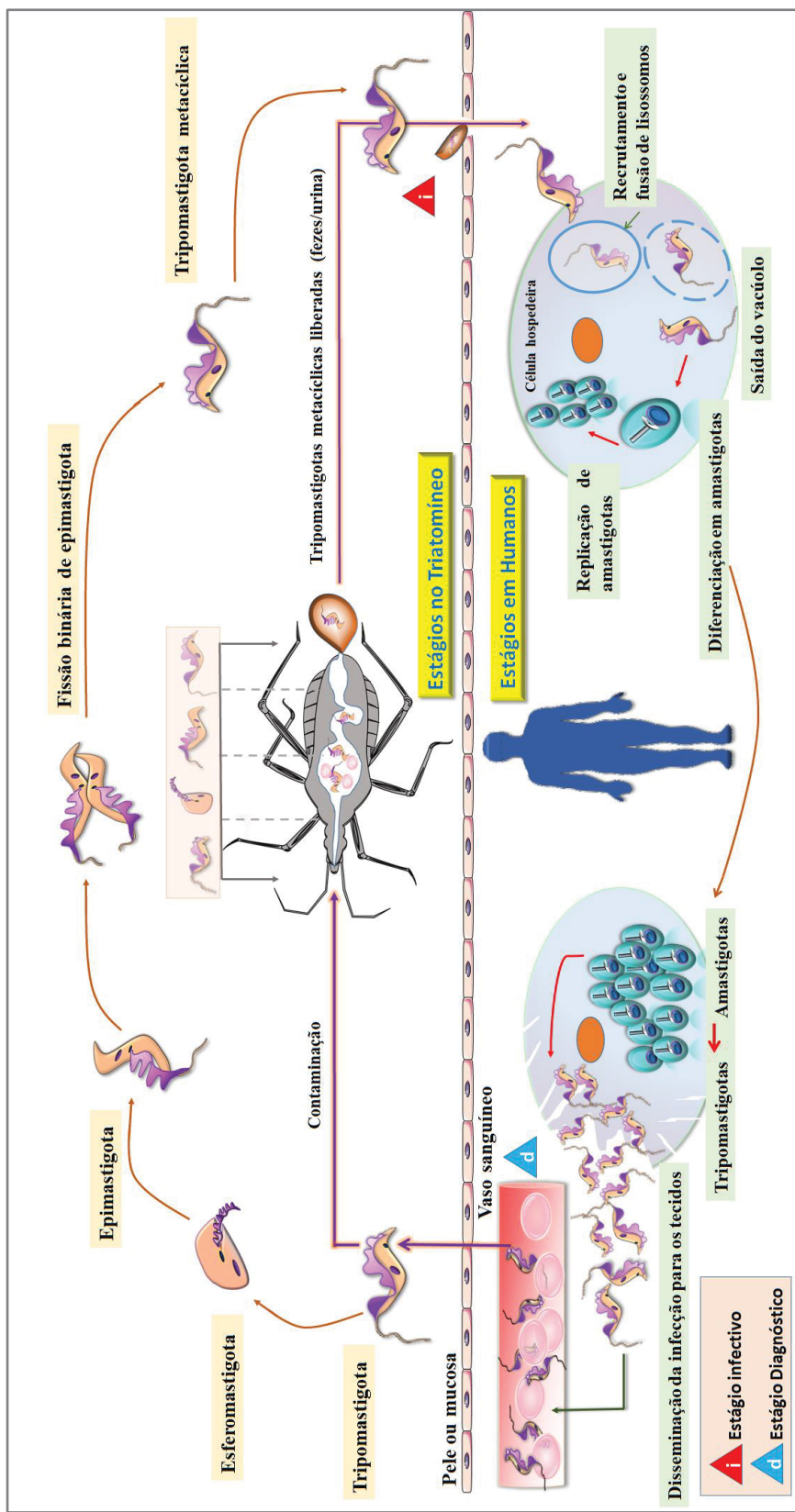
Apesar da certificação de interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* no Brasil concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde - Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS) em 2006, no período de 2007 a 2011 foi observada a persistência de focos de *T. infestans* em quatro municípios do Estado da Bahia e em 12 municípios do Rio Grande do Sul. Esse mesmo estudo identificou uma taxa de triatomíneos naturalmente infectados com o *T. cruzi* de 2,7% (15.967 no total de 591.360), sendo as espécies *T. vitticeps* (52,0%), *R. robustus* (33,3%) e *P. lutzii* (29,4%) as que apresentaram as maiores taxas de infecção natural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; DIAS et al., 2016). Estes dados reforçam a provável subestimativa dos casos relativos a esta forma de transmissão, tanto nacional quanto internacionalmente.

2.1.3 Ciclo de vida do *T. cruzi*

A infecção pelo *T. cruzi* através da transmissão vetorial ocorre a partir do repasto sanguíneo de triatomíneos que sugam o sangue de vertebrados infectados

com tripomastigotas de *T. cruzi*, que pode ser o homem ou outro hospedeiro reservatório, como gatos e cachorros domésticos; além de espécies selvagens como tatu, guaxinim e rato. O ciclo de vida do parasito no barbeiro inicia-se a partir da ingestão de tripomastigotas, posteriormente transformadas em formas esferomastigotas ou epimastigotas. As epimastigotas se multiplicam no intestino médio e se ligam às membranas perimicrovilares das células intestinais. Nas regiões mais posteriores do intestino do vetor e no reto, muitas epimastigotas se destacam da superfície intestinal e são transformados em tripomastigotas metacíclicas infecciosas que são então liberadas juntamente com fezes e urina do barbeiro. As tripomastigotas metacíclicas não são capazes de penetrar na pele intacta mas entram no hospedeiro por fricção da ferida, ou através da mucosa ou conjuntiva. Para estabelecer a invasão parasitária e evadir dos efeitos do sistema imune o *T. cruzi* realiza o recrutamento e a fusão de lisossomas da célula hospedeira (como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais) para formar um vacúolo parasitóforo (YOSHIDA; CORTEZ, 2008). Em seguida, a saída do *T. cruzi* desse vacúolo é mediada por uma hemolisina secretada pelo parasito, TC-tox, a qual possui uma atividade lítica e formadora de poros na membrana deste vacúolo em pH ácido (SACKS; SHER, 2002). Dessa maneira, é possível a diferenciação das formas tripomastigotas em amastigotas intracelulares, que após em torno de nove ciclos de divisão binária voltam a forma tripomastigota e são liberados para a circulação sanguínea (DVORAK et al. 1973). Estas infectam novas células ou são absorvidas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo repetindo o ciclo do parasito. Uma vez na corrente sanguínea de um hospedeiro mamífero, o *T. cruzi* é capaz de infectar vários tipos de células de uma variedade de tecidos e de se transformar em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção, estabelecendo a infecção crônica (FIGURA 7). O *T. cruzi* também pode ser transmitido via transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transplacentária, ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas ou por exposição acidental, mas esses mecanismos ainda não são bem estabelecidos (HONTEBEYRIE; BRENIÈRE; AZNAR, 2010).

FIGURA 7 – CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*.



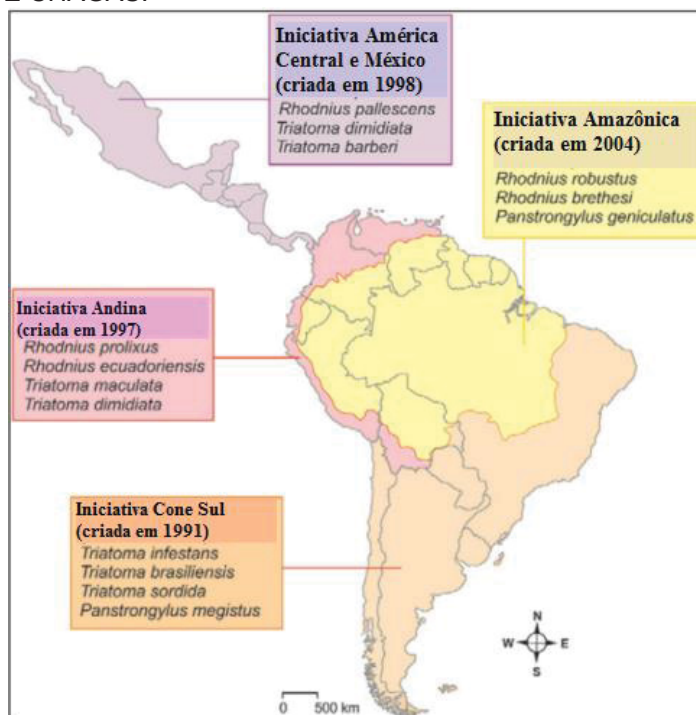
FONTE: Modificado de LIDANI et al., 2017

NOTA: A transmissão é iniciada por vetores insetos, que defecam após uma refeição sanguínea e liberam tripomastigotos metacíclicos nas proximidades da picada. Este estágio infeccioso é caracterizado pela invasão de tripomastigotas em células hospedeiras através de vacúolos parasitóforos, dos quais eles escapam posteriormente, se diferenciam em amastigotas e se replicam no citosol. Os amastigotas dividem-se, diferenciam-se em tripomastigotas e ocorre a disseminação da infecção nos tecidos após a ruptura da célula. Ao sair da célula, os tripomastigotas atingem a corrente sanguínea, onde são eventualmente capturados pelo inseto ou infectam novas células. Em triatomíneos, os tripomastigotas se diferenciam em esferomastigotas tornando-se inicialmente epimastigotas curtas. Após a migração para o intestino posterior do barbeiro, os epimastigotas longas se ligam à cutícula do intestino seroso e dão origem a tripomastigotas metacíclicos infecciosos, completando o ciclo de vida do parasito.

2.1.4 Transmissão

Apesar de inúmeras formas de transmissão da DC, a vetorial constitui a de maior interesse epidemiológico, pois se relaciona com aspectos sociais, culturais e econômicos da população, refletindo também às medidas de controle e vigilância entomológica. Desde a descoberta da doença, tornou-se um consenso que o combate sistemático dos barbeiros reduz drasticamente ou elimina a expansão da doença, o que levou a implantação da iniciativa do Cone Sul para a eliminação do *T. infestans*, em 1991; seguido pela Iniciativa Andina (1997), Iniciativa América Central e México (1998) e Iniciativa Amazônica (2004) (COURA, 2013) (FIGURA 8). Diante dessas estratégias de controle do vetor, foi observada uma acentuada redução no número de casos da doença por via vetorial, o que contribuiu indiretamente para uma redução também em relação às transmissões transfusional e congênita.

FIGURA 8 – INICIATIVAS PARA CONTROLE DOS PRINCIPAIS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS.



FONTE: Adaptado de COURA, 2013

A transmissão transfusional depende de uma série de fatores que incluem aspectos intrínsecos ao doador/receptor, assim como parâmetros técnicos referente a triagem de doadores em banco de sangue. No Brasil, em 1950, a prevalência média estimada de sorologia reagente para *T. cruzi* entre candidatos à doação de sangue

era de 8,3%, nos anos 1960 e 1970 reduziu-se para 6,9% e, no final dos anos 1980 e início de 1990, alcançou 3,2% (MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011). Em 1990, 100% dos hemocentros já haviam implantado o teste de triagem para *T. cruzi* no Brasil, e em 2010 foram detectados 0,18% dos doadores com a Doença de Chagas. No caso da transmissão congênita, apesar da ausência de ações sistemáticas de prevenção desta forma de transmissão no país, reconhece-se que o tratamento anti-*T. cruzi* em mulheres infectadas em idade fértil e que ainda não estão grávidas, pode representar uma estratégia útil para reduzir a transmissão vertical da DC. A OMS estima que 1.124.930 mulheres entre 15 e 44 anos estão infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2015), sendo que o risco global de infecção congênita por *T. cruzi* em crianças nascidas de mães infectadas é de 5% (HOWARD et al., 2014).

Atualmente, a forma de transmissão mais preocupante é a oral, pois é considerada mais difícil de controlar que a vetorial, já que alguns casos de contaminação alimentar foram identificados em áreas com baixo índice de parasitos circulantes, e até mesmo em áreas não endêmicas (HONTEBEYRIE et al., 2010). Essa forma de transmissão foi observada inicialmente em modelo animal a partir de 1913 (BRUMPT, 1927), quando se propôs que animais reservatórios poderiam se alimentar do barbeiro (DIAS, 1933); sendo confirmadas mais tarde com infecções experimentais a partir da ingestão de sangue com tripomastigota, urina/fezes de barbeiro infectado ou *T. cruzi* de cultura (MAYER et al., 1961). Os primeiros casos humanos de infecção oral foram reportados por Silva e colaboradores (2008) no Rio Grande do Sul; e por Shaw e colaboradores (1969) no Pará. Vários micro-surtos foram descritos no Brasil, com destaque para os anos de 2005, devido a ingestão de caldo-de-cana contaminado com *T. cruzi* em Santa Catarina, com 24 casos confirmados (STEINDEL et al., 2008); e 2006 pela ingestão de açaí contaminado no Pará, com 178 casos da doença aguda (NÓBREGA et al., 2009).

2.1.5 Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, sendo a maioria em 21 países da América Latina, que conta com 5.742.167 pessoas com a DC, das quais 3.581.423 (62,4%) residem em países da Iniciativa do Cone Sul, destacando-se a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821) e o México (876.458), seguidos da Bolívia (607.186) (WHO, 2015). De acordo com um

estudo que incluiu o período de 1980 a 2012, a prevalência estimada do número de infectados pelo *T. cruzi* no Brasil foi de 4,6 milhões para todo o período ou 2,4% da população a partir de 2010 (MARTINS-MELO et al., 2014). Ao avaliar a projeção relativa às estimativas do número de pessoas infectadas por *T. cruzi* e do número de casos com a forma crônica sintomática da DC no Brasil, de 2015 a 2055 (TABELA 1), observa-se, por exemplo, que para 2020 o número de pessoas infectadas será de 1.365.585 a 3.213.142, em que a cardiomiopatia chagásica pode afetar até 963.943 indivíduos (DIAS et al., 2016).

TABELA 1 – PROJEÇÕES DAS ESTIMATIVAS DE PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *T. cruzi* E DA DOENÇA DE CHAGAS NA FASE CRÔNICA COM A FORMA CARDÍACA E COM A FORMA DIGESTIVA NO BRASIL, NO PERÍODO DE 2000 A 2055.

Ano	Estimativa da população brasileira	Faixa etária de referência			Estimativa do número de pessoas infectadas		Estimativa de casos com a forma digestiva		Estimativa de casos com a forma cardíaca	
		Faixa etária	População	%	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b
2000	173.448.346	≥5	156.133.836	90,0	1.592.565	3.747.212	159.257	374.721	477.770	1.124.164
2005	185.150.806	≥10	150.944.641	81,5	1.539.635	3.622.671	153.964	362.267	461.891	1.086.801
2010	195.497.797	≥15	145.563.676	74,5	1.484.749	3.493.528	148.475	349.353	445.425	1.048.058
2015	204.450.649	≥20	139.901.357	68,4	1.426.994	3.357.633	142.699	335.763	428.098	1.007.290
2020	212.077.375	≥25	133.880.929	63,1	1.365.585	3.213.142	136.559	321.314	409.676	963.943
2025	218.330.014	≥30	127.334.466	58,3	1.298.812	3.056.027	129.881	305.603	389.644	916.808
2030	223.126.917	≥35	120.096.221	53,8	1.224.981	2.882.309	122.498	288.231	367.494	864.693
2035	226.438.916	≥40	112.013.898	49,5	1.142.542	2.688.334	114.254	268.833	342.763	806.500
2040	228.153.204	≥45	102.983.115	45,1	1.050.428	2.471.595	105.043	247.160	315.128	741.479
2045	228.116.279	≥50	92.984.144	40,8	948.438	2.231.619	94.844	223.162	284.531	669.486
2050	226.347.688	≥55	82.097.220	36,3	837.392	1.970.333	83.739	197.033	251.218	591.100
2055	222.975.532	≥60	70.485.475	31,6	718.952	1.691.651	71.895	169.165	215.686	507.495

a) Parâmetros para estimativas (mínima e máxima) da prevalência de infecção por *T. cruzi* –PAHO, 2006; MARTINS-MELO et al., 2014.

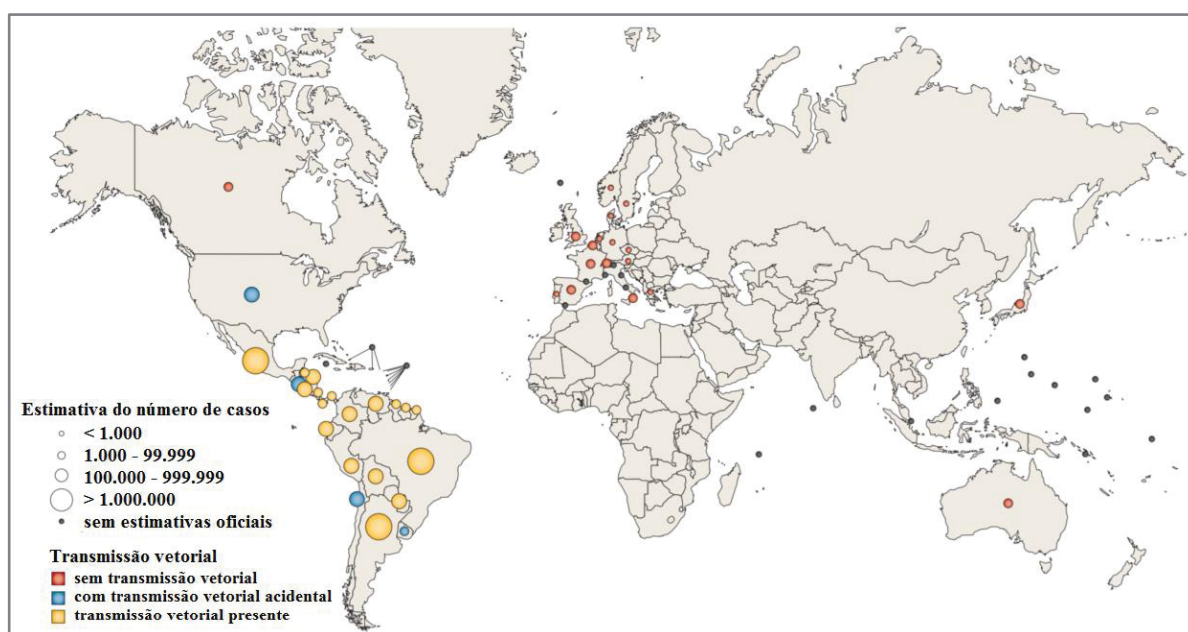
b) Parâmetros para estimativas máximas da prevalência de doença de Chagas na fase crônica com a forma cardíaca (x 30%) e com a forma digestiva (x 10%).

FONTE: II Consenso em Doença de Chagas (2016).

Devido às migrações internacionais de pessoas de áreas endêmicas para os EUA, Europa, Ásia e Austrália, casos inesperados de DC foram diagnosticados primeiro nos EUA (NAVIN et al., 1985), depois na Europa (FLORES-CHÁVEZ et al., 2008; FRANK et al., 1997), Canadá (STEELE et al., 2007), e Ásia (UENO et al., 1995) (FIGURA 9). Dessa forma, a transmissão por transfusão sanguínea tornou-se uma grande preocupação para países não endêmicos, onde se estima que pelo menos 2% dos imigrantes latino-americanos estejam infectados com o *T. cruzi*. Além disso, o fato de em alguns países a doação de sangue ser paga aumentava mais o risco de

transmissão da doença, visto que essa prática atraía pessoas com menos recursos financeiros como os imigrantes, o que pressionou os bancos de sangue a adotarem uma rotina de triagem com testes para *T. cruzi*, iniciando com os EUA (GALEL; ENGLEMAN, 1995; KIRCHHOFF et al., 2006), seguido da Espanha (REESINK, 2005). Atualmente, estima-se uma prevalência de 300.000 infectados nos EUA (BERN; MONTGOMERY, 2009) e 80.000 na Europa, incluindo Bélgica, França, Itália, Espanha, Suíça e Reino Unido (BASILE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012).

FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO NÚMERO DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS E SITUAÇÃO DA TRANSMISSÃO VETORIAL, DE 2006 A 2009.



FONTE: Adaptado de WHO, 2010

Considerando que mais de 80% das pessoas afetadas pela doença no mundo não são diagnosticadas e nem tratadas (DIAS et al., 2016) tal fato além de ratificar o caráter negligenciado da doença, contribui para a expressiva morbimortalidade e custo social da enfermidade. O custo da DC em termos de perda de produtividade foi estimado em US\$ 1,2 bilhões por ano para os sete países do Cone Sul; e no Brasil, o afastamento de trabalhadores com a doença representa uma perda mínima estimada de US\$ 5,6 milhões por ano (WHO, 2010).

2.1.6 Sintomatologia e formas clínicas

Na maioria dos casos, a fase aguda da DC é assintomática, porém podem aparecer sintomas inespecíficos, como febre, cefaléia, mialgia, astenia,

hepatomegalia, ascite e esplenomegalia (BARRETT et al., 2003). Na transmissão vetorial, pode haver sinais relacionados à porta de entrada do *T. cruzi* no hospedeiro, quando o contato é através da pele produz o chagoma, uma área endurecida de eritema e inchaço; enquanto que a entrada através das mucosas oculares produz o sinal de Romanã, que consiste em edema unilateral indolor da pálpebra e tecidos perioculares (PRATA, 2001). Após um período de 4 a 8 semanas a parasitemia reduz bastante e essas manifestações desaparecem espontaneamente em 90% dos casos, e destes, 60 a 70% nunca desenvolverá sinais ou sintomas atribuíveis à Doença de Chagas, o que representa a forma crônica indeterminada da doença, podendo permanecer assintomático por toda a vida. Essa forma é caracterizada por sorologia positiva para anticorpos contra *T. cruzi*, eletrocardiograma (ECG) normal e exames de tórax, esôfago e cólon também normais (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Durante essa fase, em cerca de 50% dos casos, podem ser detectadas alterações inespecíficas no ECG como bloqueio do ramo direito, hemibloqueio anterior esquerdo, alterações de repolarização ou baixa tensão. Em mais de 95%, estes sintomas e as alterações eletrocardiográficas desaparecem espontaneamente (BLUM et al., 2008). Porém, após 20 a 30 anos 30-40% dos pacientes na forma indeterminada da doença irão desenvolver manifestações clínicas neuronais, digestivas (megacólon e megaesôfago), cardíacas ou cardiodigestiva (VAGO et al., 2000). Os distúrbios neurológicos são raros e aparecem em aproximadamente 3% da população chagásica, e o envolvimento visceral digestivo ocorre em cerca de 5-10%, porém a cardiopatia constitui a mais séria complicação, atingindo, em algum momento da vida, um terço dos indivíduos com sorologia positiva (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999) (FIGURA 10).

A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por uma miocardite difusa associada a destruição de fibras cardíacas, com substituição por fibrose cicatricial e anormalidade segmentar do movimento da parede. Uma inflamação crônica ativa, progressiva e fibrosante é o substrato morfológico fundamental dos mecanismos fisiopatológicos da miocardite chagásica (MARIN-NETO et al., 2007). A congestão hepática passiva com ascite e edema de membros inferiores juntamente com a dispneia de esforço, em geral, são as manifestações iniciais da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Ortopnéia e dispnéia paroxística noturna ou edema agudo de pulmão são raros, sendo observado somente diante do acometimento bi-ventricular, com a predominância da insuficiência cardíaca direita em fases mais

avançadas da CCC (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Nesses casos, ocasionalmente, verificam-se focos isolados de reação inflamatória aguda, como se a reativação do processo estivesse ocorrendo. Além disso, são frequentes os achados de hipertrofia das fibras miocárdicas e dilatação das cavidades com a presença de trombos, fibrose e afinamento do ápice do ventrículo, especialmente o ventrículo esquerdo, caracterizando o aneurisma apical, que é quase sempre revestido internamente com coágulos sanguíneos organizados (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). A trombose do aneurisma é comum, assim como a trombose mural na parte inferior do ventrículo esquerdo e na aurícula direita dilatada. A presença de trombos explica a ocorrência freqüente de fenômenos tromboembólicos no sistema pulmonar e circulatório (ROSSI et al., 2010).

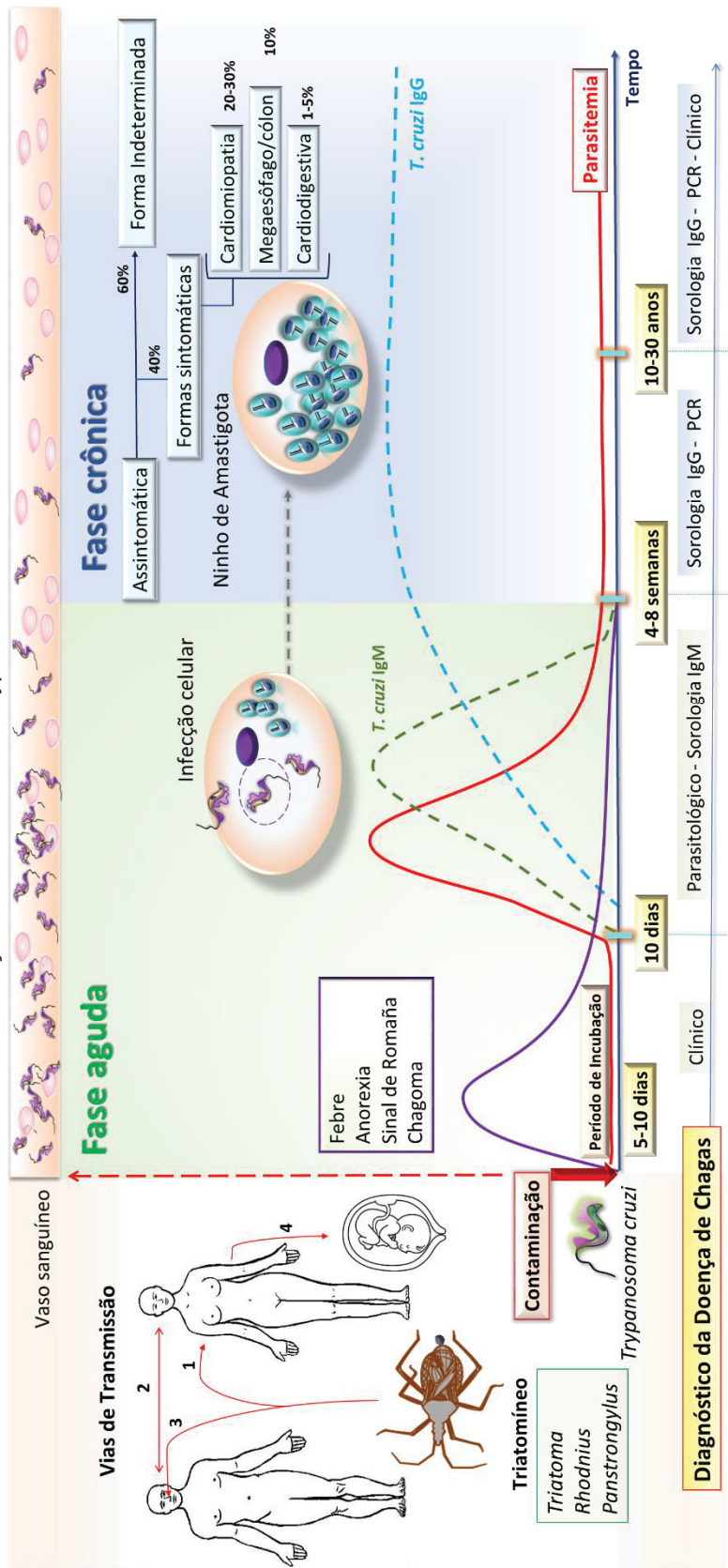
Uma das características da CCC é a alta frequência de arritmias, onde episódios de taquicardia ventricular não sustentada são observados em 40% dos pacientes com acometimento moderado da contração ventricular, e em 90% dos pacientes com insuficiência cardíaca (RASSI JR; RASSI; LITTLE 2000). Pacientes com cardiomiopatia com insuficiência cardíaca franca têm taxas de mortalidade entre 50% e 80% após três anos (CUBILLOS-GARZÓN et al., 2004). Nas últimas décadas, têm-se demonstrado que as alterações na microvasculatura no coração podem contribuir para a patogênese da cardiomiopatia chagásica (PRADO et al., 2011; ROSSI et al., 2010). Tais alterações microvasculares e a disfunção endotelial poderia preceder a cardiomiopatia chagásica e afetar a reserva vasodilatadora microvascular (KOSHY; GOVINDARAJAN, 2014).

Interessantemente, Nagajyothi e colaboradores (2009; 2012) têm demonstrado em modelo murino que a infecção pelo *T. cruzi* também promove um importante aumento sérico de LDL-colesterol e triglicerídeos; e apesar desse achado ainda não está bem definido em pacientes com DC, um estudo recente com cardiomiócitos infectados demonstrou que a invasão/infecção do *T. cruzi* via LDLr parece estar envolvida em mudanças na homeostase do colesterol intracelular (JOHNDROW et al., 2014). Nesse contexto, Peverengo e colaboradores (2016) observaram importante correlação entre o índice aterogênico e a severidade da cardiomiopatia chagásica.

A forma digestiva da DC no estágio crônico se deve à desnervação do sistema nervoso entérico que regula as funções motoras do tubo digestivo, causando principalmente acalasia e perda de peristaltismo esofágico, o que resulta em disfagia. A hipomotilidade do sistema digestório também leva a uma dilatação do cólon com

consequente quadro de constipação maciça (DE OLIVEIRA et al., 2008; PINAZO et al., 2010). Embora a qualidade de vida seja muito limitada por megacólons e megesôfagos em muitos casos, o prognóstico é principalmente limitado quando ocorre o desenvolvimento concomitante de cardiomiopatia, caracterizando a forma cardiodigestiva (MATSUDA et al., 1995).

FIGURA 10 – CURSO NATURAL DE INFECÇÃO HUMANA PELO *Trypanosoma cruzi*.



FONTE: Modificado de LIDANI et al., 2017

NOTA: A transmissão pode ocorrer por via 1) vetorial, 2) transfusão de sangue ou transplante de órgãos, 3) oral, ou 4) congênita. Após o contato do *T. cruzi* com o hospedeiro humano inicia o período de incubação por 5 a 10 dias, até a fase aguda da Doença de Chagas que dura de 4 a 8 semanas. Esta fase é caracterizada por tripomastigotas circulantes detectáveis pela visualização direta do parasito, e após 10 dias pela detecção de IgM contra antígenos do *T. cruzi*. A maioria dos pacientes apresenta sintomas inespecíficos como febre e anorexia ou é assintomático, porém em alguns casos pode desenvolver inflamação e inchaço no local de inoculação na pele ou conjuntiva, caracterizando o chagoma e o sinal de Romaña, respectivamente. A fase crônica inicia-se quando a parasitemia cai abaixo dos níveis detectáveis pela microscopia, geralmente de 4 a 8 semanas após o início da infecção, e o diagnóstico é baseado na detecção de IgG contra antígenos de *T. cruzi* ou testes moleculares. Nesta fase a maioria das pessoas infectadas entra em um prolongado período assintomático e nunca vai desenvolver sintomas relacionados a doença, conhecido como forma indeterminada. No entanto, após 10 a 30 anos, estima-se que 30 a 40% das pessoas infectadas cronicamente apresentarão manifestações clínicas envolvendo complicações cardíacas, digestivas ou ambas.

Estudos epidemiológicos realizados por Dias (1992) indicaram uma observação interessante sobre a distribuição geográfica diferencial para a forma clínica envolvida. Por exemplo, no Chile forma digestiva é a mais frequente, enquanto que na Argentina, ela corresponde apenas a 3,5% do total de pacientes chagásicos. A distribuição variável foi observada mesmo em diferentes regiões endêmicas no interior do Brasil, onde, em geral, a prevalência da forma cardíaca e digestiva é de 20-30% e 8-10%, respectivamente, enquanto a forma cardiodigestiva é rara. Esta heterogeneidade geográfica sugere que a variação genética do hospedeiro, do parasito, ou de ambos, é de suma importância para estabelecer a forma clínica da doença. De qualquer forma, estima-se que quase 1 milhão e 200 mil pessoas tenham cardiomiopatia chagásica, o que preocupa as autoridades de saúde e demonstra a necessidade de políticas direcionadas para essa população, além dos quase 70 milhões que vivem em área de risco para a infecção. É importante notar que apesar das campanhas para erradicação do triatomíneo, essa forma de transmissão do *T. cruzi* ainda é uma realidade na América Latina (TABELA 2), contando com quase 30 mil novos casos em 2010, destacando a Bolívia com 8.087 casos. Somado a transmissão vetorial, a prevalência de casos da DC adquiridos através da forma congênita também é outro dado preocupante, e está associado diretamente ao elevado número de mulheres na faixa etária de 15-44 com a doença e a falta de diagnóstico e/ou acompanhamento clínico, especialmente porque se trata de países considerados endêmicos para DC (WHO, 2015).

TABELA 2 – DADOS A PARTIR DA ESTIMATIVA DEMOGRÁFICA E EPIDEMIOLÓGICA DE 2010.

País da América Latina	População	Infectados	Novos Casos Vetorial	Mulheres com DC 15-44 anos	Casos DC Congênita (anual)	População sob risco	CCC	Doadores de sangue infectados	IDH 2010
ARGENTINA	41343000	1 505 235	1 078	211102	1 457	2 242 528	376 309	3.130	0.775
BELIZE	315000	1 040	10	272	25	70 252	200	N/A	0.794
BOLÍVIA	9947000	607 186	8 087	199 351	616	586 434	121 437	2.320	0.643
BRASIL	190755799	1 156 821	46	119 298	571	25 474 365	231 364	0.180	0.699
CHILE	17095000	119 660	0	11 771	115	0	35 898	0.160	0.783
COLÔMBIA	45805000	437 960	5 274	116 221	1 046	4 813 543	131 388	0.410	0.689
COSTA RICA	4516000	7 667	10	1 728	61	233 333	2 300	0.045	0.725
EQUADOR	14483499	199 872	2 042	62 898	696	4 199 793	40 384	0.190	0.695
EL SALVADOR	6952000	90 222	972	18 211	234	1 019 000	18 044	1.610	0.659
GUATEMALA	13550000	166 667	1 275	32759	164	1 400 000	20 833	1.340	0.560
*GUIANAS SURINAME	1501962	12 600	280	3 818	18	377 258	882	N/A	0.611/ 0.646
HONDURAS	7989000	73 333	933	16 149	257	1 171 133	14 667	1.650	0.604
MÉXICO	112468855	876 458	6 135	185 600	1 788	23 474 780	70 117	0.390	0.750
NICARÁGUA	5604000	29 300	383	5 822	138	642 750	5 990	0.220	0.565
PANAMÁ	3557687	18 337	175	6 332	40	466 667	3 667	0.500	0.755
PARAGUAI	8668000	184 669	297	63 385	525	1 703 659	32 974	2.550	0.640
PERU	28948000	127 282	2 055	28 132	232	1 290 415	25 456	0.620	0.723
URUGUAI	3301000	7 852	0	1858	20	0	615	0.230	0.765
VENZUELA	27223000	193 339	873	40 223	665	1 033 450	38 668	0.320	0.696
TOTAL	543877115	5 742 167	29 925	1 124 930	8 668	70 199 360	1 171 193	0.930	**0.704

* Considerado Guiana e Guiana Francesa

** IDH médio da América Latina em 2010.

FONTE: Adaptado de WHO, 2015.

NOTA: CCC- cardiomiopatia chagásica crônica; IDH- Índice de Desenvolvimento Humano; N/A- não aplicado.

2.1.7 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da DC pode ser realizado em qualquer fase da doença. Na fase aguda é possível determinar a presença de parasitos circulantes no sangue periférico, empregando exame a fresco, esfregaço ou gota espessa. No caso de persistência dos sintomas por mais de 30 dias, são recomendados métodos de concentração devido ao declínio da parasitemia (teste de Strout, micro-hematócrito, QBC); e presença de

anticorpos IgM anti-*T. cruzi* no sangue indica doença aguda quando associada a fatores clínicos e epidemiológicos compatíveis. Para o diagnóstico na fase crônica da doença é necessário detectar a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* por dois testes sorológicos de princípios distintos, sendo recomendados Imunofluorescência Indireta (IFI), Hemaglutinação (HE) e ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA). Por serem de baixa sensibilidade, os métodos parasitológicos são desnecessários nessa fase, porém técnicas de hemocultivo ou reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser úteis para a indicação da doença crônica. Para a avaliação clínica, tanto na fase aguda quanto na crônica, são solicitados exames laboratoriais gerais, ECG, radiografia de tórax e hepatograma (BERN et al., 2007; LIDANI et al., 2017; SCHIJMAN et al., 2011).

Muitos medicamentos foram testados contra o *T. cruzi*, porém, sem sucesso (BRENER, 2000). As drogas utilizadas atualmente no tratamento etiológico, benznidazol ou nifurtimox, podem curar a doença se administradas ainda na fase aguda; porém o tratamento é frequentemente interrompido devido aos efeitos colaterais que incluem anorexia, vômitos, e dermatite alérgica (PAHO, 2016). Apesar de não haver um consenso para o uso do tratamento na fase crônica, estudos demonstraram que o tratamento antiparasitário foi capaz de impedir o aparecimento ou retardar a progressão da DC na maioria dos casos avaliados (BERN et al., 2007; FABBRO et al., 2007; GALLERANO; SOSA, 2001; VIOTTI et al., 2006). Por outro lado, recentemente, um estudo multicêntrico, BENEFIT (sigla em inglês para Avaliação do Benznidazol para Interrupção da Tripanossomíase), avaliou 2.854 pacientes com a forma crônica cardíaca da Doença de Chagas e demonstrou que o tratamento administrado (300mg/dia durante 40 a 80 dias) na fase crônica não foi capaz de retardar a progressão clínica para formas mais graves da cardiomiopatia chagásica, porém reduziu o número de intercorrências clínicas associadas (MORILLO et al., 2015). É importante ressaltar que o percentual de cura e sua comprovação dependem de alguns fatores, como a fase e o tempo de duração da DC, a idade do paciente, os exames utilizados para a avaliação de eficácia terapêutica e o tempo de seguimento pós-tratamento, comorbidades associadas e, até mesmo, a susceptibilidade da cepa de *T. cruzi* aos medicamentos antiparasitários (DIAS et al., 2016).

Na prática, realiza-se somente tratamento sintomático suportivo de acordo com o tipo e gravidade dos sintomas. Diante do envolvimento cardíaco são recomendadas as mesmas drogas que para outras cardiopatias (cardiotônicos, diuréticos,

antiarrítmicos, vasodilatadores, etc.), enquanto que para o envolvimento digestivo pode ser indicado tratamento conservador (dietas, laxativos, lavagens) ou cirúrgico (hemi-colectomia), dependendo do estágio da doença. Em relação à forma indeterminada crônica, o tratamento é expectante.

2.1.8 Comorbidades associadas à DC

Nas últimas décadas diversos trabalhos têm caracterizado os pacientes com DC apresentando inúmeras comorbidades associadas à forma crônica da doença, destacando-se as doenças circulatórias e metabólicas. Guariento e colaboradores; (2009) avaliaram prospectivamente 2.497 pacientes e observaram que 63,8% apresentaram algum tipo de doença associada, com maior prevalência (20,6%) para hipertensão arterial sistêmica (HAS), seguido de diabetes mellitus (1,1%). Da mesma forma, Pereira e colaboradores (2015) relataram que 86,6% dos pacientes com DC crônica apresentavam pelo menos uma comorbidade, sendo 67% HAS e 31,9% dislipidemia. Kamiji e colaboradores (2005) observaram cardiopatia hipertensiva, doença coronariana ou doença valvular em 29,5% dos pacientes com DC crônica, sendo que em 26,5% houve coexistência de miocardiopatia chagásica e outra cardiopatia.

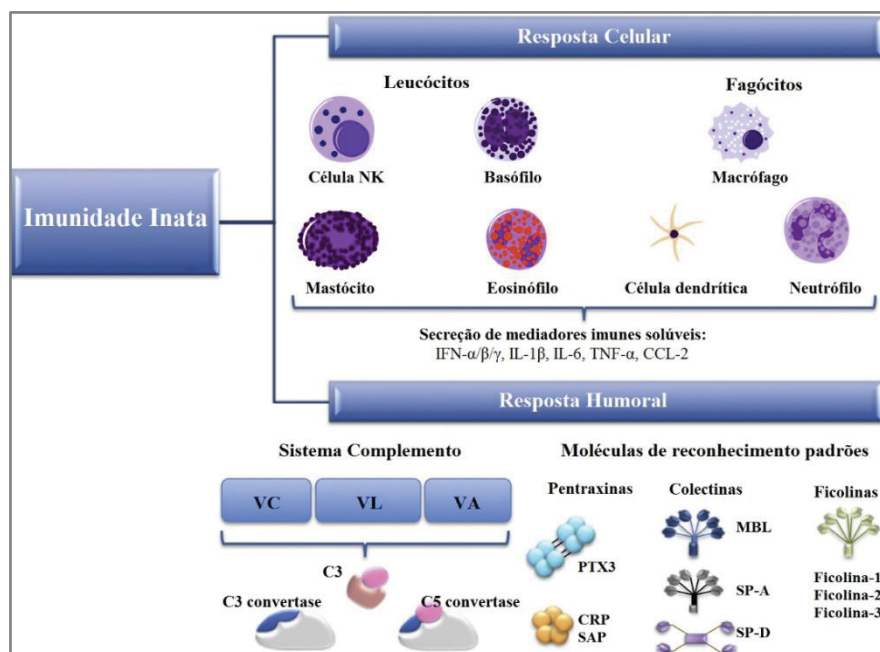
Além disso, o desenvolvimento de doença cerebrovascular associada à HAS (GURGEL et al., 2003) e dislipidemia foram relatados em pacientes chagásicos idosos (PEREIRA et al., 2015; GUARIENTO et al., 2002). Adicionalmente, necropsias de 92 pacientes idosos com DC revelaram HAS (37%), aterosclerose (62%) e cardiopatia isquêmica (6,5%) (OLIVEIRA et al., 2001), indicando uma sobreposição entre essas comorbidades e a DC. Navarro e colaboradores (2013) relataram 75,7% de dislipidemia em pacientes com forma indeterminada, sugerindo um maior risco de progressão para o estágio sintomático da doença. Assim, esses achados indicam que a dislipidemia e/ou a aterosclerose podem ter influência direta na sobrevida do paciente, uma vez que uma das principais causas de mortalidade no paciente com DC crônica é a morte súbita (RASSI JR; RASSI; RASSI, 2001). Recentemente, uma metanálise demonstrou uma elevada mortalidade para pacientes com DC, sintomáticos e assintomáticos, quando comparados aos controles, sendo a morte

súbita/doenças cardiovasculares e transplante cardíaco as principais causas (CUCUNUBÁ et al., 2016).

2.2 RESPOSTA IMUNE E O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores ou produtos de lesão celular, caracterizado por uma cascata de proteínas regida pela interação bidirecional entre efetores celulares e humorais. O braço humoral da imunidade inata inclui o sistema complemento, bem como moléculas de reconhecimento padrões (PRMs); enquanto o braço celular inclui uma variedade de células, como leucócitos e fagócitos (FIGURA 11). Entre os PRMs, os membros das famílias das pentraxinas e ficolinas têm sido intensamente estudados nos últimos anos (FOO et al., 2015).

FIGURA 11 – RESPOSTA CELULAR E HUMORAL DA IMUNIDADE INATA.

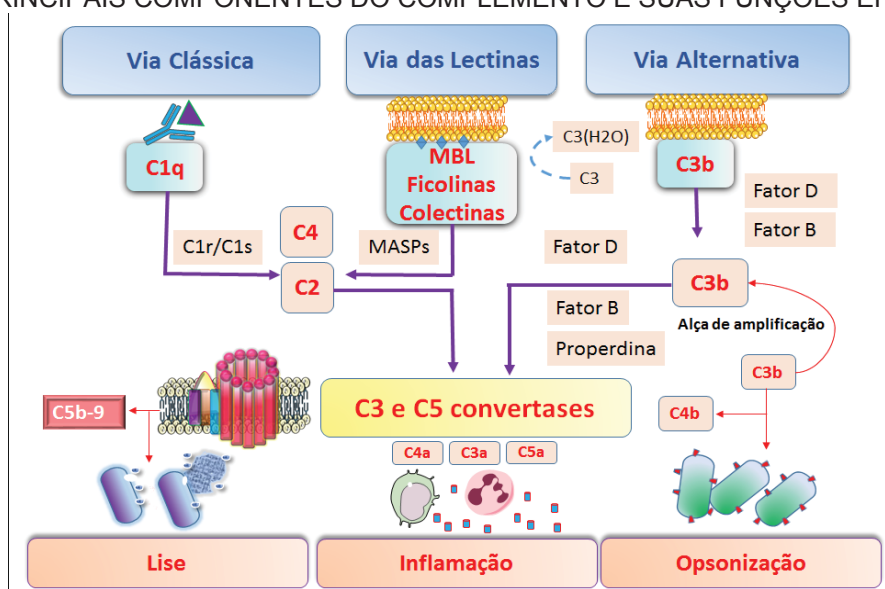


FONTE: Adaptado de FOO et al., 2015

NOTA: A resposta celular é composta de células imunes, como leucócitos e fagócitos, bem como mediadores imunes secretados por estas células. A resposta humoral é composta da cascata do complemento [vias clássica (VC), das lectinas (VL) e alterNativa (VA)] e moléculas de reconhecimento padrões (PRMs). A interface entre a resposta celular e humoral da imunidade inata é crucial para uma resposta imediata no sentido de estimular e facilitar a resposta imune adaptativa. SAP: componente amilóide P; MBL: lectina ligadora de manose; SP-A: proteína surfactante A; SP-D proteína surfactante D.

O sistema complemento é um componente chave da imunidade inata, e apresenta um papel significativo na primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Compreende mais de 35 proteínas plasmáticas e de membrana celular e pode ser ativado principalmente por três vias: lectina (VL), clássica (VC) e alternativa (VA), resultando em importantes respostas biológicas como inflamação, fagocitose e lise de patógenos (RICKLIN et al., 2010). A ativação do complemento leva a uma potente resposta inflamatória por meio da formação de anafilatoxinas (C3a, C4a, C5a) que recrutam e estimulam neutrófilos, macrófagos e outras células fagocitárias para o local de ativação (GASQUE, 2004; RICKLIN; REIS; LAMBRIS, 2016). Além disso, o sistema complemento conecta as respostas inatas e adquiridas através da ativação de linfócitos B e síntese de imunoglobulinas (RICKLIN; REIS; LAMBRIS, 2016; WALPORT, 2001). Também desempenha um papel importante na solubilização e remoção de complexos imunes circulantes evitando a sua deposição, e consequentemente lesões teciduais (MILLER; NUSSENZWEIG, 1974). O complemento também está envolvido na opsonização de células apoptóticas, contribuindo para a sua fagocitose e remoção (FLIERMAN; DAHA, 2007) (FIGURA 12).

FIGURA 12 – PRINCIPAIS COMPONENTES DO COMPLEMENTO E SUAS FUNÇÕES EFETORAS.



FONTE: Adaptado de ANDRADE et al., 2017

NOTA: A ativação da VC requer um complexo antígeno-anticorpo na superfície do patógeno, que se liga a C1 (C1q, C1r, C1s). A VL reconhece a manose ou resíduos acetilados presentes na superfície de patógenos que conduzem à ativação do complexo MBL/Ficolina/Colectina-11 (CL-K1) - MASPs. Ambas as vias induzem a formação da C3 convertase C4b2a. A VA é permanentemente ativada por hidrólise espontânea de C3 em C3(H₂O), que pode se ligar ao Fator B, que é, então clivado pelo Fator D, produzindo a C3 convertase C3bBb. A ativação do complemento leva à opsonização e fagocitose de patógenos por deposição de C3b e C4b, lise bacteriana pela formação de complexos C5b-9 e inflamação por C4a, C3a e C5a levando ao recrutamento de células imunes, e ativação de células endoteliais.

2.2.1 Vias de ativação

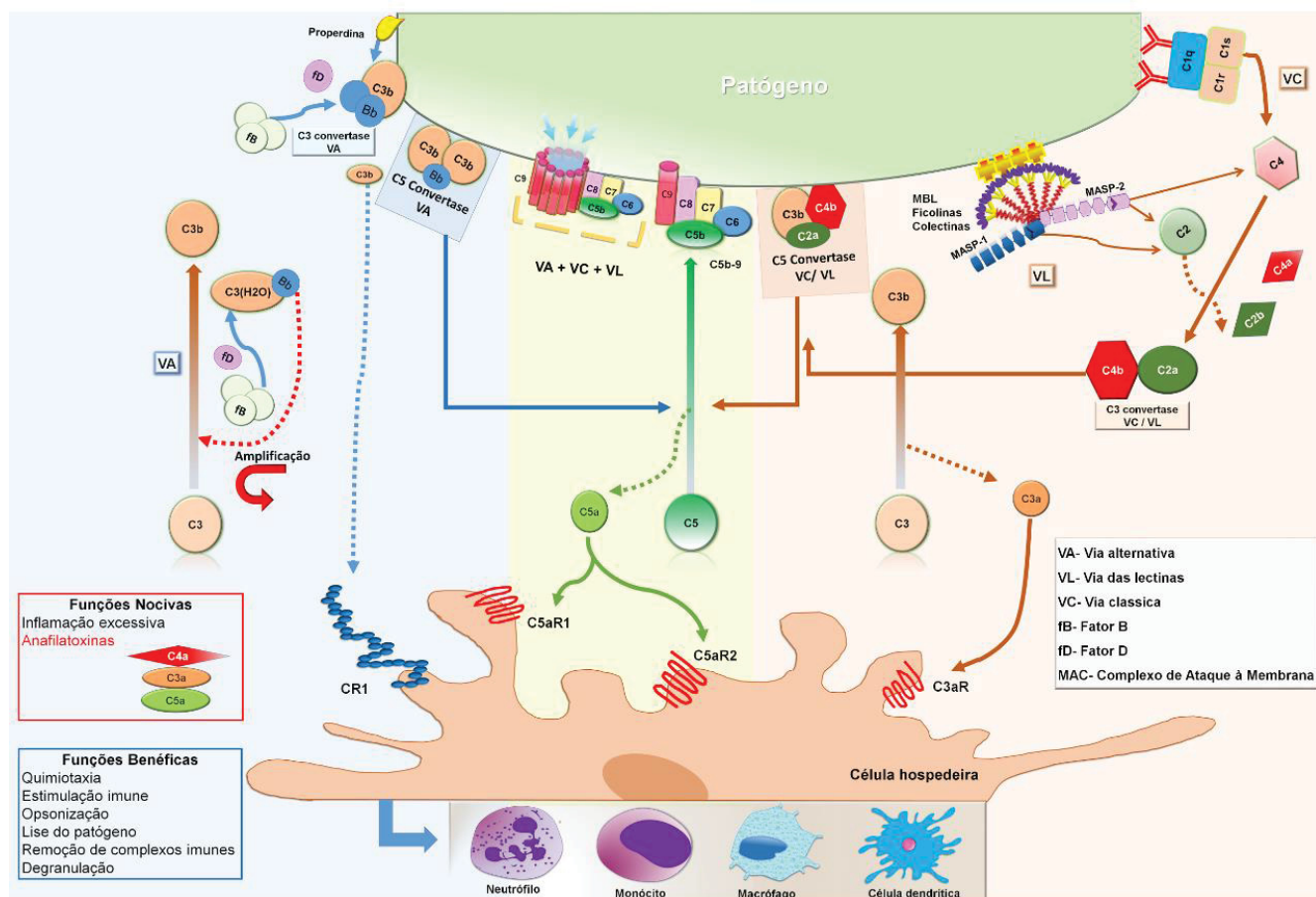
A ativação do complemento pelas três vias, VL, VC e VA, leva à geração de moléculas efetoras, auto-amplificação e indução de sinalização imunológica (RICKLIN et al. 2010). A VL pode ser ativada por meio da ligação de PRMs, tais como lectina ligante de manose (MBL), ficolinas (ficolina-1 [ou ficolina-M], ficolina-2 [ou ficolina-L] e ficolina-3 [ou ficolina-H]) e colectina 11 (CL-K1), à padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície do patógeno (BELTRAME et al., 2015). Enquanto que os domínios de reconhecimento de carboidratos na molécula de MBL se ligam a porções de açúcar na superfície do patógeno (tais como D-manose, glucose, L-fucose e N-acetil-D-glucosamina [GlcNAc]) (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992), as três ficolinas ligam-se a PAMPs por domínios de reconhecimento do tipo fibrinogênio e apresentam diferenças nas suas especificidades de ligação (GOUT et al., 2010). A Ficolina-1 reconhece compostos N-acetilados (tais como GlcNAc e N-acetilgalactosamina [GalNAc]) (FREDERIKSEN et al., 2005), compostos O-acetilados e glicanos contendo ácido siálico (GOUT et al., 2010). A Ficolina-2 também reconhece compostos N-acetilados e cepas capsuladas de bactérias (GOUT et al., 2010), enquanto a ficolina-3 liga-se a GalNAc, GlcNAc, D-fucose como mono/oligossacarídeos e lipopolissacarídeos (SUGIMOTO et al., 1998). Além disso, a CL-K1 detecta derivados de produtos microbianos contendo manose e fucose (KESHI et al., 2006). Após a ligação de MBL, ficolinas ou CL-K1 a PAMPs, a VL é iniciada pela ativação de serino proteases associadas à MBL (MASP-1 e MASP-2) resultando na clivagem de C2 em C2a e C2b pela MASP-1; e além da clivagem de C2, MASP-2 também cliva C4 em C4a e C4b (KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013), culminando com a formação da C3 convertase (C4b2a) e, posteriormente, da C5 convertase (C4bC2aC3b) da VL (MERLE et al., 2015; WALPORT, 2001).

A ativação da VC depende principalmente da interação de C1 com complexos antígeno-anticorpo ou, alternativamente, por PAMPs (lipopolissacarídeos e porinas de bactérias gram-negativas), fosfolipídios, células apoptóticas (fosfatidilserina) ou pentraxinas (proteína C reativa e pentraxina 3), entre outros (KISHORE et al., 2004). O complexo C1 é formado por uma molécula de C1q e duas moléculas de C1r e de C1s (C1qC1r₂C1s₂). C1q inicia a ativação da VC pela ligação a domínios CH3 ou CH2 presentes na região Fc de IgM e IgG, respectivamente, induzindo uma alteração conformacional em C1q. Isso leva à ativação das serino proteases C1r e C1s, em que

C1r se auto-ativa e ativa C1s, enquanto C1s cliva C4 e C2 (LÖRINCZ et al., 2000), formando as C3 e C5 convertases (C4b2a e C4bC2aC3b) semelhantes às geradas na VL (RICKLIN et al., 2010).

A ativação da VA começa com a hidrólise espontânea de uma ligação tioéster intracadeia alfa de C3, gerando C3(H₂O). Esta molécula exibe um sítio reativo para o fator B (FB), formando o complexo C3(H₂O)B. Nesta condição, o FB pode ser clivado pelo fator D (FD) em Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a C3(H₂O), formando a primeira C3 convertase da VA (C3(H₂O)Bb), que agora exibe atividade de serino protease clivando outras moléculas de C3 em C3a e C3b. Da mesma forma que C3(H₂O), o fragmento C3b exibe sítio reativo para a ligação de FB permitindo a sua clivagem por FD, resultando na segunda C3 convertase desta via, C3bBb. Adicionalmente, C3b liga-se a C3bBb formando o complexo C3bBbC3b, um complexo com atividade C5 convertase (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (FIGURA 13).

FIGURA 13 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO NA PRESENÇA DE PATÓGENO

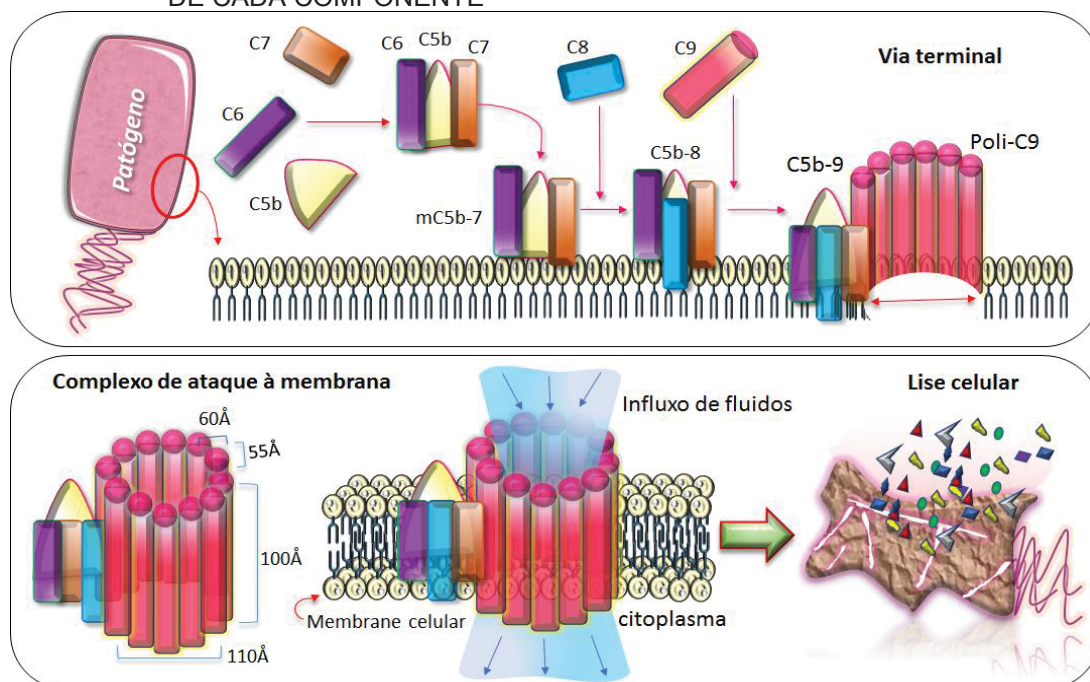


FONTE: o autor.(2017)

NOTA: A MBL e as ficolinas reconhecem e ligam-se à glicoproteínas e carboidratos presentes na superfície do patógeno iniciando a VL. Esta interação conduz a alterações conformacionais em MBL e ficolinas que levam a ativação da MASP-1 seguida de MASP-2 que cliva C4 em C4a e C4b; e C2 em C2a e C2b gerando a C3 convertase (C4b2a). Na presença de anticorpos anti-*T. cruzi* específicos, as moléculas C1q reconhecem e se ligam a IgM e IgG na superfície do parasito iniciando a VC. Depois que C1q sofre alterações conformacionais, ativa C1r que, por sua vez, cliva e ativa C1s que cliva subsequentemente C4 e C2 gerando a C3 convertase (C4b2a). Quando C3b se liga ao complexo C4b2a gerando C4b2aC3b, com atividade C5 convertase. A VA é iniciada pela hidrólise espontânea de C3, formando C3(H₂O), ou como consequência da alça de amplificação desencadeada pela ativação da VL e VC. Uma vez que FB se liga a C3(H₂O), o FB pode ser clivado por FD em Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a C3(H₂O) formando a primeira C3 convertase da VA (C3 (H₂O) Bb) que cliva C3 em C3a e C3b. C3b tem também um local para a ligação do FB, permitindo a clivagem pelo FD, o que resulta na formação da segunda C3 convertase da VA, C3bBb. Moléculas de C3b adicionais se ligam ao complexo C3bBb3b formando C3bBb3bn, que exerce actividade C5 convertase. Ambas as C5 convertases da VL/VC e AP clivam o componente C5 em C5a e C5b. O recém formado C5b inicia a formação do complexo de ataque de membrana (MAC) que, por sua vez, induz a lise das membranas alvo. Além disso, como consequência de todas as vias, são formados os pequenos fragmentos C4a, C3a e C5a, que são anafilatoxinas potentes, atraindo e ativando células inflamatórias para o local de ativação, tais como neutrófilos, monócitos macrófagos e células dendríticas.

Uma vez que as três vias são ativadas, as C5 convertases formadas pelas VC/VL (C4b2a3b) e pela VA (C3bBb3b) clivam C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b liga-se a C6, formando um complexo estável C5b6, que recruta C7 resultando num complexo hidrofóbico que se dirige às membranas celulares (mC5b-7). Depois de C8 ser incorporado a mC5b-7, o complexo C5b678 insere-se na membrana celular e a adição de 12-18 cópias da molécula C9, resultante da polimerização das mesmas (por pontes dissulfeto), forma uma estrutura em anel. Esta estrutura em anel tem a capacidade de formar poros caracterizando o complexo de ataque à membrana (MAC) (C5b678(9)_n), inserido na célula como um canal transmembrana, favorecendo o desequilíbrio iônico e um aumento no volume intracelular que conduz à ruptura da membrana das células (KONDOS et al., 2010) (FIGURA 14).

FIGURA 14 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC) E FUNÇÕES DE CADA COMPONENTE



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

FONTE: o autor.(2017)

NOTA: As três vias do complemento convergem para a ativação da molécula de C5 e conduzem à formação da C5 convertase, que cliva C5 e forma C5a (anafilatoxina) e C5b, que liga sua cadeia alfa à C6 para formar C5b6, o que leva C6 a sofrer alteração conformacional com capacidade de interagir com os domínios hidrofóbicos da bicamada lipídica. A interação de C7 com a cadeia alfa de C5b em C5b6 resulta no complexo C5b-7, com uma transformação anfifílica da molécula C7 para produzir um complexo com afinidade por lipídios. A cadeia beta de C8 liga-se ao C5b de C5b-7 associada à membrana e conduz à formação de C5b-8. A ligação de C9 a C5b-8 produz o complexo C5b-8,9, que é então seguido pela incorporação mais lenta de múltiplas moléculas de C9 para formar a polimerização C5b-8,9n através C9-C9, incorporando até 16 moléculas de C9. *C5a não participa da formação do MAC.

Considerando que a ativação exacerbada do complemento pode levar a inflamação e danos nos tecidos, é necessário um sistema eficaz e preciso de moléculas reguladoras para a manutenção da sua homeostase. Neste contexto, uma variedade de proteínas de membrana (tais como o receptor do complemento 1 [CR1], CD59, CD46 e fator de aceleração do decaimento [DAF ou CD55]) regulam negativamente a ativação local do complemento, protegendo as células hospedeiras

da lise pelo complemento (CARROLL; SIM, 2011; NORIS; REMUZZI, 2013). Além disso, várias proteínas plasmáticas [tais como Fator H (FH), Fator I (FI), Inibidor da C1 esterase (C1-INH), proteína de ligação a C4b (C4BP) e vitronectina] controlam a ação de componentes e complexos solúveis do complemento (CARROLL; SIM, 2011; NORIS; REMUZZI, 2013). Em geral, a ativação excessiva ou defeituosa do complemento pode estar implicada na patogênese de doenças autoimunes, inflamatórias crônicas e infecciosas (RICKLIN; LAMBRIS 2013).

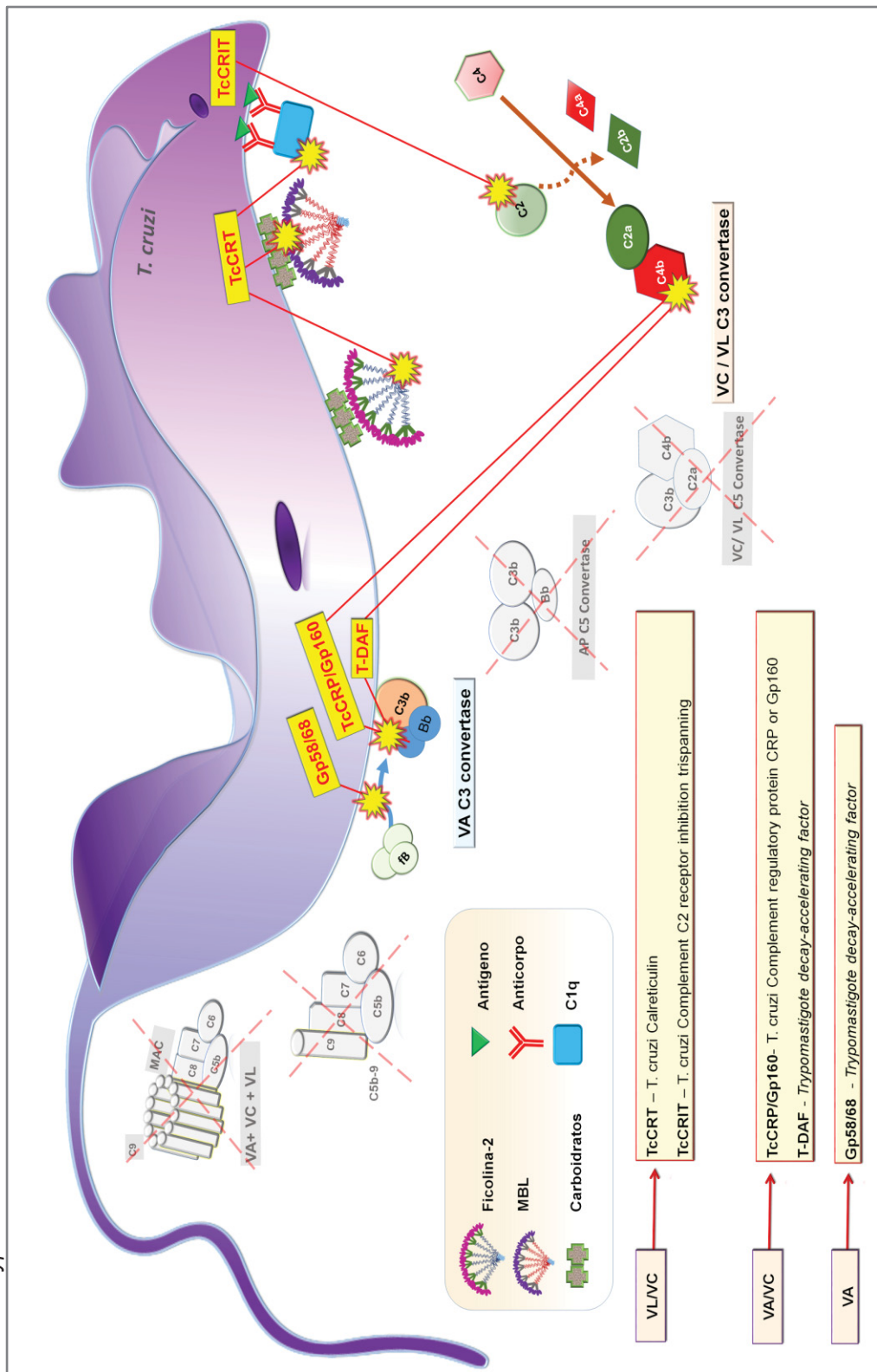
2.3 O SISTEMA COMPLEMENTO NA DOENÇA DE CHAGAS

Embora a maioria das pessoas infectadas pelo *T. cruzi* permaneça assintomática durante toda a vida, a interação parasito-hospedeiro parece ser crucial para o desenvolvimento da DC e para a gravidade das formas crônicas sintomáticas. Neste contexto, o sistema complemento desempenha um papel importante como primeira linha de defesa imune do hospedeiro promovendo o reconhecimento, opsonização e lise direta de patógenos invasores. Entretanto, durante a infecção humana pelo *T. cruzi*, a ativação do complemento pode apresentar um papel duplo nas fases aguda e crônica da DC, sendo inicialmente crucial no controle da parasitemia, porém mais tarde na fase crônica pode contribuir para o desenvolvimento ou gravidade das formas sintomáticas devido ao seu efeito pró-inflamatório (BOLDT, LUZ, e MESSIAS-REASON 2011; LUZ et al. 2013; LUZ et al. 2016; WEITZEL et al. 2012). Além disso, Luz e colaboradores (2016) observaram associação entre a deficiência de MBL e a proteção contra o desenvolvimento e progressão da CCC.

Considerando que a ativação do complemento pelas VL, VC e VA leva a uma cascata proteolítica e, em última instância, a um poderoso efeito lítico, este sistema é um alvo especial para estratégias de evasão utilizadas por patógenos para assegurar o sucesso da infecção (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008) e possivelmente a progressão para doença crônica, como ocorre na DC. De fato, *T. cruzi* exibe uma gama de diferentes estratégias para contornar os efeitos nocivos do complemento possibilitando a sobrevivência do parasito e o desenvolvimento da DC (LIDANI et al., 2017) (FIGURA 15). Porém, é importante ressaltar que da mesma forma que componentes do complemento são importantes alvos para a evasão do parasito, o entendimento dessas moléculas durante a infecção chagásica crônica pode contribuir

para a identificação de marcadores moleculares de progressão clínica para as formas sintomáticas da DC, principalmente a CCC.

FIGURA 15 – *Trypanosoma cruzi* E SUAS ESTRATÉGIAS PARA EVASÃO DO COMPLEMENTO.



FONTE: o autor.(2017)

NOTA: TcCRT bloqueia a VC e LV por se ligar a C1q, MBL e ficolina-2; T-DAF e Gp160/TcCRP bloqueiam a montagem da C3 convertase da VA e VC; TcCRIT bloqueia a VC e VL por se ligar à C2; Gp58/68 bloqueia a C3 convertase da VA por se ligar ao fator B. VC: via clássica; VL: via das lectinas; VA: via alternativa.

Nesse contexto, algumas moléculas cruciais para a resposta imune que ainda não foram estudadas na DC, como Pentraxina 3 (PTX3), Ficolina-3, e o Fator H (FH) podem apresentar-se como potenciais marcadores da DC ou da CCC, com possível influência nos parâmetros cardiometabólicos observados em pacientes com DC crônica. A PTX3, pertencente à família da CRP, tem sido associada às doenças cardiovasculares por atuar no processo inflamatório e interagir com produtos metabólicos (PRESTA et al., 2007); a ficolina-3 é a proteína mais abundante da VL, o que pode ter relação direta com seu efeito na resposta imune diante da infecção pelo *T. cruzi* (ZACHO et al., 2012); e o FH, por ser uma molécula reguladora do complemento no plasma, células hospedeiras e tecidos, em particular nos locais de inflamação tecidual, após lesão ou durante a degeneração, além de ter sítio de ligação para o parasito (JOINER et al., 1986; FERREIRA et al., 2014).

2.3.1 Pentraxina 3

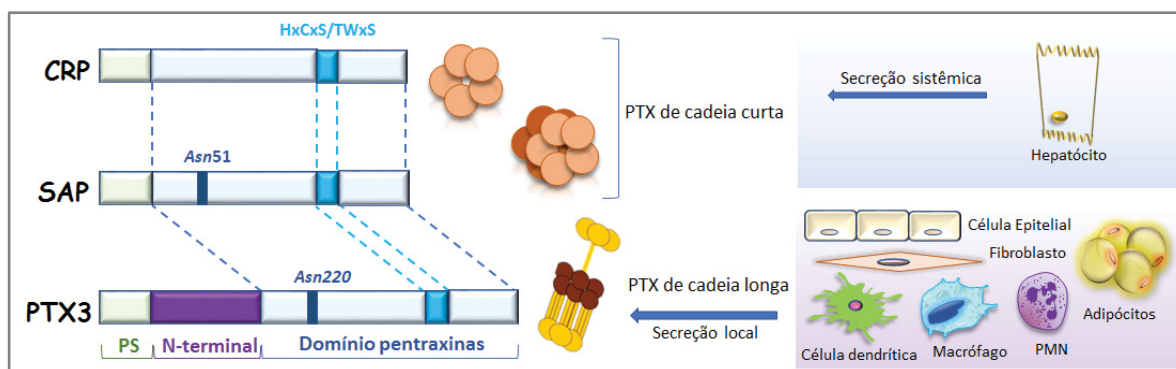
2.3.1.1 Estrutura e funções

As pentraxinas são uma superfamília de moléculas de fase fluida, caracterizadas por uma estrutura multimérica cíclica, que atuam como PRM. Trata-se de um grupo de proteínas filogeneticamente conservadas que partilham um domínio C-terminal de cerca de 200 aminoácidos conhecido como "domínio das pentraxinas" e uma sequência conservada de 8 aminoácidos conhecida como "assinatura das pentraxinas" (HxCxS/TWxS, sendo "x" qualquer aminoácido) (GARLANDA et al., 2005). De acordo com a constituição e organização estrutural as pentraxinas são classificadas em curtas ou longas.

As pentraxinas de cadeia curta, representadas pela proteína C reativa (CRP ou PTX1) e pelo componente amilóide P (SAP ou PTX2), são secretadas inicialmente por hepatócitos em resposta à estímulos pró-inflamatórios (IL-1, IL-17 e, principalmente, IL-6). Os genes que codificam CRP (*CRP*) e SAP (*APCS*) estão localizados no cromossomo 1q23.2 (FLOYD-SMITH et al., 1986), onde *CRP* consiste de dois éxons e dois íntrons (LEI et al., 1985; WOO; KORENBERG; WHITEHEAD, 1985); enquanto *APCS* apresenta dois éxons e um íntron (FLOYD-SMITH et al., 1986). CRP e SAP

apresentam estrutura quaternária com cinco ou dez protômeros idênticos de 23-kDa dispostos em uma simetria radial pentamérica (EMSLEY et al., 1994). Após a dissociação da estrutura quaternária, CRP sofre mudança conformacional espontânea e irreversível (DIEHL et al., 2000), resultando na forma monomérica (mCRP) que apresenta solubilidade reduzida, e tem sido encontrada em ateroma de carótida e aorta (KRUPINSKI et al., 2006). Durante a fase aguda de processos infecciosos, concentrações elevadas de CRP e SAP podem levar à consequente ativação do sistema complemento devido a interação com C1q (CRP e SAP), ficolinas (CRP) e FH (CRP), resultando na remoção de debris celulares (NAUTA et al., 2003) (FIGURA 16).

FIGURA 16 – ESTRUTURA DE CRP, SAP E PTX3, COM AS CÉLULAS QUE AS SECRETAM.



FONTE: o autor (2017).

NOTA: As pentraxinas curtas CRP e SAP apresentam 224 e 126 aminoácidos, respectivamente, e são sintetizadas por hepatócitos. A PTX3 (pentraxina longa) apresenta uma porção N-terminal alongada que difere das demais pentraxinas; e compartilha um domínio carboxiterminal comum (domínio pentraxina), no qual a sequência de 8 aminoácidos conservados (HxCxS/TWxS) é conhecida como “assinatura das pentraxinas”. A PTX3 apresenta um único sítio de glicosilação ligado ao N presente no resíduo Asn220 associado à diferentes tipos de células inflamatórias e/ou estímulos inflamatórios que induzem a produção de PTX3. Essa glicosilação permite que PTX3 amplie sua interação com outras moléculas, como componentes do complemento. PS- peptídeo sinal, PTX- pentraxina, PMN- polimorfonucleares.

A Pentraxina 3 (PTX3), descrita no início da década de 1990, é considerada o protótipo das pentraxinas de cadeia longa, diferindo das pentraxinas curtas pela sua localização cromossômica, expressão gênica, fonte celular e ligantes (GOODMAN et al., 1996). O gene *PTX3* está localizado no cromossomo 3q25 e organizado em três exons separados por dois íntrons, onde os dois primeiros éxons codificam para o peptídeo líder e o domínio N-terminal da proteína, respectivamente; enquanto o

terceiro éxon codifica o domínio pentraxina (BASILE et al., 1997; BREVIARIO et al., 1992). PTX3 apresenta 381 aminoácidos e constitui-se de uma estrutura octamérica, composta de dois tetrâmeros ligados por ponte dissulfeto, com um domínio C-terminal comum à família das pentraxinas; e um longo domínio N-terminal (INFORZATO et al., 2010). Sua expressão é rapidamente induzida por diversas células hematopoiéticas e estromais, principalmente em resposta a estímulos pró-inflamatórios de TNF- α e IL-1b, como monócitos, macrófagos, células de músculo liso, células epiteliais renais e alveolares, células sinoviais, células gliais, condrócitos, e adipócitos, bem como fibroblastos e células endoteliais (MANTOVANI et al., 2008). A PTX3 tem a capacidade de se ligar a uma série de moléculas, incluindo as três vias do complemento [VC (C1q), VL (ficolinas e MBL) e VA (FH)]. A influência da PTX3 sobre o complemento depende da forma que a mesma se encontra: livre (circulante) ou associada à matriz extracelular, o que determina seus efeitos nas funções endoteliais. Quando associada à matriz tem a capacidade de induzir a ativação de componentes da VC pela ligação da PTX3 à superfície de células apoptóticas junto com C3b/iC3b (KUNES et al., 2007). Por outro lado, a ligação da PTX3 (forma livre) à C1q impede a ativação de outros componentes do complemento e a formação de complexos C1q/imunoglobulina (KUNES et al., 2007; PRESTA et al., 2007).

Posteriormente à PTX3, outras moléculas com características semelhantes (uma porção carboxi-terminal relacionada à CRP e SAP e uma porção N-terminal diferente) foram identificadas e passaram a fazer parte do grupo das pentraxinas longas: apexina ou PTX4, as pentraxinas neurais Pentraxina 1 (NP1 ou NPTX1) e 2 (NP2 ou NPTX2) e o NPR (*neuronal pentraxin receptor*) (GARLANDA et al., 2005; GEWURZ; ZHANG; LINT, 1995).

2.3.1.2 Pentraxina 3 e doenças

A PTX3 tem sido intensamente estudada em doenças cardiovasculares como um marcador molecular da atividade inflamatória, interagindo com fatores da angiogênese e remodelamento vascular [fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2)] e P-selectina. Interessantemente, lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*- HDL) e IL-10 têm sido associados a modulação na expressão da PTX3,

sugerindo um papel crucial no balanço entre propriedades anti e pró-inflamatórias (MALLAT; TEDGUI, 2008; NORATA et al., 2008), o que pode ter uma influência direta na fisiopatologia da aterosclerose. Slusher e colaboradores (2016) demonstraram *in vitro* um aumento de PTX3 e IL-10 após estimulação de células mononucleares na presença de palmitato, ácido graxo de cadeia longa, porém não houve secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1b, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α), indicando papel da PTX3 como um contra-regulador no desenvolvimento da aterosclerose. Por outro lado, a PTX3 pode interferir com a estabilidade da placa de ateroma por ligar-se ao FGF2, que atua na proliferação e migração de células de músculo liso (BASSI et al., 2009). A PTX3 tem sido evidenciada como marcador precoce de doença cardiovascular, como infarto agudo do miocárdio (SUZUKI et al., 2008) e fibrilação atrial (HOLUBCOVA et al., 2016).

Além disso, PTX3 também tem sido estudada em diversas doenças infecciosas, autoimunes e oncológicas. Diante de um quadro infeccioso PTX3 tem a capacidade de se ligar à membrana externa de determinados patógenos, como fungos (*Aspergillus fumigatus*), bactérias (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitides*, *Escherichia coli uropatogênica*) e vírus (citomegalovírus e cepas H3N2 do vírus Influenza A), modulando uma resposta imunopatológica, tanto no sentido de ativar mecanismos antimicrobianos como contribuir para o estabelecimento da infecção (DEBAN et al., 2011; MOALLI et al., 2011). Ainda não foi demonstrada a capacidade de ligação da PTX3 à protozoários, incluindo *T. cruzi*. Em relação às doenças autoimunes, PTX3 foi associada à artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla e fibromialgia (HUANG et al., 2016). Estudos recentes revelaram o papel da PTX3 também como oncoproteína supressora extrínseca, capaz de ajustar a inflamação relacionada ao câncer (LEALI et al., 2011).

2.3.2 Fator H

2.3.2.1 Estrutura e funções

A eficácia da resposta imune mediada pelo complemento depende de um delicado equilíbrio entre ativação e regulação. Embora a geração contínua da

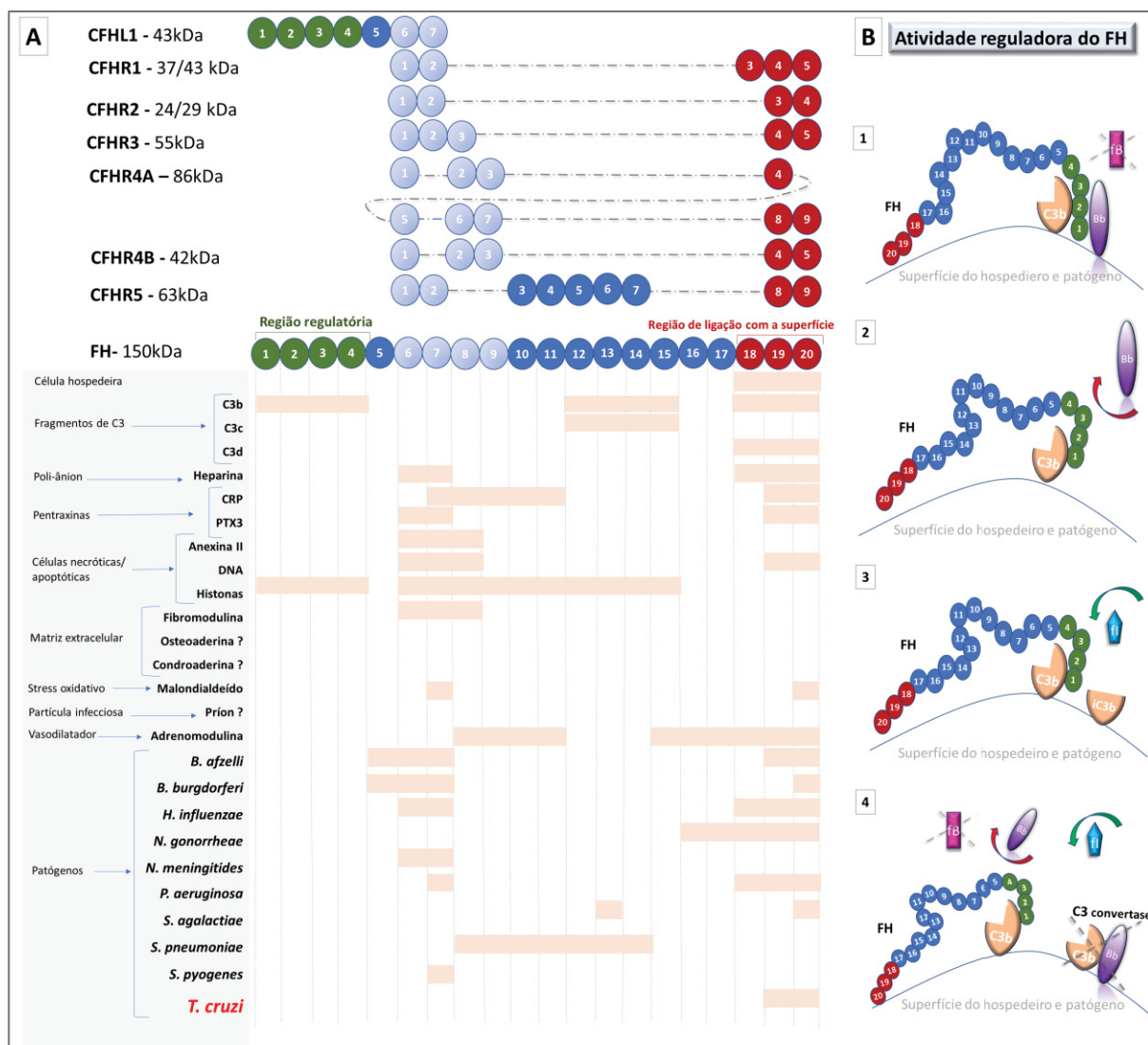
opsonina C3b pela VA permita uma reação rápida frente a células exógenas ou alteradas, a sua deposição indiscriminada pode causar dano tecidual no hospedeiro. Nesse sentido, proteínas do complemento atuam regulando constantemente a geração de novos fragmentos C3b por meio da aceleração do decaimento das C3 convertases, ou como cofatores para o fator I (FI) na degradação de C3b existente; ambas funções relacionadas à atividade do fator H (FH), principal regulador solúvel da VA do complemento (WU et al., 2009).

O FH é uma glicoproteína plasmática de 150 kDa (~150–550 µg/ml) de cadeia simples composta por 20 domínios (RIPOCHE et al., 1988; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA et al., 2004). Estes são denominados de repetições de consenso curto (SCRs- *short consensus repeats*) ou módulos de proteína de controle de complemento (CCPs- *complement-control-protein*). Cada um destes domínios globulares dobráveis e independentes é composto por aproximadamente 60 aminoácidos, estabilizados por duas ligações dissulfeto internas (MALE et al., 2000). Os primeiros quatro domínios (SCR1-4) de FH são necessários para a regulação do complemento na fase fluida, enquanto a especificidade de ligação das células hospedeiras é determinada pelos domínios SCR5-20 (SCHMIDT et al., 2008). FH é codificado pelo gene *CFH*, localizado no cromossomo 1q32 (RODRIGUEZ DE CORDOBA; LUBIN; ATKINSON, 1985), onde também se encontram os genes *CFHR1-CFHR5* (*Complement factor H related proteins*), que codificam cinco proteínas menores e menos abundantes relacionadas com *CFH* (ZIPFEL et al., 1999); e o gene *CFHL1* (*Complement factor H like 1*) (FIGURA 17A), com evidências de papel regulador no complemento, porém suas propriedades fisiológicas ainda não estão claras (ZIPFEL; SKERKA, 1994).

O FH é constitutivamente expresso no fígado e por diferentes tipos celulares como monócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, plaquetas e células epiteliais de pigmento retiniano (FERREIRA; PANGBURN; CORTÉS, 2010). Essa liberação local de FH nos tecidos pode ajudar a limitar a ativação do complemento e manter um ambiente anti-inflamatório. O FH regula a ativação do complemento por (i) inibição da montagem das enzimas C3 e C5 convertases da VA através da competição com o fator B para a ligação C3b; (ii) facilitar a desmontagem das convertases deslocando o fator Bb ligado; e (iii) atuar como um cofator para o fator I da serino

protease na clivagem e inativação de C3b à iC3b ("atividade cofatora") (GROS; MILDER; JANSSEN, 2008; RICKLIN et al., 2010) (FIGURA 17B). Estas atividades reguladoras são mediadas pelos quatro domínios N-terminal SCRs 1-4, enquanto os domínios C-terminal SCRs 18-20 são responsáveis pelo reconhecimento do alvo (CÓRDOBA; DE JORGE 2008). Um dos alvos importantes para a ligação do FH na vizinhança de C3b nas células hospedeiras são moléculas de superfície poli-aniônicas, como glicosaminoglicanos e ácido siálico, que aumentam a afinidade do FH para C3b (MERI; PANGBURN, 1990). Assim, além de suas atividades reguladoras na fase fluida, o FH também é capaz de controlar a ativação do complemento nas auto-superfícies (PERKINS et al., 2012). Em contraste, as moléculas poli-aniônicas semelhantes a hospedeiros normalmente não estão presentes na superfície dos patógenos, tornando-os suscetíveis ao ataque do complemento.

FIGURA 17 – FH, SEUS LIGANTES E FUNÇÕES NO SISTEMA COMPLEMENTO.



FONTE: o autor (2017)

LEGENDA: A: Estrutura do FH, CFHL1 (Complement factor H like 1) e CFHR (Complement factor H related proteins), composta exclusivamente por repetições de consenso curto (SCRs). FH apresenta 20 domínios SCR, com as duas principais regiões funcionais localizadas na porção N-terminal (região reguladora do complemento) e na C-terminal (região de ligação com a superfície). As proteínas CFHR (CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 e CFHR5) foram alinhadas com os domínios do FH conforme a sequência de aminoácidos, com homologia predominante nos SCRs 6-9 e no domínio C-terminal. CFHL apresenta maior semelhança em relação à região N-terminal. Diversas moléculas se ligam à determinados SCRs do FH, como fragmentos de C3, poli-ânions, pentraxinas, células necróticas/apoptóticas, matriz extracelular, produtos do estresse oxidativo, príon, e vasodilatadores; além de inúmeros patógenos, incluindo o *T. cruzi*. B: A atividade reguladora do FH pode ser devido (1) à competição com o fator B (fB) pelo sítio de ligação com C3b; (2) ao deslocar o Bb ligado ao C3b; (3) ou facilitar a ligação do fator I (fI) e gerar iC3b; (4) impedindo a formação da C3 convertase, e consequentemente, C5 convertase e MAC.

2.3.2.2 Fator H e doenças

A importância do FH na manutenção de uma resposta imune bem regulada tem sido ratificada pelo número crescente de doenças com forte associação à mutações e polimorfismos no gene *CFH*, incluindo degeneração macular relacionada à idade (DMRI), síndrome hemolítica urêmica atípica e glomerulonefrite membranoproliferativa do tipo II, além de aumentar a susceptibilidade à infecções microbianas recorrentes e facilitar a evasão de células tumorais do sistema imune diante da deficiência da proteína (JÓZSI et al., 2004; ZIPFEL et al., 2006). Interessantemente, vários patógenos evitam o ataque lítico do complemento expressando homólogos estruturais de FH ou recrutando o FH do hospedeiro para as suas superfícies através de proteínas que se ligam ao FH, demonstrando o seu papel vital na modulação da resposta imunológica, com possível aplicação terapêutica para doenças associadas a alterações ou perda de controle do complemento (MERI et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2009).

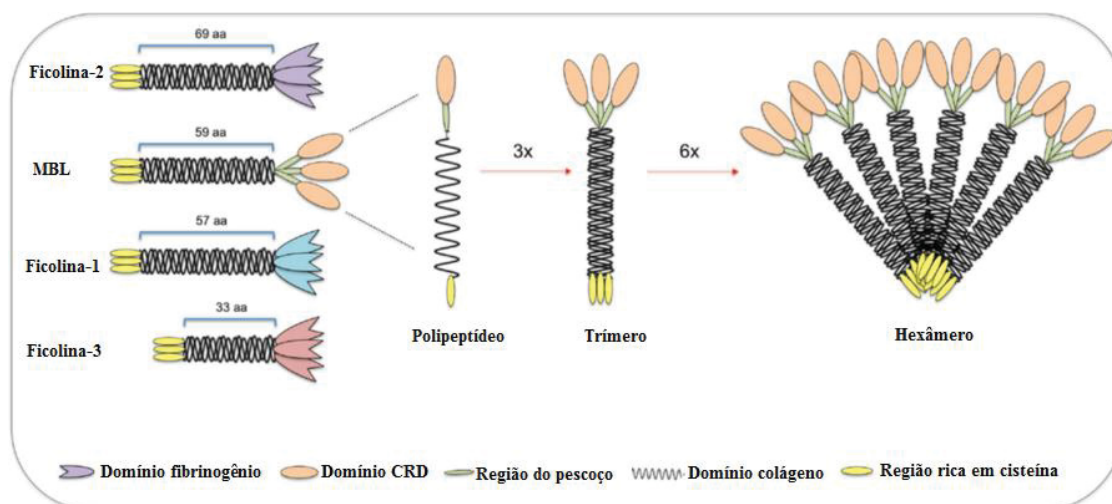
2.3.3 Ficolina 3

2.3.3.1 Estrutura e funções

As ficolinas [ficolina-1 (ou ficolina L), ficolina-2 (ou ficolina M) e Ficolina-3 (ou ficolina H)] são um grupo de lectinas multiméricas, cada uma codificada por seu próprio gene, constituídas por unidades estruturais de três polipeptídeos (trímero), composto de uma região de colágeno e três domínios do tipo fibrinogênio, onde esses trímeros podem se associar a outros trímeros e formar oligômeros com quatro a seis trímeros (REN; DING; ZHANG, 2014). As subunidades estruturais são unidas através de pontes dissulfeto nas regiões N-terminais, semelhante à MBL, caracterizadas por reconhecerem compostos acetilados (GARLATTI et al., 2009) (FIGURA 18). As ficolinas desempenham papel importante na imunidade inata por atuar como uma molécula de reconhecimento de patógenos, ativando a VL do complemento ao se associarem às MASPs, contribuindo para a opsonização e lise celular (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2011; MATSUSHITA 2010). Essa família de proteínas

também tem a capacidade de limitar a secreção de interferon- γ (IFN- γ), IL-17, IL-6, TNF- α e óxido nítrico por macrófagos (REN; DING; ZHANG, 2014), atuando como uma molécula anti-inflamatória.

FIGURA 18 – ESTRUTURA DAS FICOLINAS E MBL.



FONTE: Adaptado de BELTRAME et al., 2015.

NOTA: As ficolinas e MBL apresentam uma região N-terminal curta rica em cisteína seguida por uma sequência semelhante ao colágeno. A região C-terminal é um domínio de ligação de carboidratos para MBL (formato oval) e um domínio do tipo fibrinogênio para ficolinas (formato de tulipas). Os polipeptídeos interagem através da região semelhante ao colágeno formando hélices triplas (trímeros), que se associam adicionalmente até oligômeros (tetrâmeros a hexâmeros).

A ficolina-3 é a mais abundante PRM da VL, sua concentração plasmática média é de 25 $\mu\text{g/ml}$ (variando de 3 a 54 $\mu\text{g/ml}$), enquanto que para ficolina-2 e ficolina-1 a concentração média é de 5 $\mu\text{g/ml}$ e 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, sugerindo que entre as moléculas de reconhecimento da via da lectinas, a ficolina-3 tem importante potencial de ativação do complemento (KRARUP et al., 2007). Ficolina-3 é altamente expressa no tecido hepático e pulmonar, reconhecendo compostos acetilados (GalNAc, GlcNAc, D-fucose como mono/oligossacarídeos e lipopolissacarídeos) (SUGIMOTO et al., 1998) em uma grande variedade de microrganismos, incluindo *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, *Escherichia coli*, e *Aerococcus viridans*, além de reconhecer células apoptóticas para sinalização e depuração das mesmas (SUGIMOTO et al., 1998; TSUJIMURA et al., 2001). No entanto, ao contrário das outras duas ficolinas, a ficolina-3 não se liga a fibronectina, elastina ou zimosan (SUGIMOTO et al., 1998). Essa diversidade na especificidade de ligação pode estar

relacionada às diferenças na composição de aminoácidos na região C-terminal das ficolinas, uma vez que a ficolina-1 e a ficolina-2 são 84% homólogas com relação a sequência de aminoácidos primária do domínio semelhante ao fibrinogênio mas são apenas 50% semelhantes com os domínios C-terminais de ficolina-3 (HUMMELSHOJ et al., 2008). Entre as ficolinas, a ficolina-3 é considerada a mais antiga filogeneticamente, com 46% e 52% de identidade de aminoácidos com ficolina-1 e ficolina-2, respectivamente (GARRED et al., 2010).

2.3.3.2 Ficolina-3 e doenças

Concentrações plasmáticas aumentadas de ficolina-3 foram observadas em pacientes com aterosclerose crônica em região carotídea (ZHOU et al., 2013) e aneurisma de aorta abdominal (FERNANDEZ-GARCÍA et al., 2017), enquanto que concentrações reduzidas desta proteína foram observadas em pacientes na fase aguda de acidente vascular encefálico (FÜST et al., 2011), sugerindo o seu potencial papel como biomarcador de doenças vasculares. Ficolina-3 também foi associada a doenças autoimunes como LES, em que a concentração elevada da proteína pode relacionar-se com estímulos inflamatórios crônicos, independente da atividade da doença (HEIN et al., 2015). Por outro lado, considerando que ficolina-3 também pode mediar a remoção de células apoptóticas, debris miocárdicos e estrutura cardíacas alteradas em pacientes com insuficiência cardíaca, essa interação pode ativar o complemento levando à inflamação e dano tecidual local (PROHÁSZKA et al., 2013). Além disso, a deficiência hereditária de ficolina-3 pode levar a falhas no reconhecimento de estruturas acetiladas pelo sistema complemento, resultando em provável associação com infecções recorrentes graves e danos pulmonares (MUNTHE-FOG et al., 2009).

2.4 INFLAMAÇÃO E TECIDO ADIPOSEO

Diversos autores têm relacionado a resposta imune no contexto das doenças metabólicas, sendo o tecido adiposo o denominador comum entre moléculas pró-inflamatórias e obesidade (RICHARDSON; SMITH; CARTER, 2013), e atuando como

fonte de inflamação para promover aterosclerose (ALEXOPOULOS; KATRITSIS; RAGGI, 2014). O aumento da massa de gordura corporal resulta no recrutamento de células imunes para o tecido adiposo, onde tanto células imunes como células do próprio tecido adiposo secretam citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1b), adipocinas (leptina, adiponectina e resistina) e também componentes do complemento (PHIELER et al., 2013) influenciando nos distúrbios metabólicos (ZHANG et al., 2007).

2.4.1 Sistema complemento e o tecido adiposo

Uma vez que adipócitos têm a capacidade de sintetizar diversas moléculas da resposta imune como MCP-1, TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e PTX3 (MAKKI; FROGUEL; WOLOWCZUK, 2013), além de componentes do complemento como FD, C3, FB, properdina, C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C7 e MASP-1 (GABRIELSSON et al., 2003; HILLIAN et al., 2013), é possível inferir a presença de ativação local da VC, VL e VA no tecido adiposo devido a presença de C3b, C3d, C3a, C5a e C5b-9 (BLOGOWSKI et al., 2013). Além disso, o tecido adiposo também expressa receptores (C3aR, C5aR1, C3aR1 e C5aR2) e reguladores (FH, CD59 e DAF) do complemento (VLAICU et al., 2016).

2.4.2 *T. cruzi* e o tecido adiposo

Embora o *T. cruzi* seja capaz de infectar praticamente qualquer célula nucleada *in vitro*, um grupo tecidual restrito envolvendo músculos cardíaco e esquelético (BRENER, 1973; MACEDO; PENA, 1998), nervos entéricos (TAFURI et al., 1971) e adipócitos (COMBS et al., 2005; FERREIRA et al., 2011) parecem estar envolvidos na patologia da doença. Nagajyothi e colaboradores (2008) demonstraram que a infecção por *T. cruzi* resulta em uma alteração de vias de sinalização nos adipócitos, provavelmente influenciando a inflamação sistêmica e homeostase energética. Atualmente está bem estabelecido que o *T. cruzi* persiste nos tecidos de camundongos cronicamente infectados e que essa persistência é importante na patogênese da DC (ANDRADE, 1995; COMBS et al., 2005; NAGAJYOTHI et al., 2008). Ferreira e colaboradores (2011) estudaram as consequências da infecção pelo

T. cruzi no tecido adiposo e em cultura de adipócitos, demonstrando que quando os camundongos foram infectados o tecido adiposo foi um dos primeiros alvos do parasito, persistindo também na fase crônica. Além disso, durante a infecção pelo *T. cruzi* foi observada regulação positiva de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, que persistiu desde o início da infecção (COMBS et al., 2005).

Nagajyothi e colaboradores (2008) e Combs e colaboradores (2005) indicaram o tecido adiposo como alvo da infecção por *T. cruzi* em modelo animal. Além disso, o tecido adiposo e os adipócitos, provavelmente, representam um reservatório a partir do qual a infecção crônica pode ser reativada durante períodos de imunossupressão. A reativação da DC pode ocorrer durante períodos de imunossupressão, como durante a administração de terapia imunossupressora ou em casos de coinfeção com HIV/AIDS (FIORELLI et al., 2011; SARTORI et al., 2007), com a suposta libertação de parasitos na circulação resultante dos períodos de lipoatrofia (TERSHAKOVEC; FRANK; RADER, 2004), implicando na necessidade do tecido adiposo para a manutenção do parasito; ou seja, atuando, de fato, como um reservatório ou alvo para o protozoário.

Outros microrganismos também utilizam o tecido adiposo como reservatório, como o *Rickettsia prowazekii*, patógeno responsável pela doença de Brill-Zinsser (BECHAH et al., 2010); e o *Mycobacterium tuberculosis*, que persiste dentro de adipócitos na tuberculose latente ou ativa (NEYROLLES et al., 2006). Além disso, o *Plasmodium sp.* também tem sido observado na vasculatura do tecido adiposo (FRANKE-FAYARD et al., 2010).

Embora o tecido adiposo seja composto por vários tipos celulares, o adipócito continua sendo a célula de maior interesse dada suas funções efetoras essenciais no sentido de influenciar vários processos bioquímicos e fisiológicos, incluindo a homeostase energética, resistência à insulina e inflamação. As principais vias de sinalização nos adipócitos não são muito diferentes daquelas encontradas em outras células de mamíferos. No entanto, sob condições específicas, a ativação de vias de sinalização resulta na síntese de proteínas que são únicas para o adipócito, as adipocinas (DESRUISSEAU et al., 2007).

2.5 ADIPOCINAS

As adipocinas têm diferentes funções, como: regulação de apetite e balanço energético, imunidade, sensibilidade à insulina, angiogênese, inflamação e resposta de fase aguda, regulação da pressão sanguínea e metabolismo de lipídeos. No contexto das doenças cardiovasculares, as adipocinas podem ser divididas em cardioprotetoras (anti-inflamatórias) e naquelas que afetam o sistema cardiovascular (pró-inflamatórias). Entre as adipocinas mais conhecidas e estudadas estão: leptina e adiponectina (LEAL; MAFRA, 2013).

2.5.1 Leptina

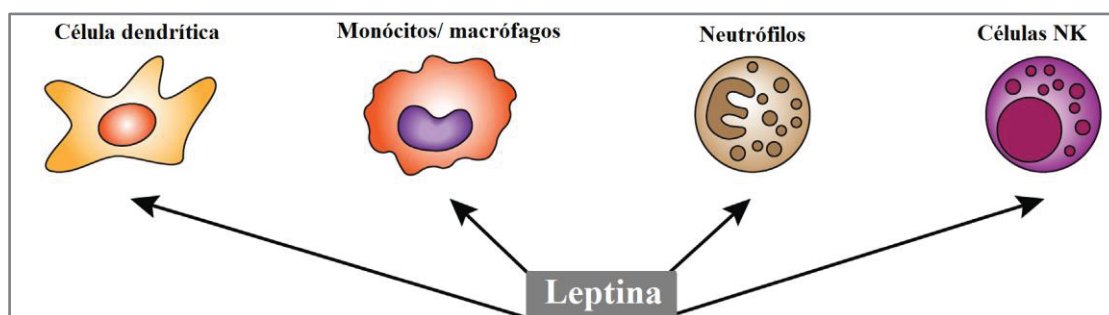
2.5.1.1 Estrutura e funções

A leptina é um hormônio polipeptídico não glicosilado de 16 kDa e 167 aminoácidos que regula a massa de tecido adiposo e o balanço energético (COHEN et al., 1996; ZHANG et al., 2005). Trata-se de uma molécula estruturalmente semelhante às citocinas de cadeia longa, composta de quatro alfa-hélices (ZHANG et al., 2005), e secretada principalmente por adipócitos, mas também é expressa em concentrações reduzidas no epitélio gástrico, músculo, placenta e sistema nervoso central (AHIMA; FLIER, 2000). A expressão da leptina é controlada por diversas substâncias, como insulina, glicocorticóides e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, também pode ser influenciada por quadros infecciosos e pela presença de endotoxinas, elevando a sua concentração plasmática (KERSHAW; FLIER, 2004).

A ação da leptina no sistema nervoso central (hipotálamo), em mamíferos, promove a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras (FRIEDMAN; HALAAS, 1998), portanto, possui papel fundamental na homeostase energética, e nas funções metabólicas e imunológicas. Nesse contexto, foi demonstrado que a leptina apresenta diferentes efeitos no sistema cardiovascular, pois pode levar à uma condição de remodelamento vascular, estresse oxidativo, formação de neo-íntima e hipertrofia de cardiomiócitos (SCHULZE; KRATZSCH,

2005), contribuindo para a modulação do metabolismo e da inflamação. Nesse último caso, a leptina tem sido associada à produção de mediadores pró-inflamatórios da resposta imune, tanto inata quanto adquirida (MARTÍ; MARCOS; MARTÍNEZ, 2001). Matarese e colaboradores (2001) demonstraram que a leptina pode estimular ou suprimir a produção de citocinas, indicando que esse hormônio pode ser o elo entre o estado nutricional e a função celular imune. Dessa forma, a leptina pode representar um importante alvo da interação imunológica em diversas condições fisiopatológicas, afetando quase todas as células da imunidade inata (ZABEAU; PEELMAN; TAVERNIER, 2014) (FIGURA 19).

FIGURA 19 – ATUAÇÃO DA LEPTINA NA RESPOSTA IMUNE INATA.



FONTE: Adaptado de ZABEAU et al., 2014.

NOTA: Nas células dendríticas humanas, a leptina está envolvida na maturação dessas células e aumento da quimiotaxia. Em monócitos/macrófagos, a leptina aumenta a fagocitose, secreção de citocinas pró-inflamatórias, proliferação, regulação positiva da ativação marcadores, e atua como um potente quimioatraente para estas células. A leptina também pode promover a quimiotaxia de neutrófilos e a liberação de espécies reativas de oxigênio, embora não se possa excluir que estes sejam efeitos indiretos do TNF- α produzido e secretado pelos monócitos. Finalmente, a leptina desempenha um papel no desenvolvimento, diferenciação, ativação e citotoxicidade de células NK.

2.5.1.2 Leptina e doenças

Os adipócitos aumentam a expressão de leptina em consequência do aumento do tamanho de célula, o que deveria resultar em apetite deprimido e aumento do gasto energético (LEE; FRIED 2009). No entanto, indivíduos obesos são frequentemente resistentes a estes efeitos da leptina, o que pode ser devido à saturação do transportador sangue-cérebro, que é influenciada por hipertrigliceridemia; ou devido à diminuição da resposta celular à leptina (OSWAL; YEO, 2010). Concentrações

plasmáticas de leptina e insulina estão positivamente relacionadas, independentemente da massa adiposa, e a leptina também tem sido associada a propriedades proliferativas e aterogênicas, resultando no aumento do risco cardiovascular, especialmente para o paciente diabético (LIBERALE et al., 2017; PAYNE et al., 2014). Nesse contexto, a obesidade está relacionada com elevada concentração de leptina, em que pacientes obesos apresentam um perfil de resistência central à ação da leptina (NGUYEN et al., 2015). Na insuficiência cardíaca os dados são controversos, com achados de concentração sérica de leptina aumentada (SCHULZE et al., 2003) ou reduzida (RICHARTZ et al., 2001) em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, ambos em relação aos controles. Além disso, considerando as características pró-inflamatórias da leptina, sugere-se que a mesma possa contribuir para o aparecimento e progressão de doenças autoimunes (CAVA; MATARESE, 2004), pois foi observado em pacientes com doença inflamatória crônica e auto-imunidade um aumento da secreção de leptina periférica. Concentrações séricas elevadas de leptina foram associadas a um risco aumentado de certos tipos de câncer, incluindo próstata, mama, colorretal, renais e mieloma (ZABEAU; PEELMAN; TAVERNIER, 2014).

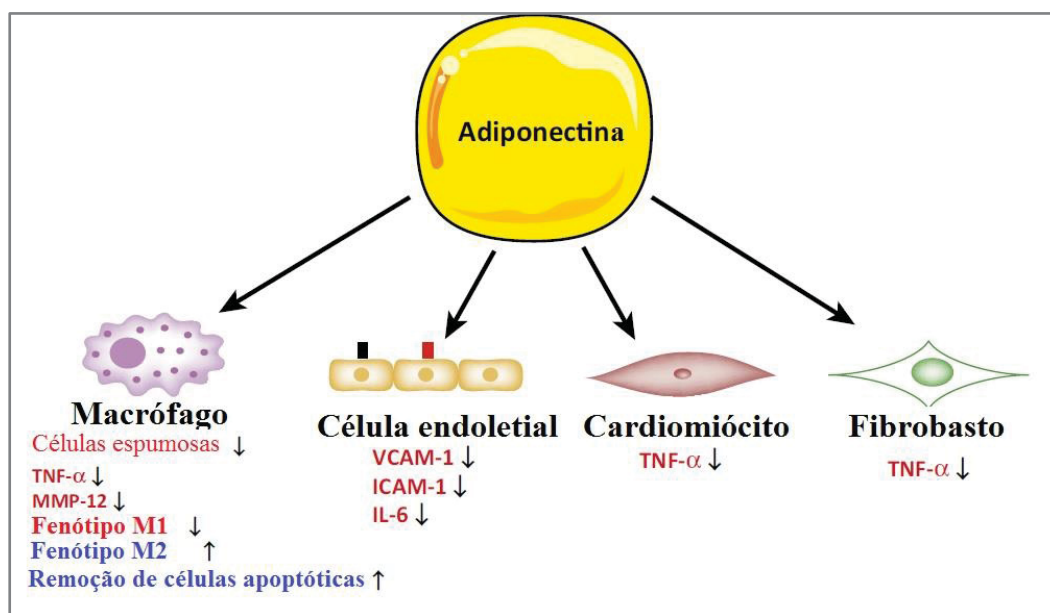
2.5.2 Adiponectina

2.5.2.1 Estrutura e funções

A molécula de adiponectina é composta por um domínio globular e um de colágeno, similar à C1q, formando trímeros por meio dos domínios de colágeno, os quais podem ainda se associar para formar oligômeros (4-6 trímeros) multiméricos estáveis (CHANDRAN et al., 2003). Adiponectina é quase que exclusivamente sintetizada por adipócitos, com concentração sérica de 3 a 30µg/ml, e induz a secreção de IL-10 e receptor antagonista de IL-1 (OUCHI et al., 1999). A concentração de adiponectina é menor em indivíduos obesos quando comparados com os de peso normal, pois a sua produção é inibida por mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α e IL-6, assim como por hipóxia e estresse oxidativo (OUCHI; WALSH, 2007). Além disso, a adiponectina inibe a expressão de células endoteliais de moléculas de adesão

in vitro, suprimindo a ligação de monócitos (OUCHI et al., 1999). Dessa forma, tem-se associado um papel anti-inflamatório para a adiponectina, que atua em diversas células como macrófago, células endoteliais, cardiomiócitos e fibroblastos (OHASHI et al., 2014) (FIGURA 20).

FIGURA 20 – AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADIPONECTINA EM MACRÓFAGOS, CÉLULAS ENDOTELIAIS, CARDIOMIÓCITOS E FIBROBLASTOS.



FONTE: Adaptado de OHASHI et al., 2014.

NOTA: A adiponectina reduz a transformação dos macrófagos em células espumosas, e reduz a expressão de TNF- α e metaloproteinases 12 da matriz (MMP-12) em macrófagos. A adiponectina promove a alteração fenotípica dos macrófagos de perfil inflamatório M1 para o anti-inflamatório M2, e auxilia na remoção precoce de células apoptóticas. Nas células endoteliais, a adiponectina também reduz a expressão da molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), além de reduzir a expressão de IL-6. Além disso, a adiponectina reduz a expressão de TNF- α em cardiomiócitos e fibroblastos. Portanto, a adiponectina exibe uma ação protetora em vários órgãos incluindo coração e vasculatura.

2.5.2.2 Adiponectina e doenças

Diversos estudos clínicos têm demonstrado associação entre adiponectina e disfunções metabólicas associada à obesidade, onde as concentrações plasmáticas de adiponectina se correlacionam negativamente com o acúmulo de gordura visceral (RYO et al., 2004); e estão diminuídas em pacientes com diabetes tipo 2 (ALEIDI et

al., 2015). Além disso, o aumento da concentração de adiponectina foi associado a um menor risco de desenvolver diabetes tipo 2 (LI et al., 2009). A adiponectina também pode desempenhar papel anti-aterogênico e anti-inflamatório, com concentração plasmática diminuída em pacientes com doença arterial coronariana (HOTTA et al., 2000), pois reduz os níveis séricos das adipocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , contribuindo para a homeostase da glicose e de lipídios, além de provocar o aumento da oxidação de gorduras (BERG; COMBS; SCHERER, 2002). Em um modelo animal de aterosclerose, Matsuda e colaboradores (2002) observaram maior espessamento neo-intimal de artérias alteradas em ratos deficientes em adiponectina, com boa resposta terapêutica diante do uso de adiponectina exógena (MATSUDA et al., 2002). Dessa forma, adiponectina desempenha papel crucial no metabolismo, pois apesar da sua expressão mais elevada está associada aos adipócitos funcionais (encontrados em indivíduos magros), sua expressão é regulada negativamente nos adipócitos disfuncionais, como aqueles associados com a obesidade (NIGRO et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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 e registrado sob o número CEP/HC-UFPR n. 360.918/2013-08.

3.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

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

3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

3.3.1 Pacientes

Fazem parte deste estudo materiais biológicos retrospectivos pertencentes à soroteca e ao banco de DNA do laboratório de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR. Foram avaliados prontuários de 178 pacientes diagnosticados com Doença de Chagas (DC) crônica, cadastrados no Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico do HC-UFPR. Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: indivíduos menores de dezoito anos, pacientes com evidências de cardiopatia de etiologia não chagásica, uso de estatinas, indivíduos sob tratamento etiológico da DC, outras doenças inflamatórias, neoplasias, endocardite infecciosa ou outras infecções, no momento da coleta do material. A caracterização dos pacientes foi realizada com base na análise do histórico clínico através de questionário epidemiológico e dos prontuários médicos dos pacientes. Os principais dados demográficos e clínicos dos pacientes estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 – DADOS DEMOGRÁFICOS DE ACORDO COM AS FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Parâmetros	Formas Clínicas da Doença de Chagas				
	Indeterminada	Cardíaca	Digestiva	Cardiodigestiva	Total
N (%)	65 (36,5)	68 (38,2)	21 (11,8)	24 (13,5)	178
Idade (média)	53,7 [34-76]	58,7 [34-90]	59,2 [36-84]	57,2 [37-73]	57,2 [34-90]
Sexo (%)					
<i>Masculino</i>	20 (30,8)	34 (50,0)	4 (9,0)	13 (54,2)	71
<i>Feminino</i>	45 (69,2)	34 (50,0)	17 (81,0)	11 (45,8)	107
Ancestralidade*					
(%)					
<i>Euro-brasileiro</i>	58 (89,2)	45 (66,2)	14 (66,7)	19 (79,2)	136
<i>Afro-brasileiro</i>	4 (6,2)	17 (25,0)	6 (28,6)	5 (20,8)	32
<i>Asiático-brasileiro</i>	0	2 (2,9)	0	0	2
<i>Indígena</i>	3 (4,6)	4 (5,9)	1 (4,7)	0	8

*A classificação dos pacientes segundo a ancestralidade foi definida pelo pesquisador, obedecendo ao critério de coloração da pele e traços físicos, além de levar em consideração a origem dos seus ascendentes (pais e avós).

FONTE: o autor (2017).

Dados de glicemia, hemograma completo, lipidograma [lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT)], e proteína C reativa ultrasensível (uCRP) foram obtidos de prontuários médicos na mesma data da consulta, realizada entre 2007 e 2009. Altura, peso, pressão arterial e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foram obtidos dos exames ecocardiográficos; e informações sobre hábitos de vida como tabagismo e alcoolismo também foram obtidas no período referente à consulta médica. Hipertensão foi definida como pressão sistólica ≥ 140 mmHg ou diastólica ≥ 90 mmHg (Consenso Brasileiro em Hipertensão Arterial, 2016). O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado usando a fórmula padrão: peso (kg) dividido pela altura ao quadrado em metros (h²), e classificada como < 20 kg/m² (abaixo do peso), 20-25 kg/m² (ppeso ideal), 25-30 kg/m² (sobrepeso), 30-35 kg/m² (obesidade leve), 35-40 kg/m² (obesidade moderada), e 40-50 kg/m² (obesidade mórbida). O risco relacionado a um evento cardíaco em 10 anos foi estimado a partir do Score de Framingham (DAGOSTINO, 2008).

A classificação fenotípica ou bioquímica considera os valores de CT, LDL-C, TG e HDL-C e compreende quatro tipos principais bem definidos:

- a) hipercolesterolemia isolada: elevação isolada do LDL-C (≥ 160 mg/dl);
- b) hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos TGs (≥ 150 mg/dl) que reflete o aumento do número e/ou do volume de partículas ricas em TG, como VLDL, IDL e quilomícrons;
- c) hiperlipidemia mista: valores aumentados de LDL-C (≥ 160 mg/dl) e TG (≥ 150 mg/dl). Nos casos em que TGs ≥ 400 mg/dl, o cálculo do LDL-C pela fórmula de Friedewald é inadequado, devendo-se, então, considerar a hiperlipidemia mista quando CT ≥ 200 mg/dl;
- d) HDL-C baixo: redução do HDL-C (homens < 40 mg/dl e mulheres < 50 mg/dl) isolada ou em associação a aumento de LDL-C ou de TG (XAVIER et al., 2013).

O estadiamento dos pacientes chagásicos, de acordo com a gravidade da cardiopatia, foi realizado segundo a classificação de insuficiência cardíaca da *American Heart Association* (AHA), adaptada para Doença de Chagas, conforme recomendado pelo Consenso Brasileiro de Doença de Chagas 2016 (DIAS et al., 2016) (QUADRO 1), que considera parâmetros eletro e ecocardiográficos dos pacientes.

QUADRO 1 –ESTADIAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DA *AMERICAN HEART ASSOCIATION*, ADAPTADO PARA DC

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

FONTE: II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2016) NOTA: ECG = eletrocardiograma; ECO = ecocardiograma; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IC = insuficiência cardíaca.

3.3.2 Grupo Controle

O grupo controle, para uso de amostras de soro e plasma, foi composto de até 128 adultos voluntários 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, ancestralidade e faixa etária, frente à amostra de pacientes. Para a avaliação do *Score* de Framingham foram incluídos outros 80 indivíduos com sorologia negativa para DC, atendidos na Clínica de Cardiologia do Dr. Cesar Maistro Guimarães, sem cardiopatia manifesta, doença infecciosa crônica, autoimune ou neoplasias, selecionados de forma consecutiva quando havia interesse do paciente em participar da pesquisa. Os controles do Banco de Sangue não apresentavam os exames laboratoriais necessários para o cálculo do risco cardiovascular e tampouco estavam em jejum para que fosse possível realizar as dosagens

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Determinação do *Score* de Framingham

O *Score* de Framingham foi determinado a partir de uma pontuação obtida de acordo com os parâmetros: sexo, faixa etária, pressão arterial sistólica, colesterol total, HDL-colesterol, diagnóstico de diabetes e hábito tabágico, para estimar o risco cardiovascular em 10 anos (morte coronariana, infarto do miocárdio, insuficiência coronariana, angina, acidente vascular encefálico isquêmico e hemorrágico, ataque isquêmico transitório, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca).

TABELA 4 – DETERMINAÇÃO DO SCORE DE FRAMINGHAM PARA ESTRATIFICAR O RISCO CARDIOVASCULAR

Parâmetro	Fatores de Risco	Homens		Mulheres		Total de pontos	Risco (%) Homens	Risco (%) Mulheres
Idade (anos)	30-34	0		0		-3 ou menos	<1	<1
	35-39	2		2		-2	1,1	<1
	40-44	5		4		-1	1,4	1,0
	45-49	7		5		0	1,6	1,2
	50-54	8		7		1	1,9	1,5
	55-59	10		8		2	2,3	1,7
	60-64	11		9		3	2,8	2,0
	65-69	13		10		4	3,3	2,4
HDL-C (mg/dl)	70-74	14		11		5	3,9	2,8
	75+	15		12		6	4,7	3,3
	<35	-2		-2		7	5,6	3,9
	35-44	-1		-1		8	6,7	4,5
	45-49	0		0		9	7,9	5,3
Colesterol Total (mg/dl)	50-59	1		1		10	9,4	6,3
	≥60	2		2		11	11,2	7,3
	<160	5		5		12	13,3	8,6
	160-199	2		2		13	15,6	10,0
	200-239	1		1		14	18,4	11,7
Pressão Sistólica (mmHg)	240-279	0		0		15	21,6	13,7
	≥280	-2		-2		17	29,4	18,51
	<120	Não Tratado	Tratado	Não Tratado	Tratado	18	>30,0	21,5
	120-129	0	2	0	2	19	>30,0	24,8
	130-139	1	3	1	3	20	>30,0	27,5
	140-149	2	4	2	5	21 +	>30,0	>30
	150-159	2	4	4	6			
>160	3	5	5	7				
Tabagismo	Sim	0		0				
	Não	4		3				
Diabetes	Sim	0		0				
	Não	3		4				
Score categorizado								
								Risco Leve
								Risco Moderado
								Risco Elevado

FONTE: Adaptado de DAGOSTINO, 2008.

3.4.2 Coleta de sangue

Após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletados por punção venosa periférica um volume de 10 mL, o qual foi dividido em dois tubos: com anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA) e sem. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 3.500 rpm para separação do plasma e soro, respectivamente. As amostras foram alíquotadas para aproximadamente 500 ul cada tubo e armazenadas à temperatura de -80°C até o momento das análises laboratoriais.

3.4.3 Quantificação de PTX3, ficolina-3, FH, leptina e adiponectina

A determinação das concentrações de PTX3, ficolina-3, FH, leptina, adiponectina foram realizadas por meio de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA), utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante. As quantificações foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR em amostras de soro para PTX3 (*Human Pentraxin 3/TSG-14*, R&D®System, Minneapolis, EUA), ficolina-3 (*Human Ficolin 3/HK340* Hycult Biotechnology, Uden, Holanda), leptina (*Human Leptin Immununoassay*, R&D®System, Minneapolis, EUA), adiponectina (*Human Total Adiponectin/Acrp30*, R&D®System, Minneapolis, EUA); e plasma para FH (*Human Complement Factor H*, Hycult Biotech, EUA).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados clínicos e demográficos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, EUA). Todas as variáveis quantitativas foram avaliadas quanto a Normalidade da sua distribuição através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Tendo sido rejeitada a hipótese de Normalidade, as comparações entre medianas foram feitas através dos testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A estatística descritiva em relação às concentrações de PTX3, FH, ficolina-3 e adipocinas circulantes foi apresentada em mediana e percentis. Quando apropriado, foi calculado o odds ratio (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC95%) em análise multivariada de regressão logística, adotando $p < 0,2$ na análise univariada como critério de inclusão no programa STATA (STATA Corp, Texas, EUA). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme norma recente do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da UFPR, que recomenda também a apresentação (nesse tópico) dos artigos submetidos e publicados referentes à tese, os resultados seguirão a sequência apresentada acima: avaliação clínico-laboratoriais; e concentrações circulantes de PTX3, FH, ficolina-3, leptina e adiponectina dos pacientes com DC crônica.

O trabalho intitulado “*Characterization of cardiovascular risk in patients with chronic Chagas Disease using the Framingham Risk Score*” foi submetido à Tropical Medicine and International Health e está sob revisão. A partir de avaliação clínico-laboratorial, que incluiu lipidograma, glicemia, idade, sexo, tabagismo e níveis pressóricos, foi aplicado o Score de Framingham para definição do risco cardiovascular em 105 pacientes com as diferentes formas clínicas da DC e 80 controles. Observamos um risco aumentado para os pacientes com DC (independente da forma clínica) quando comparado aos controles. Além disso, o índice aterogênico (triglicerídeos/HDL-C) (GAZIANO et al., 1997; MARUYAMA et al., 2003; DA LUZ et al., 2008) só foi correlacionado com tal score em controles, demonstrando que o paciente com DC crônica necessita de um acompanhamento clínico eficaz, sendo o Score de Framingham uma ferramenta simples, barata e útil para uma avaliação mais completa, com potencial de implantação imediata, até mesmo em áreas mais carentes.

O trabalho intitulado “*Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease?*” foi submetido à *International Journal of Cardiology* em 23/03/15 e publicado em 14/04/2015 (*Volume 190, Pages 233–235, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.04.106>*). Objetivamos investigar a concentração plasmática de PTX3 em 128 pacientes com DC crônica e 87 controles; e a relação dessa proteína como marcador de doença inflamatória. Observamos concentrações reduzidas de PTX3 nos pacientes quando comparados aos controles; e em pacientes com a forma cardíaca quando comparados com a indeterminada da DC. Além disso, a PTX3 se correlacionou positivamente com a fração de ejeção ventricular esquerda

(FEVE), HDL e índice de massa corpórea (IMC). Nossos achados sugerem um papel imunorregulador associado à característica cardioprotetora da PTX3 nos pacientes com DC crônica.

O trabalho intitulado “*Complement Factor H as a potential atherogenic marker in chronic Chagas disease*” foi submetido à revista *Parasite Immunology* e está sob revisão. Objetivamos investigar a associação entre os concentrações plasmáticas de FH com comprometimento cardíaco, parâmetros inflamatórios e cardiometabólicos de 80 pacientes com DC crônica. As concentrações de FH, em pacientes, foram correlacionados positivamente com triglicerídeos, LDL, colesterol, uCRP e IMC; e negativamente com concentrações de HDL. Além disso, pacientes dislipidêmicos apresentaram maiores concentrações de FH quando comparados aos normolipidêmicos, embora não tenham sido observadas diferenças no FH entre as formas clínicas da DC. Nossos resultados sugerem que a via alternativa do complemento pode representar uma ligação relevante entre a resposta imune e distúrbios metabólicos, com papel imunorregulador na DC crônica.

4.1 RESULTADOS EM FORMATO DE ARTIGO

Artigo: *Characterization of cardiovascular risk in patients with chronic Chagas Disease using the Framingham Risk Score*

Characterization of cardiovascular risk in patients with chronic Chagas Disease using the Framingham Risk Score

Kárita Cláudia Freitas Lidani¹, Cesar Maistro Guimarães^{1,2}, Thaisa Lucas Sandri^{1,3},
Marcia Iurico Miyazaki⁴, Iara J de Messias-Reason^{1,*}

¹Laboratory of Molecular Immunopathology, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

²Intensive Care Medicine, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

³Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany

⁴Chagas Disease Ambulatory, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Short title: Characterization of chagasic patients using the Framingham Risk Score

* Corresponding author:

Setor de Ciências da Saúde, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

Rua General Carneiro 181, 80060-900, Curitiba, PR, Brazil.

Phone: +55 41 3360 1800x6537; fax: +55 41 3362 7598.

E-mail address: iarareason@hc.ufpr.br

Abstract

Objectives

Chagas disease (CD) affects about 8 million people in Latin America becoming an emerging health problem worldwide due to international migration. Chronic CD is a complex disease marked by high morbidity and mortality, being sudden death and cardiac disease the main cause of mortality. The particularities of the pathophysiology of chronic CD difficult the prediction of risk of developing cardiovascular diseases (CVD) for these patients using general cardiovascular risk scoring systems. In this context, Framingham Risk Score (FRS) is a sex-specific multivariable risk factor algorithm based on individual characteristics, clinical and laboratorial findings that is extensively used to assess CVD risk.

Methods

In this study, the ten-year risk for CVD was estimated using the FRS in 80 healthy controls and 105 patients with chronic CD followed up from 2008 to 2016 from Southern Brazil. Each variable distribution was assessed by Shapiro-Wilk test and adjusted for binary logistic regression analysis.

Results

According to FRS, 40% (42/105) of the patients with chronic CD and 25% (20/80) of paired controls have intermediate risk to develop CVD. CVD risk assessed by FRS was significantly higher in CD patients than in controls ($p < 0.0001$), in indeterminate patients in relation to controls ($p = 0.0005$). Atherogenic index and FRS were positively correlated with the controls ($p = 0.039$), but not in patients.

Conclusions

These results highlight the importance of a good characterization of the patient and suggest the use of FRS in the follow-up of chronic CD patients to implement preventive strategies, thereby reducing long-term risk.

Keywords: Cardiomyopathy; Cardiovascular Risk; Chagas Disease; Chronic Chagasic Patients; Framingham Score.

Introduction

Chagas disease (CD) is a vector-borne infection caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi*,

which affects more than 8 million people in Latin America and is an emerging health problem worldwide due to international migration (1,2). Although most CD patients remain asymptomatic in the indeterminate phase throughout their lifetime, up to 5% of them progress each year to one of the symptomatic forms of the disease, developing chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), digestive megasyndromes, or both, with low effectiveness of the specific treatment in this phase. In fact, 20 to 30% of chronic CD patients develop some degree of cardiac impairment during the course of the disease and among those, one third develop a lethal form of CCC with the only available treatment being heart transplantation (3).

A combination of long-term cardiac derangements including left ventricular dilation and dysfunction, aneurysm, congestive heart failure, thromboembolism and ventricular arrhythmias (4) characterizes CD as a complex disease with high morbidity and mortality. Approximately 12,000 chronic CD patients die every year (5), with sudden death accounting for about 60%, heart failure for 25% to 30% and stroke for 10% to 15% (6). Moreover, the pathophysiology of Chagas' heart disease has some peculiarities when compared to general cardiovascular diseases (CVD) such as the predominance of systemic congestive manifestations in comparison to signs of pulmonary congestion, conduction disturbances and a tendency of symptomatic bradycardia (7). Traditionally, clinical management of cardiac commitment in chronic CD has followed guidelines for the management of other causes of CVD (8). Accordingly, the uniqueness of each patient's need and the peculiarity of the pathophysiology of chronic CD should be considered through an efficient clinical characterization considering individual features and CVD risk to predict heart events and appropriately manage the patient during the follow-up.

Cardiovascular risk scoring systems provide an estimate of the probability that a person will develop CVD within a determined period of time in order to indicate the likely benefits of

prevention (9). Among the used CVD risk scoring systems, the FRS is a sex-specific multivariable risk factor algorithm that can be conveniently used to assess CVD risk events, such as coronary, cerebrovascular, peripheral artery disease and heart failure. By taking into account individual characteristics and CVD risk events, FRS may represent a useful approach for characterizing chronic CD patients.

This model is a scoring system of 10-year risk of developing coronary heart disease considering individual differences such as age, sex, LDL cholesterol, HDL cholesterol, blood pressure (hypertension treatment), diabetes, and smoking. FRS classifies the risk of developing CVD in three categories according to the score: low risk when the person has 10% or less CVD risk at ten years, with intermediate risk 10-20%, and high risk 20% or more (10).

Considering that the appropriate clinical management of patients with chronic CD has a critical role in the disease outcome, this study aimed to characterize patients with chronic CD based on the FRS to predict coronary artery events in 10 years for better clinical management of them. Additionally, the estimation of CVD rates may predict the risk of these events and guide preventive care in chronic CD.

Methods

Patients and controls

From 2008 to 2016, the Chagas Disease Ambulatory of the Hospital de Clínicas (Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil) followed up a total of 230 chronic patients with chronic CD. The follow-up of these patients included clinical evaluation and routine exams such as echocardiogram, electrocardiogram, chest and abdominal x-rays - to evaluate heart, oesophagus, and colon - and blood tests). In order to avoid confusion variables, patients presenting hypothyroidism, uncontrolled diabetes, suspected non-chagasic cardiomyopathy

(such as hypertensive cardiopathy) or having incomplete laboratory data were excluded from this study. Thus, the study cohort included 105 patients with chronic CD (mean age 51.5 years; 64 (61%) female, 41 (39%) male; 82 (78.1%) Euro-Brazilians, 19 (18.1%) Afro-Brazilians and 4 (3.8%) Asian-Brazilians). CD diagnosis was performed by serological (Enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA and Indirect Immunofluorescence) and clinical criteria. Clinical history of the patients was obtained from medical records and interviews, using a standard questionnaire. Demographical and clinical characteristics of the specific CD forms and controls are shown in [Table 1](#).

A group of 80 South Brazilians with negative Chagas serology (anti-*Trypanosoma cruzi*), without clinical complaints and paired with age sex and ethnicity was utilized as control (mean age 51.2 years; 38 (47.5%) female, 42 (52.5%) male; 72 (90%) Euro-Brazilians and 8 (10%) Afro-Brazilians.

Clinical and laboratory findings

Glycemic index, complete blood count (white Blood cell differential, red blood cell count, hemoglobin), lipidogram (high-density lipoprotein cholesterol HDL-C, low-density lipoprotein cholesterol LDL-C, triglycerides and total cholesterol), and Ultrasensitive C-Reactive Protein (uCRP) were obtained from medical records. Height, weight, blood pressure and left ventricular ejection fraction (LVEF) were retrieved from echocardiography exams; information about smoking and alcoholism were accessed during the interview. Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg (11).

Body Mass Index (BMI) was calculated using standard formula: weight (kg) divided by height-squared (m²) and classified as < 30 kg/m² (non-obese) and ≥ 30 kg/m² (obese). The risk of a cardiac heart event within ten years was estimated using the FRS (12) for each subject. A

multivariable mathematical function including cardiovascular risk factors such as sex, age, blood pressure, diabetes, total cholesterol, LDL-C, HDL-C, and smoking behavior was used. Lipidogram was evaluated in indeterminate and cardiac patients (paired according to BMI and sex). Subjects with $\leq 10\%$ for coronary events were classified as being at low risk; those with a 10–20% as intermediate risk; and those with $\geq 20\%$ as high risk.

Patients with cardiac commitment were graded according to the cardiac insufficiency classification of the American Heart Association (AHA), adapted for Chagas disease (13) in A, B, C, and D groups.

Statistical analysis

Comparison of the FRS between the groups was performed using Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests. The normality distribution of each variable was assessed by Shapiro-Wilk test and the variables were transformed for multiple regression analysis, with adjustment for age, sex, and ethnic group. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) were determined where appropriate. Pairwise associations were done using Spearman's rank correlation test for nonparametric variables. The statistical analysis was undertaken using the STATA 12.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA) and p -values < 0.05 were considered statistically significant. The GraphPad Prism program (version 6.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to generate the graphics.

Results

According to FRS, 40% (42/105) of the patients with chronic CD and 25% (20/80) of paired controls have an intermediate risk to develop CVD. Among the patients with intermediate risk of developing CVD, 31% (13/42) are asymptomatic patients, 28.6% (12/42) are patients with digestive form and 33.3% (14/42) are patients with early stage of cardiac commitment. The

distribution of FRS of the study population graded in low, intermediate and high risk of developing CVD is shown in [Table 1](#).

The CVD risk, according to the FRS, was significantly higher in patients with CD when compared to controls ($p < 0.0001$, OR 4.93, 95%CI: 4.37-7.95, and Means: 11.02% vs. 6.04%) and in indeterminate patients in relation to controls ($p = 0.0005$, OR 2.93, 95%CI: 1.81-5.98, and Means: 10.2% vs. 6.04%). However, no association of FRS with the cardiac form was observed when compared to indeterminate form ($p = 0.201$, Means: 11.3% vs. 10.2%) ([Figure 1A](#)), digestive form ($p = 0.22$, Means: 11.3% and 10.3%) or controls ($p = 0.06$, Means: 11.3% and 6.3%). In addition, higher CVD risk was observed in men when compared to women, both in controls ($p = 0.0004$, OR 2.18, 95%CI: 1.21-4.92, and Means: 6% vs. 3%) and in patients ($p = 0.0017$, OR 1.94, CI: 0.69-3.87, and Means: 11% vs. 8%) ([Figure 1B](#)). There was no difference in CVD risk between ethnical groups of Euro-Brazilians and Afro-Brazilians both in controls and patients ($p = 0.25$ and $p = 0.53$, respectively).

The FRS was not statistically different among patients with different grades of cardiac commitment (A, B, C, and D) nor between isolated and associated cardiac clinical forms. Neither was there a difference for FRS between groups of patients with absence (grades A and B) and presence (grades C and D) of cardiac insufficiency. In relation to heart function, no significant correlation was observed between LVEF and the FRS ($p = 0.4$).

Univariate analysis comparing CD patients and controls was performed including sex, age, ethnicity, triglycerides, HDL-C, LDL-C, LVEF, smoking, systemic hypertension, diabetes mellitus, obesity and the FRS. Significant determinants identified in univariate analysis (age, BMI, body surface, smoking, and obesity) were evaluated in a stepwise multiple regression

model, with only BMI remaining independently related to FRS ($p=0.000$, OR 1.19, 95%CI: 1.1-1.39).

Lipidogram showed increased cholesterol and HDL-C concentration in the indeterminate form when compared to the cardiac form ($p=0.0035$, Means: 218.4 mg/dl vs. 194.1 mg/dl for cholesterol, and $p=0.026$, Means: 132.1 mg/dl vs. 121.1 mg/dl for HDL-C, respectively) while there was no significant difference for LDL-C and triglycerides ($p=0.597$, Means: 119.6 mg/dl vs. 114.4 mg/dl for LDL-C, and $p=0.068$, Means: 52.41 mg/dl vs. 47.26 mg/dl for triglycerides, respectively) (Figure 2).

Moreover, age and HDL-C were significantly correlated with the FRS in controls ($p<0.0001$, $r=0.72$ and $p=0.007$, $r=-0.3$, respectively) and in patients ($p<0.0001$, $r=0.66$ and $p=-0.23$, $r=0.01$, respectively). However, there was no correlation between LDL-C and FRS ($p=0.13$, $r=0.17$ for controls and $p=0.08$, $r=0.17$ for patients (Figure 3). The triglycerides/HDL-C index and FRS were positively correlated with the controls ($p=0.039$, $r=0.23$), but no difference was seen for triglycerides/HDL-C index between the groups patients and controls (Figure 4). Although there was no significant correlation between uCRP and FRS ($p=0.11$ and $\rho=0.29$), there were increased uCRP levels according to increased risk group (0.29 mg/dl for low, 0.34 mg/dl for intermediate and 0.55 mg/dl for high risk).

Discussion

CD is still considered one of the most significant neglected tropical diseases especially due to the expressive mortality affecting patients with all clinical forms (14,15). Besides, the comorbidities related to CD and their clinical repercussions contribute to the substantial proportion of global health-care costs affecting people in their most-productive working years, imposing loss in productivity especially in patients with CCC (16). Being the identification of

patients with chronic CD at risk of CVDs essential not only for better clinical management but also for primary prevention.

During the last decades, several attempts were made in order to develop a classification system for CVD risk in CD patients (13,17,18). Most of the scores focused on patients with CCC and were based on echocardiogram (ECHO) and electrocardiogram (ECG) findings. Furthermore, indeterminate CD patients can progress to the cardiac symptomatic form with CVDs being directly and independently associated with this clinical outcome (19).

Considering that endemicity of CD is historically related with low-incoming areas and adverse social determinants, the characterization of CVD risk in patients with chronic CD in a simple, economical, fast and efficient approach based on clinical and laboratorial routine parameters would make the clinical management more assertive for clinicians and improve quality of patient's life. In this context, this study proposes the use of the Framingham Risk Score (FRS) for the assessment of CVD risk in patients with chronic CD. The FRS provides a global view of the chronic CD patient by performing risk stratification, considering sex, personal characteristics, lifestyle, laboratorial features, as well as the main comorbidities related to CVDs (12). Thus, the FRS could be useful for predicting the risk of CVD in chronic CD, thereby decreasing the risk of severe cardiac involvement enabling more efficient monitoring and early treatment.

To our knowledge, this is the first study to apply the FRS to chronic CD patients. Here, asymptomatic patients and patients with digestive form were classified with intermediate risk of developing CVD together with patients with early stage of cardiac form, demonstrating that this approach may be useful in characterizing these patients to prevent clinical progression. Patients with chronic CD presented a significantly higher FRS when compared to healthy

controls, with the most expressive FRS parameters being age and HDL-C. In addition, FRS was similar among patients with different clinical forms indicating that the cardiovascular estimated risk is, in fact, associated with the *T. cruzi* infection rather than the clinical forms. Dyslipidemia was observed in 61% of patients with CD. All these findings corroborate with the study of Navarro et al. (19) that reported 75.7% of dyslipidemia in CD patients with indeterminate form, suggesting a higher risk of progression to the symptomatic stage of the disease. Then, comorbidities as dyslipidemia and/or atherosclerosis may influence directly on patient survival (6).

Another parameter used in clinical routine, the atherogenic index (triglycerides/HDL-C), was positively correlated with and FRS in controls, but not in patients. Demonstrating that using this evaluation as the unique atherogenic parameter for CVD risk assessment in chronic CD patients can lead to underestimation of the risk and lack of preventive measures during clinical management. Thus, the FRS could provide a more accurate assessment of this risk in these clinical settings.

In addition to the functional alterations inherent to the ageing of the cardiovascular system (including systemic arterial hypertension and ischemic cardiopathy), CCC presents distinguished conditions that affect clinical course and prognosis of CVDs (20–23). Consequently, these factors can lead to increased morbimortality and reduction in the quality of life of chronic elderly patients suffering from *T. cruzi* infection. In this context, special attention on the follow-up of chronic CD patients needs to be directed to the pathophysiology of disease considering its particularities.

The significant increase of CVD risk in chronic CD patients using the FRS is in accordance with a previous study (24) reporting the development of cerebrovascular disease associated to

systemic arterial hypertension and dyslipidemia in elderly chagasic patients. Moreover, increased myocardial damage was observed when associated with arterial hypertension in chronic CD (25). In addition, necropsies of 92 elderly CD patients revealed the presence of arterial hypertension (37%), atherosclerosis (62%) and ischemic heart disease (6.5%), indicating an overlap between these comorbidities and chronic CD (26).

Interestingly, adipose tissue is considered an important target and reservoir for *T. cruzi* infection (27–29), contributing not only to the pathogenesis of CD but also to the disruption of fat and glucose metabolisms, with an impact on CVD risk. The fact that high levels of cholesterol and HDL-C were also observed in indeterminate CD patients indicates that the presence of *T. cruzi* infection might be related to dyslipidemia, regardless of cardiac involvement. It is important to emphasize that sudden cardiac failure is the primary cause of death among chronic CD patients, including the indeterminate form (6), which emphasizes the need for a preventive control program to reduce such risks. The lack of a significant difference in the FRS between indeterminate and cardiac CD forms might indicate that both groups are influenced by adipocyte infection. It is also important to consider that although indeterminate patients present no abnormalities in the ECG or ECHO, they are at risk of progressing to cardiac or digestive forms. Thus, both symptomatic and asymptomatic CD patients with confirmed or suspected arrhythmia, particularly with any degree of myocardial dysfunction, should be carefully assessed, initially with non-invasive methods, and by electrophysiological evaluation whenever necessary (6).

However, the sample size of CD patients is a limitation of this study that was due to the strict exclusion criteria of comorbidities related to lipid metabolism reinforcing the fact that estimated

CVD risk is associated to CD. Thus, additional studies including a larger cohort of patients with different ethnical backgrounds are needed to confirm this finding.

Although, ECG was useful in providing prognostic information in patients <60 years old with a normal ECG at the time of diagnosis having long-term survival rates similar to seronegative controls (29), a recent meta-analysis reported high mortality due to CD in both symptomatic and asymptomatic patients when compared to controls, with sudden cardiac death/CVDs and heart transplant being the major causes (30). Therefore, approaches able to identify subgroups at higher risk of cardiovascular events are essential in the follow up of all CD clinical forms, assuring appropriate intervention and reducing long-term risks, such as atherosclerosis, coronary artery disease, and sudden death.

Conclusion

An increased risk of CVD using the Framingham algorithm was observed in patients with CD. This finding reinforces the need for a multifactor risk score such FRS to be used in clinical settings on a routine follow-up.

References

1. WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2012;(975):v-xii, 1-100.
2. Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2014 Feb 1;130:167–74.
3. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388–402.
4. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clin Cardiol*. 2015 Sep 1;38(9):565–9.
5. Salvatella R, Irabedra P, Sánchez D, Castellanos LG, Espinal M. South-south cooperation for Chagas disease. *Lancet (London, England)*. 2013 Aug 3;382(9890):395–6.
6. Rassi Jr A, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*.

- 2001 Jan;76(1):86–96.
7. Quiros FR, Morillo CA, Casas JP, Cubillos LA, Silva FA. CHARITY: Chagas cardiomyopathy bisoprolol intervention study: a randomized double-blind placebo forced-titration controlled study with Bisoprolol in patients with chronic heart failure secondary to Chagas cardiomyopathy [NCT00323973]. *Trials*. 2006 Dec 9;7(1):21.
 8. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005 Sep 20;112(12):e154-235.
 9. Studziński K, Tomasik T, Krzyszton J, Józwiak J, Windak A. Effect of using cardiovascular risk scoring in routine risk assessment in primary prevention of cardiovascular disease: protocol for an overview of systematic reviews. *BMJ Open*. 2017 Mar 8;7(3):e014206.
 10. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008 Feb 12;117(6):743–53.
 11. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012 Jan 3;125(1):188–97.
 12. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation*. 1998 May 1;97(18):1837 LP-1847.
 13. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2016 Jun;25(21):1–10.
 14. Meissner D. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Heal Organ.
 15. Cucunubá ZM, Okuwoga O, Basáñez M-G, Nouvellet P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*. 2016 Dec 27;9(1):42.
 16. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez M-G, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. de Silva N, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 24;8(7):e2865.
 17. Andrade JP de, Marin Neto JA, Paola AAV de, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, et al. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. *Arq Bras Cardiol*. 2011 Jun;96(6):434–42.
 18. Carrasco HA, Guerrero L, Parada H, Molina C, Vegas E, Chuecos R. Ventricular arrhythmias and left ventricular myocardial function in chronic chagasic patients. *Int J Cardiol*. 1990 Jul 1;28(1):35–41.
 19. Navarro EC, Miziara De Abreu M, Tavares FC, Corrente JE, Maria De Arruda C, Câmara P, et al. Indeterminate Form of Chagas' Disease and Metabolic Syndrome: A Dangerous Combination. *Am J Medicine Medical Sci*. 2013;3(4):68–73.

20. Nunes MCP, Reis RCP, Colosimo EA, Ribeiro ALP, Barbosa FBL, da Silva JLP, et al. Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. *Int J Cardiol*. 2011 Mar 3;147(2):294–6.
21. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Jan 1;52(4):300–16.
22. Rocha MOC, Nunes MCP, Ribeiro AL. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(suppl 1):159–66.
23. Rassi A, Rassi A, Rassi SG. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease: A Systematic Review of Observational Studies. *Circulation*. 2007 Mar 6;115(9):1101–8.
24. Alves LC, Rodrigues RN. Determinantes da autopercepção de saúde entre idosos do Município de São Paulo, Brasil. *Rev Panam Salud Pública*. 2005 Jun;17(5–6):333–41.
25. Guariento ME, Alliegro FC, De Almeida EA, Original A. Chagas' disease associated with chronic infirmities in outpatients followed in a university hospital.
26. Andrade ZA, Silva HRR, Andrade ZA, Silva HRR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Aug;90(4):521–2.
27. Combs TP, Nagajyothi, Mukherjee S, de Almeida CJG, Jelicks LA, Schubert W, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24085–94.
28. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS, Upadhya R, Zhao D, Schwartz GJ, et al. Response of Adipose Tissue to Early Infection With *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *J Infect Dis*. 2012 Mar 1;205(5):830–40.
29. Maguire JH, Hoff R, Sherlock I, Guimarães AC, Sleigh AC, Ramos NB, et al. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation*. 1987 Jun 1;75(6):1140–5.
30. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003 Mar 1;71(3):1185–93.

Table 1. Clinical, demographical and laboratory features of the patients with chronic Chagas Disease.

Parameters		Chagas Disease Clinical Form				
		Controls N=80	Indeterminate N=41	Cardiac N=39	Digestive N=20	Cardiodigestive N=5
Age (years)	Mean [Range]	51.2 [21-85]	50.3 [32-80]	51.2 [29-71]	55.9 [36-84]	53.6 [47-64]
Sex	Female (%)	38 (47.5)	27 (65.9)	23 (58.9)	12 (60)	2 (40)
	Male (%)	42 (52.5)	14 (34.1)	16 (41)	8 (40)	3 (60)
Predominant ancestry	Euro-Brazilian	72	37	29	14	2
	Afro-Brazilian	8	4	7	5	3
	Amerindian	0	0	0	0	0
	Asian-Brazilian	0	0	3	1	0
Cardiac Commitment	A	N.a.	N.a.	20	N.a.	1
	B	N.a.	N.a.	10	N.a.	0
	C	N.a.	N.a.	9	N.a.	4
	D	N.a.	N.a.	0	N.a.	0
LVEF (%)	Mean [Range]	60.3 [33-67]	72.2 [59-85]	72.3 [67-85]	N.a.	73.5 [67-84]
Glucose (mg/dl)	Mean [Range]	98.3 [73-373]	93.2 [72-112]	102.1 [76-239]	97.5 [78-136]	107 [88-115]
BMI (kg/m ²)	Mean [Range]	26.6 [16.5-41.3]	26.7 [16.2-42.3]	26.3 [18-35.5]	25.1 [18.4-31.2]	24.4 [20.8-27.9]
Cholesterol (mg/dl)	Mean [Range]	189.1 [104-298]	202.5 [119-324]	203.7 [138-267]	200.1 [124-278]	192 [119-258]
LDL-C (mg/dl)	Mean [Range]	116.6 [49.9-209]	132.7 [57-245]	130.5 [70.8-206]	139.1 [64.8- 210]	126.1 [57-200]
HDL-C (mg/dl)	Mean [Range]	49.3 [27-98]	50.5 [28-93]	51.1 [29-78]	44.5 [28-63]	48.4 [38-60]
Triglycerides (mg/dl)	Mean [Range]	122.8 [46-508]	162.2 [46-347]	161.4 [60-255]	135.3 [46-290]	96.4 [60-143]
Systolic blood pressure	Mean [Range]	124.8 [100-140]	141.7 [120-190]	142.3 [110-180]	138.5 [100-170]	126 [90-160]
Hypertension	n (%)	43 (53.8)	25 (60.9)	23 (58.9)	13 (65)	3 (60)
Hypertension treatment	n (%)	33 (41.3)	0 (0)	4 (10.3)	3 (15)	0 (0)
Diabetes	n (%)	2 (2.5)	4 (9.8)	1 (2.5)	2 (10)	0 (0)
Smoking	n (%)	22 (27.5)	7 (17.1)	7 (17.9)	6 (30)	0 (0)
FRS	Low risk	54	28	20	7	4
	Intermediate risk	20	13	16	12	1
	High risk	6	0	3	1	0

Note: The functional classification of cardiac insufficiency according Brazilian Consensus on Chagas Disease (2016) (13): A- altered electrocardiogram (ECG) and normal echocardiogram (ECHO), absence of cardiac insufficiency (CI); B1- altered ECHO, LVEF>45%, absence of CI; C- altered ECG and ECHO, compensable CI; D- altered ECG and ECHO, refractory CI. Data is shown as numbers or mean [range]. N.a.: not applicable.

Figure 1. Cardiovascular Framingham risk score (FRS) in 105 patients with chronic Chagas Disease (CD) and 80 healthy controls. **A-** FRS in patients with CD and its clinical forms (indeterminate: n=35, and cardiac: n=55), and controls; **B-** FRS in patients with CD and controls according to sex (CD patients: 42 men and 63 women; controls: 42 men and 38 women) (Mann-Whitney test).

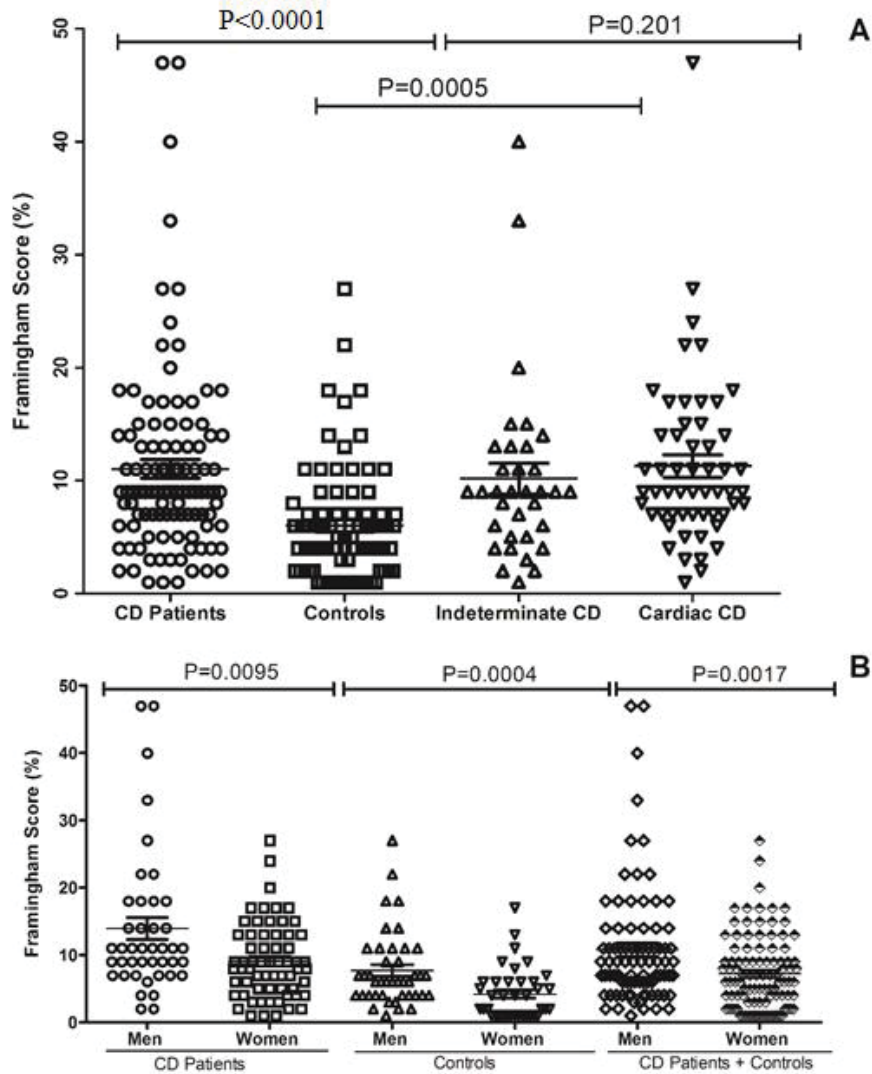


Figure 2. Triglycerides (TRI), cholesterol (COL), HDL-C and LDL-C levels in 35 indeterminate (IF) and 55 cardiac (CF) forms of Chagas Disease (CD) (Mann-Whitney test).

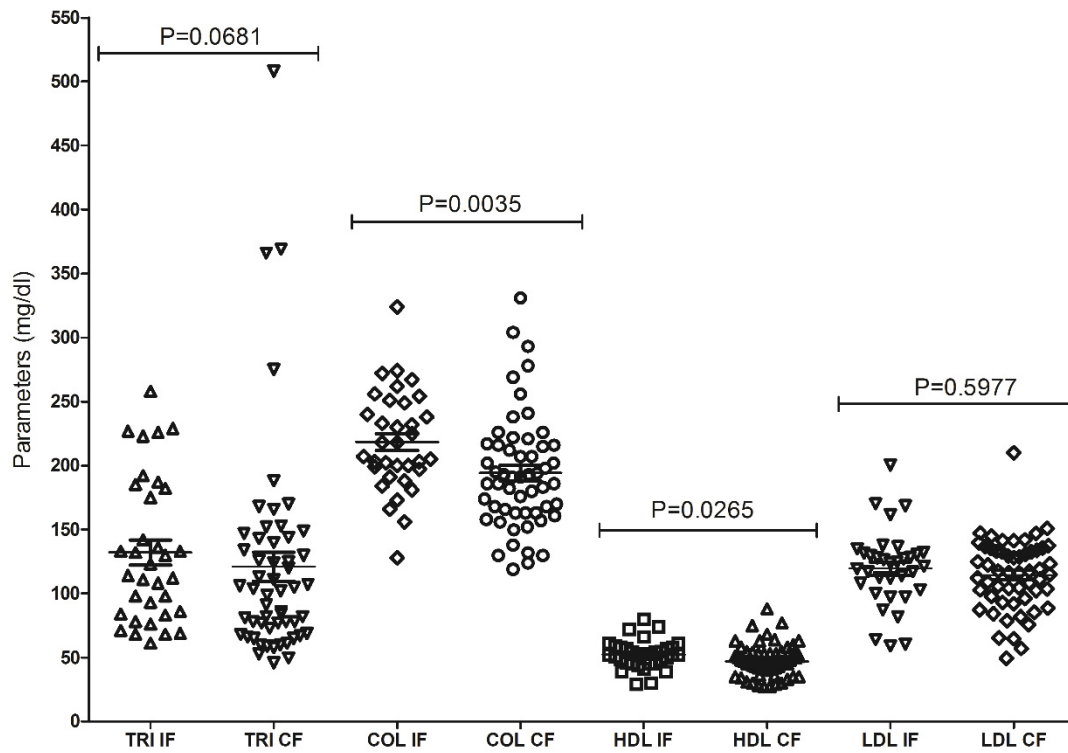


Figure 3. Correlation of FRS with Age, HDL-C and LDL-C in 105 patients with Chagas Disease (CD) and 80 controls (Spearman's test).

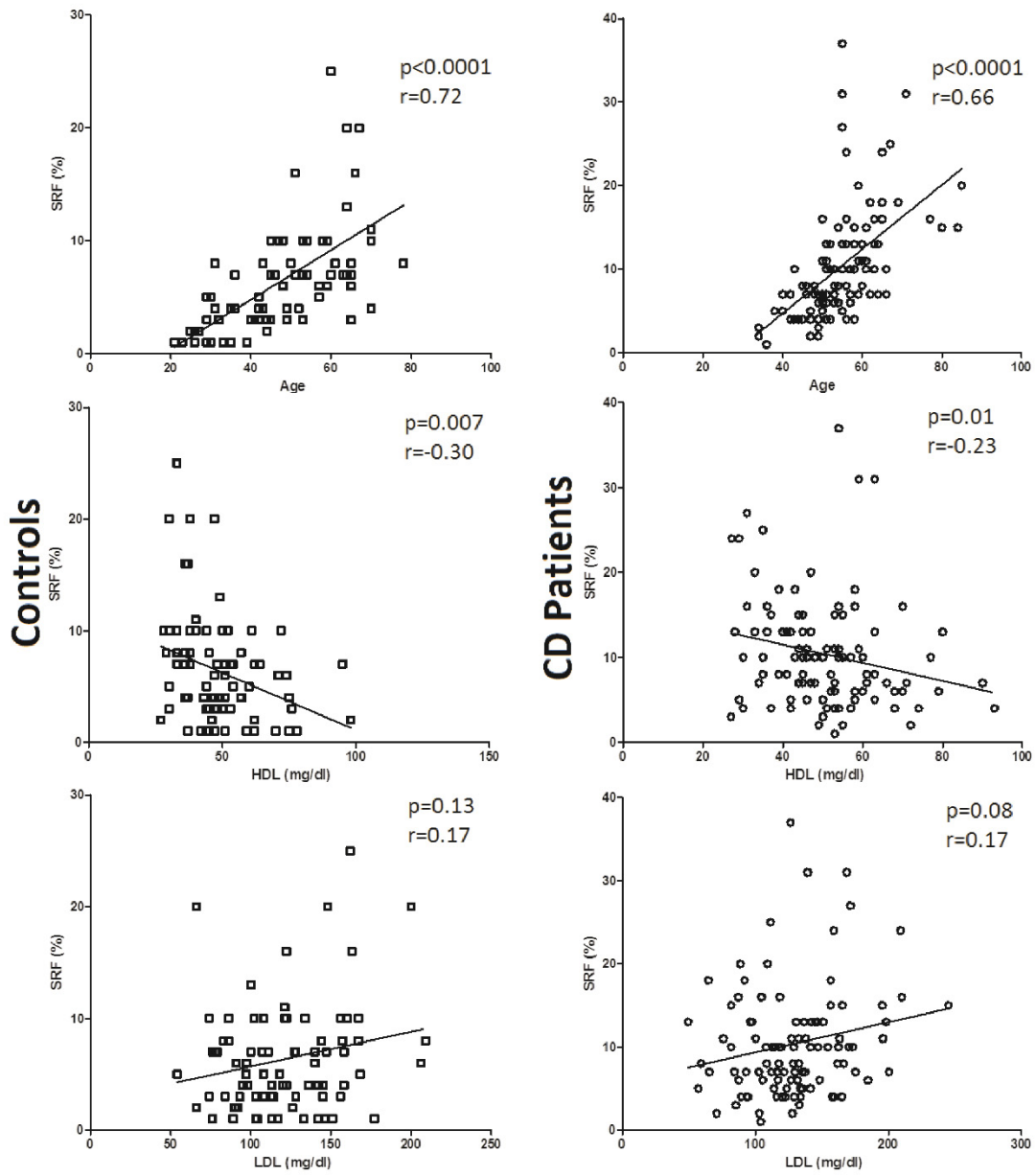
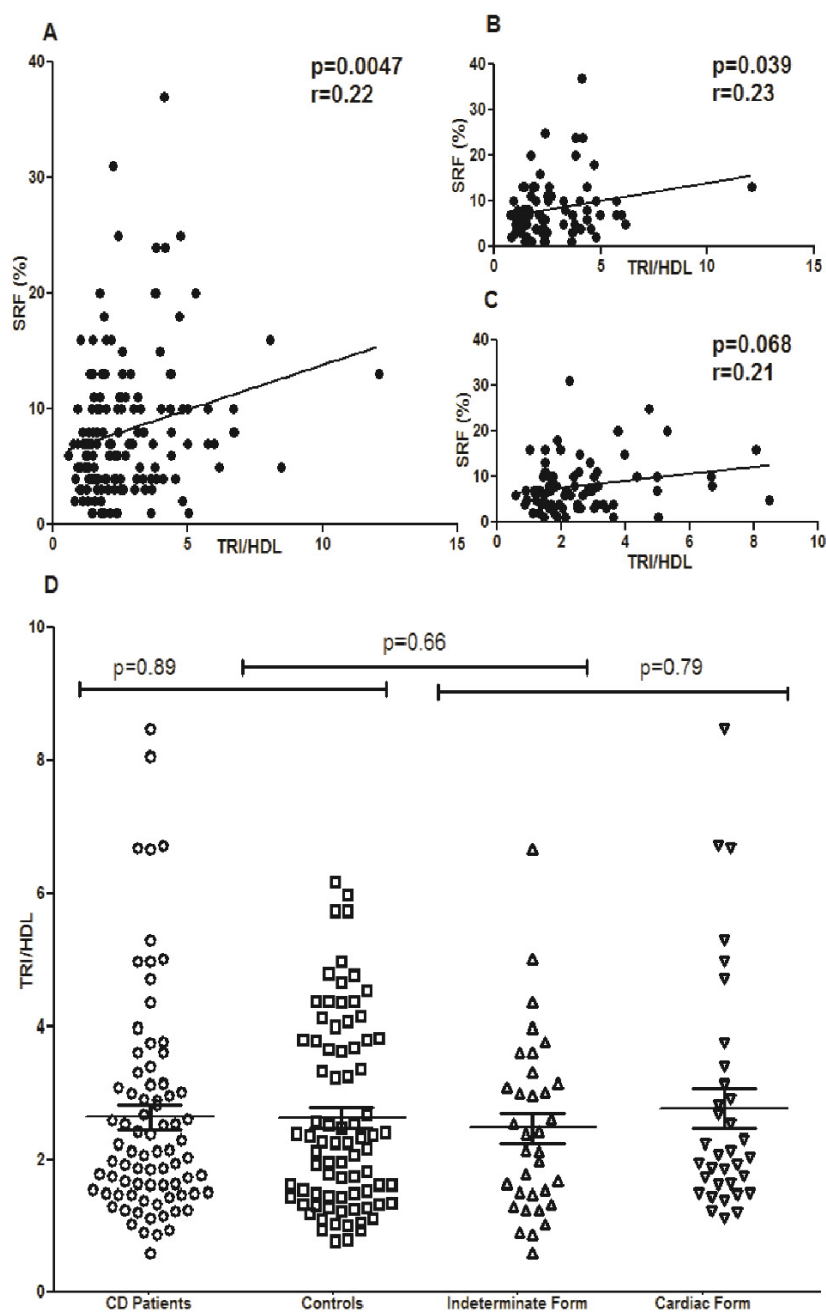
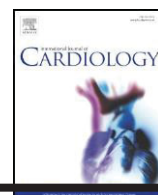


Figure 4. Spearman's correlation of FRS with TRI/HDL-C index and triglycerides distribution in 105 patients with Chagas Disease (CD) and 80 controls. A- correlation of FRS with TRI/HDL index in both patients and controls ($p=0.0047$); B- correlation of FRS in control subjects ($p=0.039$); C- correlation of FRS in CD patients ($p=0.068$); and D- TRI/HDL index comparing patients x controls ($p=0.89$), controls x indeterminate CD ($p=0.66$), and indeterminate x cardiac CD ($p=0.79$).





Letter to the Editor

Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease?



Kárita Cláudia Freitas Lidani ¹, Marcia Holsbach Beltrame ¹, Paola Rosa Luz ¹, Thaisa Lucas Sandri ¹, Renato Mitsunori Nisihara ¹, Iara José de Messias-Reaso ^{*1}

Laboratory of Molecular Immunopathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná (HC-UFPR), Curitiba, PR, Brazil

article info

Article history:

Received 23 March 2015

Accepted 14 April 2015

Available online 16 April 2015

Keywords:

Pentraxin 3 Chagas disease

Cardiomyopathy

Chagas disease (CD) is a tropical neglected disease caused by *Trypanosoma cruzi*, which affects more than 8 million people in Latin America and represents an emerging problem in North America and Europe due to international migrations. Although most individuals infected by *T. cruzi* remain asymptomatic in the indeterminate form, after 10–20 years they may progress to one of the symptomatic forms of the disease, developing chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), digestive megasyndromes, or both [1].

Cytokines and inflammatory mediators, including the complement system, are considered to contribute to the clinical progression of chronic CD. Even though the activation of complement system is essential to reduce parasite load during acute *T. cruzi* infection, it can cause tissue injury due to inflammation in CCC [2].

PTX3 is a multifunctional soluble pattern recognition molecule of innate immunity, which belongs to the long pentraxin family. Differently from C reactive protein, which is a short pentraxin produced in the liver. PTX3 is secreted at inflammatory sites by several cells, such as monocytes/macrophages and endothelial cells [3]. Thus, PTX3 has been considered a novel and probably more useful inflammatory marker for cardiovascular diseases.

Recent studies have demonstrated the involvement of PTX3 in different clinical disorders including cardiovascular diseases. While high PTX3 plasma levels were related to cardiac commitment in heart failure and associated with the risk to cardiovascular disease in metabolic syndrome, low plasma PTX3 concentrations were observed in patients with coronary

* Corresponding author at: Setor de Ciências da Saúde, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Rua General Carneiro 181, 80060-900 Curitiba, PR, Brazil.

E-mail address: iarareason@hc.ufpr.br (I.J. de Messias-Reaso).

¹ This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

artery disease and associated with metabolic syndrome and non-vascular injury resulted from previous myocardial infarction [4]. These studies reflect different roles for PTX3 in distinct inflammatory diseases and

suggest that PTX3 may be a marker of clinical progression in heart diseases.

Considering the potential role for PTX3 as a risk factor for cardiovascular diseases and that no laboratory marker is available to indicate the progression from indeterminate to symptomatic CD, we aimed to determine PTX3 plasma levels in chronic CD patients (n = 128) from Southern Brazil using an ELISA commercial kit (Human Pentraxin 3/TSG-14, R&D®System, Minneapolis, USA). The cardiac patients were graded according to the cardiac insufficiency classification of the American Heart Association, adapted for Chagas disease (2005) [5] in A, B1, B2, C, and D groups. Demographical, laboratorial, and clinical findings of the specific CD forms are shown in Table 1. Moreover, 87 unrelated Southern Brazilians with negative *T. cruzi* serology and without clinical complaints were used as control subjects. All parameters were analyzed with adjustment for age, sex, and ancestry using logistic regression analysis. Formal written consent was obtained from each individual and the study was approved by the local medical ethics committee.

Plasma levels of PTX3 were significantly lower in CD patients when compared to controls ($p < 0.0001$, medians: 1.6 ng/ml and 2.7 ng/ml, respectively) (Fig. 1A). Although PTX3 levels were not related with cardiac commitment (cardiac A form versus B1 + B2 + C + D forms), different PTX3 levels were observed in the cardiac group when compared to indeterminate patients and controls ($p < 0.0001$). Moreover, a positive correlation between plasma PTX3 and Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF) ($rho = 0.29$ and $p = 0.0048$) (Fig. 1B) was observed in the patients. There was a positive correlation between PTX3 levels and age in the controls ($rho = 0.37$, $p = 0.0027$), but not in patients and PTX3 levels were related with low HDL levels (b40 mg/dl) (1.72 ng/ml for low-HDL and 1.65 ng/ml for high-HDL, $p < 0.001$, OR 0.72, and CI 95%: 0.63–0.83) (Fig. 1C). In addition, PTX3 levels were also related to body mass index in patients (BMI) ($rho = 0.22$ and $p = 0.05$), with PTX3 levels being lower in non-obese (BMI < 30 kg/m²) than obese (BMI ≥ 30 kg/m²) CD patients (medians 1.42 ng/ml and 2.01 ng/ml, respectively, OR 1.67 CI 95%: 0.45–6.15 $p = 0.04$) (Fig. 1D).

Table 1
Clinical, demographical, and laboratorial features of the patients with chronic Chagas disease.

Parameters		Chagas disease clinical form			
		Indeterminate N = 41	Cardiac N = 52	Digestive N = 19	Cardiodigestive N = 16
Age (years)	Mean (min-max)	53.2 [34–69]	56.5 [34–84]	59.2 [36–84]	58.9 [37–73]
Sex	Female	28	25	15	7
	Male	13	27	4	9
Body mass index (kg/m ²)	(N) mean [min-max]	(34) 26.7 [19.5–36.6]	(30) 26.3 [18–35.5]	(16) 25.1 [18.4–31.2]	(4) 24.4 [20.8–27.9]
Predominant ancestry	Euro-Brazilian	36	34	12	13
	Afro-Brazilian	5	14	6	3
	Amerindian	0	3	1	0
	Asian-Brazilian	0	1	0	0
Cardiac commitment	A	N.a.	14	N.a.	6
	B1	N.a.	11	N.a.	5
	B2	N.a.	2	N.a.	0
	C	N.a.	23	N.a.	5
	D	N.a.	2	N.a.	0
Left ventricular fraction ejection (%)	(N) mean [min-max]	(27) 69 [59–78]	(41) 53.5 [24–82]	N.a.	(12) 56.3 [23–75]
Glucose (mg/dl)	(N) mean [min-max]	(29) 102.9 [77–239]	(38) 105.5 [82–373]	(14) 109.4 [89–162]	(11) 100.2 [88–115]
Total cholesterol (mg/dl)	(N) mean [min-max]	(31) 207.1 [124–272]	(42) 205.4 [120–331]	(11) 208.2 [157–267]	(12) 188.2 [119–253]
LDL cholesterol (mg/dl)	(N) mean [min-max]	(31) 131 [59.2–200.4]	(42) 156.3 [85–283]	(11) 160.4 [117–228]	(12) 140.8 [69–183]
HDL cholesterol (mg/dl)	(N) mean [min-max]	(31) 53.5 [28–80]	(42) 49 [27–114]	(11) 47.8 [31–70]	(12) 47.3 [29–76]
Triglycerides (mg/dl)	(N) mean [min-max]	(31) 112.4 [46–229]	(42) 140.2 [50–584]	(11) 140.7 [65–283]	(12) 115.5 [60–179]
History of diabetes	(N)	3/35	3/49	2/18	1/16
History of hypertension	N.a.	22/35	23/49	10/18	6/16

Note: The functional classification of cardiac insufficiency according to Brazilian Consensus on Chagas disease (2005): A: altered electrocardiogram (ECG) and normal echocardiogram (ECHO), absence of cardiac insufficiency (CI); B1: altered ECG, LVEF \geq 45%, absence of CI; B2: altered ECHO, LVEF \geq 45%, absence of CI; C: altered ECG and ECHO, compensable CI; D: altered ECG and ECHO, refractory CI. Data is shown as numbers or mean [range]. N.a.: not applicable.

PTX3 is considered to have a dual function in the innate response, at one side protecting against unwanted complement activation, and on the other hand, enhancing complement-mediated tissue injury in situations such as ischemia or reperfusion [6].

PTX3 may mediate complement activation through the binding to different pattern recognition molecules including C1q, ficolins, and mannose-binding lectin (MBL) [6]. A pro-inflammatory role for MBL

has been suggested in CCC and binding of both MBL and Ficolin-2 to *T. cruzi* was demonstrated in vitro [2]. On the other hand, PTX3 may interact with Factor H remaining functionally active, thus surface-bound PTX3/Factor H may prevent tissue damage associated with complement activation. Thus, low levels of PTX3 in patients with chronic CD may reflect an anti-inflammatory role for the protein, which might be in part related with Factor H interaction. Additionally, an anti-inflammatory

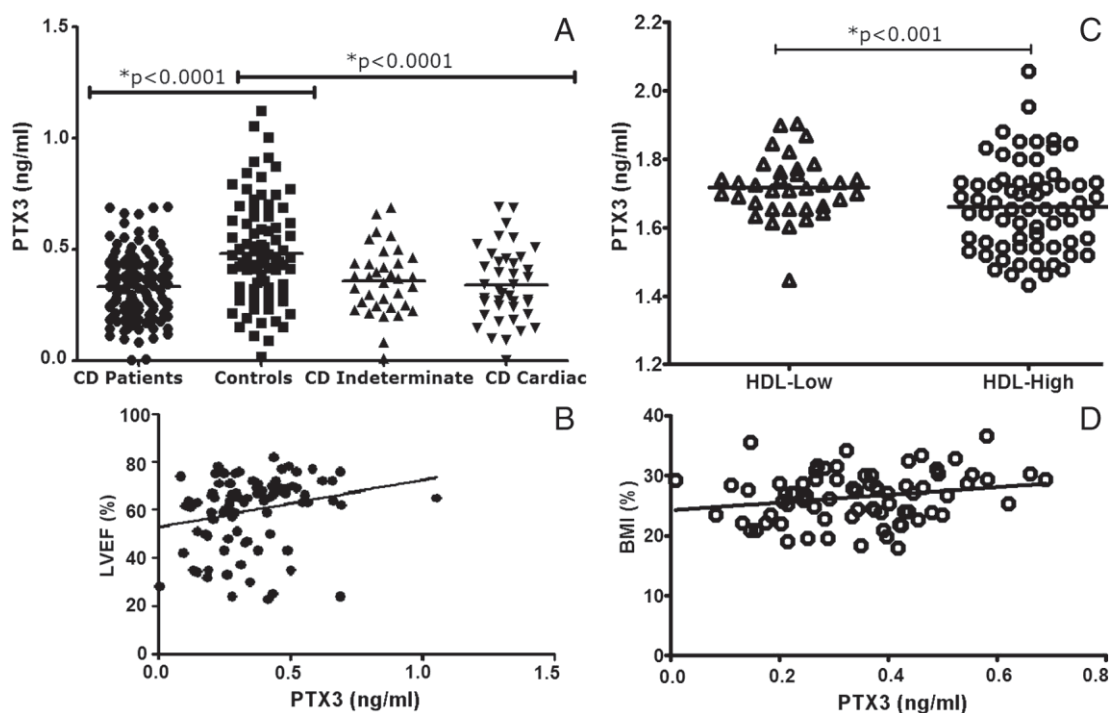


Fig. 1. Plasma PTX3 levels in patients with Chagas disease and its relation to risk factors for cardiovascular disease. A. PTX3 plasma levels in patients with Chagas disease and control subjects (*p < 0.0001, Kruskal–Wallis test); and in cardiac and indeterminate Chagas disease forms compared with control subjects (*p < 0.0001, Mann–Whitney test). B. PTX3 plasma levels in high and low HDL patients (p < 0.001). C. Correlation between PTX3 plasma levels and left ventricular ejection fraction (LVEF) in patients with CD. D. Association between PTX3 plasma levels (ng/ml) and BMI (%): rho = 0.22 and p = 0.05.

property for PTX3 has been reported in cardiac surgery and during clearance of late apoptotic cells by macrophages [7]. Moreover, exogenous administration of PTX3 was found to restrict the inflammatory response in experimental chronic granulomatous disease [8]. Low levels of PTX3 related to absence of disease activity were also found in systemic lupus erythematosus patients [9]. These studies corroborate with our findings indicating that PTX3 might play an anti-inflammatory property in chronic CD, conferring a cardioprotective role.

In contrast, high PTX3 concentrations were related to heart failure, contributing to cardiac commitment definition and associated with severity of dilative cardiomyopathy. Besides, increased PTX3 levels were observed in cardiac acute processes such as myocardial infarction and unstable angina [10]. Thus, these findings reflect different features of PTX3 in inflammatory process and suggest its use to assess clinical progression in cardiac disease.

Interestingly, we found a significant correlation of PTX3 with LVEF, which is an important cardiac function parameter. Although the pathophysiological role of PTX3 in the immune response is still unknown, this study suggests a protective role for PTX3 in chronic CD, being associated with cardioprotective function. Since low PTX3 concentration was also observed in CCC, it seems that low plasma PTX3 levels may be associated with cardiovascular risk factors in chronic CD.

In conclusion, our findings suggest an immunoregulatory role associated with cardioprotective feature for PTX3 in chronic CD. Further prospective studies should monitor plasma PTX3 levels in the follow-up of chronic patients with CD in order to confirm this effect of PTX3.

Conflict of interest

The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

Acknowledgment of grant support

This work was also supported by research grants from CAPES

(23038.005301/2011-69) (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior) and from CNPq (309970/2011-3) (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil). Also bilateral cooperation support from BMBF to VTP (BMBF BRA11/A33; 01DN11001) is acknowledged.

References

- [1] A. Moncayo, A.C. Silveira, Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (2009) 17–30.
- [2] P.R. Luz, M.I. Miyazaki, N.C. Neto, R.M. Nishihara, I.J. Messias-Reason, High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas disease, *Int. J. Cardiol.* 143 (2009) 448–450.
- [3] B. Bottazzi, A. Doni, C. Garlanda, A. Mantovani, An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm, *Annu. Rev. Immunol.* 28 (2010) 157–183.
- [4] J. Jylhävä, A. Haarala, M. Kähönen, T. Lehtimäki, A. Jula, L. Moilanen, et al., Pentraxin 3 (PTX3) is associated with cardiovascular risk factors: the Health 2000 Survey, *Clin. Exp. Immunol.* 164 (2011) 211–217.
- [5] Brazilian consensus on Chagas disease, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (2005) 1–29.
- [6] A.J. Nauta, B. Bottazzi, A. Mantovani, G. Salvatori, U. Kishore, W.J. Schwaeble, et al., Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 465–473.
- [7] P. Kunes, J. Mandak, Z. Holubcova, M. Kolackova, J. Krejssek, The long pentraxin PTX3: a candidate anti-inflammatory mediator in cardiac surgery, *Perfusion* 28 (2013) 377–389.
- [8] C. D'Angelo, A. De Luca, T. Zelante, P. Bonifazi, S. Moretti, G. Giovannini, et al., Exogenous pentraxin 3 restores antifungal resistance and restrains inflammation in murine chronic granulomatous disease, *J. Immunol.* 183 (2009) 4609–4618.
- [9] Y. Shimada, Y.F. Asanuma, K. Yokota, Y. Yoshida, H. Kajiyama, K. Sato, Y. Akiyama, T. Mimura, Pentraxin 3 is associated with disease activity but not atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus, *Mod. Rheumatol.* 24 (2014) 78–85.
- [10] N. Kotooka, T. Inoue, S. Aoki, M. Anan, H. Komoda, K. Node, Prognostic value of pentraxin 3 in patients with chronic heart failure, *Int. J. Cardiol.* 130 (2014) 19–22.

Artigo: *Complement Factor H as a potential atherogenic marker in chronic Chagas disease*

Title: Complement Factor H as a potential atherogenic marker in chronic Chagas disease

Running title: Complement Factor H in Chagas disease

Kárita Cláudia Freitas Lidani¹, Thaisa Lucas Sandri^{1,2}, Fabiana Antunes Andrade¹, Lorena Bavia¹, Renato Nisihara¹, Iara J Messias-Reason¹

¹ Laboratory of Molecular Immunopathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

² Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany

* Corresponding author: Setor de Ciências da Saúde, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Rua General Carneiro 181, 80060-900, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3360 1800x6537; fax: +55 41 3362 7598. E-mail address: iarareason@hc.ufpr.br

Disclosures

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from Fundação Araucária (CP 01/2016 Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS Edição 2015 Fundação Araucária-PR / SESA-PR / CNPq / MS-Decit) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to IM-R (CNPq).

Abstract

Aims: We aimed to investigate the association between plasma levels of complement Factor H (FH) with cardiac involvement, inflammatory and cardiometabolic parameters in patients with chronic Chagas disease (CD).

Methods: FH plasmatic levels were determined in 80 chronic CD patients. Glycemic index, lipidogram (high-density lipoprotein cholesterol HDL-C, low-density lipoprotein cholesterol LDL-C, triglycerides and total cholesterol), and Ultrasensitive C-Reactive Protein (uCRP) values were obtained from medical records. Height, weight, body mass index (BMI) blood pressure and left ventricular ejection fraction (LVEF) were obtained from echocardiography exams. Comparisons between chronic CD clinical forms were performed using Mann-Whitney test and correlation Spearman test.

Results: FH levels were correlated positively with triglycerides ($p=0.001$, $r=0.39$), LDL-C ($p=0.009$, $r=0.3$), cholesterol ($p=0.02$, $r=0.28$), uCRP ($p=0.029$, $r=0.31$) and BMI ($p=0.008$, $r=0.34$); and negatively with HDL-C ($p=0.03$, $r=-0.25$) levels. Dyslipidemic patients showed higher FH levels compared to normolipidemic, although no difference for FH levels were observed between chronic CD clinical forms.

Conclusion: Alternative pathway of complement may be a link between immune response and metabolic disorders, with important immunoregulatory role in chronic CD.

Keywords: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, Complement, Inflammation

Introduction

Chagas Disease (CD) is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* that affects about 6 to 8 million people worldwide. CD is considered the parasitic disease that causes the greatest socioeconomic impact in Latin America, where around 65 million people live at risk of contracting the disease (1,2). In the last decades, CD has become a concern of public health, especially in Europe, North America and Asia due the intense people migration from endemic areas (3,4). After the acute phase of CD, patients may remain asymptomatic form throughout their lifetime or may develop, after 20-30 years, one of the symptomatic forms of the disease according to the affected tissues, including chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), digestive megasyndromes, or both (5). In addition, rarely a severe fatal form of CD occurs in immunosuppressed patients or infants, characterized by meningoencephalitis and myocarditis (6). The mortality and substantial disability related to chronic CD occurs most in the productive age resulting in a significant social and economic loss (7) due to the frequent need for long-term treatment and surgical procedures (8).

Different studies have demonstrated the crucial role of complement as a first line of defense against *T. cruzi* infection (9,10), as well as in the maintenance of chronic infection (11) and severity of CCC (12–15). The complement system includes more than 35 plasma proteins/regulators and cell surface receptors which act together in the recognition and elimination of microbial and foreign cells. In order to keep complement activation under homeostatic conditions, an effective and fine system of regulatory molecules, such as complement Factor H (FH) is required (16) FH is a key regulator of the activation of alternative pathway and one of the most abundant complement protein with a plasma concentration ranging 110.000-615.000 ng/mL (17). FH dissociates factor B from the C3 convertase (C3bBb) and acts as a cofactor for factor I inactivating C3b, and consequently the extension of complement cascade (18,19). Thereby FH plays an important role in maintaining tissue homeostasis and protecting cells from excessive complement activation (17,18).

The role of FH in metabolic disorders has been reported and was shown to contribute to the regulation of insulin secretion, suggesting its involvement in diabetes disorders (20). Recently, one of the FH ligands, pentraxin PTX3, was associated to cardiometabolic parameters in chronic CD, corroborating with the important link between complement and serum lipids

(21). In addition, both FH gene expression in adipose tissue and circulating FH were associated to obesity and metabolic parameters, contributing to the formation of atheroma plaque (22). On the other hand, the protective role of FH in preventing atherosclerosis progression from early to advanced lesions by restricting complement activation locally has been observed by others (23).

The interplay between adipose tissue and complement has been reported with important consequence in the pathogenesis of atherosclerosis, whose process results in inflammation, tissue damage and vascular complications. Adipose tissue has been implicated as one of essential *T. cruzi* storage sites in the host whose process results in metabolism imbalance (24,25). Since mortality in chronic CD is mainly due to cardiovascular involvement causing up to 75% of sudden death or stroke (26), studies involving lipid profile and inflammatory regulators in CD may be an effective tool to predict heart commitment.

However, dysregulation of host lipid metabolism is considered to be beneficial for *T. cruzi* multiplication and survival in chronic CD (27,28), and this may contribute to development of atherosclerosis. Since adipose tissue synthesizes some complement proteins and it is a target for complement activation (29), chronic inflammatory diseases that promoting metabolic disorders such as chronic CD must, therefore, be followed-up for atherogenic risk. In this context, we aimed to investigate the association between plasma concentrations of FH, inflammatory and cardiometabolic parameters in patients with different clinical forms of chronic CD.

Material and methods

Ethics Statement

The project was approved by the ethics committee of Clinical Hospital, Federal University of Paraná (CEP/HC-UFPR n. 360.918/2013-08).

Patients

A total of 80 chronic CD patients attended at the Chagas Disease Ambulatory of the Clinical Hospital, Federal University of Paraná, were investigated [mean age 55.2 years; 43 (53.75%) female, 37 (46.25%) male; 64 (80%) Euro-Brazilians and 16 (20%) Afro-Brazilians]. CD

diagnosis was performed by serological (Enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA and Indirect ImmunoFluorescence- IIF) and clinical criteria. Clinical history of the patients was obtained from medical records and interviews. Patients younger than 18 years old, with statin prescription, recent infections, diabetes, hypothyroidism or suspected non-chagasic cardiomyopathy (such as hypertensive cardiopathy) were excluded.

Chagas disease forms

Asymptomatic form of CD is characterized by seropositivity for *T. cruzi*, absence of clinical signs and symptoms of cardiac and digestive involvement, and normal chest radiography and electrocardiography (30). Cardiac involvement affects mainly the conduction system and myocardium, and it is defined by clinical evaluation for signs and symptoms of CD and other cardiovascular risk factors, with abnormalities on 12-lead electrocardiogram (ECG) and echocardiography (ECHO) (31).

Cardiac patients were graded according to the cardiac insufficiency classification of the American Heart Association (AHA), adapted for Chagas disease, as follows: **A**: altered ECG and normal ECHO, absence of cardiac insufficiency (CI); **B1**: altered ECG, left ventricular ejection fraction (LVEF) > 45%, absence of CI; **B2**: altered ECHO, LVEF < 45%, absence of CI; **C**: altered ECG and ECHO, compensable CI; **D**: altered ECG and ECHO, refractory CI (32). Cardiac CD patients without heart failure includes forms A and B1/B2; and with heart failure forms C and D.

FH plasma levels and cardiometabolic parameters

Complement FH levels were assessed by an ELISA commercial kit (human Complement Factor H, Hycult Biotech, USA). Glycemic index, complete blood count (white blood cell differential, red blood cell count, hemoglobin), lipidogram (high-density lipoprotein cholesterol HDL-C, low-density lipoprotein cholesterol LDL-C, triglycerides and total cholesterol), and Ultrasensitive C-Reactive Protein (uCRP) were obtained from medical records. Height, weight, blood pressure and LVEF were obtained from echocardiography exams; information about smoking and alcoholism were obtained during interview. Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure

≥ 90 mm Hg (33). Parameters of lipid profile were stratified according to the V Brazilian Consensus on Dyslipidemia (34), considering dyslipidemia as total cholesterol > 240 mg/dL, LDL-C > 160 mg/dL, triglycerides > 200 and/or HDL-C < 40 mg/dL. Normolipemic was defined as normal results for total cholesterol (< 200 mg/dL), LDL-C (< 130 mg/dL), triglycerides (< 150 mg/dL) and HDL-C (> 60 mg/dL). Body Mass Index (BMI) was calculated using standard formula: weight (kg) divided by height-squared (m^2) and classified as < 30 kg/m^2 (non-obese) and ≥ 30 kg/m^2 (obese). Lipidogram was evaluated in both asymptomatic and symptomatic patients (paired according to BMI and sex).

Statistical analysis

The normality distribution of each variable was assessed by Shapiro-Wilk test. FH levels were compared between groups using Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests. Additionally, multiple regression analysis was executed to adjust results for age, sex and ethnic group. Pairwise associations were done using Spearman's rank correlation test for nonparametric variables. Statistical analysis was undertaken using the STATA 12.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA) and p -values < 0.05 were considered statistically significant. The GraphPad Prism program (version 6.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to generate graphics of dispersion presented with median and interpercentile.

Results

Demographic and clinical characteristics of the studied population classified into specific CD forms are shown in Table 1. The results showed interesting association between FH and lipid parameters in chronic CD patients. In order to evaluate cardio-inflammatory risk, FH levels were positively correlated with uCRP levels ($p=0.025$; $r=0.32$) and BMI ($p=0.008$; $r=0.34$), with FH levels being higher in obese than non-obese CD patients ($p=0.007$, medians 227050 vs. 204400 ng/ml, respectively) (**Figure 1A and 1B**). In addition, FH levels were also correlated to triglycerides ($p=0.001$; $r=0.39$), cholesterol ($p=0.02$; $r=0.28$) and LDL-C ($p=0.009$; $r=0.3$) serum levels (**Figure 1C, 1D and 1E**); and negatively correlated with HDL-C ($p=0.03$; $r=-0.25$) (**Figure 1F**). Similar significant correlations between FH levels and cardiometabolic parameters were found for both asymptomatic and cardiac group when

analyzed separately: asymptomatic form [uCRP ($p=0.05$; $r=0.16$), BMI% ($p=0.04$; $r=0.14$), triglycerides ($p=0.06$; $r=0.33$), total cholesterol ($p=0.001$; $r=0.56$), LDL-C ($p=0.001$; $r=0.57$) and HDL-C ($p=0.04$; $r=-0.27$)] and cardiac form [uCRP ($p=0.01$; $r=0.43$), BMI% ($p=0.02$; $r=0.46$), triglycerides ($p=0.009$; $r=0.41$), total cholesterol ($p=0.05$; $r=0.18$), LDL-C ($p=0.08$; $r=0.1$) and HDL-C ($p=0.01$; $r=-0.25$)].

Furthermore, the levels of FH were significantly higher in dyslipidemic when compared to normolipidemic CD patients ($p=0.0013$, medians: 217700 ng/ml and 205200 ng/ml, respectively) (**Figure 2A**). Besides that, patients having high triglyceride levels presented higher FH concentration (227550 ng/mL) compared to those with normal triglyceride levels (20700 ng/mL, $p=0.005$) (**Figure 2B**). Higher FH concentration were also observed in patients with high cholesterol levels (218550 ng/mL, $p=0.003$) and borderline (213200 ng/mL, $p=0.042$) than patients with normal cholesterol levels (203600 ng/mL) (**Figure 2C**). There was no difference in FH levels between normal vs. low HDL-C levels (210350 vs. 217100 ng/mL, $p=0.10$). Interestingly, high FH plasma levels were related to high LDL-C (211700 ng/mL, $p=0.0078$) when compared to patients with good LDL-C (203000 ng/mL), and between high (211700 ng/mL) and normal LDL-C (206550 ng/mL, $p=0.037$) (**Figure 2D**). *P* values were adjusted by multiple regression analysis.

However, no difference for FH levels were observed among CD clinical forms and cardiac insufficiency degree (**Figure 3**). FH levels presented no difference among patients with CCC grouped according to its cardiac degree A, B, C and D ($p=0.93$). Similar FH concentrations were also observed comparing Euro-Brazilians with Afro-Brazilians (210650 vs. 206400 ng/mL, $p=0.42$), as well as between women with men (211000 vs. 206400 ng/mL, $p=0.63$). There was no correlation between FH levels and age of patients.

Discussion

Numerous evidences have pointed to the role of inflammatory response in the development of chronic diseases. The activation of complement system is considered an important effector mechanism of inflammation and strict regulation is crucial for the resolution of this process hindering its excessive activation and, consequently, tissue damage. However, failure in the regulatory process of complement activation may promote development and

progression of chronic diseases, such as age-related macular degeneration (AMD), cancer, renal failure and Alzheimer's disease (35).

FH is a central regulator of the alternative pathway, including of the amplification loop which may be triggered by all three complement pathways (36). The presence of FH in human coronary artery lesions and in the superficial layer of the arterial intima suggests a protective role of FH against excessive complement activation in vascular disease (23). We investigated here whether FH could be a potential candidate to cardiovascular risk in CD and found that dyslipidemic patients showed higher FH levels compared to normolipidemic. In addition, FH levels were correlated positively with the lipid parameters associated to atherogenesis, such as triglycerides, LDL-C, cholesterol and BMI and negatively with HDL-C levels. Moreover, a positive correlation between FH and the inflammatory marker uCRP was observed.

Since the formation of the atheroma plaque requires a complex interaction between accumulated lipoproteins and vascular inflammation (37,38), FH might play a crucial anti-inflammatory role under dyslipidemia in order to modulate complement activity in such events. Considering that FH binds to arterial proteoglycans deposits (23), CRP (39) and fibromodulin (40), and that cholesterol crystals activate complement (41), increased FH levels in dyslipidemic CD might be a consequence of a stimulated FH secretion by adipocytes in an attempt to restrict complement driven damage during lipid metabolism dysregulation. Additionally, the FH His402 polymorphism displays impaired binding to mCRP (42), although this was not evaluated in this study. The association of FH with CRP levels and BMI in CD corroborates this hypothesis and is in agreement with other studies which showed that obesity is closely related to a chronic systemic inflammatory status (20,22).

In fact, the role of FH has been reported in the regulation of lipid homeostasis and transport (36). Interestingly, during dyslipidemia condition *T. cruzi* has been shown to present high affinity for host lipoproteins/cholesterol (43,44) and the use of lipids and LDL receptor for cell invasion leading to impairment of lipid metabolism and resulting in strong systemic and local inflammatory response (45). Moreover, cardiovascular complications are among the major causes of morbimortality in patients with chronic CD independently of the clinical form (26). And although the pathophysiological mechanism related to atherosclerosis in patients

with CD is unknown, the inflammatory role associated to *T. cruzi* storage in adipose tissue and complement activation may be followed by lipid metabolism dysregulation.

The plasma FH concentration in CD patients were in line with those expected for healthy adults within the range of 228510 to 829170 ng/mL (46). The levels of FH can vary depending of environmental and genetic factors, which explain this widely range (47). Since FH may represent the interplay between inflammatory and atherosclerotic events, especially in chronic CD due stored *T. cruzi* in adipose tissue, these findings are of great relevance for the clinical follow-up of these patients. One limitation of our study is that the exclusion criteria (comorbidities such as diabetes and hypothyroidism) have influenced the sample size due to their high prevalence among this age range. Thus, future investigations including larger cohort are needed in order to confirm these findings in patients and evaluate such correlation in the general population.

Finally, corroborating with previous studies, our results suggest that chronic *T. cruzi* human infection could be a potent risk factor for the progression of dyslipidemic related-immunometabolic disorders such as atherosclerosis. Further studies on the functional aspect of the relation between chronic *T. cruzi* infection and the dyslipidemic disorders are necessary. In reality, the role of innate immune mechanisms and metabolic dysfunction related to chronic parasite infection has been neglected which probably has contributed to the incidence of sudden death related to arterial occlusion in CD patients. Finally, atherosclerosis and dyslipidemia should be considered in the follow up of chronic CD patients and the value of FH as cardiovascular risk marker in chronic CD should be confirmed in further studies.

Conclusion

Deregulation of adipocyte function during *T. cruzi* chronic infection may lead to the production of proinflammatory mediators and development of atherosclerosis which might be explained by the positive correlation between FH and cardiometabolic parameters. Thus, the regulatory role of FH in the alternative pathway may be a link between inflammatory response and metabolic disorders in patients with chronic CD.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Author contributions

All authors fully participated in this work. KCFL carried out the experimental work and made analysis and interpretation of data; TLS carried out the experimental work and contributed to the acquisition of data; FAA made analysis and interpretation of data for the work; LB, RMN and IJTMR contributed to the design of the work and revised it critically. All authors reviewed the manuscript.

References

1. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease. *Glob Heart*. 2015 Sep;10(3):139–44.
2. PAHO. PAHO WHO | General Information - Chagas Disease [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 27]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=4196
3. Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2014 Feb 1;130:167–74.
4. Pérez-Molina JA, Norman F, López-Vélez R. Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Curr Infect Dis Rep*. 2012 Jun 3;14(3):263–74.
5. Malik M, Parikh I, Vasquez JB, Smith C, Tai L, Bu G, et al. Genetics ignite focus on microglial inflammation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2015 Dec 5;10(1):52.
6. Py MO. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 Sep;11(6):536.
7. Franco-Paredes C, Von A, Hidron A, Rodríguez-Morales AJ, Tellez I, Barragán M, et al. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC Int Health Hum Rights*. 2007 Dec 28;7(1):7.
8. Abuhab A, Trindade E, Aulicino GB, Fujii S, Bocchi EA, Bacal F. Chagas' cardiomyopathy: The economic burden of an expensive and neglected disease. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):2375–80.
9. Cestari I dos S, Krarup A, Sim RB, Inal JM, Ramirez MI. Role of early lectin pathway

- activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol*. 2009;47(2–3):426–37.
10. Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front Immunol*. 2016 Jan 18;6:659.
 11. Morrot A, Villar SR, González FB, Pérez AR. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? . Vol. 7, *Frontiers in Microbiology* . 2016. p. 704.
 12. Luz PR, Miyazaki MI, Chiminacio Neto N, Padeski MC, Barros ACM, Boldt ABW, et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. Tanowitz HB, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 8;10(1):e0004257.
 13. Luz PR, Boldt ABW, Grisbach C, Kun JFJ, Velavan TP, Messias-Reason IJT. Association of L-Ficolin Levels and FCN2 Genotypes with Chronic Chagas Disease. Rooijackers SHM, editor. *PLoS One*. 2013 Apr 4;8(4):e60237.
 14. Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, Nisihara RM, Messias-Reason IJ. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. Vol. 143, *International Journal of Cardiology*. 2010. p. 448–50.
 15. Boldt ABW, Luz PR, Messias-Reason IJT. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clin Immunol*. 2011;140(1):63–70.
 16. Degn SE, Thiel S. Humoral Pattern Recognition and the Complement System. *Scand J Immunol*. 2013 Aug;78(2):181–93.
 17. Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*. 2004 Jun 1;41(4):355–67.
 18. Alsenz J, Schulz TF, Lambris JD, Sim RB, Dierich MP. Structural and functional analysis of the complement component factor H with the use of different enzymes and monoclonal antibodies to factor H. *Biochem J*. 1985 Dec 15;232(3):841–50.
 19. Clark S, Bishop P. Role of Factor H and Related Proteins in Regulating Complement Activation in the Macula, and Relevance to Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med*. 2014 Dec 26;4(1):18–31.
 20. Martínez A, Pío R, López J, Cuttitta F. Expression of the adrenomedullin binding protein, complement factor H, in the pancreas and its physiological impact on insulin secretion. *J Endocrinol*. 2001 Sep;170(3):503–11.
 21. Lidani KCF, Beltrame MH, Luz PR, Sandri TL, Nisihara RM, De Messias-Reaso IJ. Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease? Vol. 190, *International Journal of Cardiology*. 2015. p. 233–5.
 22. Moreno-Navarrete JM, Martínez-Barricarte R, Catalan V, Sabater M, Gomez-Ambrosi J, Ortega FJ, et al. Complement Factor H Is Expressed in Adipose Tissue in Association With Insulin Resistance. *Diabetes*. 2010 Jan 1;59(1):200–9.
 23. Oksjoki R, Jarva H, Kovanen PT, Laine P, Meri S, Pentikäinen MO. Association between complement factor H and proteoglycans in early human coronary atherosclerotic lesions: Implications for local regulation of complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Apr 1;23(4):630–6.
 24. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, et al.

- Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol.* 2012 May;14(5):634–43.
25. Koethe JR, Hulgan T, Niswender K. Adipose Tissue and Immune Function: A Review of Evidence Relevant to HIV Infection. *J Infect Dis.* 2013 Oct 15;208(8):1194–201.
 26. Rassi Jr A, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001 Jan;76(1):86–96.
 27. Tanowitz HB, Amole B, Hewlett D, Wittner M. *Trypanosoma cruzi* infection in diabetic mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(1):90–3.
 28. Miao Q, Ndao M. *Trypanosoma cruzi* Infection and Host Lipid Metabolism. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:1–10.
 29. Vlaicu SI, Tatomir A, Boodhoo D, Vesa S, Mircea PA, Rus H. The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. *Immunol Res.* 2016 Jun 11;64(3):653–64.
 30. Dias JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989;22(3):147–56.
 31. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Vol. 115, *Circulation.* 2007. p. 1109–23.
 32. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde.* 2016 Jun;25(21):1–10.
 33. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2015 Jan 27;131(4):e29-322.
 34. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(4):01–22.
 35. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):785–97.
 36. Józsi M, Zipfel PF. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol.* 2008 Aug 1;29(8):380–7.
 37. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res.* 2014 Jun 6;114(12):1852–66.
 38. Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med.* 2012 Sep 1;16(9):1978–90.
 39. Okemefuna AI, Nan R, Miller A, Gor J, Perkins SJ. Complement Factor H Binds at Two Independent Sites to C-reactive Protein in Acute Phase Concentrations. *J Biol Chem.* 2010 Jan 8;285(2):1053–65.
 40. Sjöberg AP, Trouw LA, Clark SJ, Sjölander J, Heinegård D, Sim RB, et al. The Factor H Variant Associated with Age-related Macular Degeneration (His-384) and the Non-disease-associated Form Bind Differentially to C-reactive Protein, Fibromodulin, DNA, and Necrotic Cells. *J Biol Chem.* 2007 Apr 13;282(15):10894–900.
 41. Pilely K, Rosbjerg A, Genster N, Gal P, Pál G, Halvorsen B, et al. Cholesterol Crystals Activate the Lectin Complement Pathway via Ficolin-2 and Mannose-Binding Lectin: Implications for the Progression of Atherosclerosis. *J Immunol.* 2016 Jun 15;196(12):5064–74.

42. Molins B, Fuentes-Prior P, Adán A, Antón R, Arostegui JI, Yagüe J, et al. Complement factor H binding of monomeric C-reactive protein downregulates proinflammatory activity and is impaired with at risk polymorphic CFH variants. *Sci Rep*. 2016 Sep 10;6(1):22889.
43. Johndrow C, Nelson R, Tanowitz H, Weiss LM, Nagajyothi F. *Trypanosoma cruzi* infection results in an increase in intracellular cholesterol. *Microbes Infect*. 2014 Apr;16(4):337–44.
44. Nagajyothi F, Weiss LM, Zhao D, Koba W, Jelicks LA, Cui M-H, et al. High Fat Diet Modulates *Trypanosoma cruzi* Infection Associated Myocarditis. Santiago H da C, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 2;8(10):e3118.
45. Cabalén ME, Cabral MF, Sanmarco LM, Andrada MC, Onofrio LI, Ponce NE, et al. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity model. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):13400–15.
46. Naked GM, Florido MPC, Ferreira de Paula P, Vinet AM, Inostroza JS, Isaac L. Deficiency of Human Complement Factor I Associated with Lowered Factor H. *Clin Immunol*. 2000 Aug;96(2):162–7.
47. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol*. 2010 Aug 1;47(13):2187–97.

Table and figures

Table 1. Demographic and clinical features of chronic CD patients.

Parameters	CD clinical forms		Cardiac Insufficiency Classification			
	Asymptomatic	Cardiac	A	B	C	D
Age (years) N, median [min-max]	35, 55 [36-73]	43, 56 [34-81]	9, 56 [47-63]	10, 53 [34-60]	23, 56 [34-73]	1, 81
Sex						
Female	17	24	6	8	9	1
Male	18	19	3	2	14	-
Ancestry						
Euro-Brazilians	25	37	8	8	20	1
Afro-Brazilians	10	6	1	2	3	-
Body mass index (kg/m²) N, median [min-max]	32, 27 [19.5-36.6]	25, 25.9 [18.3-35.5]	8, 29 [22-32.8]	5, 29.7 [24-31.1]	12, 23.2 [18.3-35.5]	-
Total cholesterol (mg/dl) N, median [min-max]	30, 206 [124-272]	39, 193 [120-331]	8, 176 [130-269]	8, 210 [138-331]	22, 193 [120-293]	1, 216
HDL-C (mg/dl) N, median [min-max]	30, 51.5 [28-80]	39, 45 [27-90]	8, 49.5 [30-71]	8, 46 [43-54]	22, 41 [27-90]	1, 42
LDL-C (mg/dl) N, median [min-max]	30, 129.5 [59.2-200.4]	39, 124.8 [49.4-228.4]	8, 110.5 [82-156.6]	8, 129 [49.4-212]	22, 130.5 [64.2-228]	1, 157.6
Triglycerides (mg/dl) N, median [min-max]	30, 103 [46-229]	39, 104 [50-508]	8, 99 [50-275]	8, 198.5 [56-508]	22, 103 [53-306]	1, 82
uCRP (mg/dl) N, median [min-max]	20, 0.34 [0.08-2.1]	30, 0.35 [0.08-3.66]	5, 0.55 [0.08-0.96]	5, 0.19 [0.08-2.25]	19, 0.34 [0.08-2.42]	1, 3.66
LVEF (%) N, median [min-max]	26, 68 [59-78]*	38, 55 [23-82] *	7, 67 [59-82]	8, 67 [59-76]	22, 43 [23-69]	1, 24
Hypertension (%) N, %	26, 77%*	34, 50% *	8, 63%	8, 63%	18, 39%	-
Factor H (ng/ml) N, median [min-max]	36, 209050 [155000-249900]	44, 209800 [155000-245100]	9, 208900 [189100-231600]	10, 211850 [192900-229500]	24, 209150 [155000-245100]	1, 213200

* $p < 0.05$ Asymptomatic vs. Cardiac.

HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol), LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol), uCRP (Ultrasensitive C-Reactive Protein), LVEF (left ventricular ejection fraction).

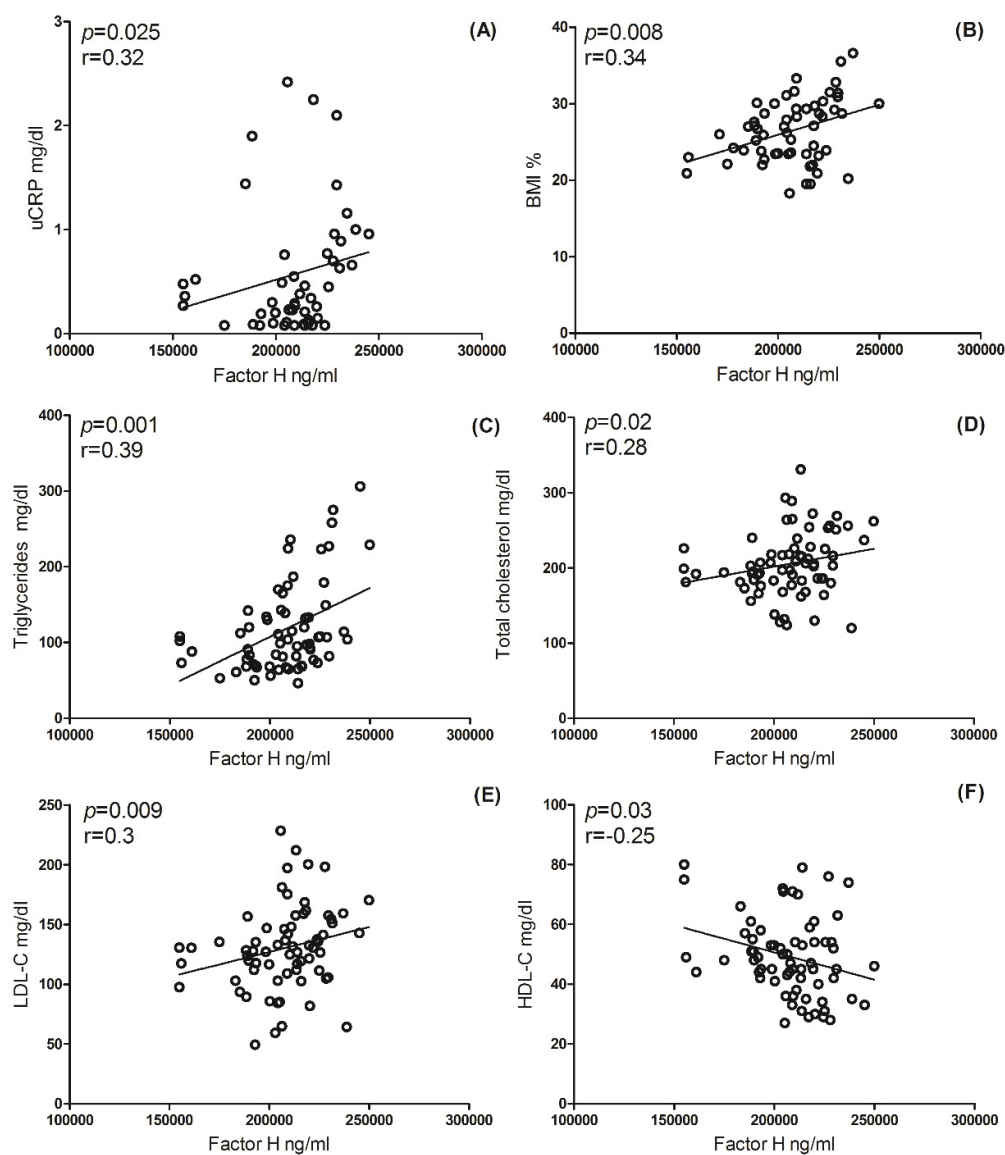


Figure 1. FH plasma levels in patients with chronic Chagas disease in relation to risk factors for cardiovascular disease. (A) Correlation between FH levels and Ultrasensitive C-Reactive Protein (uCRP) ($p=0.025$ $r=0.32$); (B) Body Mass Index (BMI%) ($p=0.008$ $r=0.34$); (C) Triglycerides ($p=0.03$ $r=0.39$); (D) Total cholesterol ($p=0.02$ $r=0.28$); (E) LDL-C ($p=0.009$ $r=0.3$); and (F) HDL-C ($p=0.03$ $r=-0.25$), using Spearman's rank correlation coefficient (non-parametric test) for all *T. cruzi* infected patients. Similar significant correlations between FH levels and cardiometabolic parameters were found for both asymptomatic and cardiac group when analyzed separately.

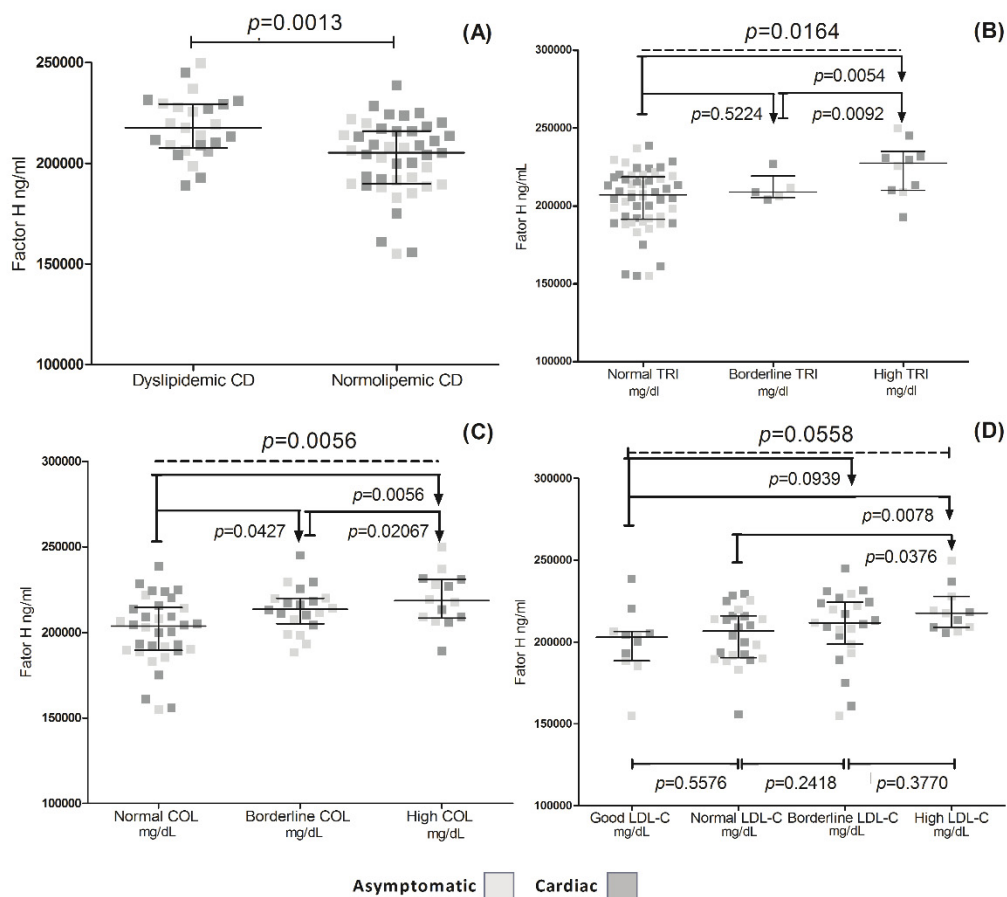


Figure 2. FH plasma levels in patients with chronic CD.

FH levels in CD patients classified as dyslipidemic and normolipidemic (A); and according to the triglyceride (B), cholesterol (C), and LDL-C (D) levels. No significant difference ($p > 0.05$) in FH plasma levels between asymptomatic and cardiac patients was found for all these parameters. TRI- triglycerides; COL- cholesterol. Triglycerides [normal (< 150 mg/dl), borderline (150-199 mg/dl) and high (> 200 mg/dl)]; total cholesterol [normal (< 200 mg/dl), borderline (200-239 mg/dl), high (≥ 240 mg/dl)] and LDL-C [good (< 100 mg/dl), normal (100-129 mg/dl), borderline (< 130 -159 mg/dl), high (> 160 mg/dl)]. FH levels were compared between group using Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests, as indicated by Shapiro-Wilk test.

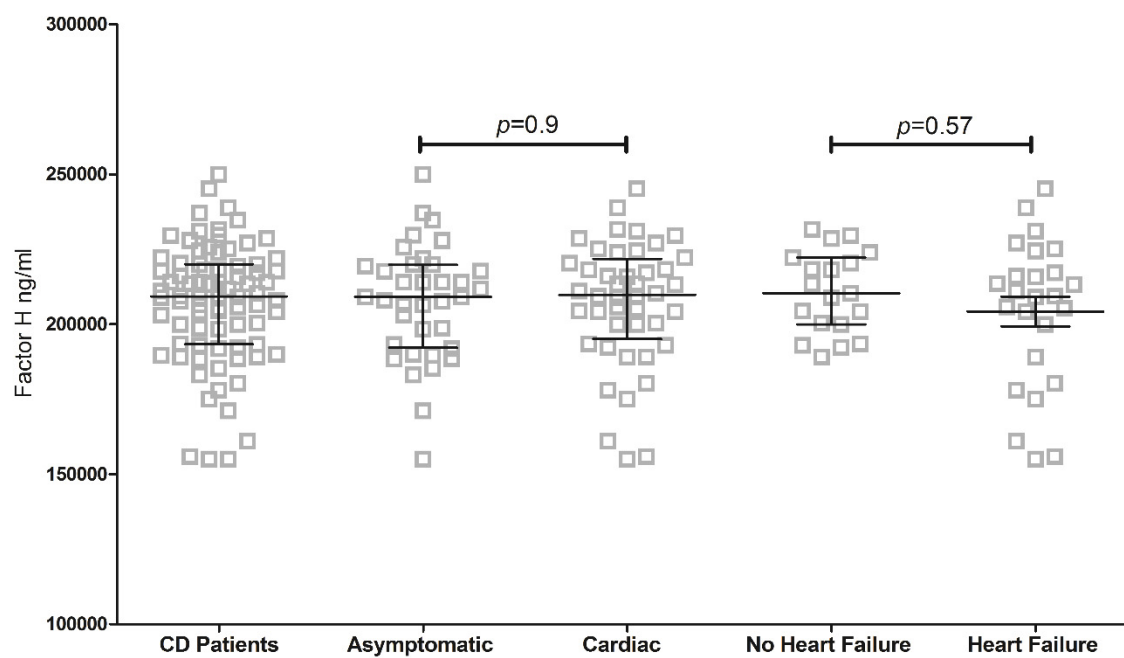


Figure 3. FH plasma levels in patients with Chagas Disease (n=80).

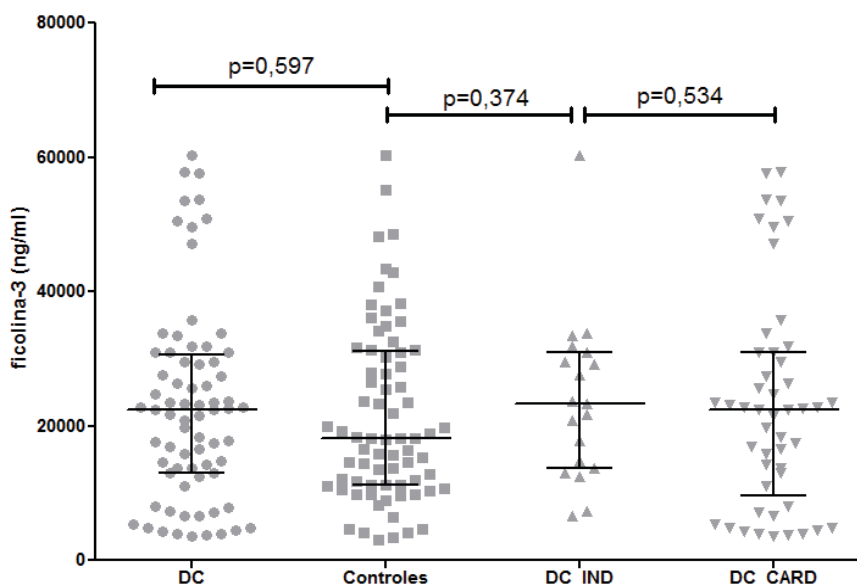
Cardiac (n=44) and asymptomatic (n=36) Chagas disease forms were compared each other, while the absence (A+B forms, n=19) and presence (C+D forms, n=25) of heart failure in cardiac and cardiogestive forms were also compared.

4.2 DEMAIS RESULTADOS

4.2.1 Ficolina-3

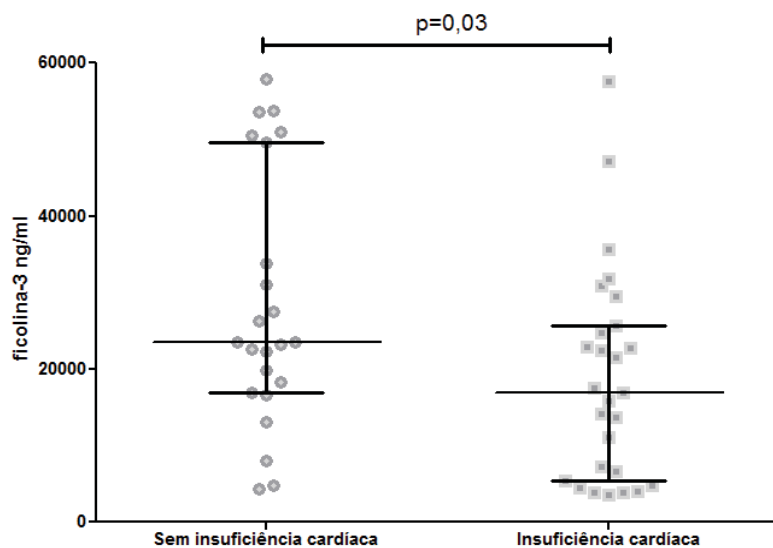
A quantificação sérica de ficolina-3 foi realizada em 80 pacientes com DC crônica e 80 controles. Não foi observada diferença significativa entre as dosagens de ficolina-3 entre pacientes e controles ($p=0,597$ medianas de 22369 ng/ml vs. 18231 ng/ml, respectivamente); e entre as formas indeterminada vs. cardíaca da DC ($p=0,534$ medianas de 23232 ng/ml vs. 22394 ng/ml) (GRÁFICO 1). Quando os indivíduos com a forma cardíaca da DC (incluindo as formas isolada e cardiodigestiva), foram distribuídos em relação à presença ou ausência de insuficiência cardíaca (IC), observou-se uma diferença significativa dos valores de ficolina-3, com menor concentração para os pacientes com IC ($p=0,03$ mediana de 16862 ng/ml vs. 23531 ng/ml) (GRÁFICO 2). Além disso a ficolina-3 se correlacionou positivamente com dados de FEVE ($p=0,0028$ $r=0,496$) para os pacientes de forma geral, incluindo todas as formas clínicas (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-3 NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E CONTROLES



NOTA: valores de p para o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. DC- Doença de Chagas; DC_IND: forma indeterminada da DC; DC_CARD: forma cardíaca da DC.
FONTE: o autor (2017).

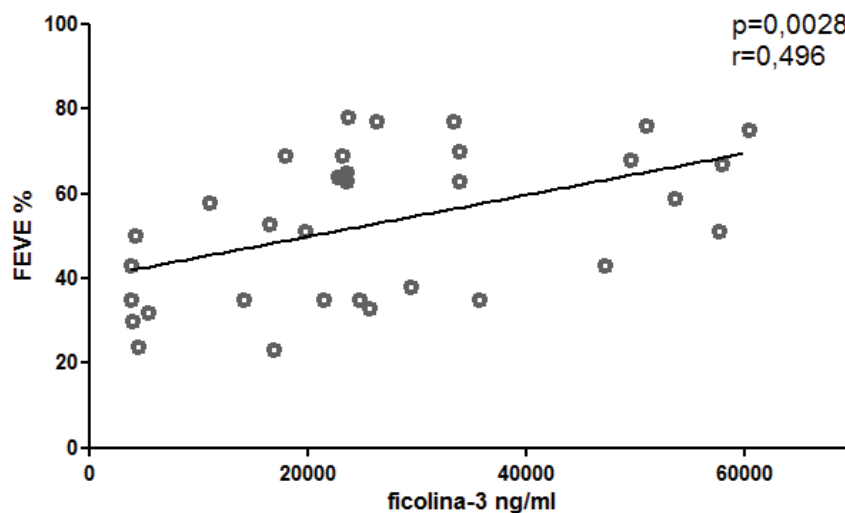
GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FICOLINA-3 EM PACIENTES COM A FORMA CLÍNICA CARDÍACA COM OU SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.



NOTA: valor de p para o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

FONTE: o autor (2017).

GRÁFICO 3 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-3 E FEVE EM PACIENTES COM DC NAS FORMAS CLÍNICAS INDETERMINADA E CARDÍACA.



NOTA: aplicado teste de correlação de Spearman; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda.

FONTE: o autor (2017).

Considerando que o complemento representa a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, como o *T. cruzi*, a ativação desse processo é crucial para o entendimento da fisiopatologia da doença, pois pode atuar tanto no controle da parasitemia (CESTARI; RAMIREZ, 2010; RICKLIN et al., 2010) como no desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas. Na fase crônica da DC, o complemento foi associado tanto à doença em si quanto à gravidade da forma cardíaca, em que pacientes com concentrações séricas reduzidas de ficolina-2 apresentaram maior acometimento de acordo com a classificação funcional de insuficiência cardíaca, além de menor concentração sérica de ficolina-2 em pacientes quando comparados aos controles (LUZ et al., 2013). Além disso, concentrações reduzidas de MASP-2 (BOLDT; LUZ; MESSIAS-REASON, 2011) e aumentadas de MBL (LUZ et al., 2016; WEITZEL et al., 2012) também foram associadas à cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), demonstrando a existência de um efeito imuno-regulatório desses mediadores do complemento que persiste na fase crônica da DC e contribui para o seu envolvimento clínico. Apesar da ficolina-3 ser o componente plasmático mais abundante da via das lectinas, trata-se da molécula menos estudada da família das ficolinas, com menor número de alvos patogênicos e um entendimento restrito em relação à ficolina-1 e à ficolina-2 (BIDULA et al., 2015).

Este é o primeiro trabalho na literatura a avaliar ficolina-3 em pacientes com DC crônica. Os nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na concentração de ficolina-3 entre pacientes com DC e controles, indicando que não se trata de uma molécula associada à presença da infecção crônica, o que pode estar relacionado à uma menor afinidade da ficolina-3 à superfície do *T. cruzi*, já que outros ativadores da via das lectinas, como MBL e ficolina-2, também foram demonstrados interagir com o parasito (CESTARI; RAMIREZ, 2010). Ficolina-3 pode não se apresentar como um molécula preferencial no reconhecimento do *T. cruzi* pelo complemento. Por outro lado, Bidula e colaboradores (2015) observaram que a ficolina-3 participa na defesa de *Aspergillus fumigatus* através da ativação da VL do complemento, ao facilitar a interação fungo-hospedeiro e modular a resposta imune

diante da infecção de vias aéreas. Infecções pulmonares recorrentes foram associadas à deficiência hereditária de ficolina-3, levando à falta de deposição do complemento em estruturas acetilados e dano pulmonar por dificultar a remoção de debris celulares, agravando o processo inflamatório (MUNTHER-FOG et al., 2009). Dessa forma, a ficolina-3 não demonstrou ser uma molécula chave para a ativação da VL durante na infecção pelo *T. cruzi*.

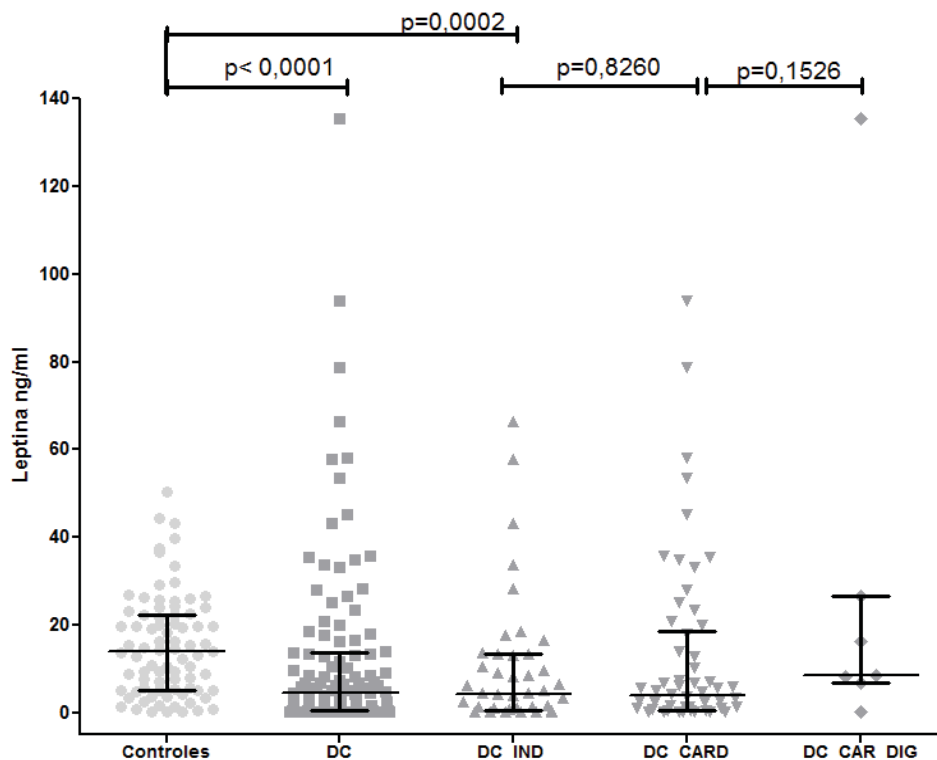
Observamos uma correlação positiva entre ficolina-3 e FEVE nos pacientes com DC, com menores concentrações da proteína em pacientes com insuficiência cardíaca. Esses achados sugerem que a ficolina-3 esteja sendo consumida proporcionalmente ao acometimento cardíaco, em que a ativação do complemento se dá pela ligação da ficolina-3 aos debris celulares e estruturas modificados resultantes do processos de oncose, necrose, e apoptose dos cardiomiócitos. Da mesma forma, Prohászka e colaboradores (2013) observaram que concentrações reduzidas de ficolina-3 em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (não chagásica) estavam relacionadas com a ativação do complemento (concentrações elevadas de C3a e reduzidas de C3), levando à inflamação e dano tecidual local; enquanto que MBL e ficolina-2 não tiveram associação significativa. De fato, já foi demonstrado aumento de componentes da via terminal do complemento na insuficiência cardíaca, restabelecido o nível de C5b9 após adequado suporte hemodinâmico à esses pacientes (OLIVEIRA et al., 2006), corroborando a hipótese de consumo de moléculas do complemento em quadro de insuficiência cardíaca, independente da etiologia.

4.2.2 Leptina

Foram observadas concentrações séricas reduzidas de leptina em pacientes com DC crônica quando comparados aos controles ($p < 0,0001$ medianas de 5,09 ng/ml vs. 14,05 ng/ml, respectivamente); assim como em pacientes com a forma indeterminada da DC quando comparados aos controles ($p = 0,0002$ medianas de 4,35 ng/ml vs. 14,05 ng/ml, respectivamente) (GRÁFICO 4). Por outro lado, não foi observada diferença significativa ao comparar a concentração de leptina entre as

diferentes formas clínicas da DC. Ao avaliar parâmetros clínico-laboratoriais dos pacientes em relação à leptina, não houve correlação estatisticamente significativa com idade, fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e IMC. Também não foram observadas tais correlações para os controles (TABELA 5).

GRÁFICO 4 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E CONTROLES.



NOTA: aplicado teste não-paramétrico de Mann-Whitney. DC- Doença de Chagas; DC_IND: forma indeterminada; DC_CARD: forma cardíaca; e DC_CARD_DIG: forma cardiodigestiva da DC
 FONTE: o autor (2017).

TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA E ADIPONECTINA EM CONTROLE E PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

Parâmetros	Pacientes com Doença de Chagas (DC) crônica				Controles
	Geral	DC Indeterminada	DC Cardíaca	DC Cardiodigestiva	
*Leptina ng/ml	5,09 (n=112)	4,35	3,98	8,5	14,05 (n=81)
*Adiponectina ng/ml	3180 (n=107)	2690	3444	1723	8794 (n=92)
Idade (média)	55,85	51,1	58,7	57,8	43,5
**IMC (%)	25,6	25,8	25,8	25,1	24,9

NOTA: * dado apresentado como mediana; ** dado apresentado como média.

FONTE: o autor (2017).

Apesar do grande interesse em se estudar a leptina com enfoque na obesidade ou resistência insulínica, a associação entre tal hormônio e o sistema imune tem evidenciado importantes aspectos no contexto de doenças inflamatórias crônicas, como as autoimunes e cardiovasculares (IHKUNI et al., 2008). De fato, a própria obesidade, associada a concentrações elevadas de leptina, caracteriza um processo inflamatório contínuo (CONSIDINE et al., 1996), o que torna os indivíduos obesos mais suscetíveis ao risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 ou doenças degenerativas incluindo autoimunidade e câncer (CALLE; KAAKS, 2004). Por outro lado, níveis reduzidos de leptina, como observado nos casos de indivíduos desnutridos, têm sido associados ao aumento do risco de infecção e à diminuição da resposta imune celular (LORD et al., 1998).

A leptina apresenta com papel crítico na modulação de resposta imune inata e adaptativa, provavelmente por apresentar semelhanças estruturais com as citocinas da cadeia longa que incluem IL-6, IL-11, IL-12 e oncostatina M (CAVA; MATARESE, 2004). Durante a resposta imune inata a leptina pode estimular células dendríticas, monócitos/macrófagos, neutrófilos e células NK (ZABEAU; PEELMAN; TAVERNIER, 2014). Em seguida, a leptina promove a ativação de células Th1, aumentando a produção de IFN- γ e IL-2, e suprime a produção de IL-4 (tipo Th2) (LORD et al., 1998).

Nesse contexto, o papel pró-inflamatório da leptina pode influenciar na resposta do hospedeiro contra infecções, com evidências de uma associação entre leptina e risco aumentado de doença inflamatória crônica.

O presente estudo mostrou que a leptina pode ter influência na fisiopatologia da DC crônica, com concentrações séricas reduzidas em pacientes quando comparados aos controles; mesmo quando foram comparados pacientes da forma indeterminada da DC com controles, demonstrando que a leptina pode estar associada à infecção crônica pelo *T. cruzi*, independente da forma clínica da doença. A concentração de leptina entre as formas clínicas cardíaca e indeterminada não apresentou diferença estatisticamente significativa, o que sugere duas hipóteses. A primeira consiste no fato de que os pacientes na forma indeterminada podem mudar para a forma clínica cardíaca antes mesmo da detecção em exames eletrocardiográficos, pois o envolvimento do sistema nervoso autônomo na forma cardíaca da DC causa anormalidades no controle cardiovascular neurogênico antes da disfunção do ventrículo esquerdo ou insuficiência cardíaca manifesta (BARRETO-FILHO et al., 2001). A segunda hipótese se apoia no fato de que durante a infecção crônica, a presença do *T. cruzi* na principal célula produtora de leptina (o adipócito) pode atuar no sentido de modificar a secreção do hormônio e contribuir para disfunções metabólicas (COMBS et al., 2005), sem uma associação direta com a cardiomiopatia chagásica.

Fernandes e colaboradores (2007) observaram menores concentrações de leptina em pacientes com DC quando comparados aos controles, assim como pacientes com insuficiência cardíaca apresentaram concentrações reduzidas de leptina em relação ao grupo controle ou aos pacientes na forma cardíaca leve da DC (somente com arritmia). Os autores sugerem que mecanismos de supressão da leptina podem atuar em pacientes chagásicos, seja por consumo, ou diminuição da síntese e liberação da leptina devido às lesões no sistema nervoso central, resultando em aumento da atividade simpática no tecido adiposo. Porém, é importante ressaltar que o estudo foi realizado em um pequeno número amostral (n=14). Apesar de ser um consenso que a leptina tem papel fundamental nas doenças cardiovasculares, na

insuficiência cardíaca os dados ainda são controversos, pois foram observadas tanto concentrações reduzidas (RICHARTZ et al., 2001) como aumentadas (LEYVA et al., 1998; LIEB et al., 2009; SCHULZE et al., 2003) de leptina em pacientes com insuficiência cardíaca não chagásica.

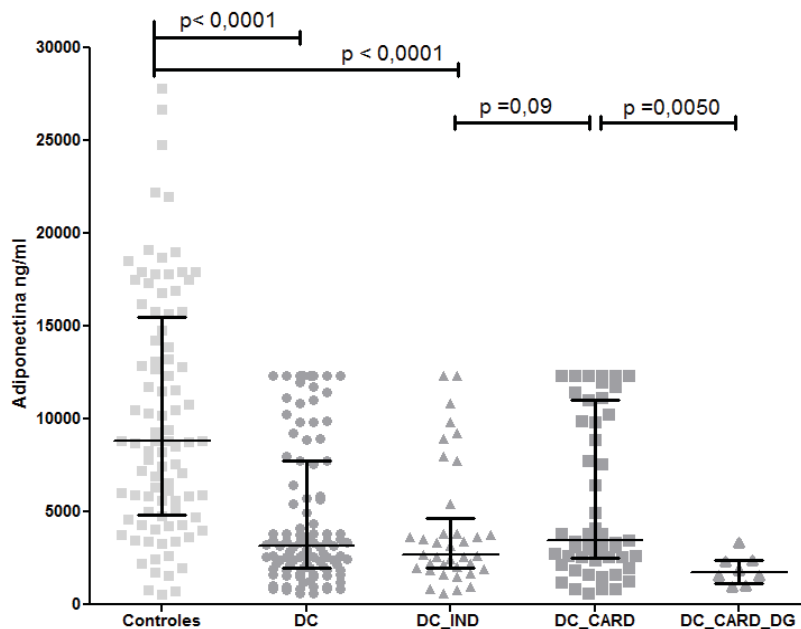
Em relação às doenças infecciosas, diversos autores têm demonstrado o envolvimento da leptina na resposta inflamatória sistêmica durante a sepse, onde concentrações crescentes de leptina sérica foram observadas em pacientes com sepse grave em comparação com controles (BORNSTEIN et al., 1998; YOUSEF; AMR; SULIMAN, 2010; BEHNES et al., 2012). Além disso, concentrações séricas de leptina possibilitaram a diferenciação entre pacientes com manifestações de síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e aqueles com sepse, atuando como marcador inflamatório precoce quando comparada à TNF- α e IL-6 (YOUSEF; AMR; SULIMAN, 2010). Concentrações séricas elevadas de leptina também foram observadas em muitas doenças inflamatórias crônicas não infecciosas, como nefrite, endometriose pélvica, hepatite não alcoólica, doença de Behçet e doença de Graves (IIKUNI et al., 2008); e autoimunes, como diabetes tipo 1, doença inflamatória intestinal e possivelmente artrite reumatoide (CAVA; MATARESE, 2004).

4.2.3 Adiponectina

Concentração sérica reduzida de adiponectina foi observada em pacientes com DC crônica em relação aos controles ($p < 0,0001$ medianas de 3180 ng/ml vs. 8794 ng/ml, respectivamente); assim como em pacientes com a forma indeterminada da DC quando comparados aos controles ($p < 0,0001$ medianas de 2690 ng/ml vs. 8794 ng/ml, respectivamente). Além disso, pacientes com a forma cardíaca associada da DC (cadiodigestiva) apresentam concentrações menores de adiponectina que pacientes com a forma cardíaca isolada ($p = 0,005$ medianas de 1723 ng/ml vs. 3444 ng/ml, respectivamente) (GRÁFICO 5). Não foram observadas correlações significativas entre adiponectina e idade, IMC ou FEVE, tanto para pacientes, como para controles.

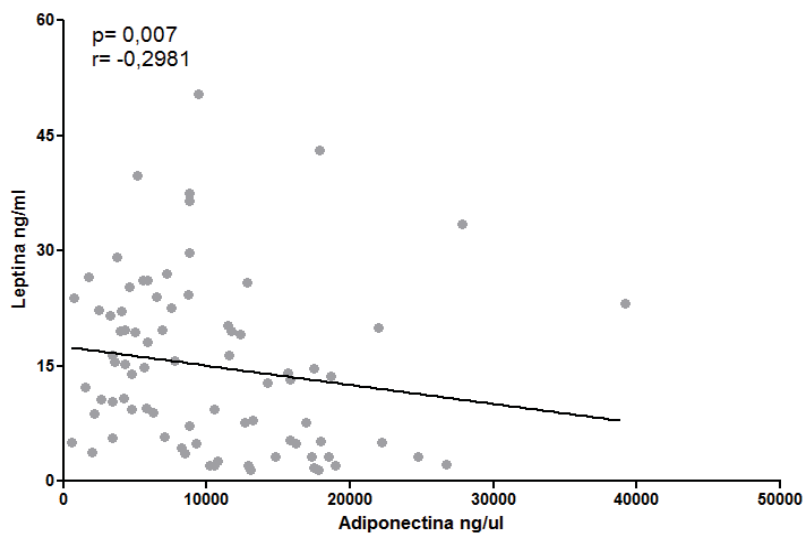
A correlação entre leptina e adiponectina foi estatisticamente significativa para controles ($p=0,007$ $r= -0,298$) (GRÁFICO 6), porém não para pacientes.

GRÁFICO 5 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ADIPONECTINA NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E CONTROLES.



NOTA: aplicado teste não-paramétrico de Mann-Whitney. DC- Doença de Chagas; DC_IND: forma indeterminada; DC_CARD: forma cardíaca; e DC_CARD_DIG: forma cardiodigestiva da DC.
FONTE: o autor (2017).

GRÁFICO 6 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LEPTINA E ADIPONECTINA, CONSIDERANDO O GRUPO CONTROLE.



NOTA: aplicado teste de correlação de Spearman
 FONTE: o autor (2017).

A adiponectina foi descrita pela primeira vez há pouco mais de uma década (em 1995), e desde então atraiu o interesse de pesquisadores devido sua alta concentração no plasma, semelhança estrutural com o componente C1q do complemento; e o fato de apresentar concentrações reduzidas em pacientes obesos (ARITA et al., 1999). Nesse contexto, a adiponectina tem sido associada à um importante papel anti-inflamatório na etiologia de diversas doenças crônicas, relacionada ou não à obesidade (ROBINSON; PRINS; VENKATESH, 2011).

Considerando que a adiponectina é uma proteína secretada principalmente por adipócitos, a maioria dos estudos de interesse clínico ou terapêutico estão voltados para o contexto dos distúrbios metabólicos, como resistência à insulina (KADOWAKI et al., 2006), síndrome metabólica (MATSUZAWA, 2006), diabetes tipo 2 (SCHERER, 2006) e aterosclerose (HUG; LODISH, 2005; LIBERALE et al., 2017). Além disso, a adiponectina tem sido associada a doenças inflamatórias, onde suas concentrações séricas elevadas foram observadas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (ROVIN et al., 2005), fibrose cística (MORICONI et al., 2006), doença inflamatória

intestinal (KARMIRIS et al., 2006) e artrite reumatoide (OTERO et al., 2006). Todavia, o significado desses achados ainda não é bem compreendido, visto que altas concentrações de adiponectina podem ser parte da resposta protetora à inflamação, ou indivíduos com baixa adiponectina podem ser mais propensos ao processo inflamatório (ROBINSON; PRINS; VENKATESH, 2011).

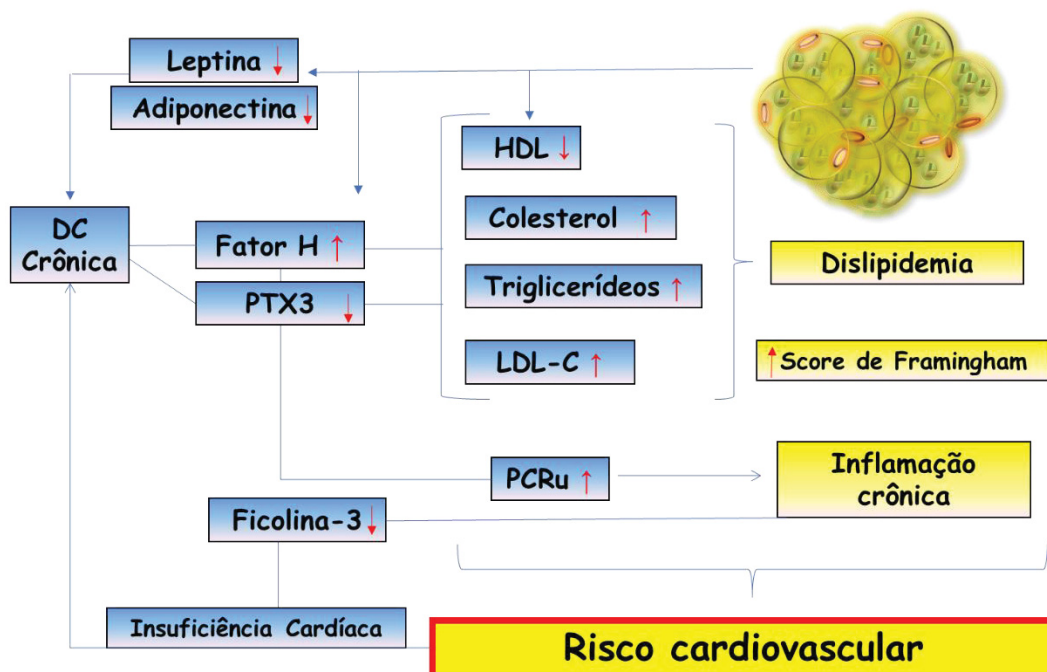
Os resultados do presente trabalho demonstraram que a adiponectina pode ter um importante papel também na DC crônica, pois concentrações reduzidas da proteína foram associadas à DC, mesmo quando somente a forma indeterminada da doença foi comparada com os controles. Esses achados sugerem um efeito anti-inflamatório da adiponectina na DC, que pode ser tanto uma consequência da infecção pelo *T. cruzi* no tecido adiposo; como da regulação negativa diante de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-12 e óxido nítrico, liberados por monócitos para controlar a infecção (CAMARGO et al., 1997; COELHO et al., 2002; TALVANI et al., 2009). Outra hipótese para tal fato é o risco cardiovascular aumentado entre pacientes com DC crônica, demonstrado no presente estudo a partir do *Score* de Framingham, e corroborado por uma metanálise publicada recentemente por Cucunubá e colaboradores (2016); e por uma revisão sistemática Linetzky e colaboradores (2012), que reportaram a alta mortalidade em pacientes com DC devido a causas cardiovasculares, o que pode contribuir para a redução dos níveis circulantes de adiponectina. Além disso, observamos que pacientes com a forma cardíaca associada da DC (cardiodigestiva) apresentam concentrações reduzidas de adiponectina quando comparados à forma cardíaca isolada. Tal fato pode estar associado à um processo inflamatório sistêmico mais pronunciado em pacientes com a forma cardiodigestiva, caracterizado por maior dano tecidual e níveis mais elevados de TNF- α que as demais formas clínicas (GUEDES et al., 2016), portanto com maior estímulo à produção de adiponectina. É importante ressaltar que o pequeno número amostral (n=8) de pacientes cardiodigestivos é uma limitação do estudo, o que pode ter influenciado esse resultado.

Corroborando com a hipótese de uma provável desregulação no metabolismo de lipídios em pacientes com DC crônica, não observamos correlação entre as

concentrações de adiponectina e leptina nos pacientes. Por outro lado, foi observada uma correlação negativa entre as adipocinas nos controles (GRÁFICO 6), o que está de acordo com a literatura (HOTTA et al., 2001; MATSUBARA; MARUOKA; KATAYOSE, 2002).

A Figura 21 ilustra um resumo geral dos resultados obtidos no presente trabalho. Moléculas participantes do metabolismo lipídico se correlacionam com adipocinas e componentes do sistema complemento, em que o dano celular pode estar relacionado à regulação dessas moléculas diante do processo inflamatório crônico pelo *T. cruzi*, além de contribuir para o risco cardiovascular nesses pacientes, independente da forma clínica.

FIGURA 21 – RESULTADOS DO TRABALHO APRESENTADOS DE FORMA COMBINADA.



FONTE: O autor. (2017)

5 CONCLUSÕES

- Os pacientes com DC crônica apresentaram risco cardiovascular aumentado em relação aos controles;
- Concentrações séricas de PTX3 apresentaram-se significativamente menores nos pacientes que nos controles;
- Concentrações séricas de PTX3 foram correlacionadas positivamente com a FEVE em pacientes;
- Pacientes chagásicos obesos apresentam maiores concentrações séricas de PTX3 quando comparados aos não obesos;
- Não houve diferença significativa para as concentrações de FH entre pacientes e controles; assim como entre as formas clínicas da DC
- Concentrações plasmáticas de FH apresentaram correlação positiva com colesterol, LDL-C, triglicédeos, proteína C reativa ultrasensível e IMC; e negativa com HDL-C;
- Pacientes chagásicos dislipidêmicos apresentaram maior concentração de FH quando comparados a normolipidêmicos;
- A concentração sérica de ficolina-3 se mostrou reduzida na insuficiência cardíaca chagásica, e se correlacionou com a FEVE em pacientes;
- Concentrações séricas de leptina e adiponectina apresentaram-se significativamente menores nos pacientes que nos controles;
- Concentrações séricas de leptina e adiponectina apresentaram-se significativamente menores nos pacientes da forma indeterminada quando comparados aos controles;
- Concentrações séricas de leptina e adiponectina não se correlacionaram com IMC, FEVE e idade em pacientes;
- Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de leptina e adiponectina nos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABUHAB, A.; TRINDADE E.; AULICINO, G.B.; FUJII S.; BOCCHI, E. A.; BACAL, F. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. **International journal of cardiology**, v. 168, n. 3, p. 2375–80, 2013.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 62, p. 413–437, 2000.
- ALEIDI, S.; ISSA, A.; BUSTANJI, H.; KHALIL, M.; BUSTANJI, Y. Adiponectin serum levels correlate with insulin resistance in type 2 diabetic patients. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 250–256, 2015.
- ALEXOPOULOS, N.; KATRITSIS, D.; RAGGI, P. Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 233, n. 1, p. 104–112, 2014.
- ANDRADE, F.A.; LIDANI, K.C.F.; CATARINO, S.J.; MESSIAS-REASON, I.J. Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System. In: Chakraborti S., Dhalla N. (eds) Proteases in Physiology and Pathology. **Springer**. 2017.
- ANDRADE ZA, S. H. Parasitism of adipocytes by Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 4, p. 521–522, 1995.
- ARAÚJO, A.; JANSEN, A.M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L.F. Paleoparasitology of Chagas disease—a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 9–16, 2009.
- ARITA, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, K; et al. C. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 257, n. 1, p. 79–83, 1999.
- ARNALICH, F.; LÓPEZ, J.; CODOCEO, R.; JIMENEZ, M.; MADERO, R.; MONTIEL, C. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. **J Infect Dis**, v. 180, n. 3, p. 908–911, 1999.
- AUFDERHEIDE, A. C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 2004.
- AYULO, V. M.; HERRER, A. Estudios sobre trypanosomiasis americana en el Perú: I. Observaciones en el departamento de Arequipa. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**, v. 3, n. 2, p. 96-117, 1944.
- BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R.J.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 2003.
- BASILE, A.; SICA, A.; D'ANIELLO, E.; BREVIARIO, F.; GARRIDO, G.; et al. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 13, p. 8172–8, 1997.

- BASILE, L.; JANSA, J.M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D.D.; ANGHEBEN, A.; et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **European communicable disease bulletin**, v. 16, p. 1–10, 2011.
- BASSI, N.; ZAMPIERI, S.; GHIRARDELLO, A.; TONON, M.; ZEN, M.; et al. Pentraxins, anti-pentraxin antibodies, and atherosclerosis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 37, n. 1, p. 36–43, 2009.
- BECHAH, Y.; PADDOCK, C.D.; CAPO, C.; MEGE, J.L.; RAOULT, D. Adipose tissue serves as a reservoir for recrudescence of *Rickettsia prowazekii* infection in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2010.
- BEHNES, M.; BRUECKMANN, M.; LANG, S.; PUTENSEN, C.; SAUR, J.; et al. Alterations of leptin in the course of inflammation and severe sepsis. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 217, 2012.
- BELTRAME, M. H.; CATARINO, S. J., GOELDNER, I., BOLDT, A. B. W., MESSIAS-REASON, I. J. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, n. January, p. 1–14, 2015.
- BERG, A. H.; COMBS, T. P.; SCHERER, P. E. Acrp30/adiponectin: an adipocytokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends Endocrinol Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 84–89, 2002.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; RASSI JÚNIOR, A.; MARINETTO, J. A.; et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 5, p. e52-4, 2009.
- BIDULA, S.; SEXTON, D.W.; YATES, M.; ABDOLRASOULI, A.; SHAH, A.; et al. H-ficolin binds *Aspergillus fumigatus* leading to activation of the lectin complement pathway and modulation of lung epithelial immune responses. **Immunology**, v. 146, n. 2, p. 281–291, 2015.
- BLOGOWSKI, W.; BUDKOWSKA, M.; SALATA, D.; SERWIN, K.; DOLEGOWSKA, B. et al. Clinical analysis of selected complement-derived molecules in human adipose tissue. **Journal of translational medicine**, v. 11, n. 1, p. 11, 2013.
- BLUM, J. A.; ZELLWEGER, M.J.; BURRI, C.; HATZ, C. Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 10, p. 631–641, 2008.
- BOLDT, A. B. W.; LUZ, P. R.; MESSIAS-REASON, I. J. T. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 140, n. 1, p. 63–70, jul. 2011.
- BONACINA, F.; BARAGETTI, A., CATAPANO, A. L., & NORATA, G. D. Long pentraxin 3: Experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases.

Mediators of Inflammation, v. 2013, 2013.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite (Paris, France)**, v. 21, p. 11, 2014.

BORNSTEIN SR, LICINIO J, TAUCHNITZ R, ENGELMANN L, NEGRÃO AB, GOLD P, C. G. Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 1, p. 280–283, 1998.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, 1973.

BRENER, Z., 2000. Terapêutica experimental na doença de Chagas (Capítulo 18). In: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. (Eds.), Livro *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*.

BRENIÈRE, S. F.; AZNAR, C.; HONTEBEYRIE, M. Vector Transmission. **American Trypanosomiasis**, p. 525–538, 2010.

BREVIARIO, F.; D'ANIELLO, E. M.; GOLAY, J.; PERI, G.; BOTTAZZI, B.; et al. Interleukin-1-inducible Genes in Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22190–22197, 1992.

BRUMPT, E. 1927. Précis de Parasitologie, Collection de PrÈcis MÈdicaux Masson & Cie Éditeurs, Paris, p. 1452.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579–591, 2004.

CAMARGO, M. M.; ALMEIDA, I. C.; PEREIRA, M. A.; FERGUSON, M. A. J.; TRAVASSOS, L. R.; et al. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-Like Glycoproteins Isolated from. **The Journal of Immunology**, v. 158, 1997.

CARROLL, M. V.; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 12, p. 965–975, 2011.

CAVA, A. LA; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 5, p. 371–379, 2004.

CESTARI, I.; 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, 2010.

CHANDRAN, M.; PHILLIPS, S.A.; CIARALDI, T.; HENRY, R.R. Adiponectin: More than just another fat cell hormone? **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2442–2450, 2003.

PRADO, C. M.; JELICKS, L. A.; WEISS, L. M.; FACTOR, S. M.; TANOWITZ, H.B. The Vasculature in Chagas Disease. **Adv Parasitol**, v. 76, p. 83–99, 2011.

COELHO, P. S.; KLEIN, A.; TALVANI, A.; COUTINHO, S. F.; TAKEUCHI, O.; et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from

Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 5, p. 837–844, 2002.

CHAGAS C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 1. n. 2, p.159–218, 1909.

COHEN, S. L.; HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M.; CHAIT, B.T.; BENNETT, L.; et al. Human leptin characterization. **Nature**, v. 382, p. 589, 1996.

COMBS, T. P.; NAGAJYOTHI; MUKHERJEE, S.; DE ALMEIDA, C.J.; JELICKS, L.A.; et al. The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24085–94, 2005.

CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 4, p. 292–295, 1996.

COURA, J. R. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

CUBILLOS-GARZÓN, L. A.; CASSAS, J. P.; MORILLO, C. A.; BAUTISTA, L. E. Congestive heart failure in Latin America: The next epidemic. **American Heart Journal**, v. 147, n. 3, p. 412–417, 2004.

CUCUNUBÁ, Z. M.; OKUWOGA, O.; BASÁÑEZ, M. G.; NOUVELLET, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & vectors**, v. 9, p. 42, 2016.

D'AGOSTINO, R.B., VASAN, R.S., PENCINA, M.J., WOLF, P.A., COBAIN, M., MASSARO, J.M., KANNEL. W.B. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care. **Circulation**. 117:743-753, 2008.

DA LUZ, P. L.; FAVARATO, D.; FARIA-NETO, JR.; LEMOS, P.; CHAGAS, A.C. High ratio of triglycerides to HDL cholesterol ratio predicts extensive coronary disease. **Clinics**, v. 63, p. 427-32, 2008.

DA SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; NOLIBOS, H.; MELLO, A. L. de; OSSANAI, J.; et al. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1968.

DE ARAUJO-JORGE, T. C.; TELLERIA, J.; RIOS-DALENZ, J. History of the Discovery of American Trypanosomiasis (chagas disease). First ed. **Elsevier Inc.**, 2010.

DE CÓRDOBA, S. R.; DE JORGE, E. G. Translational Mini-Review Series on

Complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 1, p. 1–13, 2008.

DE OLIVEIRA, G. M.; DE MELO MEDEIROS, M.; DA SILVA BATISTA, W.; SANTANA, R.; ARAÚJO-JORGE T.C.; DE SOUZA, A.P. Applicability of the use of charcoal for the evaluation of intestinal motility in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 102, n. 4, p. 747–750, 2008.

DEBAN, L.; JARVA, H.; LEHTINEN, M.J.; BOTTAZZI, B.; BASTONE, A.; et al. Binding of the long pentraxin PTX3 to Factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8433–8440, 2008.

DEBAN, L.; JAILLON, S.; GARLANDA, C.; BOTTAZZI, B.; MANTOVANI, A. Pentraxins in innate immunity: Lessons from PTX3. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 237–249, 2011.

DESRUISSEAU, M. S.; NAGAJYOTHI; TRUJILLO, M.E.; TANOWITZ, H.B.; SCHERER, P.E. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1066–78, 2007.

DIAS, E. 1933. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi* (Phd Thesis). Universidade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 115p.

DIAS JCP. Epidemiology of Chagas disease. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. Editado por Brener Z, Wendel S, Camargo ME, Rassi A. São Paulo, **ISBT Brazil** 1992: 49–80.

DIAS, J. C. P.; RAMOS, A.N.; GONTIJO, E.D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; et al. Brazilian Consensus on Chagas Disease. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 25, p. 7–86, 2016.

DIEHL, E. E.; HAINES, G. K.; RADOSEVICH, J. A.; POTEMPA, L. A. Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 319, n. 2, p. 79–83, 2000.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268–283, 1973.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 43, n. 5, p. 705–712, 2011.

ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 8, p. 363–366, 2006.

FABBRO, D. L.; STREIGER, M. L.; ARIAS, E. D.; BIZAI, M. L.; BARCO, M.; AMICONE, N. A. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: Parasitological, serological and clinical evolution. **Revista da Sociedade Brasileira**

de Medicina Tropical, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2007.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911–920, 2005.

FERNANDES, F.; DANTAS, S.; IANNI, B. M.; RAMIRES, F.J.; BUCK, P.; et al. Leptin levels in different forms of Chagas' disease. **Brazilian journal of medical and biological research.**, v. 40, n. 12, p. 1631–6, 2007.

FERNANDEZ-GARCÍA, C.E.; BURILLO, E.; LINDHOLT, J.S.; MARTINEZ-LOPEZ, D.; PILELY, K.; et al. Association of Ficolin-3 with abdominal aortic aneurysm presence and progression. **J Thromb Haemost.**, v. 15, n. 3, p. 575–585, 2017.

FERREIRA, A. V. M.; SEGATTO, M.; MENEZES, Z.; MACEDO, A.M.; GELAPE, C.; et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 13, n. 12–13, p. 1002–1005, 2011.

FERREIRA, V. P.; PANGBURN, M. K.; CORTÉS, C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. **Molecular immunology**, v. 47, n. 13, p. 2187–97, 2010.

FERREIRA, V.; MOLINA, C.; TAPIA, V.; NIETO, V.; GALDAMES, P.; CORTES, C.; RAMIREZ-TOLOZA, G. Factor H binds to *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes via its C-terminus and contributes to parasite resistance against the alternative pathway of complement (MPF2P.809) **The Journal of Immunology**, v. 192, (1 Supplement), p. 67-8, 2014.

FIORELLI, A. I.; SANTOS, R. H.; OLIVEIRA, J. L. JR.; LOURENÇO-FILHO, D.D.; DIAS, R.R.; et al. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. **Transplantation Proceedings**, v. 43, n. 1, p. 220–224, 2011.

FLIERMAN, R.; DAHA, M. R. The clearance of apoptotic cells by complement. **Immunobiology**, v. 212, n. 4–5, p. 363–370, 2007.

FLORES-CHÁVEZ, M.; FAEZ, Y.; OLALLA, J.M.; CRUZ, I.; GÁRATE, T.; et al. Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. **Cases journal**, v. 1, n. 1, p. 302, 2008.

FLOYD-SMITH, G.; WHITEHEAD, A.S.; COLTEN, H.R.; FRANCKE, U.; et al. The human C-reactive protein gene (CRP) and serum amyloid P component gene (APCS) are located on the proximal long arm of chromosome 1. **Immunogenetics**, v. 24, n. 3, p. 171–176, 1986.

FOO, S. S.; READING, P.C.; JAILLON, S.; MANTOVANI, A.; MAHALINGAM, S. Pentraxins and Collectins: Friend or Foe during Pathogen Invasion? **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 799–811, 2015.

FRANK, M.; HEGENSCHIED, B.; JANITSCHKE, K.; WEINKE, T. Prevalence and epidemiological significance of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin American immigrants in Berlin, Germany. **Infection**, v. 25, n. 6, p. 355–8, 1997.

- FRANKE-FAYARD, B.; FONAGER, J.; BRAKS, A.; KHAN, S.M.; JANSE, C.J. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: Can we learn anything from rodent models of malaria? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.
- FREDERIKSEN, P. D.; THIEL, S.; LARSEN, C.B.; JENSENIUS, J.C. M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 5, p. 462–473, 2005.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 1998.
- FÜST, G.; MUNTHE-FOG, L.; ILLES, Z.; SZÉPLAKI, G.; MOLNAR, T.; et al. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. **Journal of neuroinflammation**, v.8, n.1, p.185, 2001
- GABRIELSSON, B. G.; SOSA, R. R. High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. **Obes Res**, v. 11, n. 6, p. 699–708, 2003.
- GALEL, S. A.; ENGLEMAN, E. G. SCREENING OF THE BLOOD SUPPLY. 1995.
- GALLERANO, R. H.; SOSA, R. R. Resultados de un estudio a largo plazo con drogas antiparasitarias en infectados chagásicos crónicos. **Medicina**, 2001.
- GARLANDA, C.; BOTTAZZI, B.; BASTONE, A.; MANTOVANI, A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 337–366, 2005.
- GARLATTI, V.; MARTIN, L.; LACROIX, M.; GOUT, E.; ARLAUD, G. J.; et al. Structural insights into the recognition properties of human ficolins. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 17–23, 2009.
- GARRED, P.; HONORÉ, C.; JIE MA, Y.; RØRVIG, S.; COWLAND, J.; et al. The genetics of ficolins. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 3–16, 2009.
- GASIC, G.; BERTIN, V. Epidemiologia de la enfermedad de chagas en Chile. **Rev. Chil. Pediatr**, v. 11, n. 8, p. 561584, 1940.
- GASQUE, P. Complement: A unique innate immune sensor for danger signals. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 11 SPEC. ISS., p. 1089–1098, 2004.
- GAZIANO, J.M.; HENNEKENS, C.H.; O'DONNELL, C.J.; BRESLOW, J.L.; BURING, J.E. Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. **Circulation**. v. 96, n. 8, p. 2520-5, 1997.
- GEWURZ, H.; ZHANG, X.-H.; LINT, T. F. Structure and Function of the pentraxins. **Current Opinion in Immunology 1995**, v. 7, p. 54–64, 1995.
- GOODMAN, A. R.; CARDOZO, T.; ABAGYAN, R.; ALTMAYER, A.; WISNIEWSKI, H. G.; VILCEK, J. Long pentraxins: An emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 7, n. 2, p. 191–202, 1996.

- GOURBIÈRE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, n. 3, p. 190–202, 2012.
- GOUT, E.; GARLATTI, V.; SMITH, D. F.; LACROIX, M.; DUMESTRE-PÉRARD, C.; et al. Carbohydrate recognition properties of human ficolins: Glycan array screening reveals the sialic acid binding specificity of M-ficolin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6612–6622, 2010.
- GROS, P.; MILDNER, F. J.; JANSSEN, B. J. C. Complement driven by conformational changes. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 48–58, 2008.
- GUARIENTO, M. E.; ALEGRE, S. M.; ALMEIDA, E. A.; WANDERLEY, J. S. Doença de Chagas e enfermidades associadas em um serviço de referência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, sup. 3, p. 206-207, 2002.
- GUEDES, P. M. M.; DE ANDRADE, C. M.; NUNES, D. F.; et al. Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2016.
- GUHL, F.; JARAMILLO, C.; YOCKTENG, R.; VALLEJO, G.A.; CÁRDENAS-ARROYO F. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. **The Lancet**, v.349, n. 9062, p.1370, 1997.
- GURGEL, C. B. F. M.; ARMANDO MIGUEL JUNIOR, CLAYDE REGINA MENDES, CAROLINA OKADA ZERBINI, T. M. C. Frequência da Hipertensão Arterial na Doença de Chagas Crônica . Estudo Clínico Retrospectivo. **Arq Bras Cardiol**, v. 81, n. n° 6, p. 541–544, 2003.
- HEIN, E.; NIELSEN, L. A.; NIELSEN, C. T.; MUNTHER-FOG, L.; SKJOEDT, M. O.; et al. Ficolins and the lectin pathway of complement in patients with systemic lupus erythematosus. **Molecular Immunology**, v. 63, n. 2, p. 209–214, 2015.
- HILLIAN, A. D.; MCMULLEN, M. R.; SEBASTIAN, B. M.; ROYCHOWDHURY, S.; KASHYAP, S. R.; et al. Mice lacking C1q are protected from high fat diet-induced hepatic insulin resistance and impaired glucose homeostasis. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22565–75, 2013.
- HOLUBCOVA, Z.; KUNES, P.; MANDAK, J.; VLASKOVA, D.; KOLACKOVA, M.; et al. Pentraxin 3 and other inflammatory biomarkers related to atrial fibrillation in cardiac surgery. **Perfusion**, v. 32, n. 4, p. 269–278, 2017.
- HONTEBEYRIE, M.; BRENIÈRE, S. F.; AZNAR, C. Other Forms of Transmission. **American Trypanosomiasis**, p. 583–597, 2010.
- HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; ARITA, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUDA, M.; et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin , in Type 2 Diabetic Patients. **Arterioscler Thrombo Vasc Biol**, v. 1, n. 1, p. 1595–1599, 2000.
- HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; BODKIN, N. L.; ORTMAYER, H. K.; ARITA, Y.; et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in

parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in Rhesus Monkeys. **Diabetes**, v. 50, p. 1126–1133, 2001.

HOWARD, E. J.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUEKENS, P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and metaanalysis. **BJOG**, v. 121, n. 1, p. 22–33, 2014.

HUANG, X. L.; ZHANG, L.; DUAN, Y.; WANG, Y.J.; WANG, J. Association of Pentraxin 3 with autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. **Archives of medical research**, v. 47, n. 3, p. 223–31, 2016.

HUG, C.; LODISH, H. F. The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 2 SPEC. ISS., p. 129–134, 2005.

HUMMELSHOJ, T.; FOG, L. M.; MADSEN, H. O.; SIM, R. B.; GARRED, P. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). **Molecular Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1623–1632, 2008.

IIKUNI, N.; LAM, Q. L. K.; LU, L.; MATARESE, G.; LA CAVA, A. Leptin and Inflammation. **Current Immunology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 70–79, 2008.

INFORZATO, A.; PERI, G.; DONI, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A.; et al. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: Fine-tuning of the Interaction with C1q and Complement Activation. **Biochemistry**, v. 45, n. 38, p. 11540–11551, 2006.

INFORZATO, A.; BALDOCK, C.; JOWITT, T.A.; HOLMES, D.F.; LINDSTEDT, R.; et al. The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17681–17692, 2010.

JOHNDROW, C.; NELSON, R.; TANOWITZ, H.; WEISS, L.M.; NAGAJYOTHI, F. *Trypanosoma cruzi* infection results in an increase in intracellular cholesterol. **Microbes and infection**, v. 16, n. 4, p. 337–44, 2014.

JOINER, K.; SHER, A.; GAITHER, T.; HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma-cruzi* results from inefficient binding of Factor-B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 17, p. 6593–6597, 1986.

JÓZSI, M.; MANUELIAN, T.; HEINEN, S.; OPPERMANN, M.; ZIPFEL, P.F. Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 251–258, 2004.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K.; TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006.

- KAMIJI, M. M.; DE OLIVEIRA, R. B. O perfil dos portadores de doença de Chagas, com ênfase na forma digestiva, em hospital terciário de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 305–309, 2005.
- KARMIRIS, K.; KOUTROBAKIS, I.E.; XIDAKIS, C.; POLYCHRONAKI, M.; VOUDOURI, T.; et al. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 2, p. 100–105, 2006.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.
- KESHI, H.; SAKAMOTO, T.; KAWAI, T.; OHTANI, K.; KATOH, T.; et al. Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 12, p. 1001–13, 2006.
- KIRCHHOFF, L. V.; PAREDES, P.; LOMELÍ-GUERRERO, A.; PAREDES-ESPINOZA, M.; RON-GUERRERO, C.S.; et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: Implications for transfusion medicine in the United States. **Transfusion**, v. 46, n. 2, p. 298–304, 2006.
- KISHORE, U.; GHAI, R.; GREENHOUGH, T. J.; SHRIVE, A. K., et al. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. **Immunol Lett.**, v. 95, n. 2, p. 1–27, 2004.
- KJAER, T. R.; THIEL, S.; ANDERSEN, G. R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 413–422, 2013.
- KOETHE, J. R.; HULGAN, T.; NISWENDER, K. Adipose tissue and immune function: a review of evidence relevant to HIV infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 8, p. 1194–201, 15 out. 2013.
- KONDOS, S. C.; HATFALUDI, T.; VOSKOBOINIK, I.; TRAPANI, J.A.; LAW, R.H.; et al. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 5, p. 341–351, 2010.
- KOSHY, S. K. G.; GOVINDARAJAN, G. Microvascular dysfunction in systemic diseases: How does it relate to chagas' disease? **Echocardiography**, v. 31, n. 1, p. 1–2, 2014.
- KRARUP, A.; SØRENSEN, U.B.; MATSUSHITA, M.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules Mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1052–1060, 2005.
- KRARUP, A; WALLIS, R.; PRESANIS, J.S.; GÁL, P.; SIM, R.B. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. 1–8, 2007.
- KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, ciências, saúde--Manguinhos**, v.

16 Suppl 1, p. 13–34, 2009.

KRUPINSKI, J.; TURU, M.M.; MARTINEZ-GONZALEZ, J.; CARVAJAL, A.; JUAN-BABOT, J.O.; et al. Endogenous expression of C-reactive protein is increased in active (ulcerated noncomplicated) human carotid artery plaques. **Stroke**, v. 37, n. 5, p. 1200–1204, 2006.

KUMADA, M.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; KOBAYASHI, H.; OKAMOTO, Y.; et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. **Circulation**, v. 109, n. 17, p. 2046–2049, 2004.

KUNES, P.; LONSKY, V.; MAND'ÁK, J.; BRTKO, M.; KOLÁCKOVÁ, M.; et al. Essential PTX3 biology (not only) for cardiologists and cardiac surgeons. **Acta medica (Hradec Králové)**, v. 50, n. 1, p. 29–33, 2007.

LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 132–142, 2008.

LEAL, V. DE O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87–94, 2013.

LEALI, D.; ALESSI, P.; COLTRINI, D.; RONCA, R.; CORSINI, M.; et al. Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1600–10, 2011.

LEE, B. Y.; BACON, K.M.; BOTTAZZI, M.E.; HOTEZ, P.J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013.

LEE, M.J.; FRIED, S. K. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1230-8, 2009.

LEI, K. J.; ; LIU, T.; ZON, G.; SORAVIA, E.; LIU, T. Y; et al. Genomic DNA sequence for human C-reactive protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 24, p. 13377–83, 1985.

LEÓN GÓMEZ, A.; FLORES FIÁLLOS, A.; REYES QUESADA, L.; BONILLA, M.; POUJOL, E. R.; GÓMEZ, C. La Enfermad de Chagas en Honduras. **Comunicación Preliminar, Publicación del Hospital General**, Tegucigalpa, D.C, 1960.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O., COX, F. E. G., DEROUX, G., GRAIN, J., et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.

LEYVA, F.; ANKER, S. D.; EGERER, K.; STEVENSON, J. C.; KOX, W. J.; COATS, A. J. Hyperleptinaemia in chronic heart failure. Relationships with insulin. **European Heart Journal**, v. 19, n. 10, p. 1547–1551, 1998.

LI, S.; SHIN, H. J.; DING, E. L.; VAN DAM, R. M. Adiponectin Levels and Risk of

Diabetes type 2. A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 302, n. 2, p. 179–188, 2009.

LIBERALE, L.; BONAVENTURA, A.; VECCHIÈ, A.; MATTEO, C.; DALLEGRI, F.; et al. The Role of Adipocytokines in Coronary Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 2, 2017.

LIDANI, K. C. F.; BAVIA L., AMBROSIO A.R.; DE MESSIAS-REASON I.J. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–14, 2017.

LIEB W, SULLIVAN LM, HARRIS TB, ROUBENOFF R, BENJAMIN EJ, LEVY D, FOX CS, WANG TJ, WILSON PW, KANNEL WB, V. R. Plasma leptin levels and incidence of heart failure, cardiovascular disease, and total mortality in elderly individuals. **Diabetes Care**, v. 32, n. 4, p. 612–616, 2009.

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S.E.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 2, p. 357–364, 2006.

LINETZKY, B.; KONFINO, J.; CASTELLANA, N.; DE MAIO, F.; BAHIT, M. C.; et al. Risk of cardiovascular events associated with positive serology for chagas: A systematic review. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 5, p. 1356–1366, 2012.

LORD, G. M.; MATARESE, G.; HOWARD, J. K.; BAKER, R. J.; BLOOM, S. R.; LECHLER, R. I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897–901, 1998.

LÖRINCZ, Z.; GÁL, P.; DOBÓ, J.; CSEH, S.; SZILÁGYI, K.; et al. The cleavage of two C1s subunits by a single active C1r reveals substantial flexibility of the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer in the C1 complex. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 4, p. 2048–51, 2000.

LUZ, P. R.; VELAVAN, T. P.; KREMSNER, P. G.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60237, 2013.

LUZ, P. R.; MIYAZAKI, M. I.; NETO, N. C.; PADESKI, M. C., et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004257, 2016.

MACEDO, A M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 14, n. 3, p. 119–124, 1998.

MAGRINI, E.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. The Dual Complexity of PTX3 in Health and Disease: A Balancing Act? **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 497–510, 2016.

- MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. **ISRN Inflammation**, v. 2013, p. 1–12, 2013.
- MALE, D. A.; ORMSBY, R. J.; RANGANATHAN, S.; GIANNAKIS, E.; GORDON, D. L. Complement factor H: Sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire fH, fHR-1 and fHR-3 genes. **Molecular Immunology**, v. 37, n. 1–2, p. 41–52, 2000.
- MALLAT, Z.; TEDGUI, A. HDL, PTX3, and vascular protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 5, p. 809–811, 2008.
- MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; DONI, A.; BOTTAZZI, B. Pentraxins in innate immunity: From C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, n. 1, p. 1–13, 2008.
- MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–23, 2007.
- MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á. V. L. Cardiopatia Chagásica. **Arq Bras Cardiol**. v. 72, n. 3, p. 247–263, 1999.
- MARTÍ, A.; MARCOS, A.; MARTÍNEZ, J. A. Obesity and immune function relationships. **Obesity reviews**, v. 2, p. 131–140, 2001.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta tropica**, v. 130, p. 167–74, 2014.
- MARUYAMA, C.; IMAMURA, K.; TERAMOTO, T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. **J Atheroscler Thromb**, v. 10, p. 186-91, 2003.
- MATARESE, G.; DI GIACOMO, A.; SANNA, V.; LORD, G. M.; HOWARD, J. K.; et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 10, p. 5909–16, 2001.
- MATSUBARA, M.; MARUOKA, S.; KATAYOSE, S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 173–180, 2002.
- MATSUDA, M.; Shimomura, I.; Sata, M.; Arita, Y.; Nishida, M.; et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37487–37491, 2002.
- MATSUDA, N. M.; OLIVEIRA, R. B.; DANTAS, R.O.; IAZIGI, N. Effect of isosorbide dinitrate on gastroesophageal reflux in healthy volunteers and patients with Chagas' disease. **Dig Dis Sci**, v. 40, n. 1, p. 177–182, 1995.
- MATSUSHITA, M. Ficolins: Complement-activating lectins involved in innate

- immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 24–32, 2009.
- MATSUZAWA, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2917–2921, 2006.
- MAYER, H.F. Infeccion experimental con *Trypanosoma cruzi* por via digestive. **Anales Inst. Med. Regional**. v. 5, p. 43-8, 1961.
- MAZZA, S. Consideraciones sobre la enfermedad de Chagas en Bolivia. **Prensa Med. Arg**, v. 29, p. 51, 1942.
- MAZZA, S. La enfermedad de Chagas em La Republica Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 47, p. 273-288, 1949.
- MAZZOTTI, L. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. México. **Gac. Med. Mex**, v. 70, p. 417-420, 1940.
- MERI, S.; PANGBURN, M. K. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 10, p. 3982–3986, 1990.
- MERI, T.; AMDAHL, H.; LEHTINEN, M. J.; HYVÄRINEN, S.; et al. Microbes Bind Complement Inhibitor Factor H via a Common Site. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, 2013.
- MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–30, 2015.
- MIAO, Q.; NDAO, M. Trypanosoma cruzi infection and host lipid metabolism. v. 2014, 2014.
- MILLER, G. W.; NUSSENZWEIG, V. Complement as a regulator of interactions between immune complexes and cell membranes. **J Immunol**, v. 113, n. 2, p. 464–469, 1974.
- MOALLI, F.; JAILLON, S.; INFORZATO, A.; SIRONI, M.; BOTTAZZI, B.; et al. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.
- MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional Control of transfusional transmission. **O controle da transmissão transfusional**, v. 44, p. 64–67, 2011.
- MORICONI, N.; KRAENZLIN, M.; MÜLLER, B.; KELLER, U.; NUSBAUMER, C. P. et al. Body Composition and Adiponectin Serum Concentrations in Adult Patients with Cystic Fibrosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 4, p. 1586–1590, 2006.
- MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A. Jr.; et al. Randomized trial of Benznidazole for Chronic Chagas' cardiomyopathy.

New England Journal of Medicine, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MUNTHER-FOG, L.; HUMMELSHØJ, T.; HONORÉ, C.; MADSEN, H. O.; PERMIN, H.; GARRED, P. Immunodeficiency Associated with FCN3 Mutation and Ficolin-3 Deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 360, p. 2637–2644, 2009.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M. S.; THIRUVUR, N.; WEISS, L. M.; BRAUNSTEIN, V. L., et al. *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 9, p. 1992–1997, 2008.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M.S.; WEISS, L.M.; CHUA, S.; ALBANESE, C.; et al. Chagas disease , adipose tissue and the metabolic syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 104, Suppl 1, p. 219–25, 2009.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M.S.; MACHADO, F.S.; UPADHYA, R.; ZHAO, D.; et al. Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **The Journal of infectious diseases**, v. 205, n. 5, p. 830–40, 2012.

NAGAJYOTHI, F.; WEISS, L.M.; ZHAO, D; KOBAYASHI, W.; JELICKS, L. A.; et al. High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3118, 2014.

NAUTA, A. J.; BOTTAZZI, B.; MANTOVANI, A.; SALVATORI, G.; KISHORE, U.; et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 2, p. 465–473, 2003.

NAVIN, T. R.; ROBERTO, R.R.; JURANEK, D.D.; LIMPAKARNJANARAT, K.; MORTENSON, E.W.; et al. Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. **American Journal of Public Health**, v. 75, n. 4, p. 366–369, 1985.

NEYROLLES, O.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; PIETRI-ROUXEL, F.; FORNÈS, P.; TAILLEUX, L.; BARRIOS PAYÁN, J.A.; et al. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, 2006.

NGUYEN, P. A. H; HEGGERMONT, W. A.; VANHAVERBEKE, M.; DUBOIS, C; VYDT, T.; et al. Leptin-adiponectin ratio in pre-diabetic patients undergoing percutaneous coronary intervention. **Acta cardiologica**, v. 70, n. 6, p. 640–646, 2015.

NIGRO, E.; SCUDIERO, O.; MONACO, M.L.; PALMIERI, A.; MAZZARELLA, G.; et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, 2009.

NORATA, G. D.; MARCHESI, P.; PIRILLO, A.; UBOLDI, P.; CHIESA, G.; et al. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular**

biology, v. 28, n. 5, p. 925–31, 2008.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation.

Seminars in Nephrology, v. 33, n. 6, p. 479–492, 2013.

OHASHI, K.; SHIBATA, R.; MUROHARA, T.; OUCHI, N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 7, p. 348–355, 2014.

OLIVEIRA, F. A.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, P. A. A cardiopatia chagásica em idosos necropsiados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p.161-162, 2001.

OLIVEIRA, G. H.; BRANN, C. N.; BECKER, K.; THOHAN, V.; KOERNER, M. M.; LOEBE, M.; NOON, G. P.; TORRE-AMIONE, G. Dynamic expression of the membrane attack complex (MAC) of the complement system in failing human myocardium. **Am J Cardiol**, v. 97, n. 11, p. 1626-9, 2006.

OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the Control of Body Weight: A Review of Its Diverse Central Targets, Signaling Mechanisms, and Role in the Pathogenesis of Obesity. **Obesity**, v. 18, n. 2, p. 221–229, 2010.

OTERO, M.; ; LAGO, R.; GOMEZ, R.; LAGO, F.; DIEGUEZ, C.; et al. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 9, p. 1198–1201, 2006.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, v. 100, p. 2473–2476, 1999.

OUCHI, N.; WALSH, K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. **Clin Chim Acta.**, v. 380, n. 1–2, p. 24–30, 2007.

Pan American Health Organization (PAHO), 2016. Available from:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=en. Acesso em jan/2017.

PAYNE, G. A.; TUNE, J. D.; KNUDSON, J. D. Leptin-induced endothelial dysfunction: a target for therapeutic interventions. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 4, p. 603–8, 2014.

PEREIRA, L. S.; FREITAS, E.C.; FIDALGO, A.S.; ANDRADE, M.C.; CÂNDIDO DDA, S.; et al. Clinical and epidemiological profile of elderly patients with chagas disease followed between 2005-2013 by pharmaceutical care service in Ceará state, Northeastern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n. 2, p. 145–152, 2015.

PERKINS, S. J.; NAN, R.; LI, K.; KHAN, S.; MILLER, A. Complement Factor H-ligand interactions: Self-association, multivalency and dissociation constants. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 281–297, 2012.

- PEVERENGO, L.; RODELES, L.; VICCO, M.H.; MARCIPAR, I. The potential influence of atherogenic dyslipidemia on the severity of chronic Chagas heart disease. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 62, n. 1, p. 45–7, 2016.
- PHIELER, J.; GARCIA-MARTIN, R.; LAMBRIS, J. D.; CHAVAKIS, T. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 47–53, 2013.
- PINAZO, M. J.; CAÑAS, E.; ELIZALDE, J.I.; GARCÍA, M.; GASCÓN, J.; et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 33, n. 3, p. 191–200, 2010.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.
- PRESTA, M.; CAMOZZI, M.; SALVATORI, G.; RUSNATI, M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 723–738, 2007.
- PROHÁSZKA, Z.; MUNTHE-FOG, L.; UELAND, T.; GOMBOS, T.; YNDESTAD, A.; et al. Association of Ficolin-3 with Severity and Outcome of Chronic Heart Failure. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e60976, 2013.
- RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clin. Cardiol**, v. 23, p. 883–889, 2000.
- RASSI JR, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden Death in Chagas ' Disease. v. 76, n. nº 1, p. 86–96, 2001.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.
- REESINK, H. W. European strategies against the parasite transfusion risk. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 12, n. 1, p. 1–4, 2005.
- REIS, E. S.; BARBUTO, J. A. M.; ISAAC, L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. **Immunobiology**, v. 212, n. 3, p. 151–157, 2007.
- REN, Y.; DING, Q.; ZHANG, X. Ficolins and infectious diseases. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 1, p. 25–32, 2014.
- Research Priorities for Chagas Disease , Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, 2012.
- RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 576–589, 2012.
- RICHARDSON, V. R.; SMITH, K. A.; CARTER, A. M. Adipose tissue inflammation: Feeding the development of type 2 diabetes mellitus. **Immunobiology**, v. 218, n. 12,

p. 1497–1504, 2013.

RICHARTZ, B. M.; LOTZE, U.; KRACK, A.; GASTMANN, A.; KUTHE, F.; FIGULLA, H. R. Leptin: a parameter for metabolic changes in heart failure. **Z Kardiol**, v. 90, p. 280–285, 2001.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–97, 2010.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. **J Immunol.**, v. 190, n. 8, p. 3831–3838, 2013.

RICKLIN, D.; REIS, E. S.; LAMBRIS, J. D. Complement in disease: a defence system turning offensive. **Nature reviews. Nephrology**, v. 12, n. 7, p. 383–401, 2016.

RIPOCHE, J.; DAY, A.J.; HARRIS, T.J.; SIM, R.B. The complete amino acid sequence of human complement factor H. **The Biochemical journal**, v. 249, n. 2, p. 593–602, 1988.

ROBINSON, K.; PRINS, J.; VENKATESH, B. Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. **Critical care (London, England)**, v. 15, n. 2, p. 221, 2011.

RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; ESPARZA-GORDILLO, J.; GOICOECHEA DE JORGE, E.; LOPEZ-TRASCASA, M.; SÁNCHEZ-CORRAL, P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. **Molecular immunology**, v. 41, n. 4, p. 355–67, 2004.

RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; LUBIN, D. M.; ATKINSON, J. P. Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. **The journal of experimental medicine**, v. 161, n. 5, p. 1189–95, 1985.

ROSSI, M. A.; TANOWITZ, H.B.; MALVESTIO, L.M.; CELES, M.R.; CAMPOS, E.C.; et al. Coronary microvascular disease in chronic chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, 2010.

ROVIN, B. H.; SONG, H.; HEBERT, L.A.; NADASDY, T.; NADASDY, G.; et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. **Kidney International**, v. 68, n. 4, p. 1825–1833, 2005.

RYO, M.; NAKAMURA, T.; KIHARA, S.; KUMADA, M.; SHIBAZAKI, S.; et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 68, p. 975–981, 2004.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002.

SARTORI, A. M. C.; IBRAHIM, K.Y.; NUNES WESTPHALEN, E.V.; BRAZ, L.M.; OLIVEIRA, O. C. Jr.; et al. Manifestations of Chagas disease (American

trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 31–50, 2007.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1537–1545, 2006.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, 2011.

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

SCHMIDT, C. Q.; HERBERT, A. P.; HOCKING, H. G.; UHRÍN, D.; BARLOW, P. N. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Structural and functional correlations for factor H. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 1, p. 14–24, 2008.

SCHMUNIS, G. A. La reforma del sector salud , descentralización , prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores Health system , decentralization , and the control of vector-borne diseases. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 117–123, 2000.

SCHNEIDER, M. C.; PROSSER, B. E.; CAESAR, J. J. E.; KUGELBERG, E.; LI, S.; ZHANG, Q.; et al. *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 890–893, 2009.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–588, 2006.

SCHULZE, P. C.; KRATZSCH, J.; LINKE, A.; SCHOENE, N.; ADAMS, V.; et al. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. v. 5, p. 33–40, 2003.

SCHULZE, P. C.; KRATZSCH, J. Leptin as a new diagnostic tool in chronic heart failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 362, n. 1–2, p. 1–11, 2005.

SEGOVIA, J. C. Un caso de trypanosomiasis. **Arch. Hosp. Rosales en San Salvador**, v. 10, p. 249-254, 1913

SERPA FLÓREZ, F. Historia de la Tripanosomiasis Americana en Colombia. **Revista Medicina.**, v. 22, n. 2(53), p. 75–77, 2000.

SHAW J, LAINSON R, FRAIHA H. Epidemiology of the first autochthonous cases of Chagas' disease recorded in Belém, Pará, Brazil. **Rev Saude Publica**. v. 3, n. 2, p.153-7, 1969

SLUSHER, A. L.; MISCHO, A. B.; ACEVEDO, E. O. Pentraxin 3 is an anti-inflammatory protein associated with lipid-induced interleukin 10 in vitro. **Cytokine**,

v.86, p.36–40, 2016.

SOARES BARRETO-FILHO, J. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; FERREIRA, L. H.; MARTINS SOBRINHO, C. R.; GUERRA-RICCIO, G. M.; KRIEGER, E. M. Dysregulation of peripheral and central chemoreflex responses in Chagas' heart disease patients without heart failure. **Circulation**, v. 104, n. 15, p. 1792–8, 2001.

STEELE, L. S.; MACPHERSON, D.W.; KIM, J.; KEYSTONE, J.S.; GUSHULAK, B.D. The sero-prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Latin American refugees and immigrants to Canada. **Journal of Immigrant and Minority Health**, v.9, n.1, p. 43–47, 2007.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25–32, 2008.

SUGIMOTO, R.; YAE, Y.; AKAIWA, M.; KITAJIMA, S.; SHIBATA, Y.; et al. Cloning and Characterization of the Hakata Antigen , a Member of the Cloning and Characterization of the Hakata Antigen , a Member of the Ficolin/Opsonin p35 Lectin Family*. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 33, p. 20721–20727, 1998.

SUZUKI, S.; TAKEISHI, Y.; NIIZEKI, T.; KOYAMA, Y.; KITAHARA, T.; et al. Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. **American Heart Journal**, v. 155, n. 1, p. 75–81, 2008.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. “Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study,” **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 13, n. 2, p. 76–91, 1971.

TALVANI, A.; COUTINHO, S. F.; BARCELOS, L. S.; TEIXEIRA, M. M. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. **Parasitology Research**, v.104, n. 5, p. 1141–48, 2009.

TANOWITZ, H.B.; AMOLE, B.; HEWLETT, D. W. M. *Trypanosoma cruzi* infection in diabetic mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1, v. 82, p. 90–93, 1988.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL M, CREPALDI PH, DE SOUZA W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. 1–14, 2012.

TEJERA, E. La trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. **Bull. Soc. Pathol. Exot**, v.12, p. 509-513, 1919.

TERSIAKOV, A. M.; FRANK, I.; RADER, D. HIV-related lipodystrophy and related factors. **Atherosclerosis**, v. 174, n. 1, p. 1–10, 2004.

THIEL, S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins.

Molecular Immunology, v. 44, n. 16, p. 3875–3888, 2007.

TSUJIMURA, M.; ISHIDA, C.; SAGARA, Y.; MIYAZAKI, T.; MURAKAMI, K.; et al.

Detection of Serum Thermolabile B-2 Macroglycoprotein (Hakata Antigen) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Polysaccharide Produced by *Aerococcus viridans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 454–459, 2001.

UENO, Y.; NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; INOUE, T.; ENDO, S.; et al. A highly suspected case of chronic Chagas' heart disease diagnosed in Japan. **Japanese Circulation Journal**, v. 59, p. 219–223, 1995.

VAGO, A. R.; , ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D'AVILA D. R.; MACEDO, A.M.; et al.

Genetic characterization of trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic chagas disease differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am J Pathol**. v. 156, n. 5, p. 1805–1809, 2000.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with Benznidazole versus no treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724–734, 2006.

VLAICU, S. I.; TATOMIR, A.; BOODHOO, D.; VESA S.; MIRCEA, P. A.; RUS, H. The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. **Immunologic research**, v. 64, n. 3, p. 653–64, 2016.

WALPORT M J. Complement First of Two Parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058–1066, 2001.

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

WEITZEL, T.; ZULANTAY, I.; DANQUAH, I.; HAMANN, L.; SCHUMANN, R.R.

Mannose-binding lectin and Toll-like receptor polymorphisms and Chagas disease in Chile. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 2, p. 229–32, 2012.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2010.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H.; ENRICH, B.; TILG, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, n. 2, p. 630–635, 2004.

WOO, P.; KORENBERG, J. R.; WHITEHEAD, A S. Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 24, p. 13384–13388, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, n. 6, p. 33–44, 2015.

World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 6, p. 33–44, 2015.

WU, J.; WU, Y.Q.; RICKLIN, D.; JANSSEN, B.J.; LAMBRIS, J.D.; GROS, P. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. **Structure**, v. 10, n. 7, p. 728–733, 2009.

WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; AJUWON, K.M.; WANG, J.; CHRISTIAN, J.A.; SPURLOCK, M.E. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 3, p. 924–929, 2004.

XAVIER, H. T.; IZAR M. C.; FARIA NETO J. R.; ASSAD M. H.; ROCHA V. Z.; et al. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIA E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, supl.1, p. 1–20, 2013.

YIP, H.K.; WU, C.J.; HANG, C.L.; CHANG, H.W.; YANG, C.H. Levels and values of inflammatory markers in patients with angina pectoris. **International heart journal**, v. 46, n. 4, p. 571–81, 2005.

YOUSEF, A. A. A.; AMR, Y. M.; SULIMAN, G. A. The diagnostic value of serum leptin monitoring and its correlation with tumor necrosis factor- α in critically ill patients : a prospective observational study. **Critical care**, v. 14, n. R33, p. 1–9, 2010.

YOSHIDA N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell Biochem**. v. 47, p. 82-91, 2008.

ZABEAU, L.; PEELMAN, F.; TAVERNIER, J. Antagonizing leptin: Current status and future directions. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 499–514, 2014.

ZACHO, R. M.; JENSEN, L.; TERP, R.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S. Studies of the pattern recognition molecule H-ficolin: Specificity and purification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 8071–8081, 2012.

ZHANG, F.; CHEN, Y.; HEIMAN, M.; DIMARCHI, R. Leptin: Structure, Function and Biology. **Vitamins and Hormones**, v. 71, n. 5, p. 345–372, 2005.

ZHANG, J.; WRIGHT, W.; BERNLOHR, D.A.; CUSHMAN, S.W.; CHEN, X. Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 5, p. E1433–E1440, 2007.

ZHOU, H.; YAN, H.; BERTRAM, P.; HU, Y.; SPRINGER, L.E.; et al. Fibrinogen-specific antibody induces abdominal aortic aneurysm in mice through complement lectin pathway activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

the United States of America, v. 110, p. E4335–E4344, 2013a.

ZHOU, Y.; NI, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; WU, Q.; et al. Plasma pentraxin 3 may be a better marker of peripheral artery disease in hemodialysis patients than C-reactive protein. **Vasc Med.**, v. 18, n. 2, p. 85–91, 2013b.

ZIPFEL, P. F.; JOKIRANTA, T.S.; HELLWAGE, J.; KOISTINEN, V.; MERI, S. The factor H protein family. **Immunopharmacology**, v. 42, n. 1–3, p. 53–60, 1999.

ZIPFEL, P. F.; HEINEN, S.; JÓZSI, M.; SKERKA, C. Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 1–2, p. 97–106, 2006.

ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. Complement factor H and related proteins: An expanding family of complement-regulatory proteins? **Immunology Today**, v. 15, n. 3, p. 121–126, 1994.

APÊNDICE 1- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*

The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*

Kárita C. F. Lidani^{*†}, Lorena Bavia[†], Altair R. Ambrosio[†] and Iara J. de Messias-Reason^{*}

Laboratory of Molecular Immunopathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite known to cause Chagas disease (CD), a neglected sickness that affects around 6–8 million people worldwide. Originally, CD was mainly found in Latin America but more recently, it has been spread to countries in North America, Asia, and Europe due the international migration from endemic areas. Thus, at present CD represents an important concern of global public health. Most of individuals that are infected by *T. cruzi* may remain in asymptomatic form all lifelong, but up to 40% of them will develop cardiomyopathy, digestive mega syndromes, or both. The interaction between the *T. cruzi* infective forms and host-related immune factors represents a key point for a better understanding of the physiopathology of CD. In this context, the complement, as one of the first line of host defense against infection was shown to play an important role in recognizing *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes and in controlling parasite invasion. The complement consists of at least 35 or more plasma proteins and cell surface receptors/regulators, which can be activated by three pathways: classical (CP), lectin (LP), and alternative (AP). The CP and LP are mainly initiated by immune complexes or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), respectively, whereas AP is spontaneously activated by hydrolysis of C3. Once activated, several relevant complement functions are generated which include opsonization and phagocytosis of particles or microorganisms and cell lysis. An important step during *T. cruzi* infection is when intracellular trypomastigotes are release to bloodstream where they may be target by complement. Nevertheless, the parasite uses a sequence of events in order to escape from complement-mediated lysis. In fact, several *T. cruzi* molecules are known to interfere in the initiation of all three pathways and in the assembly of C3 convertase, a key step in the activation of complement. Moreover, *T. cruzi* promotes secretion of plasma membrane-derived vesicles from host cells, which prevent the activity of C3 convertase C4b2a and thereby may hinder complement. In this review, we aim to present an overview on the strategies used by *T. cruzi* in order to circumvent the activation of complement and, consequently, its biological effects.

OPEN ACCESS

Edited by: Angela Silva Barbosa, Instituto Butantan, Brazil

Reviewed by: Wilmar Dias Da Silva, Instituto Butantan, Brazil
Marisa Mariel Fernandez,

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET-UBA), Argentina

*Correspondence: Kárita C. F. Lidani kari.lidani@gmail.com
Iara J. de Messias-Reason iara.reason@hc.ufpr.br

†These authors have contributed equally to this work.

Specialty section: This article was submitted to Microbial Immunology, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*

Received: 10 February 2017

Accepted: 24 March 2017

Published: 20 April 2017

Citation: Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR and de Messias-Reason IJ (2017) The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.* 8:607. doi:10.3389/fmicb.2017.00607

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, complement system, complement regulatory proteins, evasion mechanism, innate immunity

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a hemoflagellate parasite of the order Kinetoplastida and Trypanosomatidae

family (Levine et al.,1980) that causes CD. The parasite presents complex mechanisms of surveillance in the mammalian host and exerts direct influence on the course of CD (Watanabe Costa et al.,2016). CD is responsible for more expressive morbimortality than any other parasitic

disease (World Health Organization [WHO],2010;Bonney, 2014), resulting in a global annual burden of \$627.5 million in health-care costs (Lee et al.,2013). It is estimated that 6–8 million people are infected with *T. cruzi* from 21 countries in Latin America (Stanaway and Roth,2015), where 25 million people live at risk of acquiring the disease (Pereira and Navarro, 2013;World Health Organization [WHO],2015). Furthermore, owing to the widespread human migration from CD-endemic areas, the disease has become an emerging global health concern, affecting several countries in Europe (World Health Organization [WHO],2009;Navarro et al.,2012;European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC],2014), the United States (Bern and Montgomery,2009), and Japan (Schmunis,2007), where transmission occurs mainly through blood transfusions, organ transplants, or by congenital routes (Singh and Sehgal, 2010).

Although most of *T. cruzi*-infected people remain asymptomatic throughout their lives, the parasite-host interaction seems to be crucial for the development of the disease and the severity of the chronic symptomatic forms. In this context, the complement system plays an important role as a first line of host immune defense promoting the recognition, opsonization, and direct lysis of invading pathogens. However, during *T. cruzi* infection in humans, the activation of complement may present a dual role in both the acute and chronic phases of CD, initially being crucial in controlling the parasitemia, but later in the chronic phase contributing to the development or severity of the symptomatic forms because of its proinflammatory effect (Boldt et al.,2011;Weitzel et al.,2012;Luz et al.,2013,2016). Considering that activation of complement by the lectin, classical, and APs leads to a proteolytic cascade and ultimately to a powerful lytic effect, this system is a special target for evasion strategies used by microbes in order to ensure infection success and possibly progression to chronic disease (Lambris et al.,2008). In fact, *T. cruzi* displays a range of different strategies to circumvent the harmful effects of the complement proteolytic cascade, which enables the parasite's survival and development of CD. Therefore, we review here published information on *T. cruzi*-derived proteins that are involved in complement evasion which are critical to successful infection and disease progression.

Abbreviations: AP, alternative pathway; C1-INH, C1 esterase inhibitor; C1qR, C1q receptor; C4BP, C4b-binding protein; CD, chagas disease; CD46, membrane cofactor protein; CD59, inhibitor membrane attack complex-inhibitory protein; CP, classical pathway; CL-K1, collectin -11; CRIT, complement C2 receptor inhibitor trispanning; CR1, complement receptor 1; DAF, decay accelerating factor or CD55; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ER, endoplasmic reticulum; FB, factor B; FD, factor D; GlcNAc, *N*-acetylgalactosamine; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; HuCRT, human calreticulin; IFA, immunofluorescence antibody test; LP, lectin pathway; MAC, membrane attack complex; MASP-1, MBL-associated serine proteases - 1; MASP-2, MBL-associated serine proteases - 2; MBL, mannose-binding lectin; MV, microvesicles; NHS, normal human serum; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PCR, polymerase chain reaction; PRMs, pattern-recognition molecules; Sh-TOR, *Schistosoma haematobium*; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; TcCRT, *Trypanosoma cruzi* calreticulin; TcCRIT, *Trypanosoma cruzi* complement C2 receptor inhibitor trispanning; TcCRP, *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein or Gp160; T-DAF, trypomastigote decay- accelerating factor; TOR, trispanning orphan receptor.

Trypanosoma cruzi AND CHAGAS DISEASE

T. cruzi Life Cycle

Trypanosoma cruzi infection occurs predominantly via vectorial transmission by triatomine bugs of the genera *Triatoma*, *Rhodnius*, and *Panstrongylus*. These bugs suck the blood of vertebrates infected with trypomastigotes, and this initiates the parasite life cycle. Once ingested by the insect vector, trypomastigotes are transformed in the anterior midgut either into spheromastigote or epimastigote forms. Epimastigotes multiply in the midgut and attach to the perimicrovillar membranes of the triatomine intestinal cells. At the most posterior region of the vector's intestine and at the rectum, many epimastigotes detach from the intestinal surface and become infective metacyclic trypomastigotes, which are then released with feces and urine during blood meals. However, metacyclic trypomastigotes are not able to penetrate the intact host skin and enter through the rubbing or scratching of the bite wound, or through permissive mucosal or conjunctival surfaces at the inoculation site. Recruitment and fusion of the host lysosome with the parasite involves the formation of a parasitophorous endocytic vacuole, which is needed for parasite invasion of fibroblasts, macrophages, and epithelial cells (Souza et al.,2010; Nogueira et al.,2015). Subsequently, the parasite promotes enzymatic lysis of the vacuole membrane, differentiating into intracellular amastigotes, which after nine cycles of binary division become trypomastigotes that are eventually released into the circulation as bloodstream trypomastigotes (Dvorak and Hyde,1973;Dvorak and Howe,1976). These either infect new cells or are taken up by a new insect vector during a blood meal, repeating the parasite cycle.

Once in the bloodstream of a mammalian host, *T. cruzi* is able to infect several cell types from a variety of tissues thereby spreading to new infection sites where they differentiate into intracellular amastigotes (Watanabe Costa et al., 2016) (**Figure 1**). Besides vectorial transmission, *T. cruzi* can also be transmitted through blood transfusion, organ transplantation, transplacentally, the ingestion of contaminated food or drinks, or by accidental exposure; however, the physiopathological mechanisms of such transmissions are still unclear.

Chagas Disease

Several clinical manifestations may result in humans from *T. cruzi* infection. This initiates with an acute phase that last for about 2 months characterized by high parasitemia. In this stage, the diagnosis may be achieved by direct visualization of the parasite in blood and by the detection of IgG antibodies against *T. cruzi* antigens. Although most acute cases are oligosymptomatic or asymptomatic, initial dermatologic manifestations resulting in a skin lesion (chagoma), eyelid edema and conjunctivitis (Romaña sign), or generalized morbilliform eruption (schizotrypanides) may be present (Nunes et al., 2013). Other symptoms may include anorexia, fever, headache, dyspnea, abdominal pain, cough, hepatosplenomegaly, rash,

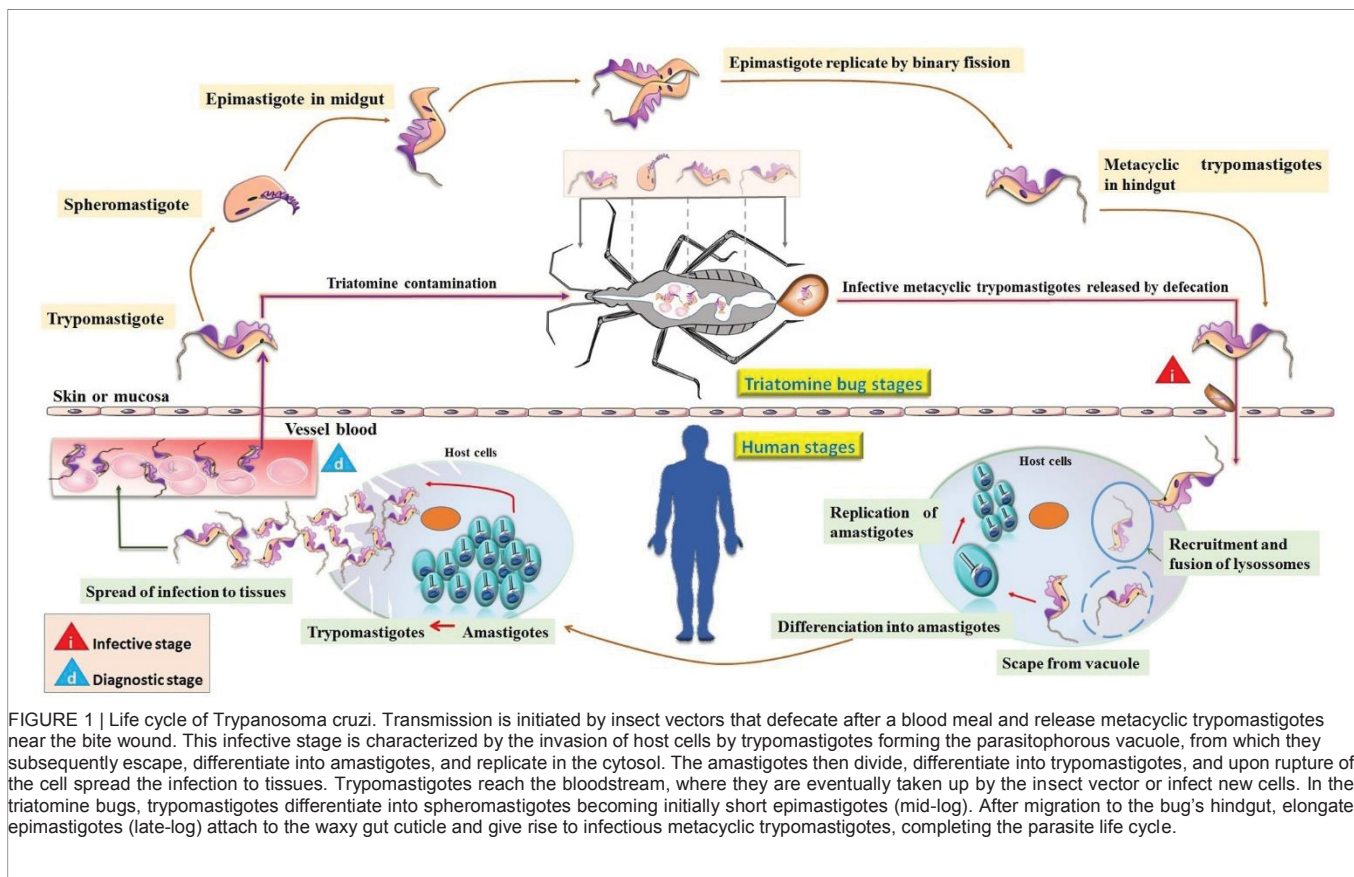


FIGURE 1 | Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Transmission is initiated by insect vectors that defecate after a blood meal and release metacyclic trypomastigotes near the bite wound. This infective stage is characterized by the invasion of host cells by trypomastigotes forming the parasitophorous vacuole, from which they subsequently escape, differentiate into amastigotes, and replicate in the cytosol. The amastigotes then divide, differentiate into trypomastigotes, and upon rupture of the cell spread the infection to tissues. Trypomastigotes reach the bloodstream, where they are eventually taken up by the insect vector or infect new cells. In the triatomine bugs, trypomastigotes differentiate into spheromastigotes becoming initially short epimastigotes (mid-log). After migration to the bug's hindgut, elongate epimastigotes (late-log) attach to the waxy gut cuticle and give rise to infectious metacyclic trypomastigotes, completing the parasite life cycle.

painful nodules, generalized body swelling, and myocarditis (Hidron et al., 2010; Malik et al., 2015).

Following the acute phase, most infected people enter into a prolonged asymptomatic indeterminate form of the chronic disease and will never develop Chagas-related symptoms. However, after 10–30 years of infection approximately 30–40% of chronically infected people will present some clinical manifestations such as cardiomyopathy (20–30%), digestive commitment (10–15%) or both (1–5%) (Rassi and Marin-Neto, 2010). Chronic cardiomyopathy represents the most severe and life-threatening manifestation of human CD, ranging from asymptomatic electrocardiogram abnormalities to congestive heart failure, arrhythmias, and/or thromboembolic events (Biolo et al., 2010) that are associated with high morbidity and mortality. In fact, mortality related with CD is generally due to cardiovascular involvement, with approximately 12,000 deaths every year (Salvatella et al., 2013), with sudden death accounting for around 60%, heart failure 25–30% and stroke 10–15% (Rassi et al., 2001).

Standard approaches for CD diagnosis in the chronic phase require at least two different serological tests, generally using ELISA and IFA (Bern et al., 2007). Additionally, amplification of parasite DNA by PCR may be employed in some uncertain cases (Schijman et al., 2011) (Figure 2).

THE COMPLEMENT SYSTEM

The complement system constitutes a key component of innate immunity with a significant role in the first line of defense against invading microbes. It comprises more than 35 plasma and cell membrane receptor/regulator proteins that become activated mainly by three pathways: lectin (LP), classical (CP), and alternative (AP), resulting in important biological responses such as inflammation, phagocytosis, and lysis of pathogens (Ricklin et al., 2010). Activation of complement and its potent inflammatory response through the production of molecules with anaphylatoxin activity was first demonstrated by Dias da Silva and Lepow (1967). The functional role in vascular permeability, histamine release from mast cells and contraction of smooth muscle of the anaphylatoxins (C4a, C3a, and C5a) was subsequently reported (Dias da Silva and Lepow, 1967; Dias da Silva et al., 1967; Cochrane and Müller-Eberhard, 1968). Besides inflammatory response, the complement also plays an important role in the solubilization and removal of circulating immune complexes to avoid their deposition, which could result in tissue injury (Miller and Nussenzweig, 1974). In addition, the complement system links the innate and acquired responses through the activation of B lymphocytes and synthesis of immunoglobulins (Walport, 2001; Ricklin et al., 2010, 2016). Furthermore, complement is involved in the opsonization of

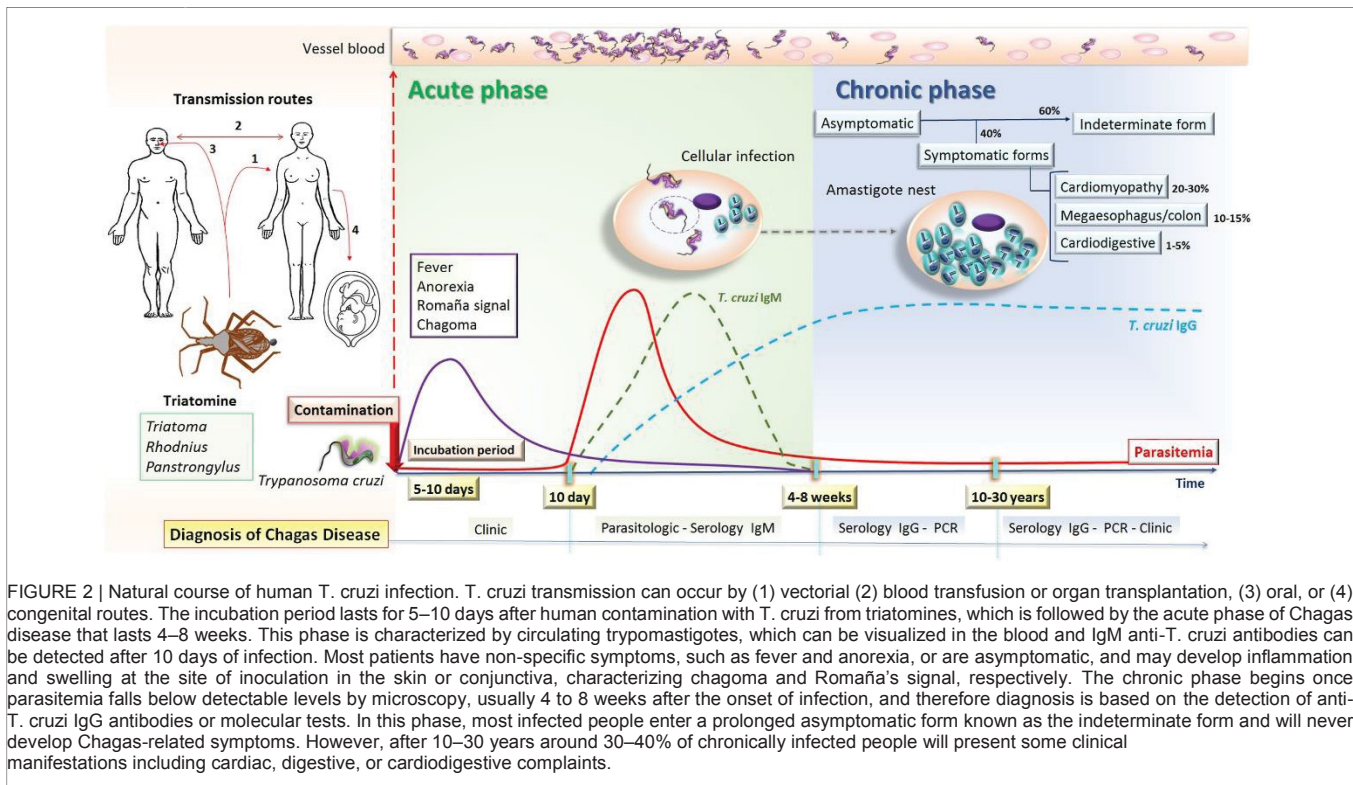


FIGURE 2 | Natural course of human *T. cruzi* infection. *T. cruzi* transmission can occur by (1) vectorial (2) blood transfusion or organ transplantation, (3) oral, or (4) congenital routes. The incubation period lasts for 5–10 days after human contamination with *T. cruzi* from triatomines, which is followed by the acute phase of Chagas disease that lasts 4–8 weeks. This phase is characterized by circulating trypomastigotes, which can be visualized in the blood and IgM anti-*T. cruzi* antibodies can be detected after 10 days of infection. Most patients have non-specific symptoms, such as fever and anorexia, or are asymptomatic, and may develop inflammation and swelling at the site of inoculation in the skin or conjunctiva, characterizing chagoma and Romaña's signal, respectively. The chronic phase begins once parasitemia falls below detectable levels by microscopy, usually 4 to 8 weeks after the onset of infection, and therefore diagnosis is based on the detection of anti-*T. cruzi* IgG antibodies or molecular tests. In this phase, most infected people enter a prolonged asymptomatic form known as the indeterminate form and will never develop Chagas-related symptoms. However, after 10–30 years around 30–40% of chronically infected people will present some clinical manifestations including cardiac, digestive, or cardiodigestive complaints.

apoptotic cells contributing to their phagocytosis and removal from circulation (Flierman and Daha, 2007).

Complement is activated mainly by three pathways, LP, CP, and AP, which lead to the generation of effector molecules, self-amplification, and the induction of immune signaling (Ricklin et al., 2010). The LP can be triggered through the binding of PRMs, such as MBL, ficolins (Ficolin-1 [or M-ficolin], Ficolin-2 [or L-ficolin], and Ficolin-3 [or H-ficolin]) and CL-K1, to PAMPs on the pathogen's surface (Beltrame et al., 2015). Whereas carbohydrate-recognition domains in the MBL molecule bind to sugar moieties on the pathogen's surface (such as D-mannose, glucose, L-fucose, and GlcNAc) (Weis et al., 1992), the three human ficolins bind to PAMPs by fibrinogen-like recognition domains and exhibit differences in their binding specificities (Gout et al., 2010). For instances, Ficolin-1 recognizes *N*-acetylated compounds (such as GlcNAc and *N*-acetylgalactosamine [GalNAc]) (Frederiksen et al., 2005), *O*-acetylated and glycan compounds containing sialic acid (Gout et al., 2010). Ficolin-2 also recognizes *N*-acetylated compounds and capsulated strains of bacteria (Frederiksen et al., 2005; Gout et al., 2010), while Ficolin-3 binds GalNAc, GlcNAc, D-fucose as mono/oligosaccharides and lipopolysaccharides (Sugimoto et al., 1998). In addition, CL-K1 senses mannose and fucose-containing microbial derived products (Keshi et al., 2006). Following the binding of MBL, ficolins, or CL-K1 to PAMPs, the LP is initiated by the activation of MASP-1 and MASP-2 resulting in active forms (Kjaer et al., 2013) that cleave C4 in C4a and C4b, and C2 in C2a and C2b, culminating with the formation of the LP C3

convertase (C4b2a) and C5 convertase (C4bC2aC3b) (Walport, 2001; Ricklin et al., 2010; Merle et al., 2015).

The activation of the CP depends mainly on the interaction of C1 with antigen-antibody complexes or alternatively, by PAMPs (lipopolysaccharides and porins from Gram-negative bacteria), phospholipids, apoptotic cells (phosphatidylserine) or pentraxins (C-reactive protein and pentraxin 3), among others (Alberti et al., 1993; Kishore et al., 2004). The C1 complex is formed of one C1q molecule and two molecules each of C1r and C1s (C1qC1r2C1s2). C1q initiates the activation of the CP by binding to CH3 or CH2 Fc domains of IgM and IgG, respectively, inducing a conformational change in C1q. This leads to the activation of C1r and C1s, and serine proteases that cleave C4 and C2 (Lörincz et al., 2000), forming the CP C3 and C5 convertases (C4b2a and C4bC2aC3b), similar to those generated in the LP (Ricklin et al., 2010).

The activation of the AP starts with spontaneous hydrolysis of the thiol-ester bond in C3 α -chain generating C3(H₂O). This molecule exhibits a reactive site for the plasma protein FB, forming the complex C3(H₂O)B. In this condition, FB can be cleaved by FD in Ba and Bb. The Bb fragment remains bound to C3(H₂O), forming the first C3 convertase of AP (C3(H₂O)Bb), which now exhibits serine protease activity cleaving further C3 molecules into C3a and C3b. Like C3(H₂O), C3b exhibits reactive sites for FB binding allowing its cleavage by FD, resulting in the second C3 convertase of this pathway, C3bBb. Additionally, C3 binds to C3bBb forming C3bBbC3b, a complex with C5 convertase activity (Walport, 2001; Ricklin et al., 2010).

Once all three pathways are activated, the C5 convertases formed by both CP/LP (C4b2a3b) and AP (C3bBb3b) cleave C5 in C5a and C5b. The fragment C5b binds to C6, forming a stable complex C5b6, which recruits C7 resulting in a hydrophobic complex that targets cell membranes (mC5b-7). After C8 is incorporated to mC5b-7, the C5b678 complex becomes inserted in the cell membrane. Then, 12–18 copies of the C9 molecule polymerize forming the MAC. This pore-forming ring structure (C5b678(9)_n) gets inserted into the cell as a transmembrane channel, favoring ionic imbalance and an increase in intracellular volume leading to membrane cell disruption (Kondos et al., 2010).

Since undesirable activation of complement may lead to inflammation and tissue damage, an effective and accurate system of regulatory molecules is required for the maintenance of its homeostasis. In this context, a variety of membrane-bound inhibitory proteins (such as CR1, CD59, CD46, and DAF or CD55) downregulate local complement activation, protecting host cells from unwanted complement lysis (Carroll and Sim, 2011; Noris and Remuzzi, 2013). In addition, several plasma regulator proteins (such as Factor H, Factor I, C1-INH, C4BP, and vitronectin) control soluble activated complement components and complexes (Carroll and Sim, 2011; Noris and Remuzzi, 2013). In general, either excessive or defective complement activation may be implicated in the pathogenesis of some conditions including autoimmune, chronic inflammatory, and infectious diseases (Ricklin and Lambris, 2013).

Complement Activation by *T. cruzi*

The interaction of complement with *T. cruzi* is a principal step in the immediate immune response of the host against the parasite. However, it is important to consider that this interaction is dependent on the evolutive forms of the parasite. Experimental studies showed that complement can be activated by amastigote (Iida et al., 1989), epimastigote (Nogueira et al., 1975), and trypomastigote forms (Kipnis et al., 1985), but only non-infective epimastigote forms are susceptible to complement lysis. However, some strains of metacyclic trypomastigotes have been shown to be susceptible to complement-mediated killing *in vitro* (Cestari and Ramirez, 2010). Epimastigotes can be recognized by MBL, ficolins, C3 and C1q, but C3b and C4b deposition assays revealed that complement activation occurred mainly by the LP and AP in non-immune sera (Cestari and Ramirez, 2010). CP can also be activated through the binding of specific antibodies to epimastigote's surface (Nogueira et al., 1975). As previously shown, AP can be activated by the spontaneous hydrolysis of C3; C3b is deposited on the epimastigote's surface supporting efficient formation of AP C3 convertase (Joiner et al., 1986). Since all pathways are activated and C3 convertases are formed, C3 is cleaved into C3a and C3b with additional C3b molecules binding to C3 convertases, forming C5 convertases, which in turn cleave C5 into C5a and C5b. Then C5b recruits C6, C7, and C8 forming a C5b-8 complex where C9 molecules polymerize forming the MAC that induces the lysis of epimastigotes (**Figure 3**). Abrahamsohn and Dias da Silva (1977) demonstrated that epimastigotes treated with specific immune serum in the

presence of splenic lymphocytes may be also killed *in vitro* by antibody dependent cell-mediated cytotoxicity.

During the differentiation cycle from non-infective/ complement susceptible to infective/complement resistance forms, trypomastigotes acquire the ability to circumvent complement lysis by TcCRT, TcCRP, TcCRIT, gp58/68, and T-DAF molecules. At the first stages of *T. cruzi* infection (seconds after infection), complement can be initially activated by the LP and AP since both pathways do not depend on a specific antibody response (Cestari et al., 2013). Thus, trypomastigotes can immediately be targeted by complement after accessing the host bloodstream. A wide range of carbohydrates (such as GalNAc and GlcNAc) anchored by glycosylphosphatidylinositol in the outer leaflet of *T. cruzi* plasma membrane (Lederkremer and Bertello, 2001; Buscaglia et al., 2006) can be recognized by PAMP sensor molecules, such as MBL and ficolins (Cestari et al., 2009; Cestari and Ramirez, 2010) leading to the activation of MASPs. Then, the serine protease MASP-2 cleaves C2 and C4 generating LP C3 convertase formation that activates C3 to form C3b, contributing to the AP amplification loop with simultaneous LP and AP activation (Ricklin et al., 2010; Cestari et al., 2013). In addition, the activation of the AP can also take place spontaneously by hydrolysis of C3, which leads to the generation of C3 convertase and C3 cleavage. However, deposition of C3b on trypomastigotes may contribute to

T. cruzi internalization by CR1 (van Lookeren et al., 2007). Both LP and AP can be continually activated, not only at the first stages of *T. cruzi* infection, but also during the course of chronic CD (Lidani et al., 2015). At a later stage of *T. cruzi* infection (days post-infection), CP becomes activated when anti-trypomastigote-specific IgM and IgG antibodies are produced allowing C1q binding and the activation of C1r and C1s serine proteases that cleave C4 and C2 forming the CP C3 convertase. Although during *T. cruzi* infection complement is activated by these three pathways, the process is interrupted at the C3 convertase level by complement regulatory proteins derived from trypomastigotes that cause abrogation of the terminal pathway and MAC formation. This evasion from complement lysis allows trypomastigote cell invasion and tissue spreading driving the infection toward chronic disease.

COMPLEMENT EVASION STRATEGIES USED BY *T. cruzi*

The success of *T. cruzi* infection depends on a series of complex mechanisms that enable the parasite to evade the host immune response. In fact, *T. cruzi* employs a range of strategies to escape the effects of both innate and adaptive immunity. A crucial step occurs during the first seconds of infection when trypomastigotes needs to circumvent the harmful lytic attack of complement (Sacks and Sher, 2002). During differentiation from epimastigote to metacyclic trypomastigote forms inside the insect vector, the parasite undergoes a series of morphological and physiological changes that confers the capacity to evade the lytic effect of complement. The mechanism controlling this resistance mainly involves the expression of complement binding

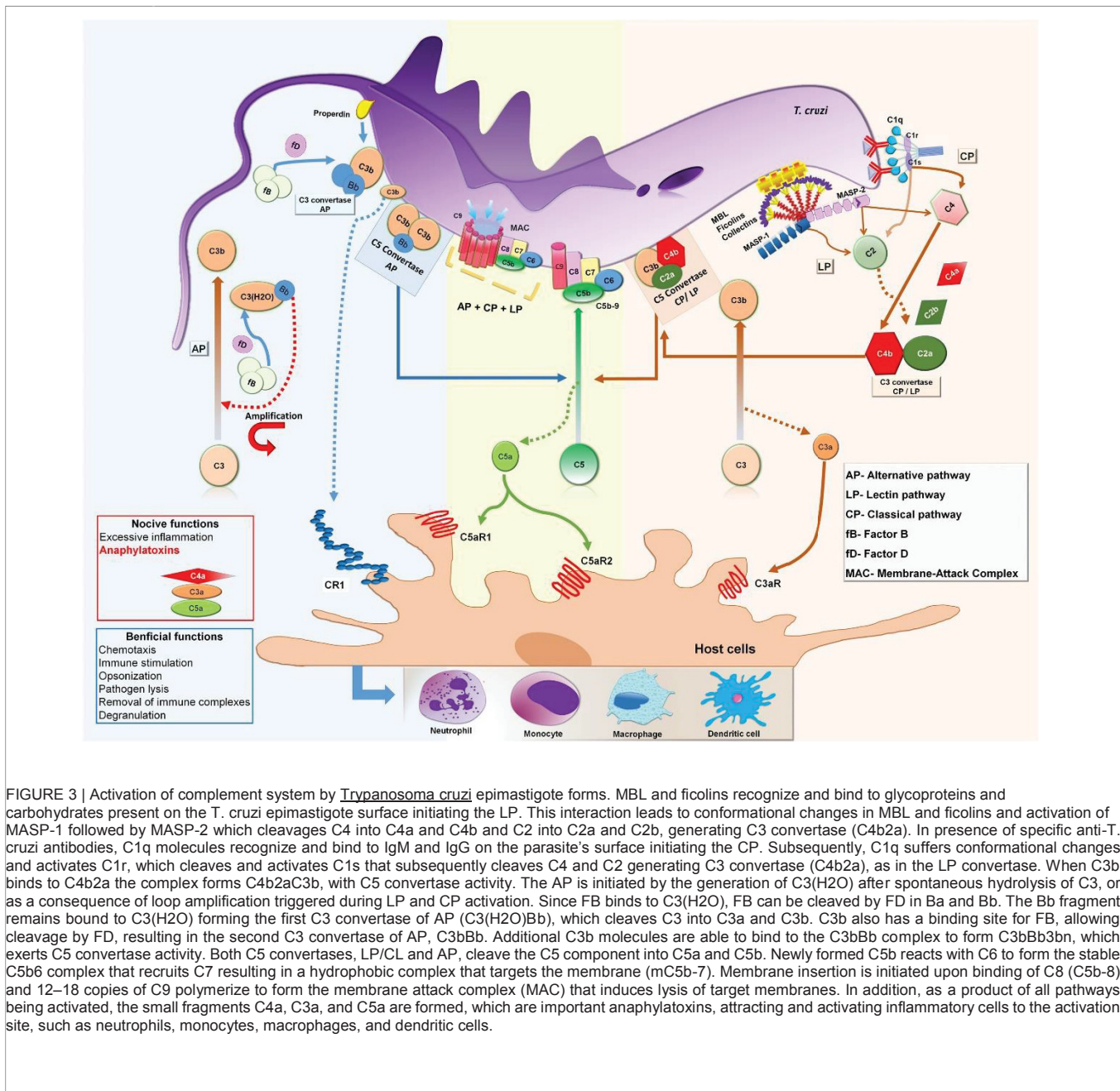


FIGURE 3 | Activation of complement system by *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. MBL and ficolins recognize and bind to glycoproteins and carbohydrates present on the *T. cruzi* epimastigote surface initiating the LP. This interaction leads to conformational changes in MBL and ficolins and activation of MASP-1 followed by MASP-2 which cleavages C4 into C4a and C4b and C2 into C2a and C2b, generating C3 convertase (C4b2a). In presence of specific anti-*T. cruzi* antibodies, C1q molecules recognize and bind to IgM and IgG on the parasite's surface initiating the CP. Subsequently, C1q suffers conformational changes and activates C1r, which cleaves and activates C1s that subsequently cleaves C4 and C2 generating C3 convertase (C4b2a), as in the LP convertase. When C3b binds to C4b2a the complex forms C4b2aC3b, with C5 convertase activity. The AP is initiated by the generation of C3(H₂O) after spontaneous hydrolysis of C3, or as a consequence of loop amplification triggered during LP and CP activation. Since FB binds to C3(H₂O), FB can be cleaved by FD in Ba and Bb. The Bb fragment remains bound to C3(H₂O) forming the first C3 convertase of AP (C3(H₂O)Bb), which cleaves C3 into C3a and C3b. C3b also has a binding site for FB, allowing cleavage by FD, resulting in the second C3 convertase of AP, C3bBb. Additional C3b molecules are able to bind to the C3bBb complex to form C3bBb3b, which exerts C5 convertase activity. Both C5 convertases, LP/CL and AP, cleave the C5 component into C5a and C5b. Newly formed C5b reacts with C6 to form the stable C5b6 complex that recruits C7 resulting in a hydrophobic complex that targets the membrane (mC5b-7). Membrane insertion is initiated upon binding of C8 (C5b-8) and 12–18 copies of C9 polymerize to form the membrane attack complex (MAC) that induces lysis of target membranes. In addition, as a product of all pathways being activated, the small fragments C4a, C3a, and C5a are formed, which are important anaphylatoxins, attracting and activating inflammatory cells to the activation site, such as neutrophils, monocytes, macrophages, and dendritic cells.

molecules on the trypomastigote's surface, such as *T. cruzi* calreticulin (TcCRT) (Ferreira et al., 2004a; Valck et al., 2010; Sosoniuk et al., 2014), *T. cruzi* complement regulatory protein (TcCRP) or Gp160 (Norris et al., 1989; Norris and Schimpf, 1994), *T. cruzi* complement C2 receptor trispanning (TcCRIT) (Cestari et al., 2008), gp58/68 (Fischer et al., 1988) and T-DAF (Tambourgi et al., 1993). In addition, it has been shown that *T. cruzi* metacyclic trypomastigote forms induce membrane-derived vesicles (microvesicles) from host cells, which interact with C3 convertase, resulting in inhibition of complement activation and increased parasite survival, as well as eukaryotic cell invasion (Cestari et al., 2012). Moreover, it has been reported that microvesicles, derived from the host cell membrane and also secreted by *T. cruzi*, can fuse thereby increasing host cell invasion

(Ramirez et al., 2016) (Table 1). The molecules and microvesicles involved in *T. cruzi* evasion from the complement system will be covered in more detail (Figure 4).

T. cruzi Calreticulin (TcCRT)

Trypanosoma cruzi calreticulin (TcCRT) is a 45 kDa calcium-binding protein that is primarily expressed in the ER of infective trypomastigotes. Upon infection, TcCRT is translocated from the RE to the emerging area of the flagellum on the plasma membrane surface (Ferreira et al., 2004a,b; González et al., 2015). Interestingly, this area has been shown to be the initial contact with the host plasma membrane (González et al., 2015).

TABLE 1 | Characteristics of the molecules involved in the evasion of *Trypanosoma cruzi* from the complement system.

Parasite molecule	Complement component	Complement pathway affected	Reference
TcCRT	Binds to MBL collagen-like domain	Lectin pathway	Ferreira et al., 2004b
	Binds to Ficolin-2 collagen-like domain	Lectin pathway	Sosoniuk et al., 2014
	Interacts with C1q collagen-like domain	Classical pathway	Ferreira et al., 2004b; Valck et al., 2010
T-DAF	Binds to C3b and C4b accelerating the dissociation of C3 convertase	Alternative, classical, and lectin (probably) pathways	Joiner et al., 1988; Rimoldi et al., 1988; Tambourgi et al., 1993
TcCRP/Gp160	Binds to C3b and C4b preventing assembly of C3 convertase	Alternative and classical Lectin (probably) pathways	Norris et al., 1991, 1989; Norris and Schrimpf, 1994; Norris, 1998
TcCRIT	Binds to C2 and prevent its cleavage by C1s and MASP2	Classical and lectin pathways	Cestari et al., 2008, 2009
gp58/68	Interacts with Factor B blocking its binding to C3b	Alternative pathway	Fischer et al., 1988
<i>T. cruzi</i> -induced membrane-derived vesicles from host cells or microvesicle (MV)	Binds to C3 convertase (C4b2a) on the <i>T. cruzi</i> surface, thereby inhibiting C3 cleavage	Classical and lectin pathway	Cestari et al., 2012; Ramirez et al., 2016

TcCRT expressed on the *T. cruzi* trypomastigote's surface is able to bind to host PRMs, similar to C1q, MBL (Ferreira et al., 2004b; Ramirez et al., 2011) and ficolins (Sosoniuk et al., 2014) interfering in the activation of the CP and LP. TcCRT also likely enhances the rate of the internalization of *T. cruzi* trypomastigotes by host cells (Ramirez et al., 2011, 2012).

Trypanosoma cruzi calreticulin was initially named Tc45 and described as a polypeptide present in lysates of epimastigotes and trypomastigotes. It was revealed to have an immunogenic role in the induction of specific antibodies in *T. cruzi*-infected mice (Ramos et al., 1991) and in human CD (Aguillón et al., 1997).

Tc45 was subsequently characterized as *T. cruzi* calreticulin (TcCRT) as gene sequencing showed homology with calreticulin genes of other species (Aguillón et al., 2000). Later, TcCRT was found to exhibit a high homology with HuCRT, a multifunctional 46 kDa protein present predominantly in the ER and subcellular compartments, as well as in the plasma membrane (Ferreira et al., 2004a). Extracellular HuCRT has been reported to contribute to cell adhesion to the extracellular matrix and to facilitate the uptake of apoptotic and cancerous cells by phagocytes (Lu et al., 2015). The molecule may act as a receptor for the collagen-like domain of C1q and MBL, promoting phagocytosis through C1qR (Stuart et al., 1997). In fact, the role of C1q in the invasion of mononuclear phagocytes and fibroblasts by *T. cruzi* trypomastigotes has previously been demonstrated (Rimoldi et al., 1989). This parasite-derived molecule was later identified in infective trypomastigotes as TcCRT (Ferreira et al., 2004b) and its activity is considered one of the strategies that mediates *T. cruzi* uptake by mammalian phagocytic cells, mimicking the process of apoptotic cells ingestion (Ramirez et al., 2011).

In the early stages of infection, TcCRT is able to bind to the carbohydrate recognition domain of MBL resulting in abrogation of interaction with its natural ligands and the collagen domain of Ficolin-2, preventing C4 activation and impairing further activation of the LP (Ferreira et al., 2004b; Sosoniuk et al., 2014). This property however, is not shared by Ficolin-3 (Sosoniuk et al., 2014). During the late stages of *T. cruzi* infection the CP can be activated in the presence of specific *T. cruzi* antibodies, as mentioned earlier. Ferreira et al. (2004b) have demonstrated using hemolytic assays that recombinant TcCRT binds to C1q collagenous tails, impairing the activation of the CP. Subsequent studies showed that

TcCRT competes with the (C1r-C1s)₂ tetrameric complex for binding in the collagenous C1q tails and interferes in the capacity of C1s to activate C4 in a calcium-independent manner (Valck et al., 2010). In summary, TcCRT has been shown to be involved in the internalization of *T. cruzi* into mammalian cells, which increases infectivity. It is also known to be an important regulator of both the LP and CP.

Trypomastigote Decay-Accelerating Factor (T-DAF)

The T-DAF is an 87–93-kDa glycoprotein present on the surface of metacyclic and tissue-culture-derived trypomastigote forms of *T. cruzi* that mimics the activity of the complement regulatory protein DAF (Tambourgi et al., 1993). T-DAF regulates the activation of the AP, CP, and probably LP, by interfering in the assembly of C3 convertases.

During *T. cruzi* infection, the three complement pathways are activated culminating with the formation of C3 convertase that cleaves the central component C3. The presence of molecules modulating the C3 convertase of the CP in trypomastigote but not epimastigote forms of *T. cruzi* surface was first described by Kipnis et al. (1986). It was subsequently demonstrated in

a supernatant culture of trypomastigotes that these modulator molecules ranged between 86 and 155 kDa in size, that were enriched for proteins of 86–98 kDa absent in epimastigotes. They were shown to accelerate the decay of both the AP and CP C3 convertases *in vitro* by interfering in the binding of factor B with C3b, or in the formation of C4b2a, respectively. Because of the similar behavior to human complement regulatory DAF the authors called these modulators as analogous to DAF (Rimoldi et al., 1988). In the same year Joiner et al. (1988) characterized biochemically an 87–93 kDa factor produced by *T. cruzi*.

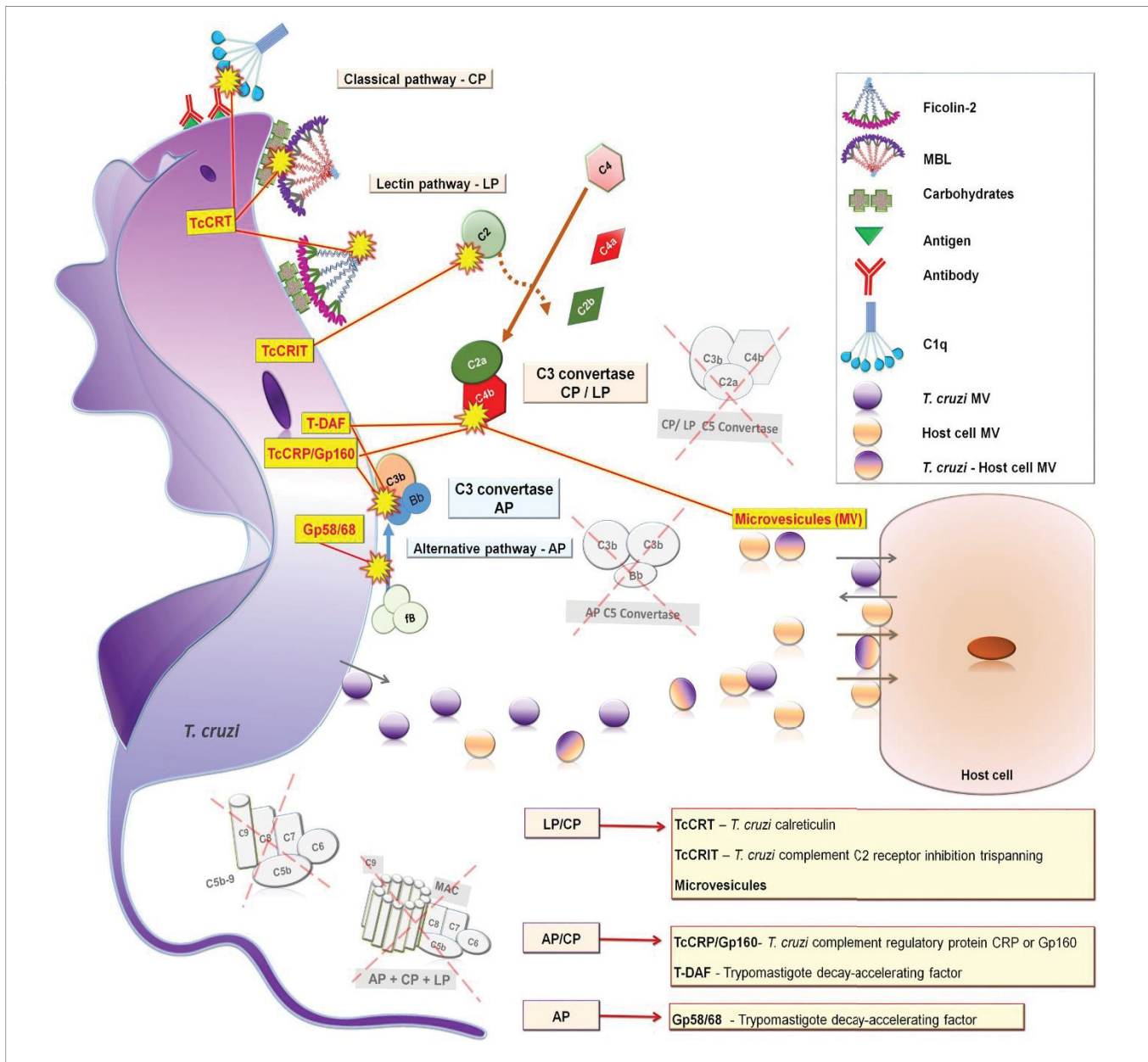


FIGURE 4 | Complement evasion by strategies of *T. cruzi* trypomastigotes forms. TcCRT blocks CP and LP binding to C1q, MBL and Ficolin-2; T-DAF and Gp160/TcCRP block AP and CP C3 convertase assembly; TcCRIT blocks CP and LP binding to C2; Gp58/68 blocks AP C3 convertase binding to factor B; and MV inhibit CP and LP C3 convertase assembly. AP, Alternative pathway; LP, Lectin pathway; and CP, Classical pathway.

trypomastigote forms responsible for accelerating the decay of C3 convertases, which appeared to be an immunogenic glycoprotein immunoprecipitated from sera of patients chronically infected with *T. cruzi*. Later, Tambourgi et al.(1993) called this molecule analogous to DAF as T-DAF owing to its ability in inhibiting complement activation in a manner functionally similar to mammalian DAF. In addition, polyclonal and monoclonal antibodies against T-DAF were shown to inhibit T-DAF activity *in vitro*, validating its functional role (Tambourgi et al.,1993). The authors also showed that T-DAF shared 40% similarity with a portion of the DNA coding region for human DAF, and that anti-T-DAF-specific antibodies were present in up to 96% of patients with both acute and chronic CD (Tambourgi et al., 1995). In summary, T-DAF either accelerates the dissociation or assembly efficiency of C3 convertases potentially affecting the AP, CP (Tambourgi et

al.,1993), and probably LP. Both soluble and surface T-DAFs are essential for the escape of *T. cruzi* from complement activation and lytic effects as well as the development of infection.

Trypanosoma cruzi Complement Regulatory Protein (TcCRP)

Trypanosoma cruzi complement regulatory protein (TcCRP), also called Gp160, is a 160 kDa glycoprotein anchored into trypomastigote membranes (Norris et al.,1989) via glycosylphosphatidylinositol linkage (Norris and Schrimpf, 1994). It is also spontaneously shed in culture from trypomastigotes (Norris et al.,1991). Both membrane and soluble forms of TcCRP are able to bind to C3b and C4b inhibiting the formation of the AP and CP C3 convertases

(Norris et al.,1991;Norris and Schrimpf,1994), and probably LP C3 convertase as well.

Trypanosoma cruzi complement regulatory protein was initially purified and partially characterized by Norris et al. (1989) as Gp160 because of its molecular weight, and was found to be expressed in membrane extracts of both metacyclic and tissue-culture-derived *T. cruzi* trypomastigotes, but absent in insect epimastigotes or intracellular amastigotes. Norris and Schrimpf (1994) purified and characterized the membrane form of TcCRP having the glycolipid anchor attached which presented a molecular mass of 185 kDa. The conversion of the 185- kDa membrane form to the 160-kDa form was suggested to be the result of cleavage by endogenous phospholipase C. Both soluble (160 kDa) and membrane TcCRP forms (185 kDa) are able to bind C3b and C4b preventing the assembly of proteolytically active C3 convertase inhibiting both AP and CP activation (Norris et al.,1991;Norris and Schrimpf,1994). It was then demonstrated that the TcCRP had similar activity to human CRP and DAF, being considered a member of the C3/C4 binding family of complement regulatory proteins, which provided infectious trypomastigotes another mean of evading the harmful effects of complement (Norris et al.,1991). Since TcCRP binds C4b, LP activation could be also affected at the same level. Moreover, anti-TcCRP lytic antibodies were present in the sera of *T. cruzi*-infected patients. Interesting, in the presence of anti- TcCRP antibodies the interaction between TcCRP and C3b was blocked allowing the AP C3 convertase assembly and parasite lysis (Norris et al.,1991).

Norris (1996) demonstrated that following the binding to C3b, TcCRP was released from the *T. cruzi* trypomastigote membrane by proteolytic cleavage, and these findings represented a new alternative mechanism of *T. cruzi* in evading complement activation. Interestingly, epimastigote forms transfected with a cDNA encoding full-length recombinant TcCRP were protected from complement-mediated lysis, confirming the role of TcCRP as a complement resistance factor of *T. cruzi* trypomastigotes (Norris et al.,1997;Norris,1998). Recently, Henrique et al. (2016) demonstrated that surface expression of TcCRP differs among parasite strains, with a tendency of higher expression levels in the most virulent *T. cruzi* strains. In summary, TcCRP is directly involved in the evasion of *T. cruzi* from complement lysis by binding to C3b and C4b and consequently inhibiting both the AP, CP, and probably LP.

T. cruzi Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning (TcCRIT)

Trypanosoma cruzi complement C2 receptor inhibitor trispanning (TcCRIT) is a 32 kDa transmembrane protein that presents a sequence homology with the C4 beta-chain, the binding site of C2. Thus, TcCRIT inhibits the cleavage of C2 by C1s or MASP-2 and consequently prevents C3 convertase formation by competing with C4 (Inal,1999;Inal and Schifferli,2002;Cestari et al.,2012). TcCRIT is mainly expressed in complement resistant trypomastigote forms of *T. cruzi* regulating the activation of both the CP and LP (Inal, 1999;Inal et al.,2005).

The complement C2 receptor inhibitor trispanning (CRIT) was first described in the tegument of *Schistosoma haematobium* and subsequently *S. mansoni* (Inal,1999;Inal and Sim,2000) as a phosphorylated tyrosine molecule named TOR that inhibited C2 cleavage by C1s inhibiting the CP activation. It was then characterized as a novel complement regulator, and named CRIT (Inal and Sim,2000). *S. haematobium* TOR (Sh-TOR) protein sequencing showed a long cytoplasmic tail with several consensus phosphorylation sites for enzymes, such as tyrosine kinases, characteristically associated with membrane receptors (Inal,1999). Later, it was demonstrated that the Sh-TOR synthetic peptide pre-incubated with C2 inhibited the CP activation both *in vitro* (Inal and Schifferli,2002) and *in vivo* (Inal et al.,2003) by competing with C4b (which presents some sequence identity to the first extracellular domain of Sh-TOR) (Inal and Sim, 2000). CRIT is highly conserved in *Schistosoma* species, *T. cruzi* strains, and mammals (Inal,1999,2005). Interestingly, both the *Trypanosoma* parasite and its human host share a receptor for C2, with a complement regulatory function (Inal et al.,2005).

Complement C2 receptor inhibitor trispanning protein was later shown to be expressed in the infective stage of *T. cruzi* preventing the lytic activity of NHS. In addition, overexpression of TcCRIT in transgenic epimastigotes increased the resistance to complement-mediated killing in the presence of non- immune NHS, blocking both the CP and LP. However, when epimastigotes were treated with exogenous C2 the complement activity was restored (Cestari et al.,2008). Although metacyclic trypomastigotes and epimastigotes differ regarding complement resistance, MBL, Ficolin-2 and Ficolin-3 are able to bind to glycosylated proteins on the surface of both parasites forms. However, only metacyclic trypomastigotes were shown to resist complement killing due to high expression levels of TcCRIT. TcCRIT circumvent LP activation through binding to C2, inhibiting its cleavage by MASP-2 and C3 convertase formation (Cestari et al.,2009). In summary, TcCRIT interferes in the activation of the LP and CP by binding to C2 and preventing its cleavage by the serine proteases C1s and MASP2, thereby evading both initial branches of complement activation. This leads to resistance against complement-mediated cell lysis, allowing *T. cruzi* survival and cell invasion.

T. cruzi Complement Regulatory gp58/68

The *T. cruzi* complement regulatory gp58/68 is a glycoprotein of an apparent molecular weight of 58 kDa (non-reduced) and 68 kDa (reduced) (Fischer et al.,1988) that is expressed on the parasite surface or can be released by trypomastigotes in culture (Ouaissi et al.,1988;Velge et al.,1988). It is part of the *T. cruzi* fibronectin/collagen receptor which consists of two molecules of 80–85 kDa and 58–68 kDa with an important role in the attachment of trypomastigote forms to mammalian cells (Ouaissi et al.,1984,1986;Velge et al.,1988). Gp58/68 acts as a *T. cruzi* complement regulatory protein shown to inhibit the formation of cell-bound and fluid-phase AP C3 convertases (Fischer et al., 1988).

Gp58/68 was first identified in studies on the biological function of *T. cruzi* fibronectin receptors (TcFnR) by Ouaissi et al. (1984). Human fibronectin purified from blood were

shown to bind specifically to *T. cruzi* trypomastigotes and to be involved in cell-parasite interaction. Anti-fibronectin antibodies were able to eradicate *in vitro* fibroblast infection by

T. cruzi trypomastigotes (Ouaissi et al.,1984). The isolation and functional characterization of TcFnR were later achieved using immunoprecipitation assays, which identified the 85 kDa protein. Both affinity-purified TcFnR and anti-TcFnR antibodies exerted an inhibitory effect in the infection of fibroblasts by *T. cruzi* trypomastigotes in culture (Ouaissi et al.,1986). Subsequent studies characterized the other part of the fibronectin/collagen receptor, the collagen receptor, and showed that the same *T. cruzi* receptor binds to the host fibronectin and/or collagen, and that both the 80–85 kDa and 58/68 kDa glycoproteins are part of the same receptor (Velge et al.,1988). In the same year, the gp58/68 was purified by affinity chromatography from lysate of both culture and peripheral blood *T. cruzi* trypomastigotes and named according to its molecular weight (Fischer et al.,1988). This *T. cruzi* glycoprotein was able to inhibit the formation of cell-bound AP C3 convertase by preventing the initial association of FB with surface fixed C3b in a dose dependent manner. Moreover, gp58/68 was also shown to restrict the formation of fluid-phase AP C3 convertase by the consumption of fluid-phase FB (Fischer et al.,1988). In summary, gp58/68 is part of a fibronectin/collagen receptor of *T. cruzi* that has an important role in the interaction of *T. cruzi* with mammalian cells and confers the parasite's ability to evade AP complement activation by inhibiting FB/C3b interaction.

Host and *T. cruzi* Microvesicles

Microvesicles (MVs) are 100–1000 nm vesicles originating from the plasma membrane and are released by a large number of cells from the blood, immune system, epithelial and endothelial tissues, among others (Evans-Osses et al.,2013). MVs are involved in intercellular communication owing to their capacity to transfer proteins, lipids, and nucleic acids, thereby influencing various physiological and pathological functions of both the recipient and parent cell (Yáñez-Mó et al.,2015). MVs are known to be released by different pathogens such as bacteria, fungus, and parasites, including *T. cruzi* (Silveira et al.,1979; Gonçalves et al.,1991;Geiger et al.,2010), which may carry virulence factors to host cells promoting the dissemination of the pathogen (Deatherage and Cookson,2012;Barteneva et al., 2013). Host mammalian cells infected with *T. cruzi* release MVs that interfere in CP and LP C3 convertases assembly on the parasite's surface, leading to the inhibition of its catalytic activity (Cestari et al.,2012) and consequently eliminating complement activation. Recent findings have demonstrated that interaction between *T. cruzi* trypomastigote and epimastigote forms with host cells also can induce MVs formation (Ramirez et al.,2016).

New insight into the mechanisms of complement immune evasion by *T. cruzi* were gain when Cestari et al.(2012) reported secretion of host MVs induced by parasitic infection. At the beginning of infection, metacyclic trypomastigotes induced the release of MVs from immune cells, such as lymphocytes, monocytes, and macrophages in a calcium-dependent process (Cestari et al.,2012). Under experimental conditions MVs were shown to strongly inhibit C3b deposition. However, C4b

deposition was not significantly inhibited. These findings suggest that MVs interfered on complement at C3 level. In addition, MVs were shown to bind LP and CP C3 convertase complexes on the surface of *T. cruzi* inhibiting complement-mediated lysis and favoring the invasion of host cells. Moreover, C1q, Ficolin-2, and Ficolin-3 were also found to bind to MVs but did not impair parasite recognition by these PRMs. It has also been shown that MVs derived from lymphocytes and monocytes carry TGF- β , an important cytokine that enhances *T. cruzi* cell invasion and protects the parasite against complement-mediated lysis (Cestari et al.,2012). Recently, the release of MVs derived from infective (metacyclic trypomastigote and tissue-culture-derived trypomastigote) and non-infective (epimastigote) parasites, and their interaction with host cells was demonstrated. In addition, infective and non-infective *T. cruzi* forms were shown to induce different levels of MV release from host cells. Moreover, the fusion of MVs derived from both host cell and parasite was demonstrated, and this phenomenon appears to facilitate contact between *T. cruzi* and host cell plasma membranes, and probably membrane fusion. Thus, MVs released during interaction of the parasite with host cells were able to increase host cell invasion by metacyclic trypomastigotes (Ramirez et al.,2016). In summary, interaction between *T. cruzi* and host cells prompt the release of MVs from both parasite and host cells and this phenomenon may contribute to evasion of CP and LP complement activation and to increase host cell infection. Thus, both host and parasite MVs probably have a potential immunomodulatory effect in the pathogenesis of *T. cruzi* infection.

IMMUNOMODULATORY PERSPECTIVES

Although it has been suggested that the effectiveness of the etiological treatment for CD is inversely proportional to the duration of *T. cruzi* infection, the success of trypanosomatid drugs in preventing clinical progression to symptomatic forms is still controversial. Considering that *T. cruzi* makes use of several strategies to evade the host immune system in order to establish the infection, these molecules involved in evasion mechanisms could be interesting therapeutic targets to be explored in the context of prevention and treatment of CD. Immunomodulatory therapies could be based on the use of antibodies against overexpressed *T. cruzi* molecules, such as TcCRT, T-DAF, TcCRP, TcCRIT, and gp58/68. For instance, *T. cruzi* complement regulatory proteins, such as TcCRP, T-DAF, and gp58/68, may also be targets of anti-*T. cruzi* lytic antibodies (as reviewed byKrautz et al.,2000) and could be used as indicators of drug efficacy in *T. cruzi* infection and parasite clearance, as observed by anti-TcCRP and anti-T-DAF detected in sera of CD patients (Norris et al.,1994;Tambourgi et al.,1995). In addition, the association of MBL deficiency with protection against the development and progression of chronic CD cardiomyopathy (Luz et al.,2016) highlighted a potential marker for disease progression. Moreover, an interesting therapeutic approach to control the early stage of *T. cruzi* infection in patients with MBL deficiency and defects in LP activation may be the restitution of MBL or other PRMs involved in complement activation. Thus,

new investigations are needed to explore which *T. cruzi* evasion molecules could be potential immunotherapeutic targets that could contribute to change the pathophysiological progression of this neglected disease.

CONCLUSION

The current knowledge on complement evasion strategies used by *T. cruzi* highlights the importance of the LP, AP, and CP as crucial components in the first line of defense against this parasitic infection. However, *T. cruzi* infective forms are able to regulate and inhibit the complement activation early in the proteolytic cascade by expressed and/or released regulator molecules thereby circumventing complement's harmful effects. Thus, complement becomes prey of *T. cruzi* and has a bad day. Understanding these complement evasion strategies is crucial for the development of innovative strategies in the battle

REFERENCES

- Abrahamsohn, I. A., and Dias da Silva, W. (1977). Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 75, 317–323.
- Aguillón, J. C., Ferreira, L., Pérez, C., Colombo, A., Molina, M. C., Wallace, A., et al. (2000). Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 306–312.
- Aguillón, J. C., Harris, R., Molina, M. C., Colombo, A., Cortés, C., Hermosilla, T., et al. (1997). Recognition of an immunogenetically selected *Trypanosoma cruzi* antigen by seropositive chagasic human sera. *Acta Trop.* 63, 159–166.
- Alberti, S., Marques, G., Camprubi, S., Merino, S., Tomas, J. M., Vivanco, F., et al. (1993). Clq binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 61, 852–860.
- Barteneva, N. S., Maltsev, N., and Vorobjev, I. (2013). Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:49. doi: 10.3389/fcimb.2013.00049
- Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B. W., and Messias-Reason, J. (2015). The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front. Pediatr.* 2:148. doi: 10.3389/fped.2014.00148
- Bern, C., and Montgomery, S. P. (2009). An estimate of the burden of chagas disease in the united states. *Clin. Infect. Dis.* 49, e52–4. doi: 10.1086/605091
- Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Marin-neto, J. A., Maguire, J. H., Acquatella, H., et al. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the united states a systematic review. *JAMA* 298, 2171–2181. doi: 10.1001/jama.298. 18.2171
- Biolo, A., Ribeiro, A. L., and Clausell, N. (2010). Chagas cardiomyopathy-where do we stand after a hundred years? *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52, 300–316.
- Boldt, A. B. W., Luz, P. R., and Messias-Reason, I. J. T. (2011). MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic chagas disease. *Clin. Immunol.* 140, 63–70. doi: 10.1016/j.clim.2011.03.008
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21, 11. doi: 10.1051/parasite/2014012
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasc, A. C. C., and Di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 229–236. doi: 10.1038/nrmicro1351
- Carroll, M. V., and Sim, R. B. (2011). Complement in health and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 965–975. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.005
- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., and Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell- derived microvesicles. *J. Immunol.* 188, 1942–1952. doi: 10.4049/jimmunol. 1102053

against *T. cruzi* infection and may pave the way for novel immunotherapies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KL, LB, and AA participated in the design and writing of the manuscript. IdM-R: participated in the design, coordination, and manuscript writing. KL developed the graphic design of all figures.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES Edital Parasitologia Básica 32/2010) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to IM-R (CNPq).

- Cestari, I., Evans-Osses, I., Schlapbach, L. J., Messias-Reason, I., and Ramirez, M. I. (2013). Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Mol. Immunol.* 53, 328–334.
- Cestari, I., and Ramirez, M. I. (2010). Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS ONE* 5:e9721. doi: 10.1371/journal.pone.0009721
- Cestari, I. S., Evans-Osses, I., Freitas, J. C., Inal, J. M., and Ramirez, M. I. (2008). Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 198, 1276–1283. doi: 10.1086/592167
- Cestari, I. S., Krarup, A., Sim, R. B., Inal, J. M., and Ramirez, M. I. (2009). Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Immunol.* 47, 426–437.
- Cochrane, C. G., and Müller-Eberhard, H. J. (1968). The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J. Exp. Med.* 127, 371–386. doi: 10.1084/jem.127.2.371
- Deatherage, B. L., and Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* 80, 1948–1957. doi: 10.1128/IAI. 06014-11
- Dias da Silva, W., Eisele, J. W., and Lepow, I. H. (1967). Complement as a mediator of inflammation. III. Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C'3. *J. Exp. Med.* 126, 1027–1048. doi: 10.1084/jem.126.6.1027
- Dias da Silva, W., and Lepow, I. H. (1967). Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. *J. Exp. Med.* 125, 921–946.
- Dvorak, J. A., and Howe, C. L. (1976). The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells In Vitro. *J. Protozool.* 23, 534–537.
- Dvorak, J. A., and Hyde, T. P. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. *Exp. Parasitol.* 34, 268–283.
- European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] (2014). *Assessing the Burden of Key Infectious Diseases Affecting Migrant Populations in the EU/EEA*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.
- Evans-Osses, I., Messias-Reason, I., and Ramirez, M. I. (2013). The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. *Sci. World J.* 2013:675898. doi: 10.1155/2013/675898

- Ferreira, V., Molina, M. C., Valck, C., Rojas, A., Aguilar, L., Ramirez, G., et al. (2004a). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol. Immunol.* 40, 1279–1291. doi: 10.1016/j.molimm.2003.11.018
- Ferreira, V., Valck, C., Sánchez, G., Gingras, A., Tzima, S., Molina, M. C., et al. (2004b). The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 172, 3042–3050. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3042
- Fischer, E., Ouaiissi, M. A., Velget, P., Cornette, J., and Kazatchkine, M. D. (1988). Gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* 65, 299–303.
- Flierman, R., and Daha, M. R. (2007). The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* 212, 363–370. doi: 10.1016/j.imbio.2006.11.005
- Frederiksen, P. D., Thiel, S., Larsen, C. B., and Jensenius, J. C. (2005). M-Ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand. J. Immunol.* 62, 462–473. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01685.x
- Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., et al. (2010). Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol.* 10:20.
- Gonçalves, M. F., Umezawa, E. S., Katzin, A. M., Souza, W., Alves, M. J. M., Zingales, B., et al. (1991). *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72, 43–53. doi: 10.1016/0014-4894(91)90119-H
- González, A., Valck, C., Sánchez, G., Härtel, S., Mansilla, J., Ramirez, G., et al. (2015). *Trypanosoma cruzi* calreticulin topographical variations in parasites infecting murine macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 887–897. doi: 10.4269/ajtmh.14-0497
- Gout, E., Garlatti, V., Smith, D. F., Lacroix, M., Dumestre-Pérard, C., Lunardi, T., et al. (2010). Carbohydrate recognition properties of human ficolins: glycan array screening reveals the sialic acid binding specificity of M-Ficolin. *J. Biol. Chem.* 285, 6612–6622. doi: 10.1074/jbc.M109.065854
- Henrique, P. M., Marques, T., da Silva, M. V., Nascentes, G. A. N., de Oliveira, C. F., Rodrigues, V. I., et al. (2016). Correlation between the virulence of *T. cruzi* strains, complement regulatory protein expression levels, and the ability to elicit lytic antibody production. *Exp. Parasitol.* 170, 66–72. doi: 10.1016/j.exppara.2016.09.001
- Hidron, A., Vogenthaler, N., Santos-Preciado, J. I., Rodriguez-Morales, A. J., Franco-Paredes, C., and Rassi, A. (2010). Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 324–349. doi: 10.1128/CMR.00054-09
- Iida, K., Whitlow, M. B., and Nussenzweig, V. (1989). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal in the absence of antibody, the alternative pathway of the complement system can function as a first barrier in preventing infection. however, certain microorganisms have developed mec. *Trop. Med.* 169, 881–891.
- Inal, J. M. (1999). Schistosoma TOR (trispinning Orphan Receptor), a novel, antigenic surface receptor of the blood-dwelling, schistosoma parasite. *Biochim. Biophys. Acta* 1445, 283–298. doi: 10.1016/S0167-4781(99)00051-2
- Inal, J. M. (2005). Complement C2 receptor inhibitor trispinning: from man to schistosome. *Springer Semin. Immunopathol.* 27, 320–331.
- Inal, J. M., Hui, K. M., Miot, C., Lange, S., Ramirez, M. I., Schneider, B., et al. (2005). Complement C2 receptor inhibitor trispinning: a novel human complement inhibitory receptor. *J. Immunol.* 174, 356–366. doi: 10.4049/jimmunol.174.1.356
- Inal, J. M., and Schifferli, J. A. (2002). Complement C2 receptor inhibitor trispinning and the Beta-chain of C4 share a binding site for complement C2. *J. Immunol.* 168, 5213–5221. doi: 10.4049/jimmunol.168.10.5213
- Inal, J. M., Schneider, B., Armanini, M., and Schifferli, J. A. (2003). A peptide derived from the parasite receptor, complement C2 receptor inhibitor trispinning, suppresses immune complex-mediated inflammation in mice. *J. Immunol.* 170, 4310–4317.
- Inal, J. M., and Sim, R. B. (2000). A schistosoma protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Lett.* 470, 131–134.
- Joiner, K., Sher, A., Gaiter, T., and Hammer, C. (1986). Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6593–6597. doi: 10.1073/pnas.83.17.6593
- Joiner, K. A., DaSilva, W. D., Rimoldi, M. T., Hammer, C. H., Sher, A., and Kipnis, T. L. (1988). Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.* 263, 11327–11335.
- Keshi, H., Sakamoto, T., Kawai, T., Ohtani, K., Katoh, T., Jang, S., et al. (2006). Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol. Immunol.* 50, 1001–1013.
- Kipnis, T. L., Kretzli, A. U., and Da Silva, W. D. (1985). Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scand. J. Immunol.* 22, 217–226.
- Kipnis, T. L., Tambourgi, D. V., Sucupira, M., and da Silva, W. D. (1986). Effect of *Trypanosoma cruzi* membrane components on the formation of the classical pathway C3 convertase. *Braz. J. Med. Biol.* 19, 271–278.
- Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T. J., Shrive, A. K., Bonifati, D. M., Gadjeva, M. G., et al. (2004). Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol. Lett.* 95, 1–27. doi: 10.1038/jid.2014.371
- Kjaer, T. R., Thiel, S., and Andersen, G. R. (2013). Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol.* 56, 413–422.
- Kondos, S. C., Hatfaludi, T., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., Law, R. H. P., Whisstock, J. C., et al. (2010). The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens* 76, 341–351. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01566.x
- Krautz, G. M., Kissinger, J. C., and Kretzli, A. U. (2000). The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* 16, 31–34. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01581-1
- Lambris, J. D., Ricklin, D., and Geisbrecht, B. V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 132–142.
- Lederkremer, R., and Bertello, L. (2001). Glycoinositolphospholipids, free and as anchors of proteins, in *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1165–1179. doi: 10.2174/1381612013397519
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., and Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect. Dis.* 13, 342–348. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70002-1
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., et al. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27, 37–58.
- Lidani, K. C. F., Beltrame, M. H., Luz, P. R., Sandri, T. L., Nishihara, R. M., and Messias-Reason, I. J. (2015). Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic chagas disease? *Int. J. Cardiol.* 190, 233–235. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.04.106
- Lörincz, Z., Gál, P., Dobó, J., Cseh, S., Szilágyi, K., Ambrus, G., et al. (2000). The cleavage of two C1s subunits by a single active C1r reveals substantial flexibility of the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer in the C1 complex. *J. Immunol.* 165, 2048–2051.
- Lu, Y. C., Weng, W. C., and Lee, H. (2015). Functional roles of calreticulin in cancer biology. *BioMed Res. Int.* 2015, 9. doi: 10.1155/2015/526524
- Luz, P. R., Miyazaki, M. I., Neto, N. C., Padeski, M. C., Barros, A. C. M., Boldt, A. B. W., et al. (2016). Genetically determined MBL deficiency is associated with protection against chronic cardiomyopathy in chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004257.
- Luz, P. R., Velavan, T. P., Kremser, P. G., and Messias-Reason, I. J. T. (2013). Association of IP-10 and PDGF-BB levels with clinical forms of chronic chagas disease. *Int. J. Cardiol.* 169, e53–e55.
- Malik, L. H., Singh, G. D., and Amsterdam, E. A. (2015). The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. *Clin. Cardiol.* 38, 565–569. doi: 10.1002/clc.22421
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremieux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015). Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* 6:262.
- Miller, G. W., and Nussenzweig, V. (1974). Complement as a regulator of interactions between immune complexes and cell membranes. *J. Immunol.* 113, 464–469.
- Navarro, M., Navaza, B., Guionnet, A., and López-Vélez, R. (2012). Chagas disease in Spain: need for further public health measures. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1962. doi: 10.1371/journal.pntd.0001962
- Nogueira, N., Bianco, C., and Cohn, Z. (1975). Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 142, 224–229. doi: 10.1084/jem.142.1.224
- Nogueira, N. P., Saraiva, F. M., et al. (2015). Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS ONE* 10:e0116712.
- Noris, M., and Remuzzi, G. (2013). Overview of complement activation and regulation. *Semin. Nephrol.* 33, 479–492.
- Norris, K. A. (1996). Ligand-binding renders the 160 kDa *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein susceptible to proteolytic cleavage. *Microb. Pathog.* 21, 235–248. doi: 10.1006/mpat.1996.0058
- Norris, K. A. (1998). Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect. Immun.* 66, 2460–2465.
- Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R., and So, M. (1991). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147, 2240–2247.
- Norris, K. A., Galvao, L. M. C., Schrimpf, J. E., Cancado, J. R., and Kretzli, A. U. (1994). Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human chagas. *Dis. Infect. Immun.* 62, 4072–4074.

- Norris, K. A., Harth, G., and So, M. (1989). Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57, 2372–2377.
- Norris, K. A., and Schrimpf, J. E. (1994). Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 62, 236–243.
- Norris, K. A., Schrimpf, J. E., and Szabo, M. J. (1997). Identification of the gene family encoding the 160-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infect. Immun.* 65, 349–357.
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., and Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 767–776. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.046
- Ouaissi, M. A., Afchain, D., Capron, A., and Grimaud, J. A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308, 380–382. doi: 10.1038/308380a0
- Ouaissi, M. A., Cornette, J., and Capron, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 201–211. doi: 10.1016/0166-6851(86)90002-2
- Ouaissi, M. A., Cornette, J., Taibi, A., Velge, P., and Capron, A. (1988). Major surface immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 502. doi: 10.1590/S0074-02761988000500058
- Pereira, P. C. M., and Navarro, E. C. (2013). Challenges and perspectives of chagas disease: a review. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 19:34. doi: 10.1186/1678-9199-19-34
- Ramírez, G., Valck, C., Aguilar, L., Kemmerling, U., López-Muñoz, R., Cabrera, G., et al. (2012). Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. *Mol. Immunol.* 52, 133–140. doi: 10.1016/j.molimm.2012.05.006
- Ramírez, G., Valck, C., Molina, M. C., Ribeiro, C. H., López, N., Sánchez, G., et al. (2011). *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology* 216, 265–273. doi: 10.1016/j.imbio.2010.04.001
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., et al. (2016). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in Eukaryotic Cells. *Cell. Microbiol.* 19:e12672. doi: 10.1111/cmi.12672
- Ramos, R., Juri, M., Ramos, A., Hoecker, G., Lavandero, S., Pena, P., et al. (1991). An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* Antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 314–322.
- Rassi, A. Jr., Rassi, S. G., and Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 76, 86–96. doi: 10.1590/S0066-782X2001000100008
- Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas Disease. *Lancet* 375, 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797. doi: 10.1038/ni.1923
- Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2013). Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J. Immunol.* 190, 3831–3838. doi: 10.4049/jimmunol.1203487
- Ricklin, D., Reis, E. S., and Lambris, J. D. (2016). Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 383–401.
- Rimoldi, M. T., Sher, A., Heiny, S., Lituchy, A., Hammer, C. H., and Joiner, K. A. (1988). Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 193–197. doi: 10.1073/pnas.85.1.193
- Rimoldi, M. T., Tenner, A. J., Bobak, D. A., and Joiner, K. A. (1989). Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. *J. Clin. Invest.* 84, 1982–1989. Sacks, D., and Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3, 1041–1047. doi: 10.1038/ni1102-1041
- Salvatella, R., Irabedra, P., Sánchez, D., Castellanos, L. G., and Espinal, M. (2013). South-south cooperation for chagas disease. *Lancet* 382, 395–396.
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, L., Duffy, T., Jaramillo, A. M. M., et al. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e931. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931
- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102(Suppl. 1), 75–85.
- Silveira, J. F., da Abrahamsohn, P. A., and Colli, W. (1979). Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 550, 222–232. doi: 10.1016/0005-2736(79)90209-8
- Singh, G., and Sehgal, R. (2010). Transfusion-transmitted parasitic infections. *Asian J. Transfus. Sci.* 4, 73. doi: 10.4103/0973-6247.67018
- Sosoniuk, E., Vallejos, G., Kenawy, H., Gaboriaud, C., Thielens, N., Fujita, T., et al. (2014). *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-ficolin. *Mol. Immunol.* 60, 80–85. doi: 10.1016/j.molimm.2014.03.014
- Souza, W., Carvalho, T. M. U., and Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.* 2010:295394. doi: 10.1155/2010/295394
- Stanaway, J. D., and Roth, G. (2015). The burden of chagas disease estimates and challenges. *Global Heart* 10, 139–144. doi: 10.1016/j.ghcart.2015.06.001
- Stuart, G. R., Lynch, N. J., Day, A. J., Schwaebler, W. J., and Sim, R. B. (1997). The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface Calreticulin). *Immunopharmacology* 38, 73–80. doi: 10.1016/S0162-3109(97)00076-3
- Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., et al. (1998). Cloning and characterization of the hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J. Biol. Chem.* 273, 20721–20727. doi: 10.1074/jbc.273.33.20721
- Tambourgi, D. V., Cavinato, R. A., De Abreu, C. M., Peres, B. A., and Kipnis, T. L. (1995). Detection of *Trypanosoma*-decay accelerating factor antibodies in mice and humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 516–520.
- Tambourgi, D. V., Kipnis, T. L., Da Silva, W. D., Joiner, K. A., Sher, A., Heath, S., et al. (1993). 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.* 61, 3656–3663.
- Valck, C., Ramírez, G., López, N., Ribeiro, C. H., Maldonado, I., Sánchez, G., et al. (2010). Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *Mol. Immunol.* 47, 1516–1521. doi: 10.1016/j.molimm.2010.01.019
- van Lookeren, C. M., Wiesmann, C., and Brown, E. J. (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol.* 9, 2095–2102. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00981.x
- Velge, P., Ouaissi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., and Capron, A. (1988). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97(Pt 2), 255–268. doi: 10.1017/S0031182000058467
- Walport, M. J. (2001). Complement first of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066.
- Watanabe Costa, R., Silveira, J. F., and Bahia, D. (2016). Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Front. Microbiol.* 7:388. doi: 10.3389/fmicb.2016.00388
- Weis, W. I., Drickamer, K., and Hendrickson, W. (1992). Structure of a C-Type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360, 127–134. doi: 10.1038/360127a0
- Weitzel, T., Zulantay, I., Danquah, I., Hamann, L., Schumann, R. R., Apt, W., et al. (2012). Mannose-binding lectin and toll-like receptor polymorphisms and chagas disease in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 229–232. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0539
- World Health Organization [WHO] (2009). Control and Prevention of Chagas Disease in Europe. Geneva: World Health Organization, 69.
- World Health Organization [WHO] (2010). Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases First WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization [WHO] (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 6, 33–44. doi: 10.2147/IBPC.S70402
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066