

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDNÉIA OLIVEIRA CAVALCANTI

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1* E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE *MASP-3*  
EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

CURITIBA

2021

EDNÉIA OLIVEIRA CAVALCANTI

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP1* E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-3  
EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação  
em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Fabiana Antunes de Andrade

Coorientadora: Prof. Dra. Iara J Messias-Reason

CURITIBA

2021

C376 Cavalcanti, Ednéia Oliveira

Polimorfismos do gene MASP1 e concentrações sericas de MASP-3 em pacientes com doença de chagas crônica [recurso eletrônico] / Ednéia Oliveira Cavalcanti. – Curitiba, 2021.

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Antunes de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason

1. Doença de chagas. 2. Serina proteases associadas a proteína de ligação a manose. 3. Proteínas do sistema complemento. I. Andrade, Fabiana Antunes. II. Messias-Reason, Iara José de. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLM: WC 705

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EDNÉIA OLIVEIRA CAVALCANTI** intitulada: "**POLIMORFISMOS DO GENE MASP1 E CONCENTRAÇÕES SERICAS DE MASP-3 EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.**", sob orientação da Profa. Dra. FABIANA ANTUNES DE ANDRADE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 25 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

25/08/2021 16:55:41.0

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/08/2021 16:45:01.0

KARIN BRAUN PRADO

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica

25/08/2021 16:30:51.0

MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL

Avaliador Externo (FAC. HERRERO )

Dedico à toda minha família, com imensa gratidão ao meu filho Miguel,  
minha mãe Lúcia e minha irmã Edlainy. A vocês, todo o meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Iara J Messias-Reason, por todo apoio, receptividade e por me aceitar como mestranda no laboratório de Imunopatologia Molecular.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiana Andrade, por todo suporte, ensinamento e empenho fundamentais à realização deste trabalho.

À Dra. Kárita, quanto aprendizado em tão pouco tempo de convívio.

Às colegas do Laboratório de Imunopatologia Molecular pela parceria e companheirismo, em especial à Camila, sempre sanando minhas dúvidas.

Ao colega Bryan, secretário da PPGMI-CS, sempre ouvindo e ajudando com muito carinho e amizade.

Aos amigos do Lacen-PR, onde muito aprendi quando lá trabalhei, em especial a Maria do Carmo e Irina que tanto e tão generosamente me ensinaram no Setor da Biologia Molecular. Ali foi plantada a semente para o mestrado.

À Dra. Márcia e demais funcionários do Ambulatório de Chagas, sempre muito prestativos e colaborativos.

À UFPR onde me graduei, trabalho e tenho a oportunidade de realizar este mestrado. São muitos anos de dedicação e história com esta querida instituição.

Aos pacientes com Doença de Chagas, mesmo tão afetados pela doença, sempre gentis e dispostos a colaborar com os pesquisadores.

À Deus, por tantas bênçãos.

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Trypanosoma cruzi*, afetando de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo todo, a maioria na América Latina. Não existem medicamentos eficazes para o enfrentamento da infecção crônica, nem marcadores de prognóstico e evolução clínica da DC. O gene *MASP1* codifica as proteínas MASP-1, MASP-3 e MASP-4 do sistema complemento. MASP-3 ainda não tem seu papel completamente esclarecido, havendo até o momento alguns estudos que indicam um papel regulatório tanto na via das lectinas (VL) quanto na via alternativa (VA) do complemento. Outras proteínas da VL já foram associadas à DC e suas formas clínicas, contudo ainda não existem registros sobre os polimorfismos do gene *MASP1* e dos níveis séricos da proteína MASP-3 em relação à doença. O presente estudo visa avaliar uma possível associação entre polimorfismos do gene *MASP1* bem como a concentração sérica de MASP-3 em pacientes com DC crônica. Foram realizadas genotipagens de cinco polimorfismos da região regulatória do gene *MASP1* em 214 pacientes e 197 controles (*rs7609662 G>A*, *rs13064994 C>T*, *rs72549262 C>G*, *rs1109452 C>T* e *rs850314 G>A*). As determinações séricas de MASP-3 foram realizadas em 70 pacientes e 66 controles. Dados clínicos e concentrações séricas de proteínas do complemento realizadas previamente nesta mesma coorte também foram incluídas nesta análise (pentraxina-3, ficolina-2, ficolina-3, MBL, coletina-11 e MASP-2). O haplótipo *MASP1 GC\_CCA* foi significativamente prevalente entre pacientes com DC ( $p_{\text{adj}}=0.002$ ; OR 3.17 [1.19 - 8.39]) e naqueles com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) ( $p_{\text{adj}}=0.013$ ; OR 4.57 [1.37 - 15.16]) em relação aos controles. Os níveis séricos de MASP-3 correlacionaram-se positivamente com os de pentraxina-3 em pacientes ( $Rho=0.62$ ;  $p=0.0001$ ), não havendo, entretanto, diferença na concentração de MASP-3 entre pacientes com DC e controles ou entre suas formas clínicas. Os polimorfismos de *MASP1* não demonstraram relação com os níveis séricos de MASP-3. Os resultados sugerem um papel do haplótipo *GC\_CCA* do gene *MASP1* na DC e na CCC onde a alteração na expressão do gene poderia resultar na modulação da ativação do complemento pela VA ou VL. A correlação positiva entre MASP-3 e PTX3 reforça um possível papel imunomodulador na fisiopatologia da DC.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *MASP1*, MASP-3, Complemento.

## ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a chronic infectious disease caused by *Trypanosoma cruzi*, affecting 6 to 7 million people worldwide, the majority in Latin America. There are no effective drugs to fight chronic infection, as well as markers for the prognosis and evolution of CD. The *MASP1* gene encodes the complement system proteins MASP-1, MASP-3 and MAp44. MASP-3 has not yet fully understood its role, and so far, there are some studies that indicate a regulatory role both in the lectin pathway (LP) and in the alternative pathway (AP) of the complement. Other LP proteins have already been associated with CD and its clinical forms, however there are still no records on *MASP1* gene polymorphism and MASP-3 protein serum levels in relation to the disease. The present study aims to evaluate a possible association between the *MASP1* gene polymorphisms as well as the serum concentration of MASP-3 in patients with chronic CD. Five polymorphisms of the regulatory region of the *MASP1* gene were genotyped in 214 patients and 197 controls (*rs7609662 G>A*, *rs13064994 C>T*, *rs72549262 C>G*, *rs1109452 C>T* and *rs850314 G>A*). Serum measurements of MASP-3 were performed in 70 patients and 66 controls. Clinical data and serum complement protein concentrations performed previously in this same cohort were also included in this analysis (pentraxin-3, ficolin-2, ficolin-3, MBL, collectin-11 and MASP-2). The *MASP1* GC\_CCA haplotype was significantly prevalent among patients with CD ( $p_{\text{adj}}=0.002$ ; OR 3.17 [1.19 - 8.39]) and in those with chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) ( $p_{\text{adj}}=0.013$ ; OR 4.57 [1.37 - 15.16]) compared to controls. The serum levels of MASP-3 correlated positively with the serum levels of pentraxin-3 in patients ( $\text{Rho}= 0.62$ ;  $p=0.001$ ), however, there was no difference in the concentration of MASP-3 between patients with CD and controls or between their clinical forms. *MASP1* polymorphisms showed no relationship with serum MASP-3 levels. The results suggest a role for the GC\_CCA haplotype of the *MASP1* gene in DC and CCC where the alteration in gene expression could result in modulation of complement activation by VA or VL. The positive correlation between MASP-3 and PTX3 reinforces a possible immunomodulatory role in the pathophysiology of CD.

**Keywords:** Chagas disease, *MASP1*, MASP-3, Complement.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARLOS JUSTINIANO RIBEIRO CHAGAS (1879 - 1934), EM SEU LABORATÓRIO NO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	19
FIGURA 2 – INSETO DO GÊNERO TRIATOMA.....	20
FIGURA 3 – <i>T. CRUZI</i> NA FORMA SANGUÍNEA TRIPOMASTIGOTA.....	21
FIGURA 4 – CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMÉRICA LATINA...	24
FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS COM BASE EM ESTIMATIVAS OFICIAIS ENTRE 2006 E 2010.....	25
FIGURA 7 – CURSO NATURAL DE INFECÇÃO HUMANA PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	27
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DAS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO E A FORMAÇÃO DO MAC.....	31
FIGURA 9 – ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS.....	33
FIGURA 10 – LOCALIZAÇÃO GENE <i>MASP1</i> NO CROMOSSOMO 3.....	34
FIGURA 11– ESQUEMA ILUSTRATIVO DO GENE <i>MASP1</i> E DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS.....	34
FIGURA 12 – PCR-SSP MULTIPLEX – PADRÃO ELETROFORÉTICO.....	44

## 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.....	26
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS CONTROLES E COMPARAÇÃO COM PACIENTES.....	41
TABELA 3 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS SNPs DO GENE <i>MASP1</i> SELECIONADOS.....	42
TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS.....	43
TABELA 5 – EXEMPLO DE INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO E ATRIBUIÇÃO DO GENÓTIPO.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA- *American Heart Association*

BENEFIT- *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*

C1-INH- Inibidor da C1 esterase

CCC- cardiomiopatia chagásica crônica

CCP – proteína de controle do complemento

CL-K1- colectina 11

CR1-receptor do complemento 1

CUB - proteína morfogenética óssea

DAF ou CD55- fator de aceleração do decaimento

DAMPs - padrões moleculares associados a danos

DC- Doença de Chagas

dNTP - desoxinucleotídeo trifosfatado

ECG- eletrocardiograma

ECO- ecocardiograma

EGF – fator de crescimento epidérmico

ELISA- ensaio de imunoadsorção ligado à enzima

FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo

FCN - ficolinas

FH- Fator H

GlcNAc- N-acetil-D-glucosamina

HE- hemaglutinação

IC- insuficiência cardíaca

IFI- Imunofluorescência Indireta

IMC- índice de massa corpórea

MAC- complexo de ataque de membrana

MAp - proteína associada a MBL

MASPs- serino-proteases associadas à MBL

MBL- lectina ligante de manose

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAHO – Organização Pan-Americana da Saúde

PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos

PCR- reação em cadeia da polimerase

PCR-SSP- reação em cadeia da polimerase sequência específica

PRMs- moléculas de reconhecimento padrões

PTX3- pentraxina 3

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

VA- Via alternativa

VC- Via clássica

VL- Via das lectinas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Agente Etiológico e Vetor	19
2.1.3 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	20
2.1.4 Transmissão	22
2.1.5 Epidemiologia	23
2.1.6 Sintomatologia e formas clínicas	26
2.1.7 Diagnóstico	28
2.1.8 Tratamento	28
2.2 RESPOSTA IMUNE E SISTEMA COMPLEMENTO	29
2.3 A VIA DAS LECTINAS	32
2.3.1 O gene <i>MASP1</i>	33
2.3.2 Polimorfismo do gene <i>MASP1</i>	35
2.3.3 A proteína MASP-3	36
2.4 O SISTEMA COMPLEMENTO NA DOENÇA DE CHAGAS	37
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	39
3.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA	39
3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA	39
3.3.1 Pacientes	39
3.3.2 Grupo Controle	40
3.4 MÉTODOS	41
3.4.1 Extração de DNA	41
3.4.2 Seleção de SNPs de interesse do gene <i>MASP1</i> e desenho de iniciadores.	41
3.4.3 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)	43
3.4.3.1 PCR-SSP Multiplex - Intron 1 e Exon 12 de <i>MASP1</i>	44

3.4.4 Ensaio de quantificação sorológica para MASP-3	45
3.4.5 Outros marcadores sorológicos	45
3.4.6 Análise Estatística	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
4.1 ARTIGO	48
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), uma antropozoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (DIAS et al., 2016), é um importante problema de saúde pública para a maioria dos países da América Latina, onde estão a maioria dos 6 a 7 milhões de infectados mundialmente. Entretanto, nas últimas décadas, devido a frequentes migrações, a doença tem trazido preocupação a outros locais como Europa, Canadá, Estados Unidos, Austrália e Japão, onde a transmissão ocorre principalmente por transplante de órgãos, transfusão sanguínea ou de forma congênita. Devido às elevadas áreas de transmissão ativa aliadas ao elevado número de pessoas não tratadas estima-se aproximadamente 75 milhões de pessoas em risco de infecção (WHO, 2021; PAHO, 2016).

Duas fases aguda e crônica, caracterizam a DC. A fase inicial aguda, que pode levar de 3 a 8 semanas, é normalmente assintomática, apresentando-se de forma mais grave em jovens ou pessoas com o sistema imune comprometido, onde 3 a 10% destes podem ser levados à morte por miocardite e meningoencefalite (DIAS et al., 2016; WHO, 2021). Após este período, inicia-se para a maior parte do infectados uma fase indeterminada, sem sintomas, que pode durar por toda a vida. Porém, cerca de 20 a 30%, destes indivíduos infectados desenvolverá comprometimento neurológico, cardíaco, digestivo (megacólon ou megaesôfago) ou cardiodigestivo (DIAS et al., 2016; WHO, 2021; PAHO, 2021). Destas formas clínicas, a cardiomiopatia chagásica ocorre com maior frequência, com alterações eletrocardiográficas, risco de desenvolvimento de arritmias, eventos tromboembólicos e insuficiência cardíaca congestiva (LIDANI et al., 2019).

O sistema complemento, componente chave da resposta inata do sistema imune, desempenha papel fundamental na primeira linha de defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi*. É composto por mais de 50 proteínas solúveis e de membrana sendo fundamental na fagocitose e opsonização de invasores, inflamação, lise celular, remoção de complexos imunes e células apoptóticas. Além disso, o complemento atua como uma importante conexão entre as respostas inata e adaptativa. Pode ser ativado por três diferentes vias, clássica (VC), alternativa (VA) e das lectinas (VL), desencadeando complexas cascatas proteolíticas que convergem para o complexo de ataque à membrana (MAC, C5-b9), que culminam na lise dos alvos (LAMBRIS et. al., 2008; LIDANI et. al., 2017; THIEL, 2007). A ativação do complemento pela VL se

dá através do reconhecimento de açúcares ou de resíduos acetilados que se encontram na superfície dos patógenos, células apoptóticas e necróticas, por moléculas de reconhecimento padrões (PRMs), tais como a lectina ligante de manose (MBL), colectina 11 (COLEC11) e ficolinas (1, 2 ou 3). As PRMs são encontradas em complexo com as serina proteases MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (*Mannan-binding lectin associated serine protease*). Durante a ligação do complexo MASP-1, -2/PRMs aos padrões de reconhecimento, ocorre a ativação das MASP-1 e -2, desencadeando a cascata de ativação da VL (LIDANI et al., 2017; KJAER; THIEL; ANDERSEN, 2013; DEGN et al., 2012). Já o papel da MASP-3 na VL seria de regular negativamente sua ativação, pela competição por sítios nas PRMs com MASP-1 e -2 (SKJOEDT et al., 2010; DAHL et al., 2001). Por outro lado, MASP-3 também está envolvida na ativação da VA devido a sua capacidade de ativar o pró-fator D em fator D, a enzima iniciadora desta via (HAYASHI et al., 2019; DOBÓ et al., 2016; OROSZLÁN et al., 2016; BANDA, et.al, 2016; IWAKI, et.al, 2011).

O *T. cruzi*, na superfície de sua forma epimastigota, apresenta glicoproteínas e carboidratos que são reconhecidos pela MBL e pelas ficolinas, ativando a via das lectinas (BELTRAME et al., 2015; GOUT et al., 2010; FREDERIKSEN et al., 2005; SUGIMOTO et al., 1998). O envolvimento da VL na DC crônica e na cardiopatia chagásica crônica (CCC) já foi reportado em diversos estudos, indicando associação entre níveis séricos alterados e/ou de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas collectina-11 (SANDRI et al., 2019), MASP-2 (BOLDT, et al., 2011), ficolina-2 (LUZ et al., 2013), MBL (LUZ et al., 2016) e ficolina-3 (LIDANI et al., 2021).

O gene *MASP1* é responsável por codificar as proteínas MASP-1, MASP-3 e a forma truncada MAp44, através da recomposição alternativa do seu pré-mRNA. Embora *MASP1* apresente polimorfismos com variantes frequentes, grande parte desses ainda não foi investigado com relação a modulação da resposta imune e seu impacto na susceptibilidade a doenças, incluindo a infecção pelo *T. cruzi*. Recentemente, Mendes et al. encontraram associação entre níveis séricos de MASP-1 e MASP-3, assim como polimorfismos de *MASP1*, com a Hanseníase e suas formas clínicas (MENDES et al., 2020).

O presente estudo tem como objetivo avaliar uma possível associação entre polimorfismos de regiões reguladoras do gene *MASP1*, bem como de níveis séricos de MASP-3 com a DC crônica e suas formas clínicas.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A DC é uma infecção parasitária com expressiva morbimortalidade que apresenta graves manifestações clínicas em sua fase crônica e, cuja patofisiologia ainda necessita de maiores esclarecimentos. Até o momento nenhum marcador laboratorial tem se mostrado capaz de indicar quais pacientes evoluirão da forma indeterminada para umas das formas sintomáticas da DC. Um marcador prognóstico seria importante para a definição de grupos de risco, que poderiam ser beneficiados precocemente por ações preventivas e terapêuticas. A gravidade das manifestações clínicas que ocorrem na DC, em especial a cardiopatia chagásica influenciam significativamente a qualidade de vida dos pacientes e geram alto custo para o sistema de saúde. Portanto, fazem-se necessários estudos que possam auxiliar na busca de novas ferramentas prognósticas que poderiam alterar o desfecho clínico da doença.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Investigar possível associação entre polimorfismos de regiões regulatórias do gene *MASP1* e de concentração sérica da proteína MASP-3 do complemento com a DC crônica e suas formas clínicas.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se há associação entre polimorfismos do gene *MASP1* e a DC, bem como, com suas formas clínicas;
- Avaliar se os genótipos/haplótipos de *MASP1* influenciam nas concentrações séricas de MASP-3 em pacientes e controles;
- Investigar possível associação entre concentrações séricas de MASP-3 e a DC e suas diferentes formas clínicas;
- Avaliar possível correlação entre níveis séricos de MASP-3 e outras proteínas da VL (ficolina-2 e -3, MBL, collectina-11 e MASP-2), bem como com marcadores inflamatórios (pentaxina-3 e proteína C-reativa) em pacientes e controles;

- Verificar se há associação entre o polimorfismo do gene *MASP1* e níveis séricos de MASP-3 com dados clínicos dos pacientes, incluindo: hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, obesidade e outros parâmetros cardiometabólicos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DOENÇA DE CHAGAS**

#### **2.1.1 Histórico**

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, uma antroponose prevalente na América Latina, foi descoberta pelo cientista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909 (FIGURA 1), sendo protagonista nas primeiras pesquisas sobre a doença e todo seu ciclo. O pesquisador mudou-se para Lassance, Minas Gerais, entre os anos de 1907 e 1909, com o objetivo de conduzir trabalhos no combate à malária. Durante suas pesquisas, ao analisar insetos comuns na região (“barbeiros”), Carlos Chagas encontrou um protozoário hemoflagelado que apresentava cinetoplasto grande e intensa movimentação, que identificou como um *Trypanosoma* (NEVES, 2003). Após identificar o parasita em uma menina de dois anos, que havia sido picada por barbeiros, Chagas estudou as características morfológicas e biológicas do parasita e nomeou-o *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz.

FIGURA 1 - CARLOS JUSTINIANO RIBEIRO CHAGAS (1879 - 1934), EM SEU LABORATÓRIO NO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.



FONTE: Wikipédia: a enciclopédia livre. [Acesso em 16maio2021]. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/carlos\\_chagas](http://pt.wikipedia.org/wiki/carlos_chagas).

### 2.1.2 Agente Etiológico e Vetor

O *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, é um parasita intracelular da Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (LEVINE et al., 1980; Neves, 2003). É o agente causador da Doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, infectando principalmente macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (LIEKE et al., 2006). A transmissão se dá, principalmente, por um inseto hematófago habitualmente conhecido por “barbeiro”, “chupão”, “fincão”, “chupanças”, “bicudos” ou “procotós”, muito conhecidos pela população das áreas rurais de diversas regiões do Brasil (RASSI et al., 2009). São hemípteros relativamente grandes, mais comumente pretos ou acinzentados, apresentando ao redor do seu abdome manchas vermelhas, amarelas ou alaranjadas (ZINGALES et al., 2012) (FIGURA 2).

FIGURA 2 - INSETO DO GÊNERO TRIATOMA (Classe: Insecta; Ordem: Hemiptera; Família: Reduviidae; Subfamília: Triatominae; Gênero: *Triatoma*).



FONTE: Coleção de Triatominae - FCFAR - UNESP Araraquara  
<https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/triatoma/triatoma-infestans/>

Estes insetos podem alimentar-se de diversos tipos de sangue, tanto de mamíferos, aves como de animais de sangue frio. Com a proximidade do homem ao seu ambiente natural, o barbeiro passou a fazer seus ninhos nas paredes das choupanas e se alimentar do sangue humano no período noturno, picando de forma preferencial a face e ao redor da boca e olhos. A este comportamento se devem os termos “barbeiro” ou “chupão”. Como o inseto possui na saliva uma substância que anestesia o local onde introduz sua probóscide, a pessoa não sente dor na picada, mas uma pequena coceira (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

Existem mais de 100 espécies de triatomíneos silvestres e domiciliares distribuídos por todo continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina. A prevalência de cada espécie depende da região. Na América do Sul, os de maior importância epidemiológica são os *Triatoma infestans*, o *Rhodnius prolixus* e o *Panstrongylus megistus*. Na América Central é o *Triatoma phyllosoma*, enquanto o *Triatoma rubrofasciata* é uma espécie cosmopolita (VERONESI-FOCACCIA, 2009).

### 2.1.3 Ciclo de vida do *T. cruzi*

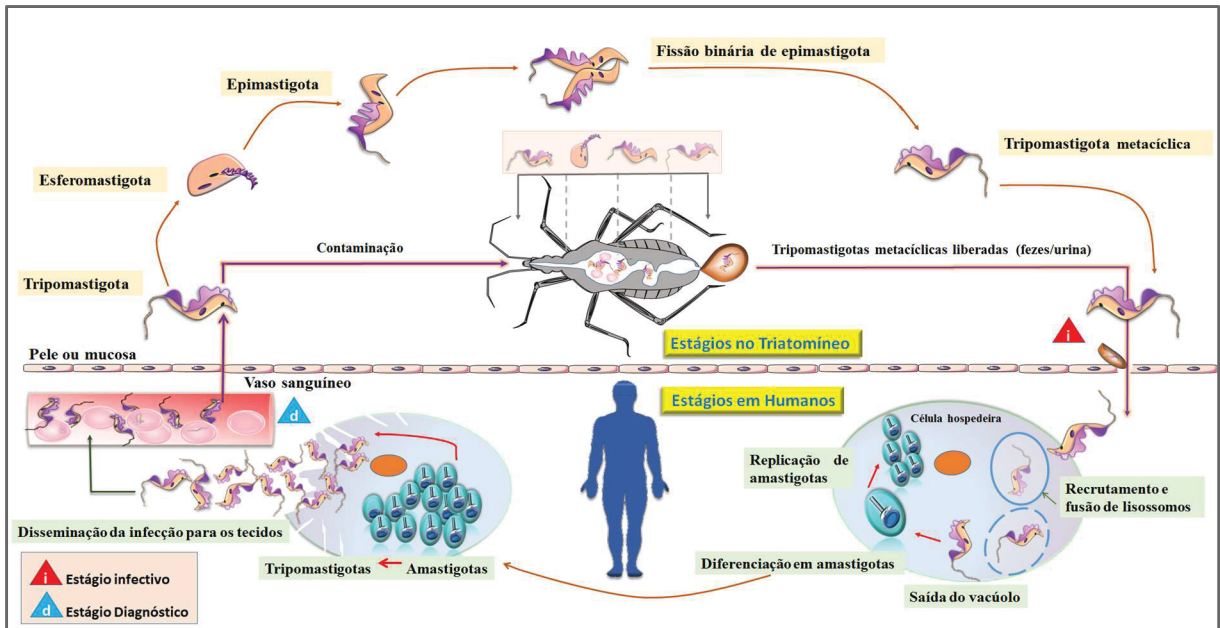
Os triatomíneos sugam o sangue de vertebrados infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (FIGURA 3) do homem ou de outro hospedeiro vertebrado infectado que incluem, gatos e cachorros domésticos, além de animais selvagens como tatu, guaxinim e rato. No intestino do triatomíneo, as tripomastigotas são

transformadas em esferomastigotas ou epimastigotas que se multiplicam no intestino médio e são transformadas em tripomastigotas metacíclicas infecciosas. Essas são liberadas junto às fezes e urina do barbeiro e infectam o hospedeiro por fricção da ferida, ou através da mucosa ou conjuntiva. Para escapar da ação do sistema imune, o *T. cruzi* funde-se com lisossomas da célula hospedeira, formando um vacúolo endocítico parasitário, do qual é liberado em seguida uma hemolisina, TC-tox (SACKS; SHER, 2002). Tal processo possibilita a diferenciação das formas tripomastigotas em amastigotas intracelulares, que após nove ciclos de divisão binária voltam a forma tripomastigota, que são liberadas para a circulação sanguínea (FIGURA 4). Estas formas podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo triatomíneo vetor durante o seu repasto sanguíneo.

FIGURA 3 - *T. CRUZI* NA FORMA SANGUÍNEA TRIPOMASTIGOTA.



FONTE: <http://bioneogenios.blogspot.com.br/2014/07/trypanosoma-cruzi-e-doenca-de-chagas.html> (Acesso: 16/05/2021)

FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO *TRYPANOSOMA CRUZI*.

FONTE: Lidani et al., 2017

A infecção crônica é estabelecida uma vez que o *T. cruzi* pode infectar uma variedade de células em diferentes tecidos, transformando-se em amastigotas intracelulares nestes locais de infecção.

Outras formas de infecção pelo *T. cruzi* ocorrem através de transplante de órgãos, transfusão sanguínea, transplacentária, exposição acidental ou ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas. (HONTEBEYRIE; BRENIÈRE; AZNAR, 2010).

#### 2.1.4 Transmissão

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial, que está associada à pobreza, condições insatisfatórias de salubridade e ausência de medidas de controle e vigilância entomológica, de grande interesse epidemiológico. Atualmente, esta forma de transmissão atinge cerca de 70% dos casos da doença em países onde não há sistemas de controle do vetor, como por exemplo, Equador ou Colômbia (COURA; DIAS, 2009; WHO, 2015).

A transmissão por transfusão sanguínea atinge até 20% dos casos onde não se faz controle nos bancos de sangue. Sabe-se que o parasita permanece viável por mais de duas semanas em bolsas de sangue armazenadas em geladeiras, como se observou na Bolívia, tornando obrigatória triagens sanguíneas antes de transfusões

(COURA; DIAS, 2009; WHO, 2015; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; COURA, 2015).

No caso da transmissão congênita, o risco global estimado é de 5% (HOWARD et al., 2014). No Brasil, o tratamento anti-*T. cruzi* em mulheres infectadas em idade fértil, antes da gestação, reduziu a transmissão vertical da DC. A OMS (Organização Mundial de Saúde) estima que 1.124.930 mulheres em idade fértil, entre 15 e 44 anos, estejam infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2015).

Já a transmissão por transplante de órgãos ocorre principalmente na América Latina, porém casos já foram relatados nos EUA, Canadá e países da Europa, relacionados a imigrantes provenientes de áreas endêmicas da América Central (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2015).

Finalmente, a transmissão por via oral tem trazido muita preocupação, uma vez que alguns casos foram detectados em locais com baixa circulação do parasita, inclusive em áreas não-endêmicas. Ganham destaque o surto por caldo de cana contaminado com *T. cruzi* em Santa Catarina em 2005, com 24 casos confirmados (STEINDEL et al., 2008), e o surto pela ingestão de açaí contaminado no Pará em 2006, com 178 casos da doença aguda (NÓBREGA et al., 2009).

#### 2.1.5 Epidemiologia

A Doença de Chagas é um grave problema de saúde pública com 6 a 7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, sendo a maioria na América Latina (FIGURA 5). As últimas estimativas baseadas em dados de 2010 indicavam 5.742.167 pessoas infectadas por *T. cruzi*, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes em nações da Iniciativa dos Países 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; DIAS, 2016).

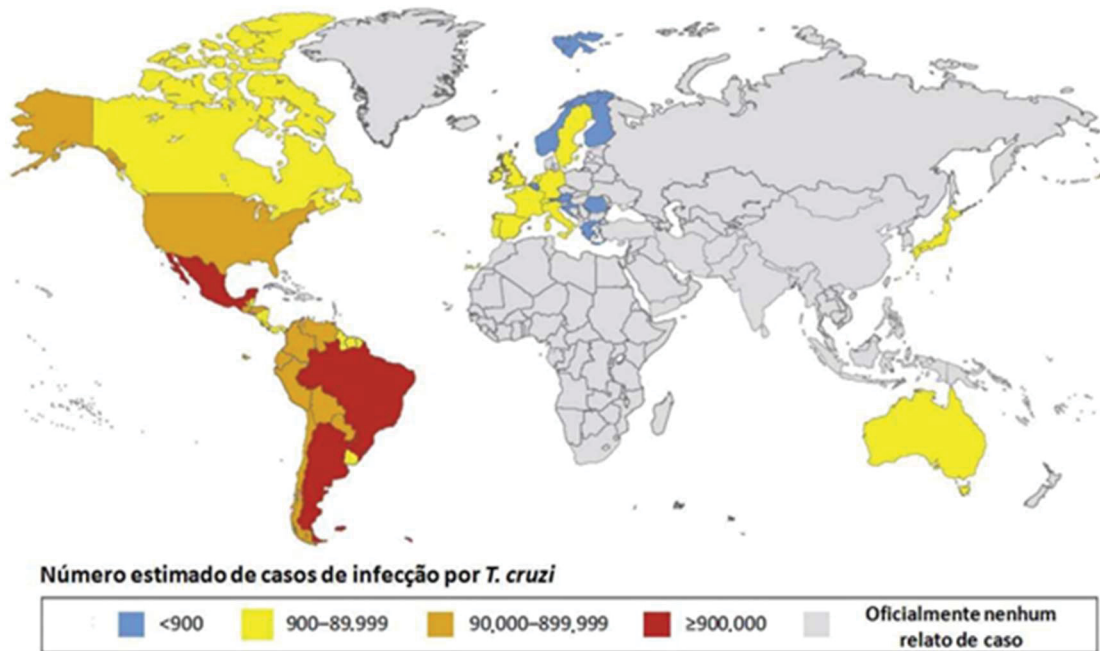
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMÉRICA LATINA. (Áreas enzoóticas representam o equivalente não humano de áreas endêmicas, sendo neste caso principalmente mamíferos como cães e porcos).



FONTE: Coura; Dias, 2009

Devido à migração de pessoas de países endêmicos, casos de DC tem sido relatados em países não endêmicos como os Estados Unidos e Canadá, além de países na Europa, incluindo Itália, Alemanha, França, Grécia e Espanha (FIGURA 6). Neste último país, mais de 47.000 imigrantes apresentaram a doença. Esse fenômeno tem indicado a necessidade de maior adequação dos sistemas de vigilância nesses países, aliada também a falta de conhecimento e consciência a respeito da doença bem como ocorrência de subnotificação (COURA; DIAS, 2009; ANIS; ANIS; MARINNETO, 2010; WHO, 2015; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; HOTEZ; GURWITH, 2011; REQUENA-MENDEZ et al., 2015; PEREZ; LIMBERY; THOMPSON, 2015).

FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS, COM BASE EM ESTIMATIVAS OFICIAIS ENTRE 2006 E 2010.



FONTE: Perez; Lymbery; Thompson, 2015.

O II Consenso em DC, realizado no Brasil em 2015, apresentou uma projeção relativa às estimativas do número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e de casos da forma crônica sintomática, de 2015 a 2055 (TABELA 1). Estima-se que a doença pode infectar de 1.298.812 a 3.056.027 pessoas até 2025, sendo que a cardiomiopatia chagásica poderá se manifestar em até 916.808 indivíduos e a forma digestiva em até 305.603 portadores da DC (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 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% <sup>a</sup>	Infecção 2,4% <sup>b</sup>	Infecção 1,02% <sup>a</sup>	Infecção 2,4% <sup>b</sup>	Infecção 1,02% <sup>a</sup>	Infecção 2,4% <sup>b</sup>
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%).

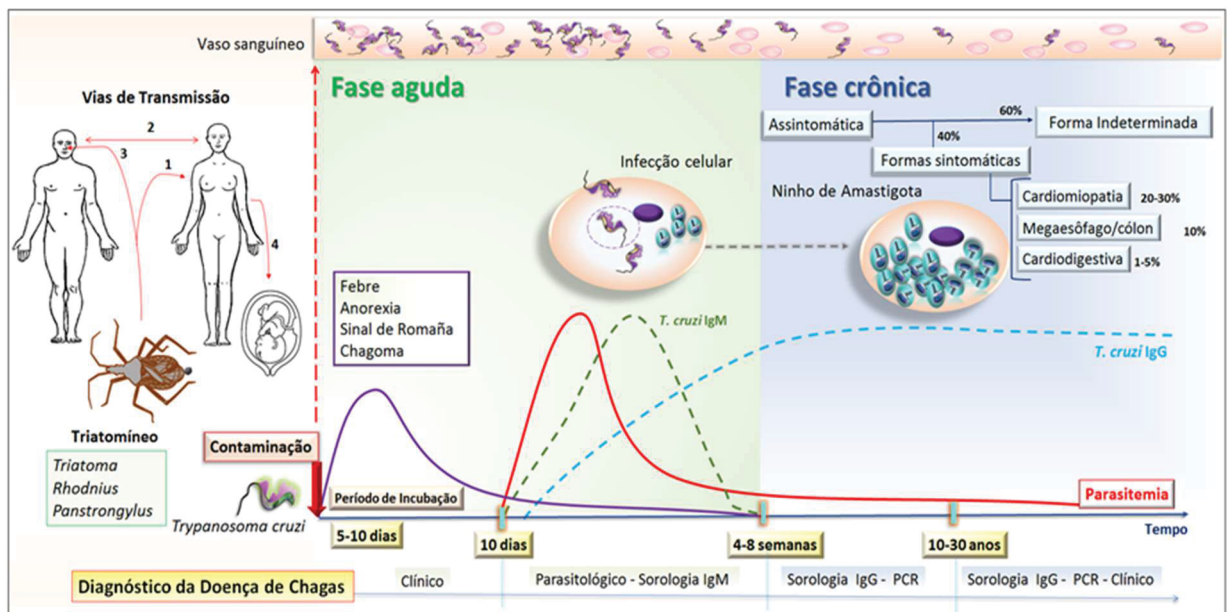
FONTE: II Consenso em Doença de Chagas (2015).

### 2.1.6 Sintomatologia e formas clínicas

A maioria dos infectados pelo *T. cruzi* não apresenta sintomas na fase aguda da doença. Quando esses aparecem costumam ser inespecíficos, tais como febre, mialgia, astenia, cefaleia, hepatomegalia e esplenomegalia (BARRET et al., 2003). Um processo inflamatório marca a entrada do *T. cruzi* na pele do hospedeiro, onde percebe-se edema e eritema no local da picada chamado de chagoma de inoculação. Quando a entrada se dá pela mucosa ocular pode ocorrer em 10 - 20% dos casos o sinal de Romaña, um edema palpebral e periauricular unilateral e indolor (PRATA, 2001). Estas manifestações clínicas tem acentuada redução após um período de 4 a 8 semanas, desaparecendo em 90% dos casos. Destes, 60 a 70% não desenvolvem sintomas clínicos, podendo permanecer assintomáticos por toda vida. Esses casos caracterizam a forma indeterminada da doença, que apresenta sorologia positiva para anticorpos contra *T. cruzi* e seguimentos normais no eletrocardiograma (ECG), exames de tórax, esôfago e cólon (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Entretanto, 30-40%

destes pacientes, após 20 a 30 anos, poderão evoluir para manifestações clínicas neuronais, digestivas (megacólon e megaesôfago), cardíacas ou cardiodigestivas (VAGO et al., 2000). O comprometimento visceral digestivo atinge em torno de 5-10% dos pacientes, enquanto os distúrbios neurológicos são raros, aparecendo em aproximadamente 3% da população chagásica. De todas as complicações a mais crítica é a cardiopatia que atinge, em algum momento, um terço dos indivíduos com sorologia positiva (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999) (FIGURA 7). Destes, a maioria apresenta cardiopatia leve, porém alguns pacientes irão desenvolver formas mais graves (RIBEIRO; ROCHA, 1998; ROSSI; MENGEL, 1992).

FIGURA 7 – CURSO NATURAL DE INFECÇÃO HUMANA PELO *Trypanosoma cruzi*. 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 parasita, 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 à 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.



FONTE: LIDANI et al., 2017

Os episódios de morte por DC ocorrem de forma mais frequente devido a arritmias e falhas cardíacas. A morte súbita constitui um risco constante independente

do estágio clínico da doença, podendo ocorrer em um a dois terços dos pacientes que vão a óbito pela doença. Ainda que a maior parte destes pacientes tenham apresentado manifestações clínicas de uma prévia insuficiência cardíaca, em torno de um terço a um quinto das mortes súbitas entre pacientes chagásicos, irão ocorrer em indivíduos assintomáticos. Deste modo, esta pode ser a primeira evidência clínica da doença, retirando a vida de pessoas mais jovens, produtivas e que apresentam condições aparentemente saudáveis (ROSSI; MENGEL, 1992; RIBEIRO; ROCHA, 1998).

### 2.1.7 Diagnóstico

Na fase aguda da DC é possível observar a presença de parasitas circulantes no sangue periférico em exame a fresco, esfregaço ou gota espessa. O teste sorológico de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* no sangue indica doença aguda quando associada a fatores clínicos e epidemiológicos compatíveis. De qualquer forma, o diagnóstico pode ser realizado em qualquer fase da doença. Na fase crônica, para o diagnóstico é necessário detectar-se 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 imunoabsorção 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 incluindo ECG, radiografia de tórax e hepatograma (BERN et al., 2007; LIDANI et al., 2017; SCHIJMAN et al., 2011).

### 2.1.8 Tratamento

Passados mais de cem anos da descoberta da DC, seu tratamento ainda é muito precário. Muitos medicamentos foram testados contra o *T. cruzi*, porém, sem sucesso (BRENER, 2000). As drogas utilizadas atualmente, benznidazol ou nifurtimox, podem curar a doença na fase aguda, contudo o tratamento é frequentemente interrompido devido aos efeitos colaterais que incluem anorexia, vômitos, e dermatite alérgica (PAHO, 2016). Mesmo não havendo consenso para o

tratamento na fase crônica, estudos demonstraram que a terapia antiparasitária 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). O estudo multicêntrico BENEFIT (sigla em inglês para Avaliação do Benznidazol para Interrupção da Tripanossomíase), avaliou 2.854 pacientes com a forma crônica cardíaca da DC, demonstrando que a administração de 300mg/dia de Benznidazol durante 40 a 80 dias na fase crônica não foi capaz de retardar a progressão clínica para formas mais graves da cardiomiopatia chagásica, contudo reduziu o número de intercorrências clínicas associadas (MORILLO et al., 2015). O percentual de cura e sua comprovação dependem de fatores como fase e tempo de duração da DC, idade do paciente, exames utilizados para a avaliação de eficácia terapêutica e tempo de seguimento pós-tratamento, comorbidades associadas e, até mesmo, a susceptibilidade da cepa de *T. cruzi* aos medicamentos antiparasitários. Efetivamente, a conduta inclui o tratamento sintomático de suporte conforme o tipo e gravidade dos sintomas. Recomendando-se para o envolvimento cardíaco, as mesmas drogas utilizadas para outras cardiopatias (cardiotônicos, diuréticos, antiarrítmicos, vasodilatadores, etc.), enquanto que, para o envolvimento digestivo, a depender do estágio da doença, pode ser indicado tratamento conservador (dietas, laxativos, lavagens) ou cirúrgico (hemi-colectomia) (DIAS et al., 2016).

## 2.2 RESPOSTA IMUNE E SISTEMA COMPLEMENTO

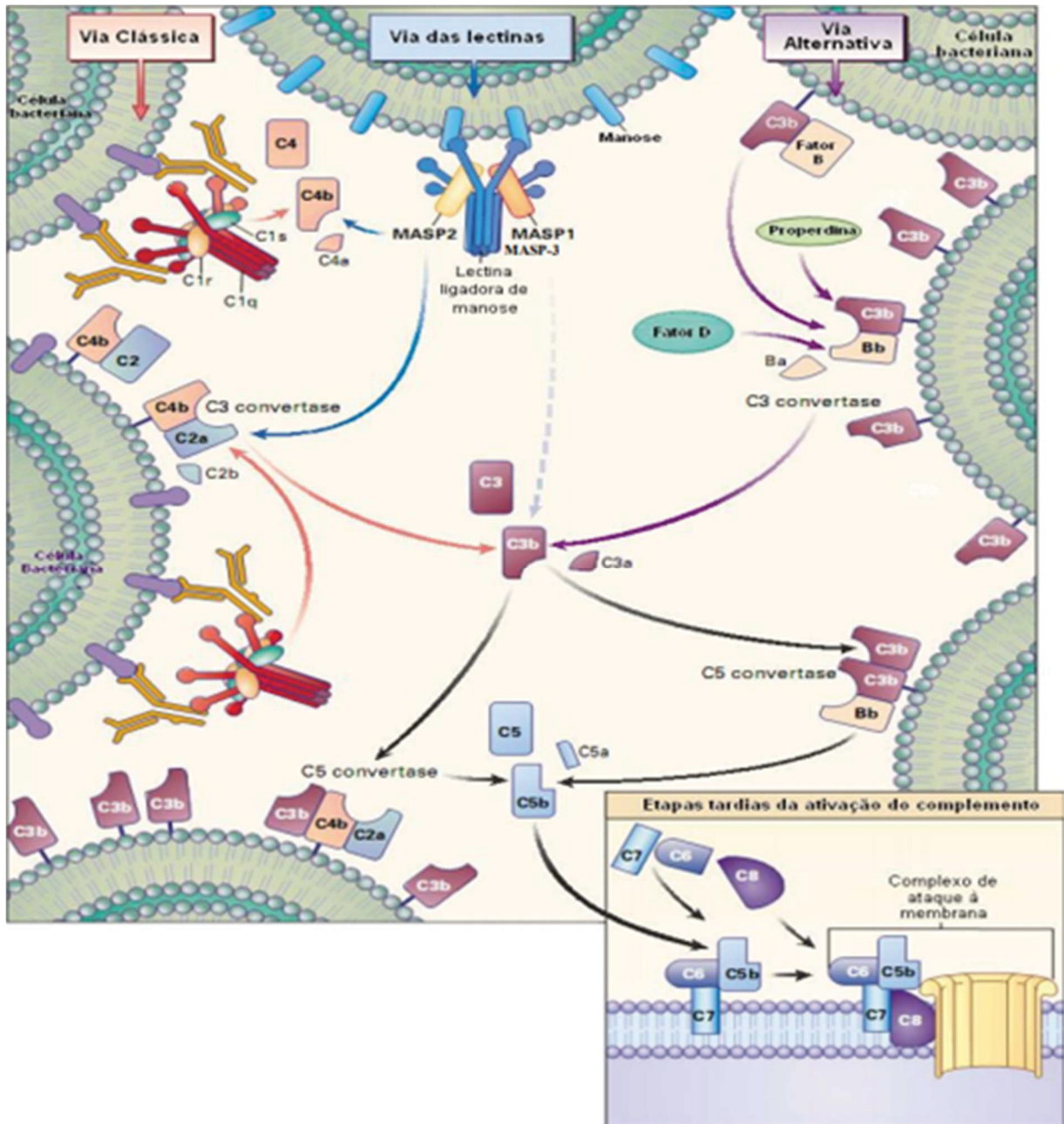
A primeira linha de defesa do hospedeiro é constituída pelo sistema imune inato que age contra patógenos ou produtos de lesão celular, numa interação mútua entre efeitos celulares e humorais. Entre esses, inclui-se o sistema complemento (SC), formado por cerca de 50 proteínas plasmáticas ou pré-enzimas (inativadas na circulação) e de superfície celular, que são produzidas principalmente pelos hepatócitos, macrófagos e fibroblastos. Ao serem ativadas essas proteínas interagem entre si e em cascata, formando complexos com propriedades proteolíticas levando a formação de fragmentos que induzem a resposta inflamatório (C5a, C3a), opsonização (C3b) e o complexo lítico de membrana C5b-9 (ABBAS et al, 2015; CRUVINEL et al., 2010; MERLE et al., 2015).

O sistema complemento pode ser ativado 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), conectando as respostas inata e adquirida através da ativação de linfócitos B e síntese de imunoglobulinas (RICKLIN; REIS; LAMBRIS, 2016; WALPORT, 2001). Outra importante função consiste na solubilização e remoção de complexos imunes circulantes evitando sua deposição, e conseqüentemente lesões teciduais (MILLER; NUSSENZWEIG, 1974). Além de atuar na opsonização de células apoptóticas, contribuindo para a sua fagocitose e remoção (FLIERMAN; DAHA, 2007). A VC é um componente da imunidade humoral adquirida, enquanto as vias alternativa e das lectinas são mecanismos efetores da resposta natural (ABBAS et al, 2015; KONDOS et al., 2010).

A via clássica inicia-se pela ligação do complexo C1 (formado por C1q, C1r e C1s), por intermédio da sua molécula de reconhecimento C1q que se liga à superfície do patógeno, à proteína C reativa ou a complexos antígeno-anticorpo. A via das lectinas, a última a ser descoberta, tem seu início pelo reconhecimento de padrões de açúcar ou resíduos acetilados pela MBL, colectina-11 ou ficolinas. Ambas vias levam a formação da C3 convertase C4b2a. A via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea e permanente de C3, que pode se ligar ao fator B (que é clivado pelo Fator D), formando a C3 convertase C3bBb. A VA também é ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pela properdina (ABBAS et al, 2015; IWAKI et al., 2011) (FIGURA 8).

Após a ativação das três vias, as C5 convertases que foram originadas pelas VC e VL (C4b2a3b) e pela VA (C3bBb3b) clivam a molécula C5 em C5a e C5b. O fragmento formado C5b se liga a C6, formando a molécula C5b6, que por sua vez se liga à C7, resultando no complexo (mC5b-7). Este se liga à C8, inserindo-se na membrana celular e com a adição de 12-18 moléculas de C9 formará uma estrutura anelar em forma de poros, o complexo de ataque à membrana (MAC) (C5b678(9)<sub>n</sub>). Este canal transmembrana, leva a um desequilíbrio iônico e conseqüente ruptura da membrana celular (ABBAS et al., 2015).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DAS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO E A FORMAÇÃO DO MAC. A via clássica pode ser ativada por IgM e IgG específicas ligadas a antígeno. A via das lectinas pode ser ativada pela ligação da MBL a resíduos de manose ou outros tipos de açúcares. MBL pode ser encontrada associada às serino proteases (MASP) 1, 2 e 3. A via alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tiol-éster encontrada na cadeia  $\alpha$  do C3 nativo com formação de C3 convertase e geração dos fragmentos C3b. As três vias culminam em uma via terminal comum que leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) a partir da associação de C5b às proteínas C6 e C7. Na sequência, C8 se liga a C7 e várias proteínas C9 se ligam a C8.



FONTE: Adaptado de Walport, 2001.

Para evitar uma ativação exacerbada do complemento, uma variedade de proteínas de membrana, tais como CR1 (receptor de complemento 1), CD46, CD59,

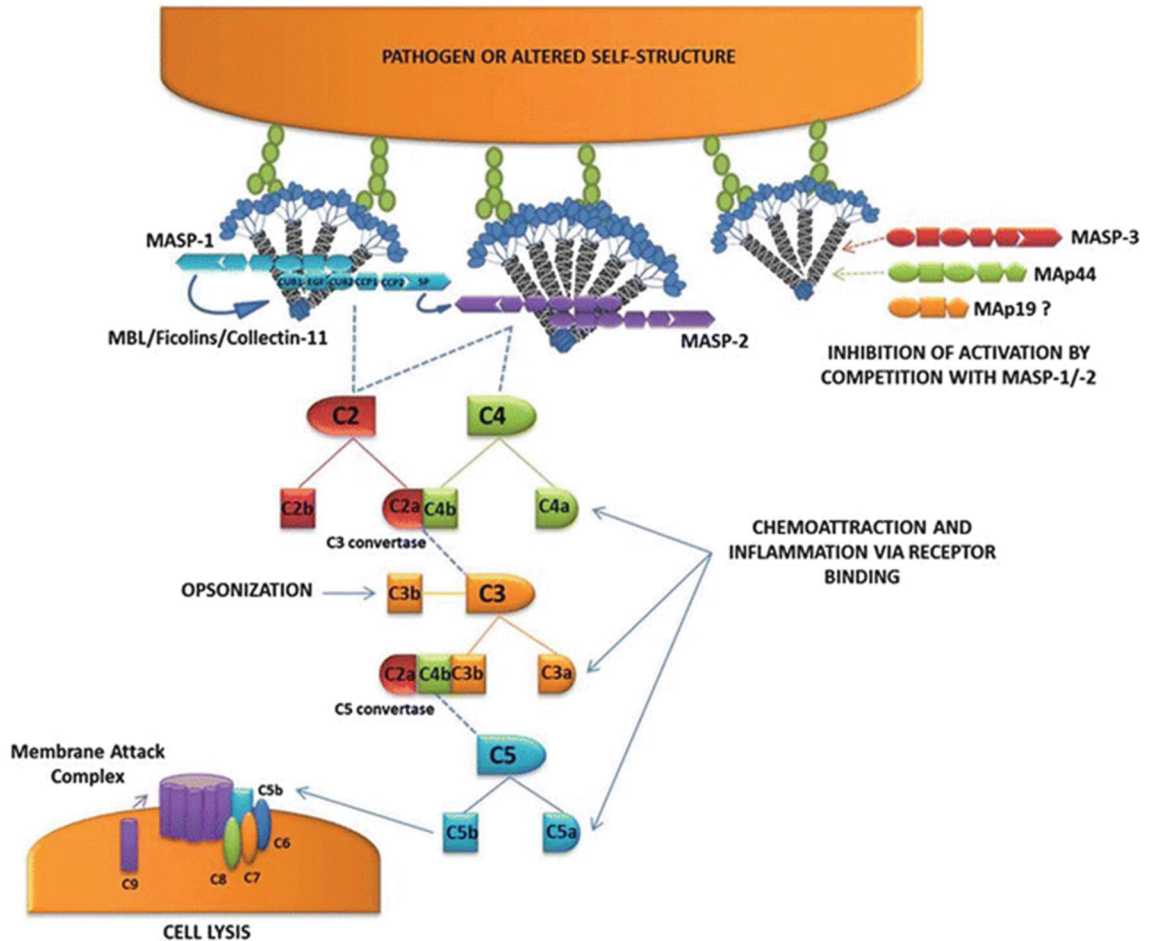
DAF (fator de aceleração do decaimento) ou CD55, regulam negativamente a ativação local do complemento, prevenindo inflamações e danos teciduais, para manutenção da homeostase. Proteínas plasmáticas como FH (Fator H), FI (Fator I) e C1-INH (Inibidor da C1 esterase) atuam no controle de complexos solúveis do complemento. Geralmente a ativação excessiva ou desregulada do complemento está relacionada a doenças autoimunes, inflamatórias crônicas e infecciosas (CARROL; SIM, 2011; NORIS; REMUZZI, 2013; RICKLIN; LAMBRIS, 2013).

### 2.3 A VIA DAS LECTINAS

A ativação da VL se dá através 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, à PAMPs que estão presentes na superfície do patógeno, ou a DAMPs (padrões moleculares associados a danos) (BELTRAME et al., 2015).

Enquanto 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 ficolinas ligam-se a PAMPs por domínios de reconhecimento do tipo fibrinogênio e apresentam diferenças nas suas especificidades de ligação (GOUT et al., 2010). Posteriormente a ligação de MBL, ficolinas ou CL-K1 (colectina 11) ao alvo, a VL é iniciada pela ativação de serino proteases associadas à MBL (MASP-1 e MASP-2 e MASP-3) o que resulta na clivagem de C2 em C2a e C2b pela MASP-1, MASP-2 além de clivar 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 MASP-3 compete com MASP-1 e MASP-2 pelos sítios de ligação em MBL e ficolinas, desta forma bloqueando a geração de C3 convertase e assim prevenindo a ativação excessiva do complemento, tendo, portanto, um papel regulador (SKJOEDT et al., 2010) (FIGURA 9). Além disso, MASP-3 é uma molécula chave na a conversão do pró-fator D em fator ativo D e, assim, liga as vias da lectina e alternativa (The Complement FactsBook, 2018).

FIGURA 9 – ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS. Os PRMs, MBL, ficolinas (-1, -2 ou -3), ou colectinas (-10, -11), complexadas com MASP-1 ou -2, ligadas a PAMPs ou DAMPs na superfície das células. Após a ligação, a pró-enzima MASP-1 autoativa e é convertida na sua forma ativa podendo ativar MASP-2 e clivar o fator do complemento C2. MASP-2 subsequentemente cliva C4. A ativação desta via resulta na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), opsonização e quimioatração de outras células do sistema imunológico e inflamação.



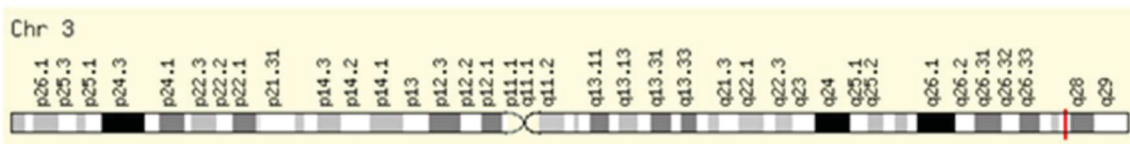
FONTE: BOLDT et al., 2016.

### 2.3.1 O gene *MASP1*

*MASP1* é um gene localizado no cromossomo 3, mais precisamente na região 3q27-3q28 (FIGURA 10), que codifica três diferentes proteínas através da recomposição alternativa do seu mRNA: MASP-1, MASP-3 e a forma truncada MAp44. O gene compreende 18 exons. O exon 1 abriga a sequência não traduzida (5'UTR), mas os últimos cinco nucleotídeos são traduzidos para todos os três produtos de *MASP1*. Os exons 2 a 11 codificam os domínios de regulação CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2, dos quais os primeiros oito juntamente aos exons 10 e 11 codificam os cinco domínios N-terminais compartilhados por MASP-1 e MASP-3: CUB-EGF-CUB-

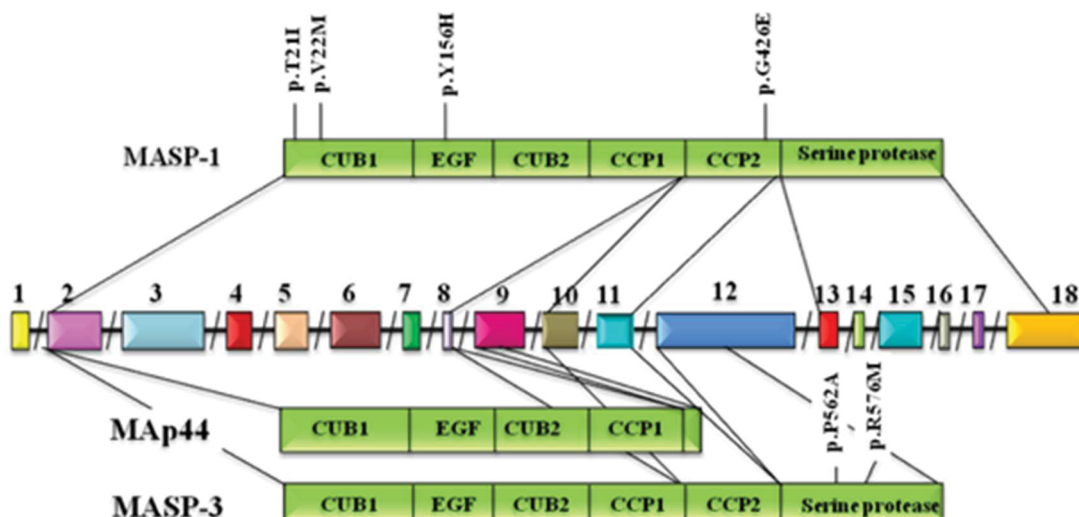
CCP-CCP (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011) (FIGURA 11). O domínio de serina protease de MASP-1 é codificado por seis exons separados (exons 13-18). Embora a MASP-3 possua os primeiros cinco domínios em comum com MASP-1, tem domínio distinto de serina protease, o qual é codificado pelo exon 12. O terceiro produto de processamento alternativo, MAp44 é composto por nove exons: os primeiros oito exons são compartilhados com MASP-1 e MASP-3, codificando os primeiros quatro domínios, CUB-EGF-CUB-CCP, enquanto o exon 9 é único para MAp44. O segundo domínio CCP bem como o domínio serina protease não estão presentes na MAp44 (DEGN et al., 2009).

FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *MASP1* NO CROMOSSOMO 3.



FONTE: Database of Gene, 2013  
 NOTA: o gene está indicado em vermelho

FIGURA 11: ESQUEMA ILUSTRATIVO DO GENE *MASP1* E DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS. Exons representados pelas caixas coloridas, e correspondente domínio proteico codificado. MASP: mannan-binding lectin associated serine protease; CUB: C1r/C1s, Uegf and bone morphogenetic protein; EGF: epidermal growth factor; CCP: complement control protein.



FONTE: BOLDT et al., 2011.

NOTA: Exons estão numerados (exon 12 é exclusivo de MASP-3 e o exon 9 codifica 17 aminoácidos exclusivos de MAp44). Os tamanhos dos introns não são proporcionais. Exon 1 codifica o peptídeo sinal (não representado).

### 2.3.2 Polimorfismo do gene *MASP1*

Nos seres humanos as sequências genômicas se assemelham 99,9% entre si, sendo que a quase totalidade dos 0,1% restantes, ocorrem em variações de somente um nucleotídeo, ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Ainda que existam no banco de dados *SNP Data Base*, 1869 SNPs listados para o gene *MASP1*, ainda há poucos estudos relacionados ao gene e suas proteínas MASP-1/MASP-3/MAP44. Um importante estudo correlacionando concentrações séricas e polimorfismos gênicos foi realizado por AMMITZBOOL et al. (2013), que demonstraram forte associação entre a concentração de uma ou mais das proteínas MASP-1/MASP-3/MAP44 e diferentes SNPs do gene *MASP1*. Dentre estes, quatro diferentes SNPs (rs3774275, rs698090, rs72549154 e rs67143992), todos localizados na região de recomposição alternativa do gene, estão associados ao aumento de MASP-1 e MAP44 e diminuição de MASP-3, ou vice-versa, em indivíduos saudáveis (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013). O efeito antagônico de aumento na concentração sérica da proteína MASP-1 e diminuição de MASP-3 e MAP44, é compreensível ao se ter em vista que MASP-1 tem uma função de ativação no sistema complemento à medida que MASP-3 e MAP44 atuam na regulação negativa. Também foi observado uma associação de polimorfismos de *MASP1* com fibrose cística, em pacientes portando o alelo menos comum do SNP rs850312 (p.L617=), com mediana de idade <15 anos e infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (HAERYNCK et al., 2012). Além disso, observou-se uma relação da atividade do complexo MBL/MASP-1 com a gravidade da fibrose em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C e com os depósitos glomerulares de fibrinogênio e hematúria prolongada na glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica (BROWN et al., 2007). MASP-1/3 cliva fator XIII e fibrinogênio (HAJELA et al., 2002) e atua na coagulação com atividade similar à trombina (TAKAHASHI et al., 2011).

Mutações raras no exon 12 do gene *MASP1*, que codifica exclusivamente para a proteína MASP-3, e do gene *COLEC11*, foram associadas com a Síndrome 3MC em 11 famílias afetadas. MASP-3, juntamente com *COLEC11*, intervém na migração celular durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados. A ausência dessas duas proteínas culmina no desenvolvimento de múltiplas anormalidades em seres humanos, incluindo defeitos craniofaciais, esqueléticos, renais e aberrações neuronais, que caracterizam a síndrome 3MC (ROORYCK et al, 2011; SIRMACI et al, 2010).

### 2.3.3 A proteína MASP-3

A concentração sérica da proteína MASP-3 é de aproximadamente 1.800 a 10.600 ng/ml (DEGN et al., 2010), e circula principalmente associada à ficolina-3 e em menor quantidade à ficolina-2 e MBL (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011). A mesma é um produto alternativo do gene *MASP1*, que contém uma cadeia A idêntica, mas uma cadeia B completamente diferente e é altamente conservada (STOVER et al., 2003). A MASP-3 é expressa principalmente no pâncreas, músculo esquelético, baço, timo, próstata e ovário. Estudos demonstraram que os níveis de MASP-3 foram associados a infecções em crianças admitidas em unidades de terapia intensiva. A baixa concentração de MASP-3 foi associada a um aumento do risco de novas infecções em crianças gravemente doentes (INGELS et al., 2014). Por outro lado, foi demonstrado (HERTLE et al., 2016) que MASP-3 parece ter um papel importante no desenvolvimento embrionário inicial, assim como ocorre com CL-K1, MASP-1 e MAp44. Foi demonstrado que algumas mutações raras em uma região altamente conservada do exon 12 do gene *MASP1*, que é exclusivo da MASP-3 causa a síndrome 3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale), caracterizada por vários distúrbios do desenvolvimento (ROORYCK et al. 2011).

Outra atividade de MASP-3 consiste na capacidade de clivar a proteína 5 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-5). A proteína IGFBP-5 possui papel crucial no controle de sobrevivência e diferenciação celular e apoptose (CORTESIO; JIANG, 2006). Ao contrário de MASP-1, atua inibindo a ativação da VL ao competir com MASP-1 e MASP-2 por sítios de ligação em MBL, colectinas e ficolinas, contudo, circula no soro principalmente associada à FCN-3 (SKJOEDT et al. 2010). Além disso, MASP-3 cliva exclusivamente o pró-fator D da via alternativa (VA), e o fator D cliva o fator B complexado com C3b, gerando a enzima C3 convertase da via alternativa (HAYASHI et al., 2019; DOBÓ et al., 2016; OROSZLÁN et al., 2016; BANDA et al., 2016; IWAKI et al., 2011). Dessa forma, MASP-3 atua também na ativação da VA.

Em outro estudo, Medjeral-Thomas et al. (2018), consideram que o mecanismo que provoca o aumento da inflamação glomerular no caso da glomerulonefrite por IgA, causada por depósitos de imunoglobulina A que provoca inflamação e lesão dos glomérulos de forma progressiva, seja o mesmo observado na nefrite lúpica, sugerindo maior ativação SC nos rins. A proteína MASP-3 tem a capacidade de

deslocar por competição MASP-1 e 2 e ligar-se aos seus sítios de ativação, inibindo a via das lectinas. Como baixas concentrações de MASP-3 foram associadas ao aumento da ativação do complemento, uma hipótese dos autores é que em baixas concentrações MASP-3 não se liga aos sítios de MASP-1 e 2 sendo sua função direcionada para ativar o fator D, o que desencadeia a via alternativa e intensifica o processo inflamatório na nefrite lúpica. Esse entendimento é de importância, pois demonstra relação da VL com a VA e a VC. Porém, ainda não há comprovação se a ativação glomerular pela via alternativa na nefrite lúpica ou na IgAN seja influenciada pelos níveis de MASP-3.

Mais recentemente, Mendes et al. 2020, publicaram um estudo onde demonstraram que polimorfismos do gene *MASP1* que regulam a expressão de MASP-1/MASP-3/MAp44 no soro modulam a susceptibilidade à hanseníase. Este trabalho aponta para a importância da regulação da via das lectinas contra patógenos que exploram a fagocitose para parasitar macrófagos de hospedeiros.

#### 2.4 O SISTEMA COMPLEMENTO NA DOENÇA DE CHAGAS

A interação parasita-hospedeiro apresenta-se como determinante para a evolução das formas clínicas da DC. Na primeira linha de defesa do sistema imunológico do hospedeiro, o sistema complemento é fundamental para o reconhecimento, opsonização e lise direta do patógeno invasor. Porém, no decorrer da infecção humana pelo *T. cruzi*, a ativação do complemento pode apresentar papel duplo nas fases aguda e crônica da DC. Na fase inicial atua de forma determinante no controle da parasitemia, contudo posteriormente na fase crônica há a possibilidade de favorecer o desenvolvimento ou gravidade das formas sintomáticas devido ao seu efeito pró-inflamatório (BOLDT; LUZ; MESSIAS-REASON, 2011; LUZ et al., 2013; LUZ et al., 2016; WEITZEL et al., 2012). Tendo em consideração a ativação do sistema complemento pelas três vias, que resulta em um poderoso efeito lítico, torna-se evidente que este sistema seja um foco importante a ser utilizado pelo patógeno para seus mecanismos de evasão e êxito no processo infeccioso (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008) e possivelmente na progressão da doença crônica. Efetivamente o *T. cruzi* possui diversas habilidades para evitar os efeitos lesivos do complemento, contribuindo para a sobrevivência do parasita e desenvolvimento da doença (LIDANI et al., 2017).

As três vias de ativação do complemento mostraram ser desencadeadas pela infecção por *T. cruzi* através de ensaios *in vitro* (CESTARI; RAMIREZ, 2010; ARROYO-OLARTE et al., 2018; NOGUEIRA; BIANCO; COHN, 1975). Além disso, componentes das três vias do complemento já foram associadas a DC e suas formas clínicas (LIDANI et al., 2017; BOLDT et al., 2011; WEITZEL et al., 2012; LUZ et al., 2016), reforçando seu papel na defesa do hospedeiro e na resposta inflamatória relacionada ao dano tecidual em pacientes com CCC (LIDANI et al., 2017; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; RASSI JR; MARIN NETO; RASSI, 2017; PROHÁSZKA et al., 2013). Depósitos de C3, molécula central da ativação das três vias do complemento, bem como do BF da VA, já foram observados na superfície do *T. cruzi* (KIPNIS, T. L. et al.). Além disso, os alótipos (forma variante da proteína) C3F e BF S já foram associados à progressão e proteção, respectivamente, para forma sintomática cardíaca da DC (MESSIAS-REASON; URBANETZ; PEREIRA DA CUNHA, 2003).

Estudos anteriores também já demonstraram diversos componentes da VL associados a doenças infecciosas, entre elas a DC e suas formas clínicas (EVANS-OSSES; MESSIAS-REASON; RAMIREZ, 2013). A deficiência de MBL foi associada com proteção ao desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia crônica na DC (LUZ et al., 2016). A collectina-11 foi associada à patofisiologia da DC (SANDRI et al., 2019), enquanto níveis séricos de FCN-2 e genótipos foram relacionados à DC e sua progressão (LUZ et al., 2013). Baixos níveis de FCN3 foram associados ao risco de insuficiência cardíaca em pacientes (LIDANI et al., 2021).

Ao se considerar a relevância do complemento na defesa do organismo contra a infecção pelo *T. cruzi*, sendo o mesmo alvo para a evasão do parasita, é de importância buscar melhor entendimento do papel destas moléculas durante a infecção chagásica crônica, e desta forma contribuir na busca de marcadores moleculares que possam identificar as formas clínicas sintomáticas da doença.

### 3 MATERIAIS 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 do tipo transversal.

#### 3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

##### 3.3.1 Pacientes

Fazem parte deste estudo materiais biológicos retrospectivos pertencentes ao banco de DNA e à soroteca do laboratório de Imunopatologia Molecular do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde - UFPR. Foram avaliados prontuários de 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, 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, onde foram obtidos os dados de idade, sexo, ancestralidade, parâmetros cardiometabólicos, índice de massa corpórea (IMC) ( $\text{peso [kg]}/\text{altura [m]}^2$ ) e comorbidades. As definições das formas clínicas da DC foram obtidas segundo os critérios do II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS et al., 2016). Pacientes com a forma indeterminada da doença (assintomática) apresentaram sorologia positiva para *T. cruzi*, mas sem sintomas clínicos para DC, com resultados normais para ECG, raio-x de tórax, exames

para esôfago e cólon. A forma digestiva foi caracterizada por alterações na esofagografia e exames radiológicos de enema de bário, utilizados para diagnóstico do megaesôfago ou megacólon. Pacientes com CCC apresentaram teste eletrocardiográfico sugestivo de comprometimento cardíaco, e a associação entre os acometimentos cardíacos e digestivos foram considerados como forma cardiodigestiva.

A classificação funcional da insuficiência cardíaca nos pacientes com DC foi estabelecida de acordo com as orientações do *American College of Cardiology and American Heart Association (ACC/AHA)*, adaptado para DC conforme orientação do Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, seguindo os seguintes critérios: A: ECG alterado e ecocardiograma (ECO) normal; B1: ECO alterado, fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE)  $\geq 45\%$  e ausência de insuficiência cardíaca (IC); B2: ECO alterado, FEVE  $< 45\%$  e IC ausente; C: ECG e ECO alterados e IC compensável; D: ECG e ECO alterados e IC refratária.

### 3.3.2 Grupo Controle

O grupo controle, para uso de amostras de DNA e soro, foi composto de adultos voluntários com sorologia negativa para Doença de Chagas, selecionados entre os doadores do Banco de Sangue do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR e o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), sendo os mesmos pareados em relação ao sexo e ancestralidade às amostras de pacientes. Os critérios de inclusão para os controles foram: homem ou mulher com 18 anos ou mais, autodeclarados não possuírem doença inflamatória crônica (TABELA 2).

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS CONTROLES E PACIENTES COM DC

<b>Parâmetros</b>	<b>Controles n = 197</b>	<b>Pacientes* n = 214</b>
Idade (anos) mediana [IIQ]	35,0 [27 - 44]	61,0 [54 - 67]
Mulheres (%)	57,4	60,3
Ancestralidade (%)		
Euro-Brasileiros	75,6	72,4
Afro-Brasileiros	15,7	23,8
Asiáticos	2,0	0,9
Ameríndio	6,6	2,8
Classificação funcional de insuficiência cardíaca (%)		
A	n.a.	32.1
B1	n.a.	33.9
B2	n.a.	3.8
C	n.a.	28.3
D	n.a.	1.9

\* 53 pacientes foram possuíam classificação funcional de insuficiência cardíaca; IIQR: intervalo interquartil; n.a.: não se aplica

### 3.4 MÉTODOS

#### 3.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído da camada leuco-plaquetária de sangue periférico, obtido de sangue total com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). A extração foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Molecular - HC/UFPR, com a utilização de kit comercial (Qiagen, Hilden, Alemanha). O procedimento seguiu as instruções do fabricante, compreendendo lise de células, precipitação de proteínas e precipitação e ressuspensão do DNA. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA), diluídas a 50 ng/μL e armazenadas a -20°C até uso.

#### 3.4.2 Seleção de SNPs de interesse do gene *MASP1* e desenho de iniciadores.

Foram selecionados cinco polimorfismos de interesse em regiões potenciais reguladoras do gene *MASP1*, compreendendo tanto intron 1 quanto exon 12, através do banco de dados de SNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Os SNPs escolhidos

apresentam frequência alélica mínima (Maf) igual ou superior a 10% da população europeia Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (Tabela 3).

TABELA 3 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS SNPs DO GENE *MASP1* SELECIONADOS

<b>Gene <i>MASP1</i> SNPs</b>	<b>Local</b>	<b>NG029440.1</b>	<b>População Europeia (%)</b>	<b>População Africana (%)</b>
rs7609662	Intron 1	g.8113G>A	G-172(87) A-26(13)	G-161(75) A-55(25)
rs13064994	Intron 1	g.8795C>T	C-142(72) T-56(28)	C-216(100)
rs72549262	3'UTR do Exon 12	g.61897C>G	C-179(90) G-19(10)	C-216(100)
rs1109452	3'UTR do Exon 12	g.62223C>T	C-139(70) T-59(30)	C-204(94) T-12(6)
rs850314	3'UTR do Exon 12	g.62224G>A	G-144(73) A-54(27)	G-214(99) A-2(1)

Legenda: N, número de cromossomos; entre parênteses, porcentagem. Em negrito, SNP marcador.  
Dados: *Ensembl*

Os polimorfismos rs7609662 G>A e rs13064994C>T do intron 1 foram relacionados à alteração na expressão do mRNA de *MASP1*, segundo a base de dados de expressão gênica GTEx (<https://gtexportal.org/>), com os genótipos rs7609662GG e rs13064994TT associados a maior expressão da proteína. Além disso, controles saudáveis que carregavam o alelo rs13064994T apresentaram maiores níveis séricos de MASP-3 que aqueles com genótipo rs1306499GG (MENDES et al., 2020). As variantes situadas no exon 12, o qual codifica para o domínio serina protease exclusivo de MASP-3, localizam-se na região não-traduzida (3'UTR) deste exon, e podem potencialmente impactar a expressão do gene. A região 3'UTR de transcritos pode ser alvo de miRNAs, cuja ligação pode conduzir à degradação do mRNA e repressão da tradução (VALINEZHAD ORANG; SAFARALIZADEH; KAZEMZADEH-BAVILI, 2014). Variantes presentes no exon 12 já foram associadas às diferenças nos níveis séricos de MASP1, -3 e Map44 (AMMITZBØLL; STEFFENSEN; NIELSEN, 2013) e à síndrome 3MC (ROORYCK et al., 2011). Além disso, o alelo rs1109452C foi associado a maiores concentrações séricas de MASP-3 e menores de MASP-1, enquanto o alelo rs850314A apresentou

relação com níveis elevados de MASP-3 em controles saudáveis (MENDES et al., 2020). Para os SNPs selecionados foram desenhados iniciadores sequência específicos com uma média de 18 a 23 nucleotídeos complementares a uma região específica do gene, com o último nucleotídeo do iniciador coincidindo com a variação a ser investigada. Utilizando a ferramenta NCBI/Primer-Blast, foram projetados os iniciadores diretos e reversos de acordo com a sequência NT-019501 do cromossomo 3 (TABELA 4).

TABELA 4 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS

Iniciador Direto	Iniciador Reverso	Fragmento
<b>Intron 01</b>		
<i>MA SP1</i> rs7609662_Af 5' ATATTGTTTCATATGTTTGAACCA 3'	<i>MA SP1</i> rs13064994_Cr 5' TTCTTAAACCAATCTGTGGAAG 3'	730 bp
<i>MA SP1</i> rs7609662_Gf 5' ATATTGTTTCATATGTTTGAACCG 3'	<i>MA SP1</i> rs13064994_Tr 5' TTCTTAAACCAATCTGTGAAA 3'	730 bp
<b>Exon 12</b>		
<i>MA SP1</i> rs72549262_Cf 5' CCCTCTCTTAGTGTGATC 3'	<i>MA SP1</i> rs1109452_Tr 5' CGACTAAGTCCCATATTCA 3'	365 bp
<i>MA SP1</i> rs72549262_Gf 5' CCCTCTCTTAGTGTGATG 3'	<i>MA SP1</i> rs1109452_Cr 5' CGACTAAGTCCCATATTG 3'	365 bp
	<i>MA SP1</i> rs850314_Ar 5' CGACTAAGTCCCATATT 3'	366 bp

Legenda: Em negrito, nucleotídeos variantes; pb: pares de base; f: *foward* (iniciador direto); r: *reverse* (iniciador reverso).

### 3.4.3 Reação em cadeia da polimerase com iniciadores de sequência específica (PCR-SSP)

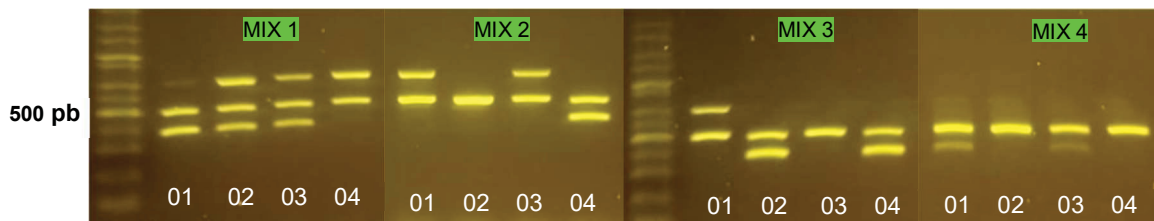
Na PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction/Sequence Specific Primers) são utilizados um iniciador SSP direto e outro reverso, onde pode se detectar SNPs espaçados em até 1200 pb (pares de base). Para a PCR-SSP multiplex, um grupo de alelos de SNPs diferentes foi identificado para cada indivíduo, sendo permitido a determinação dos haplótipos dos polimorfismos pelo uso conjugado dos iniciadores SSP (BOLDT et al., 2011). Os produtos resultantes das reações de amplificação são submetidos a corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,0% contendo 5 µl de corante fluorescente *Sybr Safe* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para cada 1,5g de agarose em 100 mL de solução tampão. Os dados resultantes das reações são obtidos com base nos padrões eletroforéticos dos fragmentos amplificados, observados em transiluminador sob luz ultravioleta.

### 3.4.3.1 PCR-SSP Multiplex - Intron 1 e Exon 12 de *MASP1*

A tipagem dos SNPs seguiu a metodologia desenvolvida por MENDES et al., em 2020, com algumas modificações. A reação de amplificação do tipo PCR-SSP multiplex realizada utilizou iniciadores sequência-específicos para as variantes g.61897C>G (rs72549262), g.62223C>T (rs1109452) e g.62224G>A (rs850314) do exon 12, o qual é exclusivo de MASP-3; e para as variantes g.8113G>A (rs7609662) e g.8795C>T (rs13064994) do intron 01 do gene *MASP1*.

Para cada reação de PCR utilizou-se de 20 a 50 ng de DNA genômico, 0,3  $\mu$ M dos iniciadores SSP do exon 12 e 1,0  $\mu$ M dos iniciadores do intron 01, na presença de 0,2 mM de desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 1x de Tampão Coral (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1,5% de Glicerol e 0,04 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). As amostras foram submetidas à reação de PCR em termociclador sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C (período de desnaturação) por 20 segundos e terminando com 72°C (período de extensão) por 1 minuto e 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi de 62°C nos 10 primeiros ciclos, 60°C 10 seguintes e 58°C nos 15 últimos ciclos (FIGURA 12) (TABELA 5). Cada reação foi acompanhada por controles negativos e positivos de amostras de DNA com genótipos conhecidos.

FIGURA 12 - PCR-SSP MULTIPLEX – Padrão eletroforético



Nota: Amplificação dos fragmentos esperados conforme combinações de SNPs. Fragmentos esperados: Intron 1 – 730 pb (pares de base) e Exon – 12 (365 pb). Como controle endógeno foram utilizados iniciadores para fragmento específico do Exon 08 da FCN-2 – 500 pb, amplificando em todos os indivíduos.

TABELA 5 - EXEMPLO DE INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO DE PCR-SSP E ATRIBUIÇÃO DE GENÓTIPO

AMOSTRA	Intron 01 (rs7609662 e rs13064994) 730 pb	Exon 12 (rs72549262, rs1109452 e rs850314) 365 pb
01	GT/AC	CCG/CCA
02	GC/GC	CCG/GTG
03	GC/GT	CCG/CCA
04	GC/GC	CTG/GTG

#### 3.4.4 Ensaio de quantificação sorológica para MASP-3

O método utilizado para quantificar os níveis séricos de MASP-3 foi o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com o kit HK339 (Hycult Biotechnology, Uden, Países Baixos) seguindo-se as instruções do fabricante. O ensaio apresenta o limite de detecção de 8 a 500 ng/mL de MASP-3. A concentração de MASP-3 foi avaliada em 70 pacientes com DC (mediana de idade: 56 anos, sendo 46% mulheres e 81,4% Euro-Brasileiros) e em 66 controles (mediana de idade: 46 anos, sendo 66% mulheres e 77,3% Euro-Brasileiros).

#### 3.4.5 Outros marcadores sorológicos

Foram incluídas nas avaliações outras proteínas da VL determinadas em estudos prévios usando a mesma coorte de pacientes com DC e controles do presente trabalho de correlação com os níveis de MASP-3. Essas incluíram: ficolin-2 (LUZ et al., 2013) (HK336, Hycult® Biotech, Uden, Netherlands), ficolin-3 (LIDANI et al., 2021) (HK 340 Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands), MBL (LUZ et al., 2010) (Antibody Shop, Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark), collectin-11 (SANDRI et al., 2019) (Human Collectin-11/ABX517452, Abbexa Ltd, Cambridge, UK) e MASP-2 (BOLDT et al., 2011) (HK326 Hycult® Biotechnology, Uden, Netherlands) através de teste ELISA. Os marcadores inflamatórios Pentraxina-3 (LIDANI et al., 2015) (Human Pentraxin 3 / TSG-14, R & D®System, Minneapolis, USA), e PCR também foram incluídos nas análises.

### 3.4.6 Análise Estatística

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas através de contagem direta. Os haplótipos foram inferidos através dos algoritmos EML e EBL utilizando o programa Arlequin (v.3.1). Distribuições genóticas em euro e afro-brasileiros nos grupos de controle e de pacientes foram comparadas usando o teste exato de diferenciação populacional (Raymond e Rousset 1995), e avaliadas para a hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Guo e Thompson 1992), usando o software Arlequin v.3.1. Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Quando apropriado, foi calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação às concentrações séricas de MASP-3 foi apresentada com mediana e intervalo interquartil. As comparações entre as médias foram realizadas por meio dos testes não paramétricos de Mann-Whitney. A correlação entre variáveis contínuas foi avaliada através do coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) com auxílio do software GraphPad Prism 3.0. Os dados também foram avaliados por análise de regressão logística através do programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). As covariáveis idade, sexo, ancestralidade e variáveis clínicas, foram incluídas no modelo de regressão logística quando a análise univariada apresentou  $p \leq 0,2$ . Os valores de Desequilíbrio de Ligação (DL) entre os SNPs investigados foram obtidos através do programa Haploview 4.2 (<http://broadinstitute.org/haploview/haploview>). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A correção para comparações múltiplas foi realizada de acordo com NYHOLT, 2004. Esta abordagem definiu 4 loci marcadores independentes, resultando em um alfa ajustado de 0,013 aplicando-se a correção de Bonferroni. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa “GraphPad Prism – versão 3.0” e Excel.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Esta dissertação foi escrita em modelo misto, sendo que os resultados e discussão serão apresentados na forma de artigo.

### **4.1 ARTIGO**

## **MASP1 GENE POLYMORPHISM AND MASP-3 CONCENTRATION IN PATIENTS WITH CHRONIC CHAGAS DISEASE**

### **ABSTRACT**

**Introduction:** The complement system acts in the host immune defense against *Trypanosoma cruzi* infection and in the chronic infection in Chagas disease (CD). *MASP1* gene encodes MASP-1, MASP-3 and MAp44 complement proteins. This study investigated possible association between *MASP1* gene polymorphism and MASP-3 protein serum levels with chronic CD and its clinical forms. **Methods:** Five polymorphisms of *MASP1* gene regulatory regions genotyped in 214 CD patients and 197 controls (*rs7609662 G>A*, *rs13064994 C>T*, *rs72549262 C>G*, *rs1109452 C>T* and *rs850314 G>A*). MASP-3 serum levels assessed in 70 patients and 66 healthy controls. Clinical data, serum levels of complement proteins (ficolin-2, ficolin-3 and MBL) and inflammatory markers (pentraxin-3 and hsCRP) included in the analyses. **Results:** A significant association of the *MASP1 GC\_CCA* haplotype with CD ( $p_{\text{adj}}=0.002$ ; OR 3.17 [1.19 - 8.39]) and chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) ( $p_{\text{adj}}=0.013$ ; OR 4.57 [1.37 - 15.16]) observed. MASP-3 and pentraxin-3 levels were positively correlated in patients ( $Rho=0.62$ ;  $p=0.0001$ ). No difference in MASP-3 levels observed in relation to *MASP-1* polymorphisms or to CD clinical forms. No correlation between MASP-3 levels and ficolin-2, ficolin-3, MBL and hsCRP. **Conclusion:** Our findings suggest a possible role for the *MASP1 GC\_CCA* haplotype in the susceptibility of chronic CD and CCC clinical form.

### **INTRODUCTION**

Chagas Disease (CD), also known as American Trypanosomiasis, is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (1) that affects 6 to 7 million people worldwide, mainly in endemic areas of Latin America. However, due to human migrations, an increase in the number of cases has also been observed in Canada, United States of America, European countries, Japan and Australia, where transmission occurs mainly through blood transfusion, organ transplantation or congenitally (2,3).

Most *T. cruzi* infected individuals remain asymptomatic for life, in the indeterminate

form of CD. However, after 10 - 30 years, around 30% to 40% of those will develop some clinical manifestations, including cardiac, digestive (megacolon or megaesophagus), cardiogastrointestinal, or less common, neurological involvement (2, 4, 5). Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) is the most frequent symptomatic form of CD, in which patients present electrocardiographic abnormalities in addition to the risk of developing congestive heart failure, arrhythmias, thromboembolic events, stroke and sudden death (6). However, there are no markers available that may indicate individuals with higher probability of clinical progression.

The complement system is one of the first innate mechanisms to be activated in response to *T. cruzi* infection and thereby may impact the establishment of host infection and development of CD clinical forms (7 - 9). The activation of complement can be initiated by three different pathways: classical pathway (CP), alternative pathway (AP) and lectin pathway (LP) (7, 10). LP is initiated by the recognition of conserved residues present on the surface of pathogens or altered host cells by the pattern recognition molecules (PRMs): mannose-binding lectin (MBL), collectins (10 and 11) and ficolins (ficolin-1, -2 and -3), resulting in opsonization and phagocytosis and/or lysis of the target cell. PRMs are found in complexes with MBL-associated serine proteases (MASP-1, MASP-2 and MASP-3). MASP-1 and MASP-2 trigger the activation of the LP, while MASP-3 may be involved in its regulation (11). In addition, PRMs form complex with pentraxins, such as pentraxin-3 (PTX3) and C-reactive protein (CRP) thereby acting in the modulation of the innate immune response (12).

Several components of LP have been associated with infectious diseases, including CD and its clinical forms (13), which may indicate a role for the LP in the host defense against CD and inflammatory response related to tissue damage in CCC patients (14). The impact of *MASP1* gene polymorphisms, encoding the MASP-1, MASP-3 and MASP-4 proteins, has not yet been reported in CD. The present study aimed to evaluate the influence of *MASP1* regulatory polymorphisms, as well as MASP-3 quantification in the susceptibility of chronic CD and its clinical forms.

## **METHODS**

## **Ethical statement**

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of Clinical Hospital at Federal University of Parana (HC/UFPR) (register number CEP-HC/UFPR n. 360.918/2013-08). All patients and control subjects provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

## **Study design and participants**

This cross-sectional study investigated 214 chronic CD patients attended at Chagas Disease Ambulatory of the Clinical Hospital, Federal University of Paraná (Southern Brazil), recruited in the period from 2007 - 2008 and 2016 - 2017 (Table 1). CD diagnosis was given by serological positivity for different *T. cruzi* antigens based on chemiluminescence microparticle (Architect Plus Chagas, Abbott, Illinois, USA) (15) and indirect immunofluorescence (IMUNO-Con Chagas, WAMA diagnóstica, São Paulo, Brazil) (1). Male and female CD patients with eighteen years of age or over were included in the study. Pregnant patients, those with evidence of non-Chagas heart disease, with other inflammatory diseases, neoplasias, infective endocarditis or other infections, at the time of recruitment, were excluded from the study. Clinical and demographic data such as age, sex, ancestry, cardiometabolic parameters and comorbidities were obtained from medical records and by interviews using a standard questionnaire.

The definitions of CD clinical forms followed the criteria of the 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease (1). Indeterminate form is characterized by reactive serology for *T. cruzi* in the absence of any clinical symptoms specific to CD, with normal electrocardiogram (ECG), echocardiogram (ECHO), radiological chest, esophagus and colon exams. Digestive forms of CD were identified by alterations in esophagography and barium enema radiological exams, performed to diagnose megaesophagus and/or megacolon. CCC patients were characterized by abnormalities in ECG and/or ECHO tests. Specific ECG findings included complete right bundle branch block (RBBB), left anterior fascicular block (LAFB), combination of complete RBBB/LAFB, first-degree atrioventricular block (A-V B), atrial fibrillation or flutter, and ventricular extrasystoles (VE) (16). The association between cardiac and digestive commitment was classified as cardiogestive form.

Functional classification of cardiac insufficiency in CD patients were determined according to the guidelines of the American College of Cardiology and American Heart Association (ACC/AHA) (17), adapted for CD as suggested by the Brazilian Consensus on Chagas disease, as follows: A: altered ECG and normal ECO; B1: altered ECO, left ventricular ejection fraction (LVEF)  $\geq 45\%$ , cardiac insufficiency (CI) absence; B2: altered ECO, LVEF  $< 45\%$ , CI absence; C: altered ECG and ECO, compensable CI; D: altered ECG and ECO, refractory CI (1).

Obesity was defined as BMI (body mass index: weight (kg)/ [height (m)<sup>2</sup>])  $\geq 30$ . Hypertension was designated as a systolic blood pressure  $\geq 140$  mm Hg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mm Hg (18) (19), while diabetes mellitus as a fasting plasma glucose  $\geq 126$  mg/dL or patients in treatment with an oral antidiabetic agent or insulin (20). The HDL fraction of cholesterol followed the V Brazilian Consensus on Dyslipidemia Guidelines that defines low HDL-c in men like  $< 40$  mg/dL and women like  $< 50$  mg/dL) (21).

Control group comprised healthy unrelated blood donors with negative serology for *T. cruzi* and in addition to being negatively tested for syphilis, hepatitis B, hepatitis C, AIDS and HTLV I/II, from the Blood Bank of HC/UFPR and the Center for Hematology and Hemotherapy of Paraná (Hemepar) (median age of 35 years; 57.4% female, 75.6% Euro-brazilians, 15.7% Afro-brazilians, 2.0% Asians and 6.6% Amerindians) (Table 1). Inclusion criteria for controls were: male and female with 18 years of age or over, with no clinical complains, self-declared without chronic inflammatory diseases.

### **MASP1 gene polymorphisms**

A total of five *MASP1* gene (3q27-q28) SNPs (single nucleotide polymorphisms) were assessed by sequence-specific amplification method (PCR-SSP), as reported by Mendes et al., 2020 (22). The analysis included the following SNPs: *rs7609662 G>A* and *rs13064994 C>T* in intron 1, *rs72549262 C>G*, *rs1109452 C>T* and *rs850314 G>A* in the 3'-untranslated region (3'UTR) of exon 12, which is exclusive of *MASP-3* transcript (23). Such variants occur in potentially regulatory regions of *MASP-1* and could possibly affect gene expression. Polymorphisms in intron 1 and 3'UTR of exon 12 have already been associated with differences in *MASP-3* and MAp44 serum levels in blood donors (24). In addition, the SNPs *rs13064994*, *rs1109452* and *rs850314* were

observed modulating MASP-3 concentration in healthy controls (22). DNA extraction was performed using the QIAamp DNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

### **Serum Markers**

MASP-3 serum levels were measured with commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) from Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands, ref:HK339), following the instructions of the manufacturer. A total of 70 patients (median age of 56 years, 46% female, 81.6% Euro-Brazilian) and 66 controls (median age of 46 years, 66% female, 77.3% Euro-Brazilian) were assessed. The correlation analyses included the levels of other complement proteins previously determined in the same cohort of patients: Pentraxin-3 (25) (Human Pentraxin 3 / TSG-14, R & D®System, Minneapolis, USA), ficolin-2 (26) (HK336, Hycult® Biotech, Uden, Netherlands), ficolin-3 (27) (HK 340 Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands), and MBL (28) (Antibody Shop, Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark), by ELISA tests.

### **Statistical analysis**

Allelic and genotypic frequencies were determined by direct counting. The haplotypes were inferred using the EML and EBL algorithms using the Arlequin program (v.3.1). Euro- and Afro-Brazilians genotypic distributions in control and patient groups were compared using the exact test of population differentiation (Raymond and Rousset 1995) in Arlequin software v.3.1. Hypothesis of Hardy–Weinberg equilibrium for *MASP-1* polymorphisms was evaluated using the Arlequin software package v.3.1. Genotype frequencies were analyzed by three inheritance patterns (dominant, recessive, and additive). For the association analyses, independence tests were performed between the variables using the chi-square test with Yates correction or two-tailed Fisher's test. When appropriate, the odds ratio (OR) was calculated, with a 95% confidence interval (CI). Descriptive statistics regarding serum MASP-3 concentrations were presented as median and interquartile range. Comparisons between means were performed using the non-parametric Mann-Whitney tests. Pairwise associations were done using Spearman's rank correlation test for nonparametric variables. Data were also evaluated by logistic regression analysis

using the STATA v.9.2 program (StataCorp, USA). The covariates age, sex, ancestry and clinical variables were included in the logistic regression model when the univariate analysis presented  $p \leq 0.2$ . Values of  $p < 0.05$  were considered significant. Correction for multiple comparisons was performed according to Nyholt et al., 2004 (29). This approach defined 4 independent marker loci, resulting in an adjusted alpha of 0.0125 applying Bonferroni correction. To aid the statistical analysis of this work, the software “GraphPad Prism – version 3.0” and SPSS 17.0 were used.

## RESULTS

### ***MASP1* polymorphisms and haplotypes**

There was no significant difference in the allelic and genotypic frequencies of *MASP1* gene between patients and controls nor between CD clinical forms or CCC stages (Table 2). Different combinations of investigated polymorphisms resulted in 12 observed haplotypes. The *MASP1* GC\_CCA haplotype was significantly increased in the patients ( $p_{\text{adj}}=0.002$ ; OR 3.17 [1.19 - 8.39]) and CCC ( $p_{\text{adj}}=0.013$ ; OR 4.57 [1.37 - 15.16]) when compared to controls. The other *MASP1* haplotypes were not associated with CD or its clinical forms, as shown in Table 2.

The genotypic distribution of *MASP1* SNPs was not different from that expected for the Hardy-Weinberg equilibrium in controls and patients ( $p > 0.05$ ). Furthermore, the frequency of genotypes/alleles of the evaluated SNPs was in accordance with that described in the Ensembl database for the CEU population (North-Americans of Northern and Western European ancestry from Utah) (<http://www.ensembl.org/>). Euro-Brazilians and Afro-Brazilians also had similar genotypic frequencies among patients and controls. Absolute linkage disequilibrium (LD) was observed between SNPs in intron 1 (rs7609662 and rs13064994;  $D'=1$ ) and in exon 12 (rs72549262 and rs1109452; rs72549262 and rs850314; rs1109452 and rs850314;  $D'=1$ ) in patients and controls (Supplementary material).

### **MASP-3 levels**

MASP-3 serum levels were higher in CD patients but not significantly different from the controls (4,692 ng/mL [3,314 - 6,864] vs 3,607 ng/mL [2,246 - 6,402]);  $p=0.094$ ). MASP-3 levels were also similar among CD clinical forms: indeterminate: 4,850 ng/mL (3,654 - 6,047); cardiac: 4,667 ng/mL (3,102 - 6,737); digestive: 4,252 ng/mL (1,491 - 9,028) and cardiogestive 7,887 ng/mL (5,771 - 10,004) (Figure 1a) and between functional classes of heart failure (Figure 1b).

A positive correlation between MASP-3 levels and pentraxin-3 concentration ( $Rho=0.62$ ;  $p=0.0001$ ) and with age ( $Rho=0.28$ ;  $p=0.016$ ) was observed in CD patients but not in controls ( $Rho=-0.06$ ,  $p=0.760$ ; and  $Rho=0.17$ ,  $p=0.166$ ; respectively) (Figure 1c-d). No correlation of MASP-3 levels was observed for ficolin-2 ( $Rho=-0.064$ ;  $p=0.860$ ), ficolin-3 ( $Rho=0.003$ ;  $p=0.978$ ) or MBL ( $Rho=-0.103$ ;  $p=0.399$ ) (Table 3). The levels of MASP-3 were neither correlated with clinical and laboratory markers, such as hsCRP ( $Rho=0.120$ ;  $p=0.351$ ), total cholesterol ( $Rho=0.035$ ;  $p=0.795$ ), HDL-cholesterol ( $Rho=-0.136$ ;  $p=0.322$ ), LDL-cholesterol ( $Rho=0.035$ ;  $p=0.797$ ), triglycerides ( $Rho=0.184$ ;  $p=0.164$ ), glucose ( $Rho=0.023$ ;  $p=0.876$ ), BMI ( $Rho=0.107$ ;  $p=0.484$ ), and LVEF ( $Rho=-0.133$ ;  $p=0.293$ ). A non-significant association was observed for MASP-3 concentration comparing obese and non-obese patients, hypertensive and non-hypertensive patients, diabetic and non-diabetic patients, and in those with low HDL-cholesterol and normal/high HDL-cholesterol (Supplementary material).

### **MASP1 polymorphisms and MASP-3 serum levels**

To assess the possible association between *MASP-1* polymorphisms and MASP-3 serum concentration, SNPs were evaluated separately and combined into the haplotypes. No association was observed among *MASP1* genotypes/haplotypes and MASP-3 serum levels in CD patients and controls (Supplementary material).

## **DISCUSSION**

Our results suggest that *GC\_CCA* haplotype of *MASP1* gene may play a role in the pathophysiology of chronic CD and CCC, possibly by impacting gene expression. The positive correlation between MASP-3 and PTX3 levels in CD patients suggests its involvement in the immune process of the chronic disease, although the underlying mechanism of this association needs further investigation. This study provides, to our knowledge, the first evaluation addressing *MASP1* gene polymorphisms and MASP-3 serum levels in patients with chronic CD.

*MASP1* gene encodes MASP-1, MASP-3 and the nonenzymatic protein MAp44, by alternative splicing of the primary mRNA (30). The *MASP1* polymorphisms evaluated in the present study occur in potentially regulatory regions (intron 1, shared by all *MASP1* products and 3'UTR of exon 12, exclusive of MASP-3) and could potentially affect MASP-3 protein expression (22). Although in the present study the *GC\_CCA* haplotype, associated with CD and CCC, did not significantly impact MASP-3 levels, this haplotype has been previously associated with higher MASP-3 concentration in healthy individuals (22). The lack of significance between *GC\_CCA* haplotype and MASP-3 concentration observed in this study is probably a result of low sample size, with only 32 individuals having both genotyping and serum levels evaluation. Taking this into account, it is possible that the association of the *GC\_CCA* haplotype with CD and CCC may be related to *MASP-1* expression, resulting in high MASP-3 serum levels. However, additional studies with larger cohorts are warranted to confirm this hypothesis. According to *in silico* analyses, intron 1 of *MASP1* gene exhibits enhancer-like signatures, as seen by chromatin immunoprecipitation assay with sequencing, in different cell lines (<http://genome.ucsc.edu/>). Also, it was proposed that the polymorphisms in 3'UTR of exon 12 may modulate the interaction with miRNAs, such as miR-3181, miR-2861, (22) possibly impacting MASP-3 serum levels. Thus, the evaluated SNPs might impact MASP-3 expression possibly due to differential affinity of regulatory proteins and miRNAs. Nevertheless, the hypothesis raised here should be interpreted carefully since the association of high MASP-3 levels with *GC\_CCA MASP1* haplotype was suggested based on previous findings (22) and needs to be confirmed in future studies.

The biological role of MASP-3 is not completely elucidated. Some evidence indicates that MASP-3 is involved in the AP by activating the pro-factor D to active factor D,

thereby performing an up-regulation effect on AP (31 - 35). Thus, MASP-3 might play a dual role in CD. In one way MASP-3 levels could be involved in AP activation, which in turn could contribute to the chronic inflammatory process and tissue damage in CD patients, especially the CCC form (35). On the other hand, MASP-3 may have a down-regulating effect on the LP activation due to competition with MASP-1 and -2 for binding sites on PRMs (36, 37). Decreased activation of LP due to MASP-3 down regulation could contribute to successful *T. cruzi* infection (38). Noteworthy, Hertle et al (39) found that higher concentrations of MASP-3 were associated with endothelial dysfunction, whereas this was not observed for MBL, MASP-1 or MASP-2, suggesting a harmful effect for MASP-3 in cardiovascular outcome, possibly independent of LP activation. Interestingly, the GC\_CCA haplotype was associated with resistance against leprosy, possibly because high MASP-3 levels may avoid bacterial phagocytosis, disturbing its colonization due blockage of the LP (22). LP activation was related to complement-mediated *T. cruzi* killing (9, 38), thus, high MASP-3 due GC\_CCA might contribute to parasite infection, allowing its survival and progression of the infection. However, the role of MASP-3 in *T. cruzi* infection and chronic CD needs still to be elucidated. Moreover, we cannot dismiss the possibility that GC\_CCA haplotype can also modulate MASP-1 and MAp44 proteins in CD patients. Additional studies are needed for definitive conclusions.

PTX3 is a PRM known to interact with multiple complement components contributing to host defense, tissue clearance and regulation of inflammation (40). An anti-inflammatory role for PTX3 was proposed in chronic CD, conferring a cardioprotective function, possibly due to its ability to interact with factor H (FH), thereby inhibiting excessive AP activation (12, 41). Our results showing positive correlation between MASP-3 and PTX3 in CD patients suggest an intricate mechanism between these proteins that may modulate AP activation with involvement in CD pathophysiology. However, the mechanism underlying this interaction and their impact in the chronic inflammatory response needs further investigation. The positive correlation between MASP-3 and PTX3 also observed in patients with myocardial infarction indicates this collaboration in cardiovascular disease (42), corroborating our findings. The lack of correlation between MASP-3 and FCN-2, FCN-3 and MBL, suggests that the involvement of MASP-3 in CD may be independent of LP activation.

Our study has some limitations, which includes the low sample size of CD patients and controls with measured MASP-3 concentration as well as the lack of MASP-1 and MASP44 serum levels. Future studies including all *MASP1* gene products in a larger cohort are necessary for definitive conclusions on the role of *MASP1* polymorphism and related proteins in the development and clinical outcome of chronic CD.

In summary, our findings suggest a role for the *GC\_CCA* haplotype of *MASP1* gene in the susceptibility of CD and CCC, possibly by impacting expression of MASP-3. These results may contribute to a better understanding of the immune mechanism associated with a complex interplay of down-regulate LP or up-regulate AP complement activation, or both, in chronic CD and its clinical forms.

### **Funding**

This work was supported by research grants from Fundação Araucária (CP 01/2016 Programa Pesquisa para o Sistema Único em Saúde - PPSUS Edição 2015 Fundação Araucária-PR / SESA-PR / CNPq / MS-Decit).

## REFERENCES

1. Dias JCP, Ramos Jr AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2016;49 (Suppl 1):3-60.
2. World Health Organization - WHO. Chagas Disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: WHO; 2019. [citado em 15 de Abril de 2021] Disponível em: <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>
3. Pan American Health Organization. (2016). *Neglected Infectious Diseases In The Americas: Success Stories And Innovation To Reach The Neediest*.
4. Chronic Care for Neglected Infectious Diseases: Leprosy/Hansen's Disease, Lymphatic Filariasis, Trachoma, and Chagas Disease. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 2020. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53312>
5. Centers for Disease Control and Prevention. Chagas disease [website]. Retrieved 15 April 2021 from <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>
6. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*. 2019 Jul 2;7:166.
7. Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ. The complement systems: a prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol*. 2017;8:607.
8. Cestari I, Ramirez MI. Inefficient Complement System Clearance of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes Enables Resistant Strains to Invade Eukaryotic Cells. *PLOS ONE*. 2010;5(3):e9721.
9. Cestari I, Evans-Osses I, Schlapbach LJ, de Messias-Reason I, Ramirez MI. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Mol Immunol*. 2013;53(4):328-334.
10. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Feb;6(2):132-42.
11. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, Skjoedt MO. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016 Nov;274(1):74-97.
12. Lidani KC, Beltrame MH, Luz PR, Sandri TL, Nisihara RM, de Messias-Reason IJ. Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease? *Int J Cardiol*. 2015;190:233-5.
13. Evans-Osses I, de Messias-Reason I, Ramirez MI. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:675898.

14. Luz PR, Miyazaki MI, Chiminacio Neto N, et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004257. Published 2016 Jan 8.
15. Flores-Chavez MD, Sambri V, Schottstedt V, Higuera-Escalante FA, Roessler D, Chaves M, Laengin T, Martinez A, Fleischer B. Evaluation of the Elecsys Chagas Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in a Multicenter Study in Europe and Latin America. *J Clin Microbiol*. 2018 Apr 25;56(5):e01446-17.
16. Rojas LZ, Glisic M, Pletsch-Borba L, EcheverrõÃa LE, Bramer WM, Bano A, et al. (2018). Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 12 (6): e0006567. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006567>
17. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct 15;62(16):e147-239. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.019. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23747642.
18. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: a Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 133(4):e38-60. doi:10.1161/CIR.0000000000000350. » <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000350>
19. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, et al. Brazilian Guidelines of Hypertension - 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2021 Mar;116(3):516-658. DOI: 10.36660/abc.20201238. PMID: 33909761.
20. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018. Sociedade Brasileira de Diabetes; Organização: José Egidio, Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro, Sérgio Vencio. – São Paulo: Editora Clannad, 2017. p. 1-383. Available from: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>.
21. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* . 2017;109(2, sup.1):1-91. doi:10.1016/S0140-6736(11)60739-3.09-2015-VYT-13-BR-J. » [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60739-3.09-2015-VYT-13-BR-J](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60739-3.09-2015-VYT-13-BR-J)
22. Weinschutz Mendes H, Boldt ABW, von Rosen Seeling Stahlke E, Jensenius JC, Thiel S, Messias-Reason IJT. Adding *MASP1* to the lectin pathway-Leprosy association puzzle: Hints from gene polymorphisms and protein levels. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Apr 2;14(4):e0007534. doi: 10.1371/journal.pntd.0007534. PMID: 32240160; PMCID: PMC7162614.

23. Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, Messias-Reason IJ. Serine proteases in the lectin pathway of the complement system. *Proteases Physiol Patho*. Published online June 10, 2017:397-420.
24. Ammitzbøll CG, Steffensen R, Jørgen Nielsen H, et al. Polymorphisms in the MASP1 gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MASP4. *PLoS One*. 2013;8(9):e73317. Published 2013 Sep 2. doi:10.1371/journal.pone.0073317
25. Lidani KCF, Beltrame MH, Luz PR, Sandri TL, Nishihara RM, de Messias-Reason IJ. Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease? *Int J Cardiol*. 2015;190:233-5.
26. Luz PR, Boldt ABW, Grisbach C, Kun JFJ, Velavan TP, Messias-Reason IJ (2013) Association of L-Ficolin Levels and *FCN2* Genotypes with Chronic Chagas Disease. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60237.
27. Lidani KCF, Andrade FA, Beltrame. Ficolin-3 in Chronic Chagas Disease: Low serum levels associated with the risk of cardiac insufficiency. *Parasite Immunology*. 2021;00:e12829.
28. Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, Nishihara RM, Messias-Reason IJ. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int J Cardiol*. 2010;143(3):448-450.
29. Nyholt DR. A Simple Correction for Multiple Testing for Single-Nucleotide Polymorphisms in Linkage Disequilibrium with Each Other. *Am J Hum Genet*. 2004;74(4):765–9.
30. Garred, P., Genster, N., Pilely, K., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Ma, Y.J. and Skjodt, M.-O. (2016), A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunol Rev*, 274: 74-97.
31. Hayashi M, Machida T, Ishida Y, Ogata Y, Omori T, Takasumi M, Endo Y, Suzuki T, Sekimata M, Homma Y, Ikawa M, Ohira H, Fujita T, Sekine H. Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway. *J Immunol*. 2019 Sep 15;203(6):1411-1416.
32. Dobó J, Szakács D, Oroszlán G, Kortvely E, Kiss B, Boros E, Szász R, Závodszy P, Gál P, Pál G. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. *Sci Rep*. 2016 Aug 18;6:31877.
33. Oroszlán G, Kortvely E, Szakács D, et al. MASP-1 and MASP-2 do not activate pro-factor D in resting human blood, whereas MASP-3 is a potential activator: kinetic analysis involving specific MASP-1 and MASP-2 inhibitors. *J Immunol*. 2015;196:857–65.
34. Banda NK, Acharya S, Scheinman RI, et al. Mannan- binding lectin-associated serine protease 1/3 cleavage of pro-factor D into factor D in vivo and attenuation of

collagen antibody-induced arthritis through their targeted inhibition by RNA interference-mediated gene silencing. *J Immunol.* 2016;197:3680–94.

35. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Matsushita M, Fujita T. The role of mannose- binding lectin- associated serine protease- 3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol.* 2011;187:3751–3758.

36. Skjoedt MO, Palarasah Y, Munthe-Fog L, Jie Ma Y, Weiss G, Skjodt K, Koch C, Garred P. MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. *Immunobiology.* 2010 Nov;215(11):921-31.

37. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, et al. MASP- 3 and its association with distinct complexes of the mannan- binding lectin complement activation pathway. *Immunity.* 2001;15:127–135

38. Cestari, I., Krarup, A., Sim, R.B., Inal, J.M., Ramirez, M.I., 2009. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Immunology* 47 (2-3), 426–437.

39. Hertle E, Arts IC, van der Kallen CJ, Feskens EJ, Schalkwijk CG, Hoffmann-Petersen IT, Thiel S, Stehouwer CD, van Greevenbroek MM. Distinct Longitudinal Associations of MBL, MASP-1, MASP-2, MASP-3, and MAp44 With Endothelial Dysfunction and Intima-Media Thickness: The Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016 Jun;36(6):1278-85.

40. Haapasalo K, Meri S. Regulation of the Complement System by Pentraxins. *Front Immunol.* 2019 Aug 2;10:1750.

41. Deban L, Jarva H, Lehtinen MJ, Bottazzi B, Bastone A, Doni A, Jokiranta TS, Mantovani A, Meri S. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8433-40.

42. Vengen IT, Enger TB, Videm V, Garred P. Pentraxin 3, ficolin-2 and lectin pathway associated serine protease MASP-3 as early predictors of myocardial infarction - the HUNT2 study. *Sci Rep.* 2017;7:43045. Published 2017 Feb 20.

## Tables

Table 1. Demographic data and clinical characteristics of patients with chronic Chagas disease and controls.

Parameters	Control n = 197	CD Clinical Form				Controls vs. Patients p	
		CD patients* n = 214	Indeterminate n = 66	Cardiac n = 85	Digestive n = 17		Cardiodigestive n = 31
Age (years) median [IQR]	35.0 [27 - 44]	61.0 [54 - 67]	57.0 [52 - 64]	62.0 [53 - 68]	61.0 [55 - 65]	64.0 [55 - 69]	<0.0001
Female (%)	57.4	60.3	65.1	54.1	82.3	41.9	0.616
Ancestry (%)							
Euro-Brazilians	75.6	72.4	78.8	68.2	70.6	77.4	0.056
Afro-Brazilians	15.8	23.8	18.2	27.1	23.5	19.4	
Asian	2.0	0.5	0	1.2	0	0	
Amerindian	6.6	3.3	3	3.5	5.9	3.2	
Functional classification of cardiac insufficiency (%)**							
A	n.a.	32.1	0	22.85	n.a.	50.0	n.a.
B1	n.a.	33.9	0	45.7	n.a.	11.1	
B2	n.a.	3.8	0	2.9	n.a.	5.5	
C	n.a.	28.3	0	28.6	n.a.	27.8	
D	n.a.	1.9	0	0	n.a.	5.6	

\*15 patients without clinical form definition, \*\*A total of 53 patients presented classification of cardiac insufficiency, IQR: interquartile range, n.a.: not applicable

Table 2. *MASP1* genotypes, alleles and haplotypes frequencies in patients with chronic CD and healthy controls.

Variants	Controls %(n)	CD Patients %(n)	Indeterminate %(n)	Cardiac %(n)	Digestive %(n)	Cardiodigestive %(n)	Model	CD Patients vs. Controls  p value*
Total genotypes	100 (197)	100 (214)	100 (66)	100 (85)	100 (17)	100 (31)		
rs7609662 (c.5+2718G>A)								
A	17.3 (68)	16.1 (69)	15.9 (21)	17.6 (30)	2.9 (1)	17.7 (11)	Allele	0.662
G/G	69.0 (136)	70.6 (151)	72.7 (48)	67.1 (57)	94.1 (16)	64.5 (20)	Add	0.666
G/A	27.4 (54)	26.6 (57)	22.7 (15)	30.6 (26)	5.9 (1)	35.5 (11)	Dom	0.736
A/A	3.6 (7)	2.8 (6)	4.6 (3)	2.3 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	Rec	0.665
rs13064994 (c.6- 2172C>T)								
T	26.6 (105)	22.0 (94)	22.7 (30)	21.8 (37)	23.5 (8)	16.1 (10)	Allele	0.117
C/C	52.8 (104)	60.3 (129)	60.6 (40)	61.2 (52)	58.8 (10)	67.7 (21)	Add	0.110
C/T	41.1 (81)	35.5 (76)	33.3 (22)	34.1 (29)	35.3 (6)	32.3 (10)	Dom	0.126
T/T	6.1 (12)	4.2 (9)	6.1 (4)	4.7 (4)	5.9 (1)	0.0 (0)	Rec	0.388
rs72549262 (c.1304-5229C>G)								
G	10.1 (40)	6.3 (27)	5.3 (7)	5.9 (10)	8.8 (3)	6.5 (4)	Allele	0.170
C/C	81.2 (160)	87.8 (188)	89.4 (59)	89.4 (76)	82.4 (14)	87.1 (27)	Add	0.380
C/G	17.3 (34)	11.7 (25)	10.6 (7)	9.4 (8)	17.6 (3)	12.9 (4)	Dom	0.380
G/G	1.5 (3)	0.5 (1)	0.0 (0)	1.2 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	Rec	0.304
rs1109452 (c.1304-4903C>T)								
T	37.3 (147)	30.8 (132)	33.3 (44)	23.5 (40)	44.1 (15)	40.3 (25)	Allele	0.052
C/C	39.1 (77)	48.1 (103)	42.4 (28)	60.0 (51)	29.4 (5)	35.5 (11)	Add	0.140
C/T	47.2 (93)	42.1 (90)	48.5 (32)	32.9 (28)	52.9 (9)	48.4 (15)	Dom	0.248
T/T	13.7 (27)	9.8 (21)	9.1 (6)	7.1 (6)	17.7 (3)	16.1 (5)	Rec	0.222
rs850314 (c.1304- 4902G>A)								
A	19.5 (77)	22.2 (95)	16.7 (22)	26.5 (45)	17.6 (6)	17.7 (11)	Allele	0.350
G/G	64.0 (126)	60.8 (130)	68.2 (45)	54.1 (46)	70.6 (12)	67.7 (21)	Add	0.347
G/A	33.0 (65)	34.1 (73)	30.3 (20)	38.8 (33)	23.5 (4)	29.0 (9)	Dom	0.502
A/A	3.0 (6)	5.1 (11)	1.5 (1)	7.1 (6)	5.9 (1)	3.3 (1)	Rec	0.292
Intron 1_ Exon 12 Haplotypes								
GT_GTG	0.8 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)		0.995
GT_CTG	4.8 (19)	2.3 (10)	4.6 (6)	0.6 (1)	0.0 (0)	3.2 (2)		0.078
GT_CCG	8.4 (33)	8.9 (38)	12.1 (16)	8.2 (14)	11.8 (4)	3.2 (2)		0.985
GT_CCA	12.7 (50)	10.8 (46)	6.1 (8)	12.9 (22)	11.8 (4)	9.7 (6)		0.356
GC_GTG	6.6 (26)	5.6 (24)	5.3 (7)	4.1 (7)	8.8 (3)	6.5 (4)		0.539

GC_CTG	21.3 (84)	21.0 (90)	22.0 (29)	15.9 (27)	35.3 (12)	29.0 (18)	0.791
GC_CCA	3.6 (14)	9.8 (42)	9.8 (13)	11.8 (20)	5.9 (2)	6.5 (4)	<b>0.002</b> OR 3.17 [95% IC 1.19 - 8.39]
GC_CCG	24.6 (97)	25.5 (109)	24.2 (32)	28.8 (49)	23.5 (8)	24.2 (15)	0.779
AC_CCA	3.3 (13)	1.6 (7)	0.8 (1)	1.8 (3)	0.0 (0)	1.6 (1)	0.124
AC_CTG	1.0 (4)	1.2 (5)	1.5 (2)	1.2 (2)	0.0 (0)	1.6 (1)	0.835
AC_GTG	2.8 (11)	0.7 (3)	0.0 (0)	1.8 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.310
AC_CCG	10.1 (40)	12.6 (54)	13.6 (18)	12.9 (22)	2.9 (1)	14.5 (9)	0.189

\*P values adjusted by binary logistic regression.

Dom: Dominant genetic model: major genotype vs. heterozygote+minor genotype; Rec: Recessive genetic model: minor genotype vs. major+heterozygote genotype;

Add: Additive genetic model: major genotype vs heterozygote vs minor genotype.

Table 3. MASP-3 levels correlation with LVEF and other complement proteins

Parameter	LVFE (%)	PTX3 (mg/dl)	hsCRP (mg/dL)	FCN-2 (ng/mL)	FCN-3 (ng/mL)	MBL (ng/mL)
N	64	34	62	11	70	69
Spearman Rho	-0.133	0.6157	0.120	-0.0636	0.003	-0.103
95% confidence interval	-0.373 to 0.123	0.3412 to 0.7934	-0.140 to 0.366	-0.651 to 0.571	-0.238 to 0.244	-0.338 to 0.144
P value (two-tailed)	0.293	0.0001	0.351	0.852	0.978	0.399

Note: LVEF- Left ventricular ejection fraction

## Figures

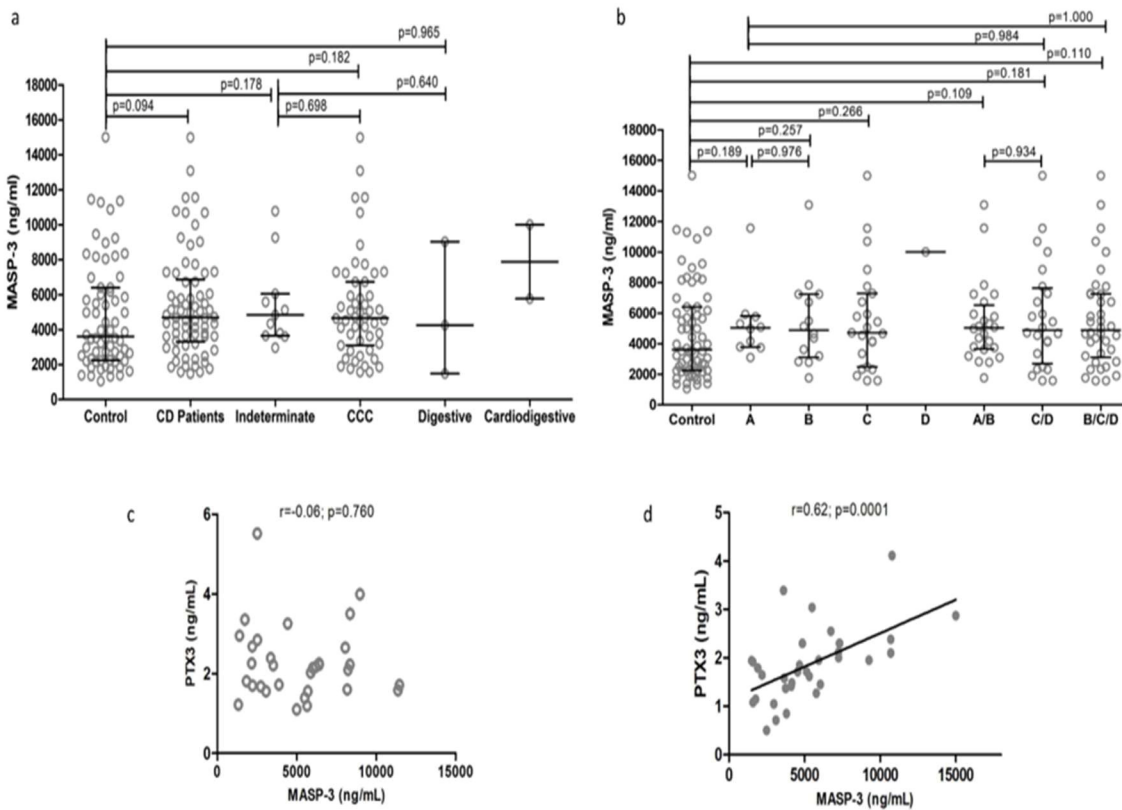
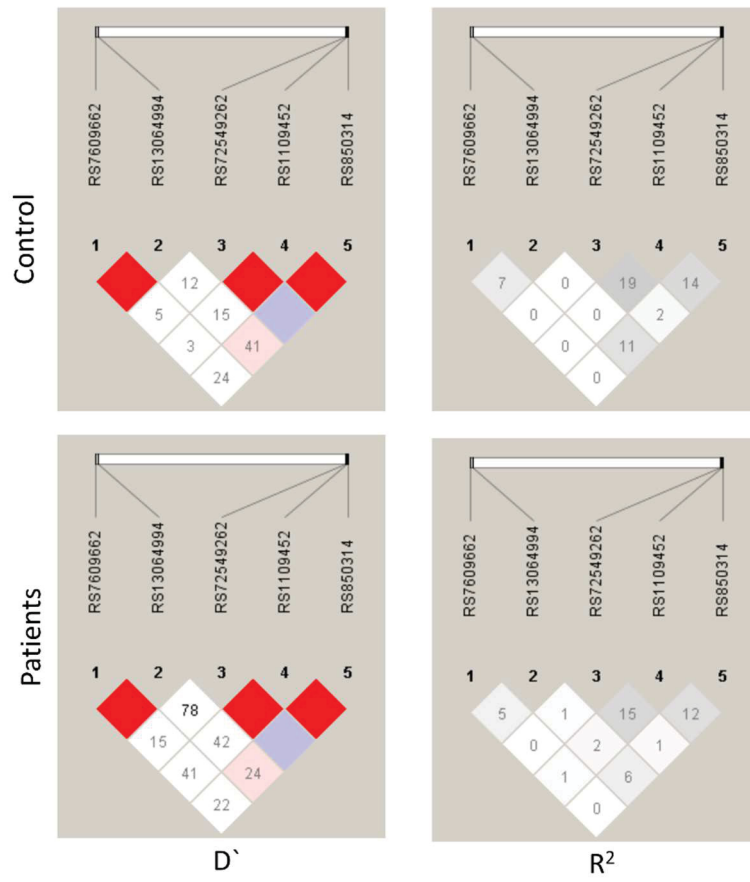


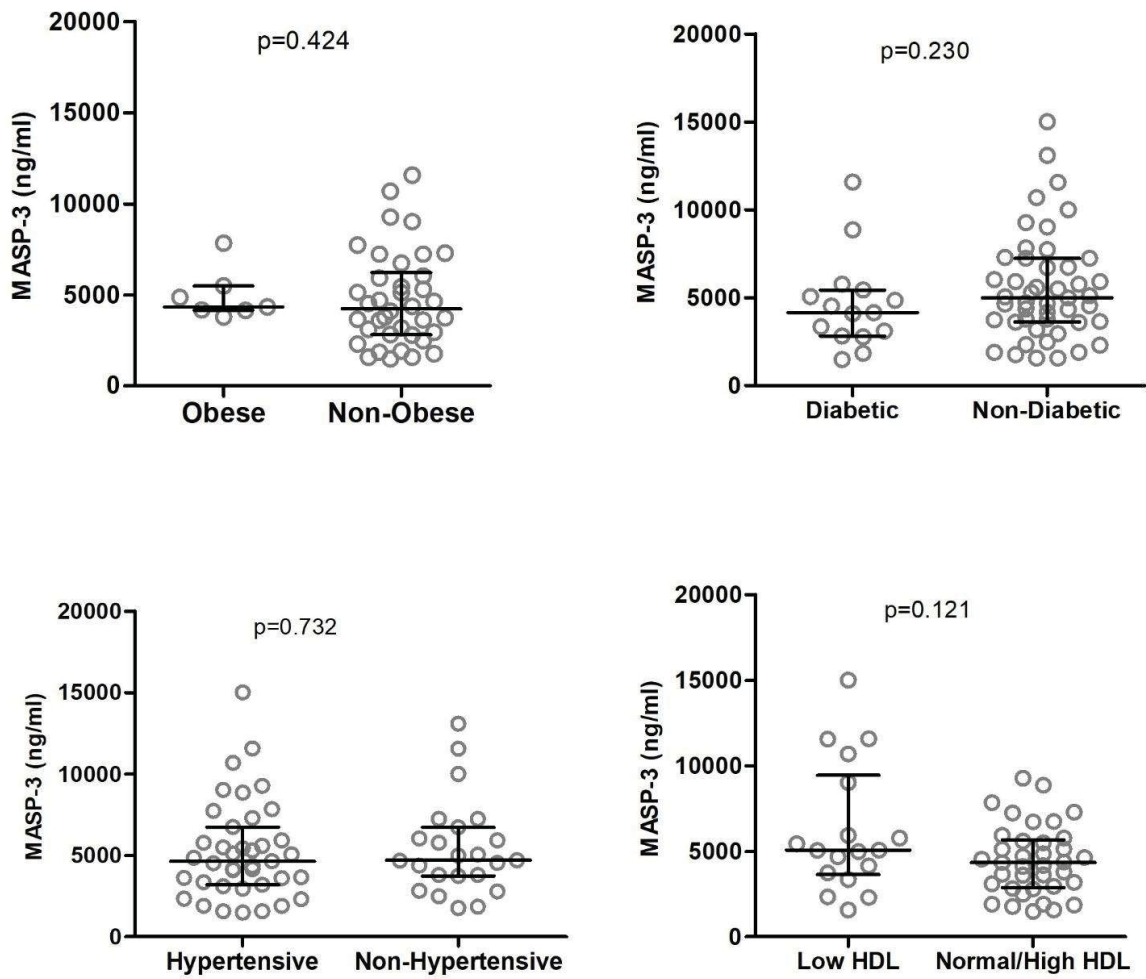
Figure 1. MASP-3 serum levels in (a) CD patients and controls; (b) according to the functional classification of cardiac insufficiency and (c) correlation between MASP-3 and (d) PTX3 concentration in controls and CD patients.

Obs.: "Stage A" means altered electrocardiogram (ECG) and normal echocardiogram (ECO); "Stage B" means altered ECO, left ventricular ejection fraction (LVEF) higher (B1) or lower (B2) than 45% and no cardiac insufficiency (CI); "Stage C" means altered ECG and ECO and compensable CI; "Stage D" means altered ECG and ECO and refractory CI.

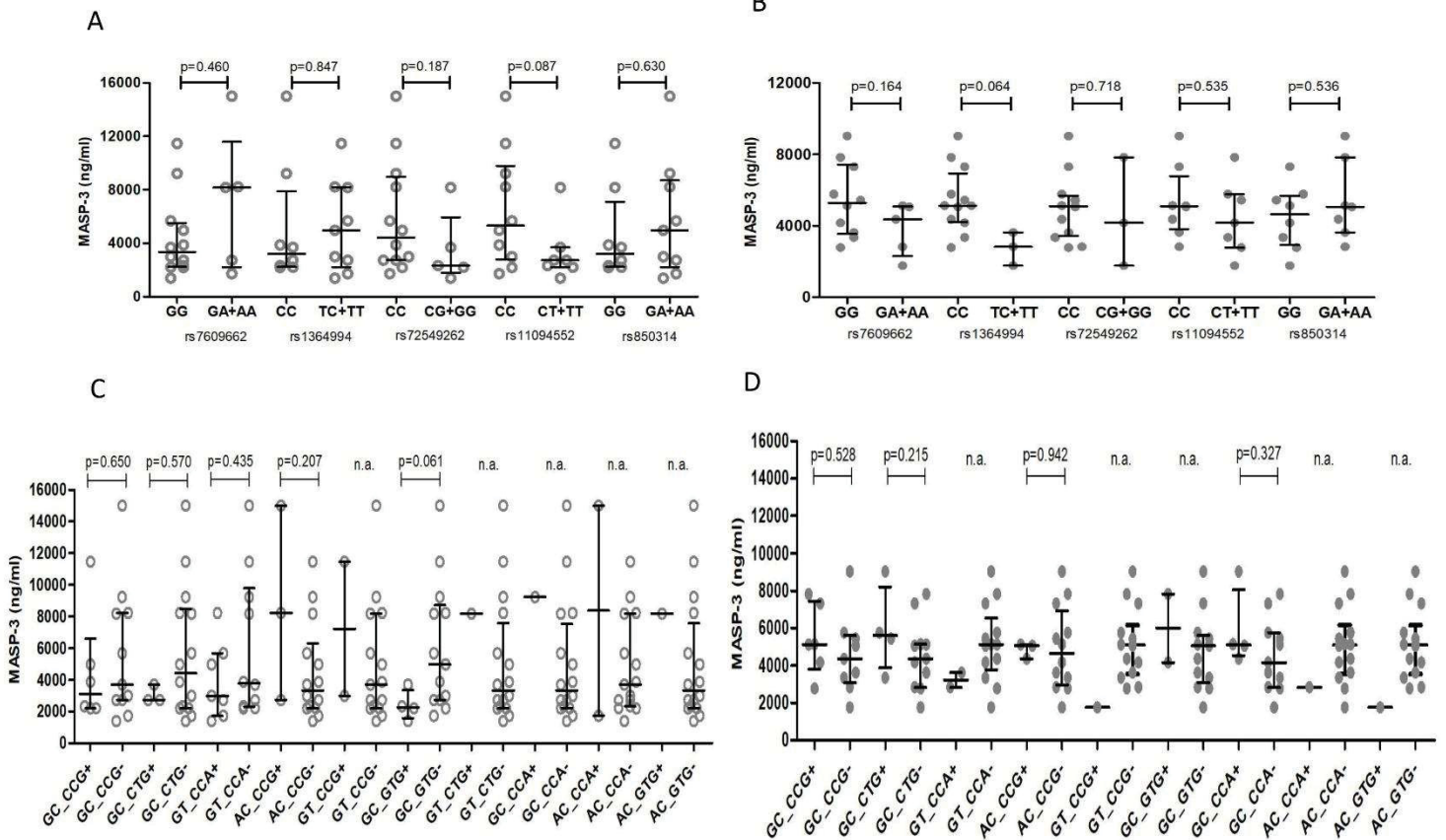
## Supplementary Material



Suppl 1. Absolute linkage disequilibrium (LD) between SNPs in intron 1 (rs7609662 and rs13064994;  $D'=1$ ) and in exon 12 (rs72549262 and rs1109452; rs72549262 and rs850314; rs1109452 and rs850314;  $D'=1$ ) in patients and controls.



Suppl 2. Association of MASP-3 concentration in obese and non-obese patients, diabetic and non-diabetic, hypertensive and non-hypertensive and low (<40 mg/dl) and normal/high HDL-cholesterol.



Suppl 3. Distribution of MASP-3 levels according to *MASP1* genotypes and haplotypes in controls (A and C) and patients with Chagas disease (B and D).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o entendimento do papel do complemento na resposta imune inata frente a infecção crônica pelo *T. cruzi*, avaliando-se o possível papel de polimorfismos de *MASP1* e da proteína MASP-3 na expressão clínica da DC crônica e na resposta inflamatória relacionada ao dano tecidual em pacientes com CCC. Este é o primeiro estudo a avaliar polimorfismos de *MASP1* e níveis séricos de MASP-3 em pacientes com DC crônica.

Uma correlação positiva entre MASP-3 e PTX3 foi observada em pacientes com DC bem como aumento do haplótipo GC\_CCA do gene *MASP1* em pacientes com DC e CCC. Embora nossos resultados não indiquem impacto do haplótipo sobre os níveis séricos de MASP-3, um estudo prévio observou sua associação com maiores níveis da proteína. Assim, é possível que o haplótipo esteja associado a DC e a CCC resultando em maiores níveis de MASP-3, o que poderia modular a ativação do complemento pela VA ou VL. Porém, devido às limitações do presente estudo, consideramos que esses são achados prévios. Uma amostragem maior de pacientes e controles genotipados para os outros polimorfismos de *MASP1* e com quantificação para os três produtos do gene são necessários para maiores conclusões. Além disso, a avaliação do possível impacto de polimorfismos de *MASP-1* e de seus produtos na progressão clínica de pacientes com DC, através de um estudo prospectivo também deve ser considerado.

Embora seja este um estudo preliminar, consideramos que os objetivos propostos foram alcançados, visto que encontramos importantes associações que podem contribuir para o melhor entendimento do papel de polimorfismos de *MASP1* e da proteína MASP-3 na DC. Além disso, nossos achados podem orientar estudos futuros, onde uma população maior possa confirmar os resultados observados.

## 6 CONCLUSÕES

- Os achados deste estudo indicam um papel do haplótipo *GC\_CCA* do gene *MASP1* na DC e na CCC;
- Os alelos e genótipos dos SNPs de *MASP1* não foram associados a DC ou suas formas clínicas;
- Não houve relação entre os genótipos/haplótipos investigados de *MASP1* e a concentração sérica de MASP-3 em pacientes e controles;
- Concentrações séricas de MASP-3 não se relacionaram a DC nem às suas diferentes formas clínicas;
- Não houve correlação entre as concentrações séricas de MASP-3 e FCN-2, FCN-3, MBL, Colectina 11 e MASP-2 em controles e pacientes com a DC;
- Concentrações séricas de MASP-3 e PTX3 demonstraram correlação positiva em pacientes com a DC;
- Não houve associação entre o polimorfismo do gene *MASP1* e níveis séricos de MASP-3 com dados clínicos dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Elsevier Editora Ltda, 2015.
- AMMITZBØLL, C.; STEFFENSEN, R.; NIELSEN, H. Polymorphisms in the *MASP1* gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MASP44. **PloS One**, v. 8, n. 9, 2013.
- ANIS, R.J.; ANIS, R.; MARIN-NETO, J.A. Chagas Disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- ARROYO-OLARTE, R. D.; MARTÍNEZ, I.; CRUZ-RIVERA, M. et al. Complement system contributes to modulate the infectivity of susceptible Tc1 strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, n. 113, v.4, 2018.
- BANDA, N. K.; ACHARYA, S.; SCHEINMAN, R. I. et al. Mannan-binding Lectin-Associated Serine Protease 1/3 Cleavage of Pro-Factor D into Factor D In Vivo and Attenuation of Collagen Antibody-Induced Arthritis through Their Targeted Inhibition by RNA Interference-Mediated Gene Silencing. **J Immunol**, v. 197, n. 9, p. 3680-3694, 2016.
- BARRETT, M.P. et al. The trypanosomiases. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 2003.
- BELTRAME, M. H. et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in Pediatrics**, v.2 n. January, p. 1-14, 2015.
- BELTRAME, M. H. et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Mol Immunol.**, v. 67, n.1, p. 85-100, 2015.
- BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.
- 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, 2011.
- BOLDT, A.B.W. et al. *MASP1* and *MASP2*. **Encyclopedia of Signaling Molecules**. Springer, New York, NY. 2016.
- BRENER, Z., 2000. Terapêutica experimental na doença de Chagas (Capítulo 18). In: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. (Eds.), *Libro Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*.
- BROWN, K. S. et al. Severe fibrosis in hepatitis C virus-infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex. **Clinical and experimental immunology**, v. 147, n. 1, p. 90–8, 2007.

Carlos Chagas. In:Wikipédia: a enciclopédia livre. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/carlos\\_chagas](http://pt.wikipedia.org/wiki/carlos_chagas)>. Acesso em 16 de maio de 2016.

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

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.

CORTESIO, C.L.; W. JIANG. Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 449, n.1-2, p. 164-170, 2006.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277-282, 2015.

CRUVINEL, W.M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 50, n. 4, p 434-447, 2010.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm.**, v. 2014; n. 683230, 2014.

DAHL, M.R.; THIEL, S.; MATSUSHITA, M. et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**, v. 15, n. 1, p. 127-35, 2001.

DEGN, S. E. et al. Biological variations of MASP-3 and Map44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. **J Immunol Methods**, v. 361, n. 1-2, p. 37-50, 2010.

DEGN, S. E. et al. MASP44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 183, n. 11, p. 7371-8, 2009.

DEGN, S.E. et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. **J Immunol**, v. 15, n.189, p. 3957-69, 2012.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. **American journal of human genetics**, v. 88, n. 6, p. 689–705, 2011.

DIAS, J.C.P. et al. [II Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 25, n. spe, p. 7–86, jun. 2016.

DOBÓ, et al. Masp-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. **Sci Rep**, v. 6, n. 31877, 2016.

EVANS-OSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M. I. The Emerging Role of Complement Lectin Pathway in Trypanosomatids: Molecular Bases in Activation, Genetic Deficiencies, Susceptibility to Infection, and Complement System-Based Therapeutics. **Scientific World Journal**, v. 2013, n. 675898, 2013.

FREDERIKSEN, P. D. et al. 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.

FABBRO, D.L. et al. 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.

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

GALLERANO, R.H.; SOSA, R.R. Resultados de un estudio a largo plazo con drogas antiparasitarias en infectados chagásicos crónicos. **Medicina**, 2001.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

GOUT, E. 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.

HAERYNCK, F. et al. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. **Human immunology**, v. 73, n. 11, p. 1175–1183, 2012.

HAJELA, K. et al. The Biological Functions of MBL-Associated Serine Proteases (MASPs). **Immunobiology**, v. 205, n. 4-5, p. 467–475, 2002.

HAYASHI, M. et al. Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway. **J Immunol**, v. 203, n. 6, p. 1411-1416, 2019.

HERTLE et al. Distinct Longitudinal Associations of MBL, MASP-1, MASP-2, MASP-3, and Map44 With Endothelial Dysfunction and Intima-Media Thickness: The Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 36, n. 6, p. 1278-85, 2016.

HONTEBEYRIE, M.; BRENIÈRE, S. F.; AZNAR, C. Other Forms of Transmission. **American Trypanosomiasis**, p. 583–597, 2010.

HOTEZ, P.J.; GURWITH, M. Europe's neglected infections of poverty. **Int J Infect Dis**, v. 15, n.9, p. 611-619, 2011.

HOWARD, E. J. et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **BJOG**, v. 121, n. 1, p. 22–33, 2014.

IWAKI, D. et al. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. **J Immunol**. v. 187, n. 7, p. 3751-8, 2011.

INGELS C. et al. Lectin pathway of complement activation and relation with clinical complications in critically ill children. **Pediatric Research**, v. 75, n. 1-1, p. 99–108, jan. 2014.

KIPNIS, T. L. et al. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 1, p. 602-5, 1981.

KJAER, T.R.; THIEL, S.; ANDERSEN, G.R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. **Mol Immunol.**, v. 56., n. 4, p. 413-22, 2013.

KONDOS, S. C. et al. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 5, p. 341–351, 2010.

LAMBRIS, J.D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B.V. Complement evasion by human pathogens. **Nat Rev Microbiol**. v. 6, n. 2, p. 132-42, 2008.

LIEKE, T. et al. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 2, p. 357–364, 2006.

LEVINE, N. D. et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.

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

LIDANI, K. C. F. et al. Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease? **Int J Cardiol**. v. 190, p. 233-235, 2015.

LIDANI, K.C.F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol**. v. 8, n. 607, 2017.

LIDANI, K.C.F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Front Public Health**. v. 7, n. 166, 2019.

LIDANI, K.C.F. et al. Ficolin-3 in chronic Chagas disease: Low serum levels associated with the risk of cardiac insufficiency. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 6, 2021.

LUZ, et. Al. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. **Int J Cardiol**, v. 143, n. 3, p. 448-50, 2010.

LUZ, P. R. et al. Association of L-Ficolin Levels and *FCN2* Genotypes with Chronic Chagas Disease. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013.

LUZ, P.R. et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 10, n. 1, 2016.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á. V. L. Cardiopatia Chagásica. **Arq Bras Cardiol**, v. 72, n. 3, p. 247–263, 1999.

MEDJERAL-THOMAS, N. R. et al. Progressive IgA Nephropathy Is Associated with Low Circulating Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H-Related Protein (FHR5) Deposition. **Clinical Research**, v. 3, n.2, p. 426-438, 2018.

MENDES, H.W. et al. Adding *MASP1* to the lectin pathway-Leprosy association puzzle: Hints from gene polymorphisms and protein levels. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 14, n. 4, 2020.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–30, 2015.

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

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.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, ed.10, 2003, p. 73-96.

NYHOLT, D. R. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 4, p. 765-769, 2004.

NÓBREGA, A.A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 653-5, 2009.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J EXP MED**, n. 142, v. 1, p. 224-229, 1975.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. **Seminars in Nephrology**, v. 33, n. 6, p. 479-492, 2013.

OROSZLÁN, G. et al. MASP-1 and MASP-2 Do Not Activate Pro-Factor D in Resting Human Blood, whereas MASP-3 Is a Potential Activator: Kinetic Analysis Involving Specific MASP-1 and MASP-2 Inhibitors. **J Immunol**, v. 196, n. 2, p. 857-65, 2016.

Pan American Health Organization - PAHO (2016). Neglected Infectious Diseases in The Americas: Success Stories And Innovation To Reach The Neediest.

Pan American Health Organization - PAHO (2021). Neglected Infectious Diseases: Leprosy/Hansen's Disease, Lymphatic Filariasis, Trachoma, and Chagas Disease. Chapter 5 - Care in Chagas Disease (American Trypanosomiasis) p.137-182. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53312>

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas disease: Implications for global health. **Trends Parasitol.**, v. 31, p 595-603, 2015.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

PROHÁSZKA, Z. et al. Association of ficolin-3 with severity and outcome of chronic heart failure. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013.

RASSI, A. J. et al. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 95, n. 7, p. 524-534, 2009.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, 2010.

RASSI JR, A., MARIN NETO, J. A., RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224-235, 2017.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9, n. 2, 2015.

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

RICKLIN, D. et al. 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.

ROORYCK, C. et al. Mutations in lectin complement pathway genes *COLEC11* and *MASP1* cause 3MC syndrome. **Nat Genet.** v. 43, n. 3, p. 197-203, 2011.

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

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

SANDRI, T.L. et al. Human. Human collectin-11 (*COLEC11*) and its synergic genetic interaction with *MASP2* are associated with the pathophysiology of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, 2019.

SCHIJMAN, A. G. 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.

SIRMACI, A. et al. *MASP1* Mutations in Patients with Facial, Umbilical, Coccygeal, and Auditory Findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels Syndromes. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, n. 5, p. 679–686, 2010.

SKJOEDT, M. O. et al. A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8234-8243, 2010.

SKJOEDT, M. O. et al. MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 921-31, 2010.

STEINDEL, M. 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.

STOVER, C. M. et al. Murine serine proteases MASP-1 and MASP-3, components of the lectin pathway activation complex of complement, are encoded by a single structural gene. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 5, p. 374-384, 2003.

SUGIMOTO, R. et al. 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.

TAKAHASHI, K. et al. Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 96-102, 2011.

**The Complement Factsbook.** Morley, Bernard J (Editor); Walport, MJ (Editor). London: Elsevier Academic Press Inc, 2018.

THIEL, S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. **Mol Immunol.** v. 44, n. 16, p. 3875-88, 2007.

VAGO, A. R. et al. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organs. **The American Journal of Pathology.** v. 156, n. 5, p. 1805–1809, 2000.

VALINEZHAD ORANG, A.; SAFARALIZADEH, R.; KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. **Int J Genomics**, v. 2014, n. 970607, 2014.

VERONESI-FOCACCIA. Tratado de Infectologia. 5 ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 2009.

VIOTTI, R. 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.

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. et al. 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.

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 (American trypanosomiasis) [Website]. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em 15 abril 2021

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 240-53, 2012.