

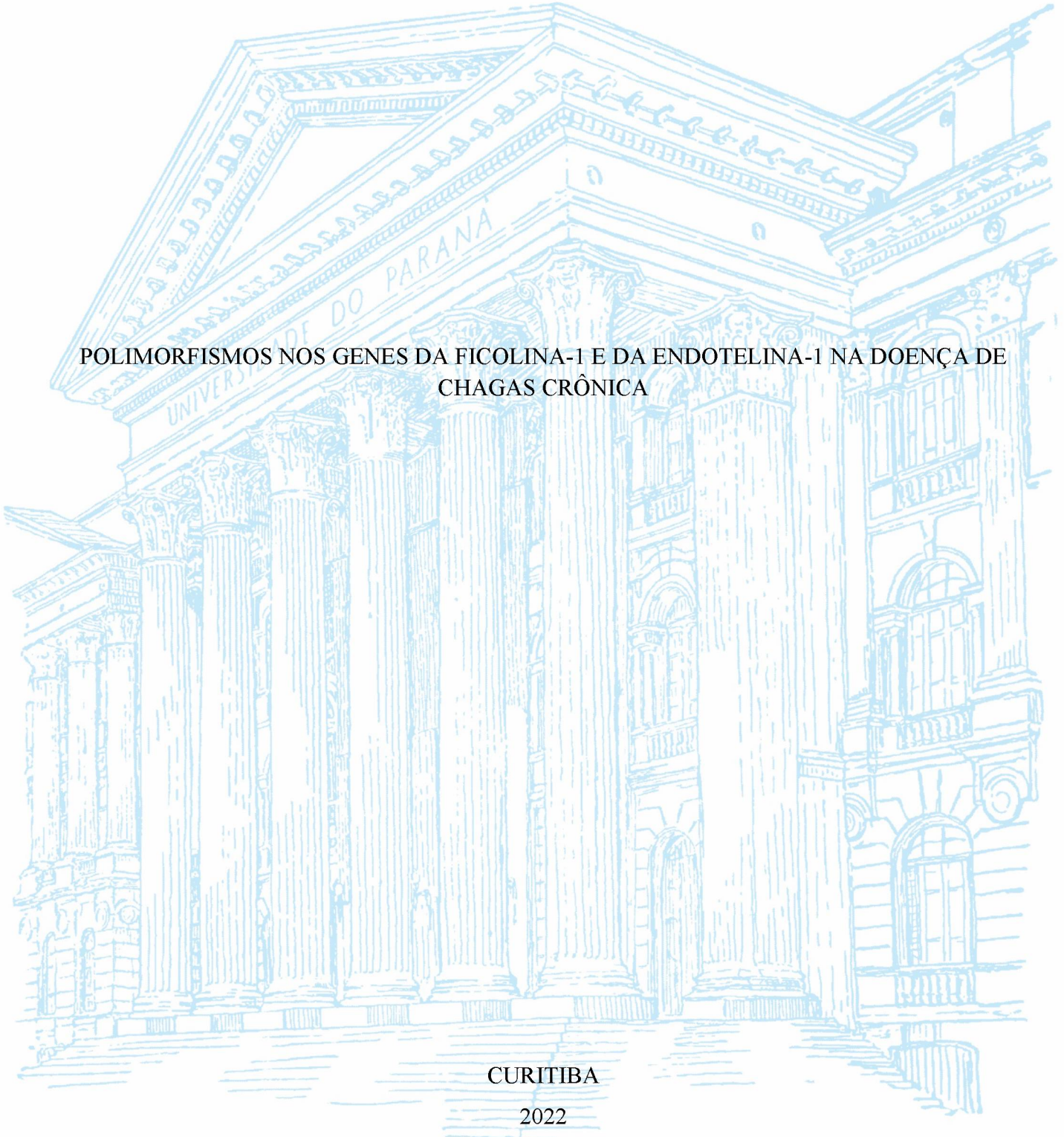
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PÂMELA DIAS FONTANA

POLIMORFISMOS NOS GENES DA FICOLINA-1 E DA ENDOTELINA-1 NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

CURITIBA

2022



PAMELA DIAS FONTANA

POLIMORFISMOS NOS GENES DA FICOLINA-1 E DA ENDOTELINA-1 NA DOENÇA DE
CHAGAS CRÔNICA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias Reason

Coorientadoras: Dra. Fabiana Antunes de Andrade
Dra. Kárita Cláudia Freitas Lidani

CURITIBA

2022

F679 Fontana, Pamela Dias

Polimorfismos nos genes da ficolina-1 e da endotelina-1 na doença de Chagas crônica [recurso eletrônico] / Pamela Dias Fontana. – Curitiba, 2022.

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

Orientadora: Profa. Dra. Iara Jose de Messias Reason

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Antunes de Andrade

Profa. Dra. Kárita Cláudia Freitas Lidani

1. Doença de Chagas. 2. Tripanossomíase. 3. Polimorfismo genético.
4. Endotelina-1. I. Reason, Iara José de Messias. II. Andrade, Fabiana Antunes de. III. Lidani, Kárita Cláudia Freitas. IV. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

NLM: WC 705



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PÂMELA DIAS FONTANA** intitulada: "**POLIMORFISMOS NOS GENES DA FICOLINA-1 E DA ENDOTELINA-1 NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.**", sob orientação da Profa. Dra. IARA JOSE DE MESSIAS REASON, 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 doutora 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, 02 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica
22/12/2022 09:42:31.0

IARA JOSE DE MESSIAS REASON
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
06/12/2022 16:01:48.0

FERNANDA BOVO

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA
UFPR)

Assinatura Eletrônica
02/12/2022 19:37:15.0

ALTAIR ROGERIO AMBROSIO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica
05/12/2022 23:11:05.0

LORENA BAVIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
07/12/2022 13:08:35.0

THAISA LUCAS SANDRI

Avaliador Externo (SYNOVO GMBH - TÜBINGEN)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br
Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 239788
Para autenticar este documento/assinatura, acesse
<https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 239788

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Iara Messias Reason, cientista excepcional, por me receber no seu grupo de pesquisa, pelo incentivo e apoio durante todos esses anos.

Agradeço as minhas coorientadoras, Dra. Kárita Freitas Lidani e Dra. Fabiana Antunes de Andrade, cientistas brilhantes, fundamentais em todas as etapas da realização desta pesquisa.

Aos professores integrantes das bancas de qualificação e defesa, por todas as contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Dr. Robert H. Gilman da Universidade Johns Hopkins e as pesquisadoras Dra. Márcia Beltrame e Dra. Alessia Ranciaro da UPenn, essenciais para o sequenciamento da *EDN1*. E a geneticista Dra. Valéria Bumiller-Bini Hoch que teve participação vital na etapa de análise estatística.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunopatologia Molecular, em especial, Ednéia Cavalcanti, Helena Placido, Camila F. O. Toré, Tatiane B. Godoy e Nathalia Signorini, pelo apoio e incentivo diários.

A equipe do ambulatório de doença de Chagas, Dra. Márcia e a enfermeira Cristina.

Ao meu companheiro de vida, Wesley, por todo cuidado e carinho, por me lembrar todos os dias que existe um mundo de infinitas possibilidades.

Aos meus pais e irmãos que sempre estimularam a busca pelo conhecimento, apoiando o meu crescimento profissional e acadêmico.

Ao meu pequeno suporte emocional, Théo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES): O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial, agradeço a todos os pacientes com doença de Chagas que foram voluntários nesta pesquisa, doando seu sangue em prol da ciência.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no oceano.
Mas o oceano seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A Doença de Chagas (DC), doença tropical negligenciada com desfechos clínicos diversos, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo protozoário em todo o mundo, principalmente na América latina, reforçando a DC como um desafio para a saúde pública global. A fase aguda, caracterizada por alta parasitemia, dura entre 4-8 semanas, sendo seguida por uma fase crônica, onde indivíduos infectados podem não apresentar nenhum comprometimento clínico (forma assintomática ou indeterminada) ou, após um período de 10-30 anos, podem desenvolver complicações cardíacas e/ou digestivas. Apesar de mais de um século de múltiplos esforços e pesquisas, a DC ainda não tem todos os seus processos fisiopatológicos completamente elucidados. O sistema complemento é peça fundamental na defesa do organismo humano contra infecções. As ficolinas, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), são essenciais para a ativação deste sistema através da via das lectinas (VL). As ficolinas -2 e -3 já foram relacionadas à DC, assim como outros componentes da VL, como a lectina ligante de manose (MBL), colectina-11, as MBL-associadas a serino proteases (MASP-1, 2 e 3), entretanto o papel da ficolina-1 (codificada pelo gene *FCNI*) ainda não havia sido investigado na DC. A endotelina-1 (EDN-1), potente peptídeo vasoconstritor endógeno, já foi associada com processos infecciosos, incluindo a DC crônica, em que níveis sorológicos elevados de EDN-1 sinalizam um papel importante no processo infeccioso da DC. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) localizados no gene da endotelina 1 (*EDNI*), foram associados a distúrbios cardiometabólicos e hipertensão, importantes comorbidades em pacientes infectados com *T. cruzi* que podem influenciar na gravidade da DC ou sua progressão clínica. SNPs da *FCNI*, especialmente da região promotora, também têm sido associados a doenças infecciosas. Entretanto, não há na literatura estudos sobre a associação entre os SNPs dos genes *EDNI* e *FCNI* e a DC crônica. O objetivo deste trabalho foi avaliar possível associação de três SNPs da região promotora do gene *FCNI* (rs2989727, rs17039495 e rs10858293) e quatro SNPs do gene *EDNI*, o rs10478718, rs10478720 e rs1800543, no intron 2, e o rs5369, no exon 3, com a DC crônica e suas formas clínicas. Os SNPs do gene *FCNI* foram determinados por meio da técnica PCR-SSP (amplificação sequência específica); e os quatro SNPs do gene *EDNI* foram sequenciados pelo método Sanger. Na análise do gene de *FCNI*, foram incluídos 200 pacientes, sendo 47 (23,5%) assintomáticos, 104 (52%) com forma clínica cardíaca, 20 (10%) digestiva e 29 (14,5%) cardiodigestiva. Para o gene *EDNI*, foram incluídos 160 pacientes, sendo 67 (41,9%) assintomáticos, 32 (20%) na forma clínica cardíaca estadiamento A, 11 (6,9%) forma cardíaca B, 10 (6,3%) com a forma cardíaca D, 16 (10%) na forma digestiva e 24 (15%) com a forma cardiodigestiva. Os resultados demonstraram um aumento significativo da frequência do alelo G rs2989727 e do genótipo GG do gene *FCNI* em pacientes ($p=0,004$ e $p=0,010$, respectivamente), sintomáticos ($p=0,008$ e $p=0,012$, respectivamente) e cardíacos ($p=0,013$ e $p=0,013$, respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Quanto aos polimorfismos da *EDNI*, foi observada uma associação significativa dos SNPs rs10478718 e rs5369 com as formas sintomáticas cardíacas da DC crônica. Não foram observados resultados significativos para os demais SNPs de *EDNI* e *FCNI* estudados. Nossos achados demonstram que os polimorfismos de *FCNI* rs2989727 (c.-1981G>A) e os SNPs rs10478718 e rs5369 do gene *EDNI* estão associados com a DC, possivelmente influenciando a expressão das proteínas FCN-1 e EDN-1.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *T. cruzi*, polimorfismo gênico, ficolina-1, endotelina-1.

ABSTRACT

Chagas disease (CD), a neglected tropical disease with diverse clinical outcomes, is caused by *Trypanosoma cruzi*. An estimated 7 million people are infected with the protozoan worldwide, mainly in Latin America, reinforcing CD as a global public health challenge. The acute phase, characterized by high parasitemia, lasts between 4-8 weeks, followed by a chronic phase where infected individuals have no clinical impairment (asymptomatic or indeterminate form) or, after a period of 10-30 years, may develop cardiac and/or digestive involvement. Despite more than a century of multiple efforts and extensive research, CD does not yet have all its pathophysiological processes fully elucidated. The complement system is a fundamental part of the human organism's defense against infections. The ficolins, pattern recognition receptors, are essential for the activation of this system through the lectin pathway (LP). Ficolins 2 and 3 have already been related to CD, as well as other components of LP, such as mannose-binding lectin (MBL), collectin-11, MBL-associated serine proteases (MASP-1, 2 and 3), however the role of ficolin-1 (encoded by the *FCNI* gene) has not yet been investigated in CD. Endothelin-1 (EDN-1), a potent vasoconstrictor, has already been associated with infectious processes, including chronic CD, in which elevated serological levels of EDN-1 may play an important role in the infectious process of CD. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the endothelin 1 gene (*EDNI*) have been associated with cardiometabolic disorders and hypertension, both considered important comorbidities in patients infected with *T. cruzi* since they can influence the severity of CD or even its clinical progression. *FCNI* SNPs, especially in the promoter region, have also been associated with infectious diseases. However, there are no studies in the literature on the association between the SNPs of *EDNI* and *FCNI* genes and chronic CD. The objective of this research was to evaluate three SNPs of the promoter region of *FCNI* gene (rs2989727, rs17039495 and rs10858293), using the PCR-SSP technique (specific sequence amplification); and four SNPs of *EDNI* gene (rs10478718, rs10478720, rs1800543 and rs5369), sequenced by Sanger method, and its possible association with chronic CD and its clinical forms. In the analysis of *the FCNI* gene, 200 patients were included, 47 (23.5%) asymptomatic, 104 (52%) with cardiac clinical form, 20 (10%) digestive and 29 (14.5%) cardiodigestive. For the *EDNI* gene, 160 patients were included, 67 (41.9%) asymptomatic, 32 (20%) in clinical form cardiac staging A, 11 (6.9%) cardiac form B, 10 (6.3%) with cardiac form D, 16 (10%) in digestive form and 24 (15%) with cardiodigestive form. We observed higher frequency of the G allele and GG genotype of the *FCNI* SNP rs2989727 in patients ($p=0.004$, $p=0.010$), symptomatic forms ($p=0.008$, $p=0.012$) and cardiac ($p=0.013$, $p=0.013$) when compared to control. As for *EDNI* polymorphisms, we observed a significant association of SNPs rs10478718 and rs5369 with the symptomatic cardiac forms of chronic CD. No significant results were observed in the evaluation of the other SNPs of both genes studied. Our findings show that *FCNI* rs2989727 (c.-1981G>A) polymorphism and SNPs rs10478718 and rs5369 of the *EDNI* gene are associated with CD, possibly influencing the expression of FCN-1 and EDN-1.

Keywords: Chagas disease, *T. cruzi*, polymorphisms, ficolin-1, endothelin-1.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS: Ácido siálico

CCC: Cardiomiopatia chagásica crônica

CONITEC: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde

DC: Doença de Chagas

DAMP: Padrões moleculares associados à danos

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTU: Unidades discretas de tipagem

ECG: Eletrocardiograma

EDN-1: Endotelina 1

EDTA: Ethylenediaminetetraaceticacid

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

FCN1: Ficolina-1 ou M-ficolina

HAI: Hemaglutinação indireta

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HEMEPAR: Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HCV: Vírus da hepatite C

IC: Insuficiência cardíaca

IFI: Imunofluorescência indireta

IL: Interleucina

MAC: Complexo de Ataque à Membrana

MASP: MBL-associada a serino protease

MBL: Lectina ligante de manose

MS: Ministério da saúde

NF-kB: Fator nuclear kB

NYHA: New York Heart Association

OMS: Organização mundial da saúde

OPAS: Organização Pan-americana de saúde

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

SC: Sistema complemento

SUS: Sistema único de saúde

VA: Via alternativa

VL: Via das lectinas

VC: Via clássica

SNP: Polimorfismos de nucleotídeos únicos

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TS: Trans-sialidase

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 JUSTIFICATIVA | 16 |
| 1.2 OBJETIVOS | 17 |
| 1.2.1 Objetivo geral | 17 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 2.1 DOENÇA DE CHAGAS | 18 |
| 2.1.1 EPIDEMIOLOGIA | 19 |
| 2.1.2 O agente causador: Trypanosoma cruzi | 23 |
| 2.2 CICLO/TRANSMISSÃO | 27 |
| 2.3 AS FASES DA DOENÇA DE CHAGAS | 29 |
| 2.3.1 Fase aguda | 31 |
| 2.3.2 Fase crônica | 32 |
| 2.4 DIAGNÓSTICO | 35 |
| 2.5 TRATAMENTO | 38 |
| 2.6 ENDOTELINAS: ENDOTELINA 1 | 40 |
| 2.6.1 EDN-1 e a doença de Chagas | 45 |
| 2.7 SISTEMA COMPLEMENTO | 47 |
| 2.7.1 O sistema complemento e a doença de Chagas | 49 |
| 2.7.2 Via das lectinas | 50 |
| 2.8 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS (SNPs) | 54 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 55 |
| 3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA | 55 |
| 3.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA | 55 |
| 3.3 COLETA DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS | 55 |
| 3.3.1 Critérios de inclusão e exclusão | 55 |
| 3.3.2 Pacientes incluídos nas análises de polimorfismos do gene FCN1 | 56 |
| 3.3.3 Controles incluídos nas análises de polimorfismos do gene FCN1 | 56 |
| 3.3.4 Pacientes - EDN1 | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PARA ANÁLISE DO GENES FCN1 E EDN1 | 60 |
| 3.5 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE SEQUÊNCIA ESPECÍFICA (PCR-SSP) PARA ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE FCN1 | 60 |
| 3.6 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO PARA ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE EDN1 | 63 |
| 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS | 64 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |
| 5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES FCN1 | 66 |
| 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES DO GENE EDN1 | 70 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 72 |
| PERSPECTIVAS..... | 73 |
| REFERÊNCIAS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas (DC), doença tropical negligenciada também conhecida como tripanossomíase americana, identificada em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas na cidade de Lassance, Minas Gerais, Brasil (KROPF; SÁ, 2009). Estima-se que a DC afete cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo com significativo impacto social e à saúde pública, gerando custos globais estimados em US\$ 627,46 milhões/ano (LEE et al., 2013; LIDANI et al., 2019; WHO, 2021). Aproximadamente 12000 mortes/ano são atribuídas a complicações da DC e cerca de 70 milhões de indivíduos encontram-se em situação de risco de contrair a doença nas Américas (PAHO/OPAS, 2022). Nas últimas décadas, muito casos de DC foram reportados em regiões classicamente não endêmicas para a doença, tais como Europa, América do Norte e Austrália, onde a transmissão ocorre principalmente por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (TARLETON, 2016; ANGHEBEN et al., 2015). Apesar da melhoria das moradias e da triagem universal em bancos de sangue que propiciaram controle da transmissão vetorial nas Américas, ainda são estimados cerca de 30 mil novos casos relatados por ano (OPAS, 2021). No cone sul, em áreas endêmicas, a DC é considerada uma relevante causa de doenças cardíacas e mortes relacionadas a problemas cardiovasculares (LIDANI et al., 2019).

Classicamente, a DC se apresenta em duas fases, a fase aguda, logo após o contágio, compreendendo um período de 4-8 semanas, seguida por uma fase crônica classificada nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou, a forma mista, cardiodigestiva (LIDANI et al., 2019; WHO, 2021). A fase aguda é geralmente assintomática ou oligossintomática, entretanto, indivíduos cronicamente infectados podem ter sua qualidade de vida substancialmente impactada pela doença (SOUSA et al., 2015), com perda de produtividade, risco de progressão para insuficiência cardíaca e morte súbita (NUNES et al., 2018) devido às formas sintomáticas da DC e/ou comorbidades associadas (TEIXEIRA et al., 2011; LEE et al., 2013).

A variabilidade genética do hospedeiro é crucial para a manifestação, estabelecimento e progressão clínica da DC (CAMPBELL; WESTENBERGER; STURM, 2004). Fatores genéticos do hospedeiro podem impactar a susceptibilidade de diferentes enfermidades, assim como o desenvolvimento de manifestações clínicas e gravidade das mesmas (OLLIER, 2004). Diferentes

marcadores já foram associados à susceptibilidade genética à DC (LUZ et al., 2013; LIDANI et al., 2019; BALLINAS-VERDUGO et al., 2021).

Diversos trabalhos apontam que o sistema complemento exerce papel fundamental no estabelecimento da DC (CESTARI et al., 2013). No âmbito das ficolinas, ligadas a ativação do complemento pela via das lectinas, a investigação de polimorfismos de ficolina-2 em pacientes com DC demonstrou maior frequência da variante 258S em pacientes com sintomas cardiodigestivos (LUZ et al., 2014) e níveis séricos reduzidos de ficolina-3 foram associados a maior risco de insuficiência cardíaca em pacientes com DC crônica (LIDANI et al., 2021).

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) foram identificados como biomarcadores chave de diversas doenças. SNPs de *FCNI*, especialmente da região promotora, já foram associados a doenças infecciosas e autoimunes, com efeitos protetores ou implicados no processo de inflamação crônica, quando a alta expressão do gene pode levar a ativação excessiva do complemento (CRUYSSSEN et al., 2007; HAERYNCK et al., 2012; PIECZARKA et al., 2020).

Outra molécula possivelmente envolvida na patogênese da DC é a endotelina-1 (EDN-1), codificada pelo gene *EDNI*. A EDN-1 é um marcador pró-inflamatório e vasoconstritor em doenças cardiovasculares, com papel essencial na disfunção endotelial; sendo um agente crítico no processo de agregação plaquetária, inflamação e vasoconstrição (FREEMAN et al., 2014; LIANG et al., 2018; KUCZMARSKI et al., 2021). Pacientes em ambas as fases aguda e crônica da DC apresentam níveis plasmáticos de EDN-1 elevados, bem como alta concentração da proteína foi observada no tecido cardíaco em modelos murinos de DC (PETKOVA et al., 2000; PETKOVA et al., 2001; TUCCI et al., 2020). A variação na expressão genética da EDN-1 tem se mostrado envolvida na disfunção microvascular coronariana (FORD et al., 2020). Em pacientes com DC crônica, observou-se que a disfunção endotelial microvascular sistêmica está associada à redução da fração de ejeção ventricular esquerda (KASAL et al., 2021). Além disso, pacientes com cardiomiopatia chagásica com disfunção cardíaca grave apresentam aumento dos níveis de EDN-1 (PENGUE et al., 2019). A EDN-1 é secretada por cardiomiócitos, fibroblastos, macrófagos, astrócitos e células dendríticas (KEDZIERSKI; YANAGISAWA, 2001; SPIRIG et al., 2009; HOFFMANN et al., 2019). Trabalhos *in vitro* demonstraram que a EDN-1 aumentou a expressão de moléculas pró-inflamatórias (BERILLO et al., 2021) e a deposição de colágeno induzindo fibrose no miocárdio em ratos com cardiomiopatia chagásica crônica (HOFFMANN et al., 2019).

A persistência do parasita na forma amastigota no tecido cardíaco e sua interação com os mecanismos imunológicos de defesa pode resultar em fibrose, comprometendo a capacidade funcional cardíaca. Nesse sentido, a deposição do tecido fibroso caracteriza-se por uma resposta inflamatória do hospedeiro ao parasita em pacientes chagásicos (TANOWITZ et al., 2015). Considerando-se o papel da EDN-1 na proliferação de células musculares lisas (WORT et al.; 2001; KIM et al.; 2015) e na promoção de hipertrofia de cardiomiócitos pela estimulação de receptores acoplados à proteína G, além da ação na expressão gênica e ativação da cascata quinase 1/2 (ERK1/2) (SUGDEN; CLERK, 1998; CULLINGFORD et al., 2008; GIRALDO et al.; 2012), essa proteína tem sido considerada como um potencial alvo terapêutico no manejo da fibrose cardíaca (LEASK, 2010; MANITSOPOULOS et al., 2018). Esses achados demonstram que a EDN-1 participa das alterações de vasculatura aumentando o tônus vascular e a pressão arterial em indivíduos com cardiomiopatia de várias etiologias que vão desde doenças infecciosas, como a DC, até distúrbios endocrinológicos como hipertensão, diabetes mellitus e síndrome de Cushing (KIAN et al., 2021). Portanto, a EDN-1 representa um potencial biomarcador para monitorar o risco cardiovascular e prognóstico em pacientes com DC crônica.

A ausência de biomarcadores de prognóstico e de progressão para a DC, impõe limitações não só no acompanhamento dos pacientes como nos testes de novos medicamentos/avaliação de efetividade dos medicamentos existentes considerando as diferentes fases e formas clínicas da DC (PINAZO et al., 2015).

Considerando que a variabilidade genética entre os indivíduos pode estar relacionada com o desenvolvimento das diferentes apresentações clínicas da DC, assim como ser um fator prognóstico ou preditivo da doença, a hipótese do presente estudo é que polimorfismos nos genes *FCNI* estão associados com a DC e suas diferentes formas clínicas. Hipotetizamos também que polimorfismos no gene *EDNI* estão associados com as formas clínicas, e diferentes estadiamentos da forma cardíaca da DC crônica, possivelmente conferindo susceptibilidade ou proteção à doença. Portanto, a fim de verificar as hipóteses apresentadas, o objetivo deste trabalho foi investigar a associação de três SNPs de *FCNI* (rs2989727, rs17039495 e rs10858293) e quatro SNPs de *EDNI* (rs10478718, rs10478720, rs1800543 e rs5369) com as diversas formas clínicas da DC crônica.

1.1 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente populações negligenciadas em situação de vulnerabilidade econômica e social em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Após 113 anos de seu descobrimento, a DC continua representando uma ameaça à vida dos indivíduos infectados, gerando custos globais em saúde estimados em mais de 3 bilhões de reais por ano. Além disso, a doença impacta diretamente na qualidade de vida dos indivíduos infectados, contribuindo para a manutenção e perpetuação da pobreza, visto que as inúmeras complicações da doença crônica podem dificultar o desenvolvimento educacional e limitar as oportunidades profissionais dos indivíduos infectados, reforçando o ciclo de estigma e exclusão social relacionado à DC.

Sabe-se que fatores genéticos do hospedeiro influenciam tanto a susceptibilidade como a progressão clínica da DC. Porém, apesar de mais de um século de investigação e esforços de diferentes grupos de pesquisa para a compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da DC, seu tratamento continua restrito a duas opções medicamentosas há mais de 50 anos e não existem biomarcadores específicos para o controle de sua progressão clínica.

Desta forma, preencher as lacunas existentes no conhecimento imunopatológico da doença é de suma importância, assim como a busca por novos biomarcadores de progressão que possam auxiliar em melhor acompanhamento dos pacientes com DC crônica.

A disponibilização das informações resultantes desta pesquisa no contexto hospitalar/ambulatorial, poderá contribuir para uma melhor gestão da infecção nos indivíduos afetados com as diferentes formas clínicas da DC crônica, considerando os polimorfismos genéticos estudados nos genes *FCNI* e *EDNI* e suas possíveis associações com a doença, possibilitando melhores prognósticos e controle de sintomas, gerando aprimoramento na qualidade do atendimento e de vida do paciente.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar os polimorfismos nos genes *FCNI* e *EDNI* na DC crônica e suas diferentes formas clínicas.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Investigar a associação entre polimorfismos da região promotora do gene *FCNI* (rs2989727, rs17039495 e rs10858293) e a DC crônica;
2. Avaliar a associação entre os polimorfismos da região promotora do gene *FCNI* (rs2989727, rs17039495 e rs10858293) e as diferentes formas clínicas da DC crônica;
3. Investigar a associação entre polimorfismos do gene *EDNI* (rs10478718, rs10478720, rs1800543) no intron 2, e o SNP rs5369, da região codificante (exon 3), e a DC crônica;
4. Avaliar a associação entre polimorfismos de interesse no gene *EDNI* (rs10478718, rs10478720, rs1800543 e rs5369) e as diferentes formas clínicas da DC crônica.
5. Avaliar a associação entre polimorfismos de interesse no gene *EDNI* (rs10478718, rs10478720, rs1800543 e rs5369) e os diferentes níveis de estadiamento cardíaco nos pacientes com a forma cardíaca da DC crônica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

Dados paleoparasitológicos sugerem que a DC se originou nos primeiros acampamentos na região costeira do Deserto do Atacama no norte do Chile (STEVERDING, 2014). Porém, a identificação do *T. cruzi* como agente etiológico e insetos triatomíneos como vetores da transmissão da doença ocorreu somente no início do século XX (STEVERDING, 2014). Mais de 110 anos se passaram desde a identificação da doença de Chagas em Lassance, interior de Minas Gerais, pelo médico e pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (Figura 1) e, apesar de inúmeras ações efetivas no combate à transmissão da doença através do controle vetorial, conscientização sobre a doença e identificação de infectados em bancos de sangue, a enfermidade se mantém como um grave problema de saúde pública com expressiva morbimortalidade, especialmente na América Latina, onde um total de 6.354.220 indivíduos foram diagnosticados com DC até 2019 (MS, 2021; OMS, 2021; GOMES-OCHOA et al., 2022). A fisiopatologia da DC ainda não foi completamente elucidada, consequências graves como a perda de produtividade relacionada à cardiomiopatia (LEE et al., 2013), morte súbita (NUNES et al, 2018) e diminuição da qualidade de vida dos portadores de DC (SOUSA et al., 2015) estão associadas à doença. Apesar de geralmente apresentar quadros assintomáticos na fase aguda, indivíduos cronicamente infectados podem ter suas vidas seriamente prejudicadas ou até mesmo morrer como consequência de uma das formas clínicas da doença e suas complicações (TEIXEIRA et al 2011). Em maio de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o dia 14 de abril como o Dia Mundial da Doença de Chagas, data no ano de 1909 em que o pesquisador Carlos Chagas diagnosticou o primeiro caso humano da doença em uma menina de dois anos chamada Berenice (OMS, 2019).



FIGURA 1. O cientista brasileiro que identificou o protozoário *T. cruzi* como o agente causador da DC, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, em seu laboratório no Instituto Federal de Soroterapia em Manguinhos no Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Wikimedia commons.

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que a DC afeta de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, causando incapacidade e sofrimento principalmente em populações vulneráveis (OMS, 2021). A doença, inicialmente quando restrita às Américas afetava especialmente zonas rurais (SCHMUNIS, 2007). Porém devido às constantes migrações populacionais, a DC se alastrou para regiões urbanas e outros continentes (Figura 2), com casos notificados ao redor do mundo, em países considerados não endêmicos como Espanha, Austrália, Nova Zelândia, Japão e EUA (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; LIDANI et al., 2019). A DC ainda é considerada uma doença endêmica e relevante preocupação de saúde pública em pelo menos 21 países da América Latina, tais como Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai, and Venezuela (ROJAS

et al., 2018; MIRANDA-ARBOLEDA et al, 2021; WHO, 2022). Na América Latina, um total de 6.354.220 indivíduos tiveram diagnóstico de DC até 2019, representando uma taxa de prevalência de 933,76:100.000 habitantes (GOMES-OCHOA et al., 2022). O internamento anual de pacientes devido à doença e suas complicações aumentou 6,8% nos anos 2002-2017 entre mulheres em idade reprodutiva nos EUA, país que apresenta mais de 325 mil indivíduos com DC (LIDANI et al., 2019; IKEDIONWU et al, 2020). Atualmente, a Espanha representa o país europeu com o maior número de pacientes infectados (ACOSTA et al., 2020). Assim, a doença passou a ser considerada um problema de saúde pública mundial (RASSI; RASSI; MARINS-NETO, 2010).

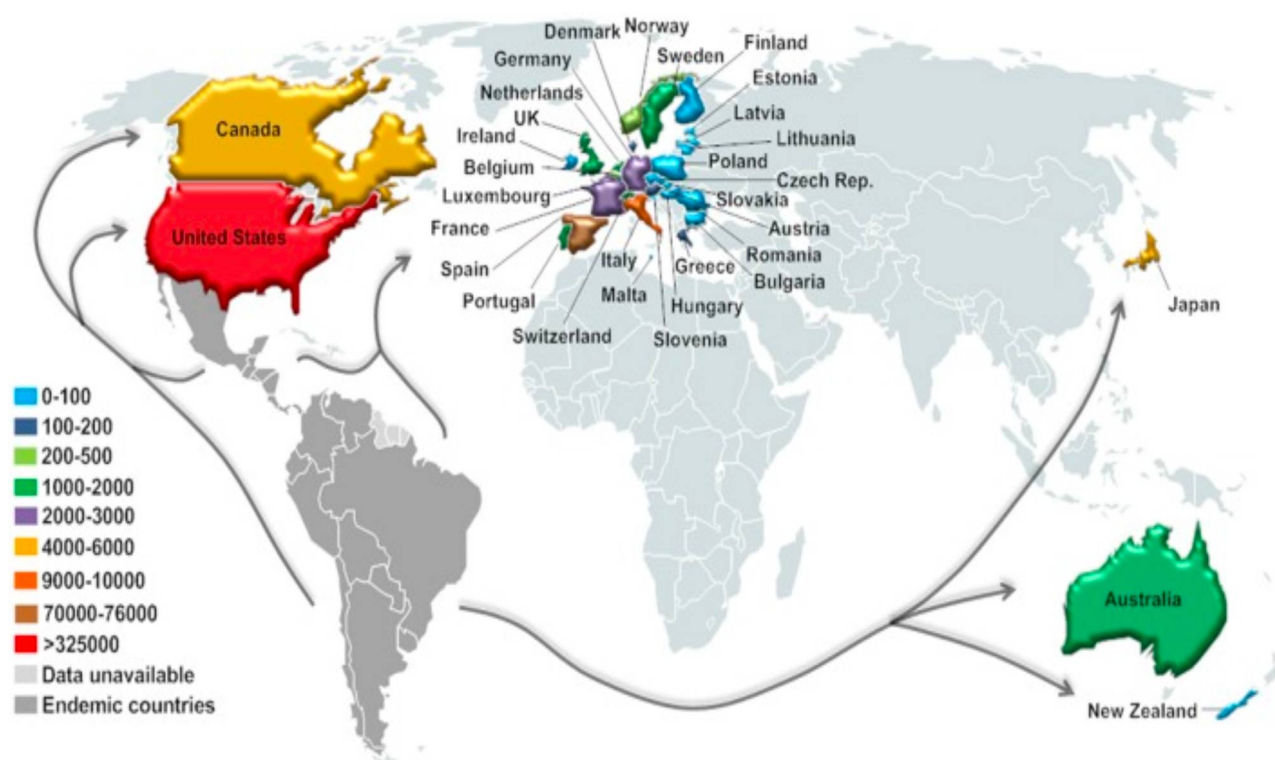


FIGURA 2. Número estimado de imigrantes com infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos. Fonte: LIDANI et al. (2019).

Estima-se que, devido à transmissão materno-infantil, cerca de 8 mil bebês nascem com a DC por ano nas Américas (OPAS, 2021). Desta forma, a detecção, busca ativa e tratamento de mulheres em idade fértil se apresenta como uma ação fundamental para o controle da DC, juntamente com a triagem de recém-nascidos e irmãos de mães infectadas em tratamento prévio com medicamentos antiparasitários (WHO, 2022).

A DC é endêmica no Brasil e representa um importante problema de saúde pública em mais de 21 países (ROJAS et al., 2018). Afeta entre 1,0-2,4% da população brasileira (DIAS et al., 2016), número estimado de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas no país (HOTEZ; FUJIWARA, 2014; MARTINS-MELO et al., 2014). Análise dos casos de doença de Chagas aguda notificados entre 2001 e 2018 (5.184 casos) mostra que a distribuição do espaço-tempo da doença nesse período foi heterogênea no Brasil. Com taxa de incidência anual de 0,16/100.000 habitantes, identificando rápido aumento das notificações antes de 2005, uma queda estável entre 2005 e 2009, seguido por um aumento das notificações após 2009 (SANTOS et al., 2020). A maior frequência de infecção foi observada em crianças, adolescentes e adultos da região Norte, durante todo o período do estudo. Já entre 2001 e 2009 na região nordeste, registrou-se maior frequência em mulheres e em pessoas de 20 a 64 anos. A transmissão vetorial foi a principal forma de transmissão até 2005, enquanto a transmissão oral registrou um aumento significativo no Norte nos demais períodos de tempo. O norte do Pará foi identificado como responsável por 81% dos casos causados pela transmissão oral na região Norte do país, com maiores taxas de casos ocorridos após a colheita de açaí, após a ingestão de produtos derivados da fruta, contaminados com excretas do inseto barbeiro (SAMPAIO et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

Assim, embora a ocorrência da DC tenha caído em todo o Brasil, foram registradas 1746 mortes onde a DC foi relatada como causa básica no período março a agosto de 2020, 146 novos casos de doença de Chagas aguda com uma letalidade de 2% foram relatados neste ano sendo 75,34% decorrentes da transmissão via oral com maior incidência na região norte do país (SVS-MS, 2021). Em 2020 foi verificada redução de 47% no registro de casos suspeitos e 63% de casos confirmados em relação ao ano anterior (2019) no Brasil, tal redução pode estar relacionada a possível subnotificação decorrente da situação de pandemia de COVID-19 (SVS-MS, 2021). Na região central-norte do Paraná, na cidade de Maringá, sul do Brasil, a transmissão vetorial se mostrou prevalente, representado ter sido a causa de 91% dos casos em estudo com 270 paciente com DC, 60% dos pacientes tinha 65 anos ou mais, nesta população 30% dos casos se enquadraram na forma indeterminada da DC e 70% em uma de suas formas sintomáticas, a maioria dos paciente com até 54 anos passou por tratamento etiológico, enquanto pacientes com 55 ou mais em sua maioria não foram tratados (GASPARIM et al., 2018). Outro estudo, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando 237 pacientes chagásicos atendidos na capital paranense, Curitiba, mostrou um perfil semelhante com

64% dos pacientes com DC apresentando sintomas cardíacos e/ ou digestivos e uma idade média de 57.7 anos, os autores ressaltam a situação de vulnerabilidade social do grupo analisado e a alta prevalência de comorbidades (LIDANI et al., 2020).

Registros de 1980 indicavam a prevalência da DC no Paraná de 4% (BOZELLI et al., 2006). Entretanto, estudos mais recentes mostram dados de prevalência da infecção na região de 0,003%, indicando a efetividade dos esforços para o controle endêmico da transmissão vetorial no estado (DIAS et al., 2016). Estima-se que em 2020, existiam 819.351 e 1.927.885 pessoas com a forma indeterminada da DC, entre 409.676 a 963.943 pessoas diagnosticadas com a forma cardíaca e entre 136.559 e 321.314 com a forma digestiva da doença no Brasil (SVS-MS, 2021). Em 2019, foram relatados por indivíduos com 18 anos ou mais, 47322 diagnósticos médicos de DC no Paraná (Figura 3) (SVS-MS, 2022).

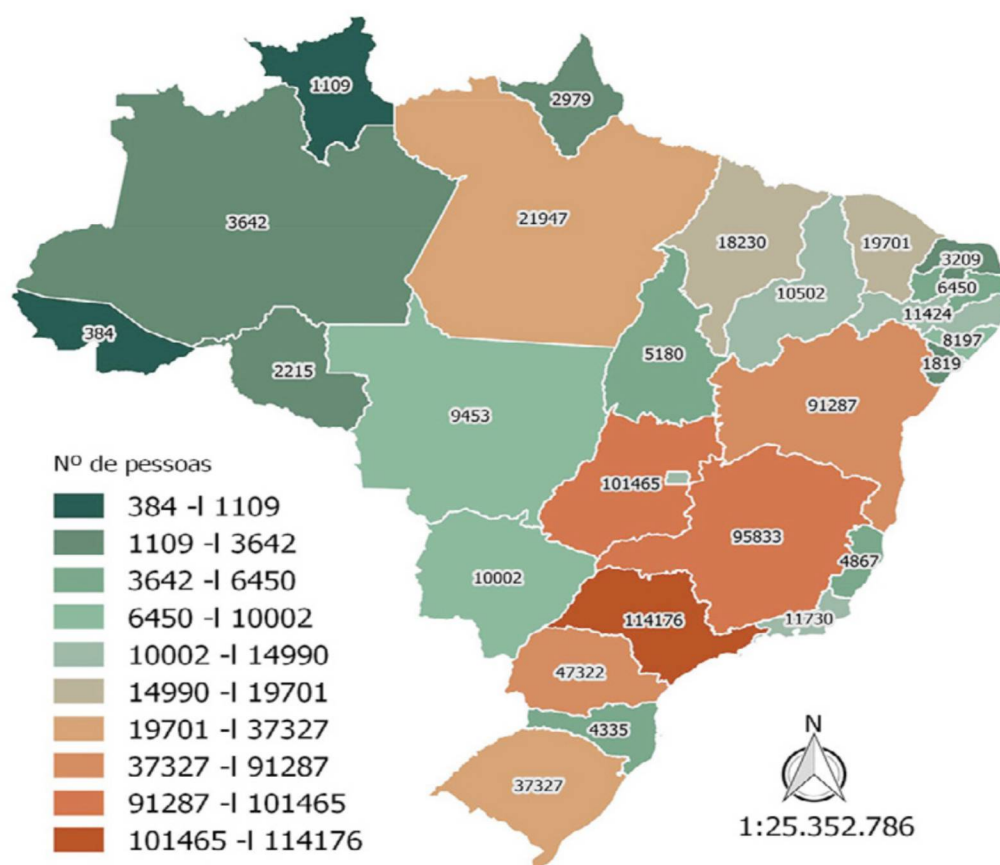


FIGURA 3. Unidades federadas do Brasil e o número de relatos de diagnósticos médicos de DC por pessoas com 18 anos ou mais na pesquisa nacional de saúde de 2019. Fonte: Boletim Epidemiológico

da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, Brasil, SVS-MS (2022).

O GBD 2019 apontou que o número de mortes por DC no Brasil diminuiu de 7.903 em 1990 para 6.523 em 2019, representando 1,6% de todas as mortes cardiovasculares no país (OLIVEIRA et al, 2022). O Brasil foi o país com o maior número de óbitos por DC no período analisado (GOMES-OCHOA et al., 2022).

2.1.2 O agente causador: *Trypanosoma cruzi*

O parasito *T. cruzi*, agente causador da DC, é um protozoário hemoflagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (Figura 4A) que se caracteriza morfológicamente pela presença de um flagelo e uma região particular na mitocôndria, chamada cinetoplasto, onde se encontra o DNA mitocondrial (kDNA) (KAUFER et al., 2017). O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve diferentes formas morfológicas, abrigadas em hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados, durante o desenvolvimento do parasito (CONTRERAS et al., 2002; DE SOUZA, 2009; SANDRI et al., 2020).

Quando os vetores invertebrados se alimentam do sangue de vertebrados infectados ingerem a forma tripomastigota, forma com mais mobilidade do que a epimastigota. Essas tripomastigotas passam das glândulas salivares para o intestino dos insetos, onde ocorre a metaciclogênese, diferenciação em epimastigotas que se multiplicam através de reprodução assexuada (fissão binária). A forma epimastigota é alongada, tem cerca de 20-40 mm de comprimento e 2-5 mm de largura), nela o cinetoplasto está anterior ao núcleo, na região central do parasito (Figura 4B e C). O flagelo emerge da porção central com uma membrana ondulante curta. Após a replicação, as epimastigotas migram para a porção terminal do intestino, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (SANDRI et al., 2020).

Na forma tripomastigota (Figura 4D e E), o cinetoplasto se localiza posteriormente em relação ao núcleo, na porção terminal do corpo do parasito. O flagelo emerge da região posterior e percorre o corpo do parasito. O flagelo encontra-se aderido à superfície do parasito formando uma membrana ondulante até a porção anterior onde o flagelo se torna livre. A membrana ondulante

melhora a mobilidade do protozoário. A forma tripomastigota é infectante e pode ser encontrada no trato digestivo de insetos e no sangue humano. A forma tripomastigota metacíclica com extensão corporal de cerca de 25mm de comprimento e 2 mm de largura, encontrada no intestino dos vetores, é responsável pela infecção em humanos. As tripomastigotas metacíclicas rompem a pele e através da corrente sanguínea infectam diferentes tecidos, principalmente, músculos, tecidos hepático e nervoso (SANDRI et al., 2020).

A amastigota é a forma proliferativa intracelular em hospedeiros vertebrados, esférica, sem flagelo proeminente, não tem mobilidade, com cerca de 2-7mm e cinetoplasto próximo ao núcleo (Figura 4F e G). A divisão das amastigotas começa cerca de 24h após a infecção pela forma tripomastigota. A divisão binária se inicia com um aumento gradual do corpo do parasito, surgindo dois corpos basais, iniciando a divisão do cinetoplasto com modificações e, posterior condensação, da cromatina nuclear. Um novo flagelo se forma. O núcleo adquire um aspecto alongado, ocorre a constrição no centro, surgindo uma célula com dois núcleos e dois cinetoplastos. Seguida por uma constrição no citoplasma que leva a separação da nova forma do parasito. Este processo ocorre a cada 14h, podendo variar de acordo com a cepa, célula hospedeira, e temperatura. Após cerca de 9 divisões, as amastigotas sofrem diferenciação em tripomastigotas, processo sincrônico, conhecido como metaciclogênese, que se inicia com o crescimento do flagelo e mudanças estruturais no cinetoplasto. No final deste ciclo intracelular, um grande número de tripomastigotas é formado, devido à intensa mobilidade as tripomastigotas rompem a célula hospedeira e ocorre sua liberação para o meio extracelular (DE SOUZA, 2009; TONELLI et al., 2010; MARTINS et al., 2012; GONÇALVES et al., 2018, SANDRI et al., 2020).

O *T. cruzi* apresenta células eucarióticas com algumas especializações nos diferentes estágios morfológicos relacionados à funções vitais e ao sucesso na infecção de seus hospedeiros. A superfície celular apresenta glicoconjugados e componentes estruturais da membrana plasmática associados, esse padrão molecular é essencial para a interação entre parasita e hospedeiro, assim como, interfere na resposta imunológica do hospedeiro e abaixo da membrana plasmática existe uma distribuição helicoidal de microtúbulos, fundamental para a forma e locomoção do protozoário (DE SOUZA, 2009; de SOUZA et al., 2010a; DAS NEVES et al., 2020). (de Souza, 2009).

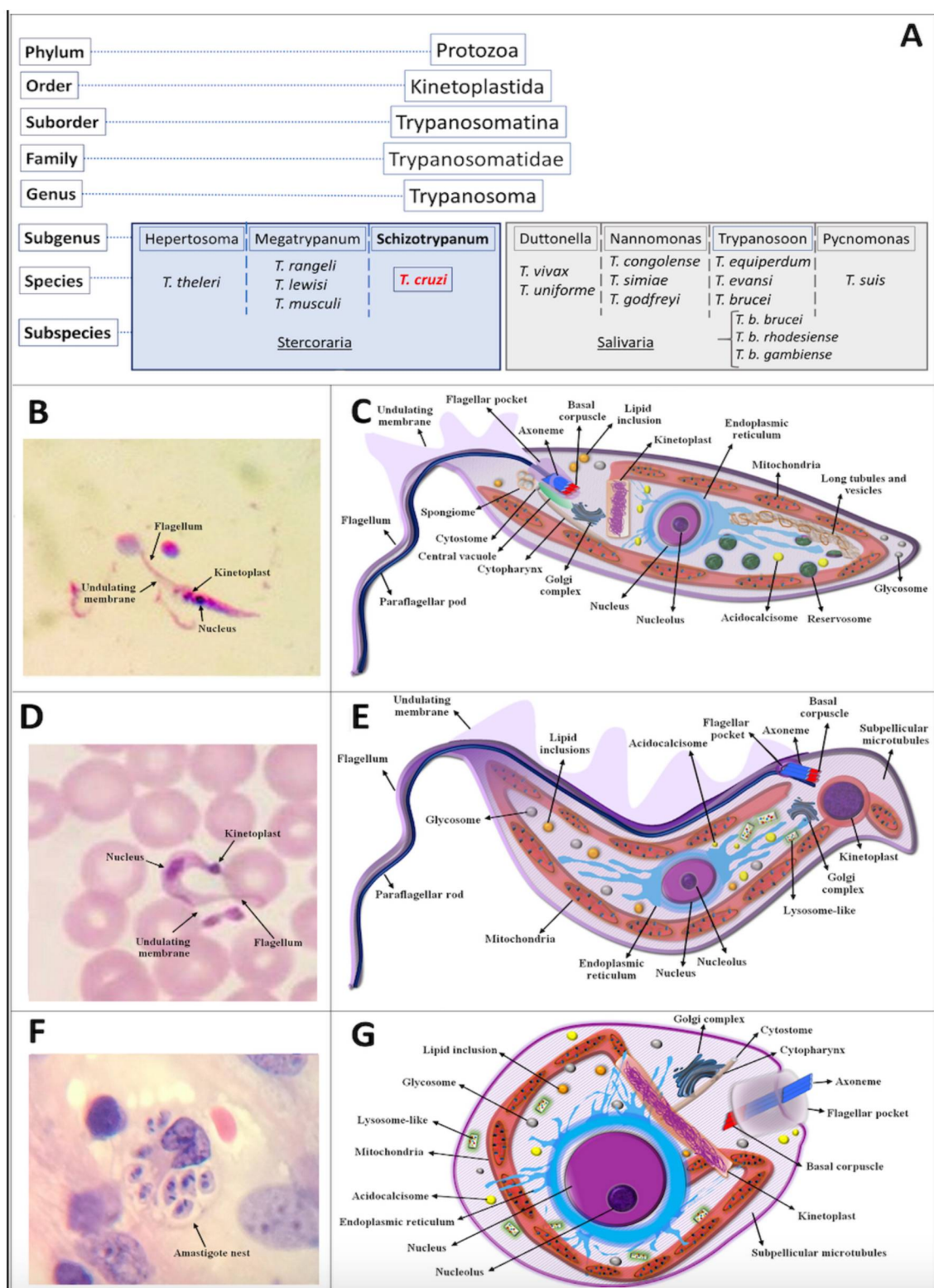


FIGURA 4. Classificação taxonômica e ultraestrutura dos diferentes estágios do *T. cruzi*. (A) Classificação taxonômica *T. cruzi*. (B) Coloração Giemsa - *T. cruzi* epimastigotas. (C) Ilustração esquemática da forma epimastigota e suas organelas. (D) *T. cruzi* forma tripomastigota em um esfregaço de sangue fino corado com Giemsa. (E) Ilustração esquemática da forma tripomastigota

e suas organelas. (F) Ninho de amastigotas em corte de tecido cardíaco corado com hematoxilina e eosina. (G) Ilustração esquemática da forma amastigota e suas organelas.
Fonte: Adaptado de Sandri et al. (2021).

O flagelo emerge da bolsa flagelar tendo comprimento variável durante as diferentes fases do ciclo de vida do parasito, confere habilidade de locomoção e auxilia na adesão inicial do parasito nas células hospedeiras. No citoplasma do *T. cruzi*, algumas estruturas são importantes para a manutenção do metabolismo do protozoário. Nas formas amastigotas e epimastigotas, próximo ao flagelo, encontra-se o citóstoma, uma porção especializada da membrana plasmática que internaliza e metaboliza macromoléculas para a sobrevivência do parasito e apresenta o reservossomo, uma organela pré-lisossomal, vital durante a metaciclogênese, que armazena macromoléculas oriundas do citóstoma (DE SOUZA, 2009).

Apresenta também glicossomos, organelas relacionadas o metabolismo de peróxidos, oxidação de ácido graxos, síntese de fosfolipídeos, fixação de dióxido de carbono, biossíntese de pirimidinas, reciclagem de purinas, alongamento de ácidos graxos e biossíntese de esteróis (DE SOUZA, 2009). Muitas dessas etapas de metabolismo vêm sendo estudadas como potenciais alvos para novos tratamentos (SANDRI et al., 2020).

O acidocalcisoma é uma organela ácida semelhante a um vacúolo com alta concentração de fósforo na forma de pirofosfato ou polifosfato, também, íons, como sódio, potássio e zinco. Tem como função regulação do pH citoplasmático, osmorregulação, estocagem de íons e compostos fosfatados (DOCAMPO et al., 2005; DOCAMPO et al., 2011). Estudos citoquímicos mostram a presença de H⁺ ATPase, Ca²⁺ ATPase e pirofosfato na membrana do acidocalcisoma. A quantidade dessas organelas varia conforme a forma do parasito, sendo relativamente maior nas amastigotas (BENCHIMOL et al., 1998).

Outra estrutura ímpar, é o cinetoplasto, composto por um DNA circular extranuclear organizada em uma rede de minicírculos e maxicírculos associados, conhecida como DNA do cinetoplasto (kDNA) (DE SOUZA, 2003; CAVALCANTI et al., 2009). A localização no citoplasma e a morfologia estrutural do cinetoplasto definem o estágio morfológico do protozoário (RIOU; YOT, 1977). Nas formas epimastigota e amastigota, o cinetoplasto se apresenta compactado na região posterior ao núcleo e anterior ao flagelo, já na forma tripomastigota o cinetoplasto tem uma forma arredondada e menos compactada, localizado na porção anterior tanto do flagelo como do núcleo (RIOU; YOT, 1977). O ciclo do kDNA é similar ao sistema de

replicação bacteriana, o que implica no uso de antibióticos como alternativa terapêutica contra a infecção causada pelo parasito (SANDRI et al, 2020). A presença de estruturas multivesiculares derivadas da membrana plasmática, conhecidas como exossomos, no *T. cruzi* foi reportada em diversos estudos. Essas organelas, presentes em diversas células eucarióticas, contêm proteínas, enzimas, ácido nucleico, RNA entre outras moléculas. No *T. cruzi* podem estar relacionadas à transmissão de sinais do parasito, facilitação da infecção das células hospedeiras e indução da resposta inflamatória no hospedeiro infectado (COLOMBO et al., 2014; LOVO-MARTINS et al., 2018; DE SOUZA; BARRIAS, 2020).

2.2 CICLO/TRANSMISSÃO

O agente causador da DC, o *T. cruzi*, tem seu ciclo de transmissão (Figura 5) iniciado com a deposição de fezes do vetor triatomíneo, durante o repasto sanguíneo. Nas excretas do inseto encontra-se o parasito na forma tripomastigota que acessa o organismo através do contato com a pele lesionada ou mucosas.

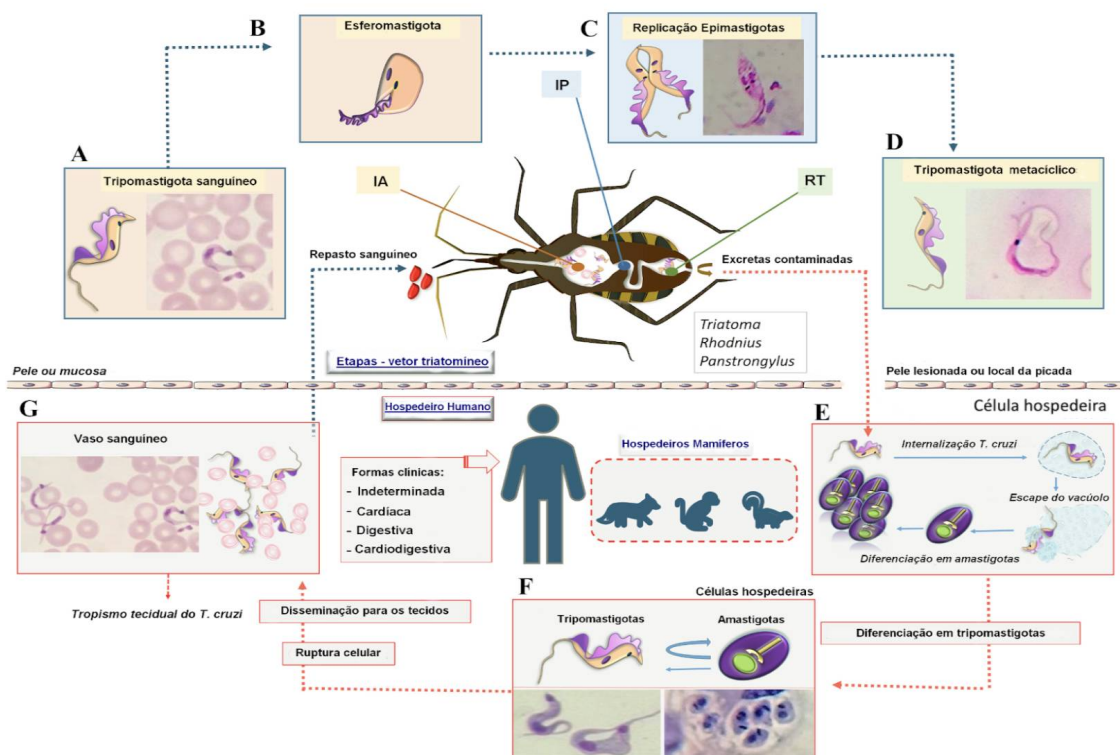


FIGURA 5. O ciclo da doença de Chagas. Adaptado pelo autor de SANDRI et al. (2021).

Os insetos hematofagos triatomíneos, como o *Triatoma infestans*, são os principais vetores da doença. O *Triatoma brasiliensis* (Figura 6), conhecido como barbeiro, é o principal vetor da DC no nordeste Brasileiro (DALE et al., 2019; LILIOSO et al., 2020). Apesar de muitos países, através de iniciativas governamentais, terem alcançado o controle da transmissão vetorial, os parasitos *T. cruzi* ainda são transmitidos principalmente pelo contato com fezes/urina de insetos de triatomíneos infectados em áreas endêmicas (SCHOFIELD et al., 2009). Esses vetores carregam os protozoários e normalmente vivem na parede ou rachaduras do telhado de casas e construções peridomiciliares, como galinheiros, gaiolas e armazéns, em ambientes rurais ou suburbanos (DE LANA; MACHADO, 2017; OMS, 2020).



FIGURA 6. *Triatoma brasiliensis*, principal vetor da DC no nordeste do Brasil. Fonte: Wikimedia commons.

Durante o processo de repasto sanguíneo, o inseto deposita excretas contendo os parasitos no local da picada. Quando o indivíduo instintivamente coça a pele, promove a entrada do *T. cruzi*, presente nas excretas do inseto vetor, através da pele e/ou mucosa lesionadas. Cerca de 140 espécies de Triatomíneos, amplamente distribuídos nas Américas, são capazes de transmitir o *T. cruzi* (WHO, 2020).

A transmissão também pode ocorrer pelo consumo de alimentos ou bebidas contaminados;

transplante de órgãos de doadores infectados; doação de sangue; acidentes laboratoriais; e transmissão vertical quando uma mãe infectada transmite a doença para seu recém-nascido durante a gravidez ou parto (OLIVEIRA et al., 2010; LIU et al., 2015; LUQUETTI et al., 2015). A via sexual também deve ser considerada um risco possível para humanos, devido ao potencial de contaminação via mucosas e considerando que a transmissão sexual já foi demonstrada em modelos animais (ARAUJO et al., 2017; RIOS et al., 2018). Assim, considerando a transmissibilidade do parasito através de amostras biológicas, segue essencial a triagem em bancos de sangue e tecidos para exclusão de potenciais doadores infectados e contenção da transmissão do parasito.

A transmissão oral, através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas por insetos triatomíneos infectados ou suas excretas contendo o protozoário, tem chamado a atenção nas últimas décadas devido a surtos recorrentes envolvendo alimentos e bebidas contaminados pelo *T. cruzi* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2012; MUNOZ-CALDERON et al., 2013; CIELO et al., 2017; PACHECO et al., 2021).

2.3 AS FASES DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas se apresenta em duas fases, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, podendo apresentar sintomas inespecíficos ou, raramente, sintomas mais graves com potenciais sintomas cardíacos ou neurológicos. Lesão específica, conhecida como chagoma (Figura 7A), pode se desenvolver em torno do local de repasto sanguíneo devido a inflamação local causada pela inoculação dos protozoários na pele do hospedeiro humano. Pode ocorrer também edema unilateral nas pálpebras, chamado sinal de Romanã (Figura 7B), decorrente da entrada do parasito via mucosa ocular em cerca de 10-20% dos casos (ROSSI; RAMOS; BESTETTI, 2003).

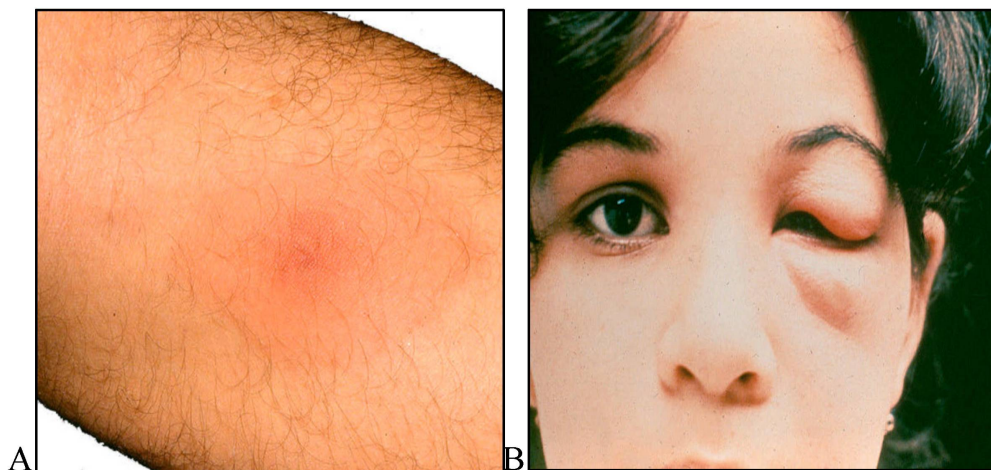


FIGURA 7. A) Chagoma de inoculação. B) Sinal de Romanã. Fonte: Adaptado pelo autor de Rossi; Ramos; Bestetti (2003).

A maioria dos casos agudos se resolve em algumas semanas progredindo para a forma crônica subclínica da doença, a forma indeterminada (assintomática). A doença pode sofrer reativação a partir da forma indeterminada em pacientes coinfectados com HIV ou pacientes imunossuprimidos (CZECH et al., 2021). A progressão para as formas crônicas sintomáticas pode ou não ocorrer mesmo décadas após a infecção inicial, gerando comprometimento cardíaco, gastrointestinal ou ambos. A invasão do músculo liso pela forma amastigota do parasito pode levar ao desenvolvimento de megasíndromes, como a cardiomegalia, megaesôfago e megacólon. Assim, as inúmeras complicações decorrentes da evolução da doença podem gerar graves limitações na vida dos indivíduos infectados ou mesmo serem fatais (SIMOES et al.; 2018). A figura 8 resume a história natural da DC a partir da exposição ao *T. cruzi* até o desenvolvimento de suas formas clínicas.

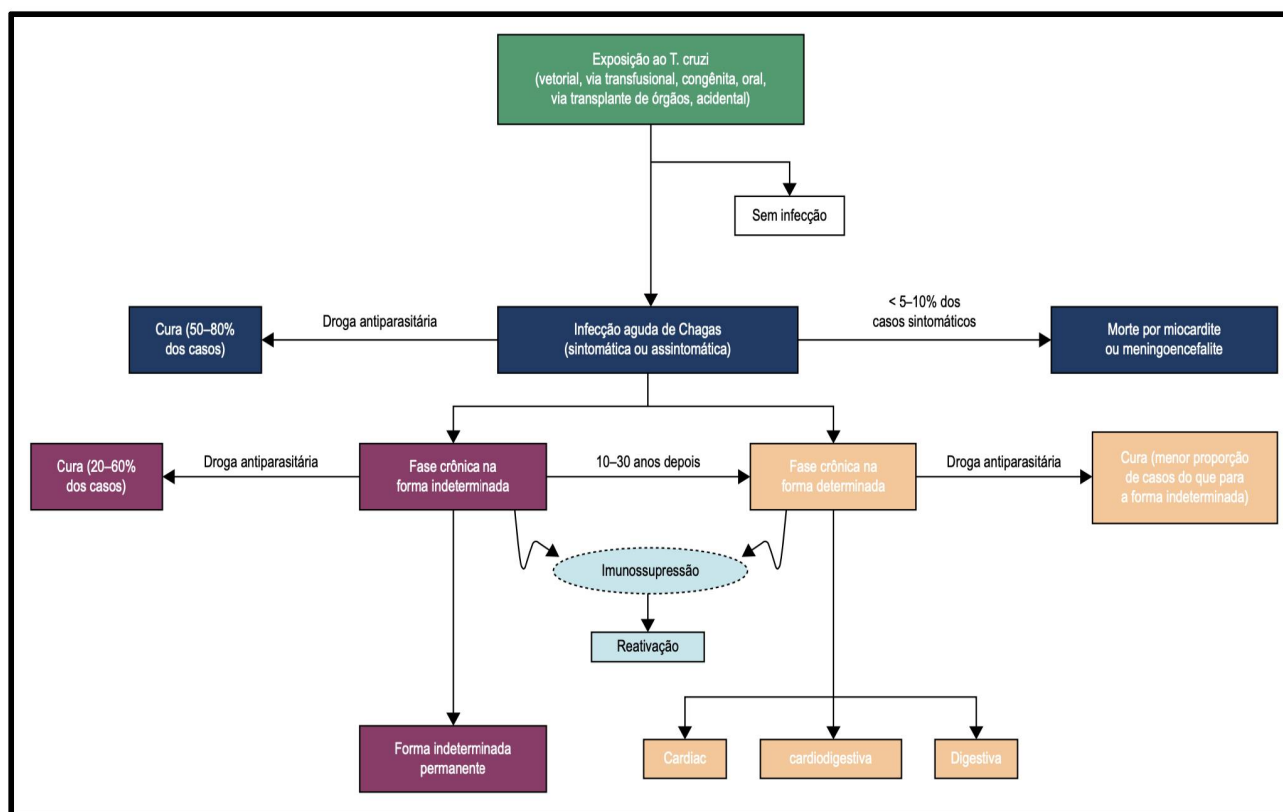


FIGURA 8. História natural da DC. Fonte: Simões et al. (2018).

2.3.1 Fase aguda

A fase aguda, onde ocorre extensa replicação do parasito no sangue do hospedeiro, portanto caracterizada por alta parasitemia, se inicia com 1-2 semanas do contato inicial com a forma tripomastigota do *T. cruzi*. A contaminação, geralmente, ocorre através do contato do indivíduo com o *T. cruzi* a partir da quebra da integridade da pele causada pela picada de um inseto triatomíneo infectado com o protozoário. Durante o processo de alimentação do inseto ocorre o depósito de fezes contendo a forma tripomastigota do parasito. A infecção pode resultar também de contaminação via oral, transplante de órgãos, transfusão sanguínea ou mesmo reativação em indivíduos cronicamente infectados em decorrência de episódios de imunossupressão (LIDANI et al, 2019). Essa fase pode durar cerca de 4-8 semanas sendo normalmente assintomática, porém podem ocorrer sintomas

inespecíficos como dor de cabeça, mal estar geral, diarreia e dores musculares (WHO, 2021). A ausência ou inespecificidade dos sintomas pode dificultar a identificação da infecção, consequentemente o diagnóstico e tratamento, visto que a fase inicial pode passar despercebida. Sinais específicos, resultantes da inoculação do parasito, como o chagoma (lesão cutânea) ou o sinal de Romana (inchaço arroxeadado unilateral na pálpebra), ocorrem em menos de 50% dos infectados pelo inseto triatomíneo (OMS, 2021). Casos agudos graves são raros, acometendo menos de 1% dos infectados (ACQUATELLA, 2007; BERN, 2015; DIAS et al., 2016). Entretanto, quando casos agudos graves ocorrem, acompanham elevado risco de mortalidade (ACQUATELLA et al., 2018). A via de transmissão oral tem sido vinculada a maior gravidade na fase aguda e mortalidade quando comparada à transmissão vetorial, hipotetiza-se que alterações nas glicoproteínas da superfície parasitária devido a exposição ao ácido gástrico na contaminação oral aumenta a capacidade invasiva do *T. cruzi* (COVARRUBIAS et al., 2007; YOSHIDA et al., 2008).

2.3.2 Fase crônica

Após o período de 4-8 semanas, ocorre o controle da replicação do parasito pelo sistema imune do infectado com redução do número de parasitos presentes na circulação periférica e o fim das possíveis manifestações clínicas agudas. Esta fase é classificada principalmente em 4 formas clínicas distintas: forma indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. A forma indeterminada é caracterizada pela ausência de sintomas e de alterações em exames, como o eletrocardiograma (ECG), radiografia do tórax, esôfago e cólon (RASSI et al., 2010; LIDANI et al., 2019). Estima-se que dos pacientes cronicamente infectados, 60-70% não apresentarão acometimento clínico em órgãos resultante da infecção pelo *T. cruzi*, caracterizando a forma clínica indeterminada da DC; porém, 30-40% dos indivíduos portadores da doença crônica apresentarão as formas cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas (RASSI et al., 2010).

2.3.2.1 Forma cardíaca

A cardiopatia chagásica é a principal complicação clínica, responsável pela alta

morbimortalidade resultante da infecção pelo *T. cruzi*, com relevante impacto econômico e social (DE BONA et al.; 2018; LIDANI et al., 2019).

O *T. cruzi* apresenta diferentes estratégias de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, permitindo sua persistência e o estabelecimento da infecção crônica que resulta no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica. Os potentes estímulos imunológicos gerados pela persistência do parasita podem resultar em danos teciduais e resposta inflamatória exacerbada (DE BONA et al., 2018). Os sintomas podem aparecer décadas após a infecção, e a instalação da insuficiência cardíaca crônica, habitualmente, ocorre 20 anos ou mais após a infecção inicial (BERN, 2015). Em alguns casos pode ocorrer o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). A CCC, causa comum de miocardite em todo o mundo, é considerada a manifestação mais grave da DC e também a mais fibrosante (BOGLIOLO et al., 1996; FELDMAN et al., 2000) e é caracterizada, frequentemente, por disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, anormalidades na motilidade da parede, bradicardia, taquiarritmia, cardiomegalias, aneurisma, insuficiência cardíaca e morte súbita (RASSI; RASSI; RASSI, 2001; ROJAS *et al.*, 2018; SOUSA JÚNIOR *et al.*, 2017). Pacientes com CCC necessitam de tratamento extensivo e cauteloso que inclui medicamentos e procedimentos intervencionais, como marcapassos, cardioversores implantáveis (CID), ablações e transplante de coração, resultando em uma elevada carga econômica (MORA, 2016; STANAWAY et al., 2015).

Além disso, a CCC apresenta um prognóstico reservado que leva a mais morbidade e mortalidade nas Américas do que qualquer outra doença parasitária (PEREIRA; NAVARRO, 2013). As comorbidades que acompanham a CCC incluem tromboembolismo (MARIN-NETO et al., 2007; TANOWITZ et al., 2015) e alta prevalência de hipertensão arterial sistêmica (HAS), principal causa de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares globais (Zhou et al., 2018). A HAS foi destacada como a comorbidade mais comum na população chagásica de um hospital comunitário no Sul do Brasil, afetando 64% dos pacientes de Chagas (LIDANI et al., 2020). Além disso, a comorbidade mais prevalente em pacientes com DC em área endêmica no Nordeste do Brasil (MEDEIROS et al., 2022).

Estima-se que entre 20-40% dos indivíduos infectados podem desenvolver cardiomiopatias, apresentando alterações eletrocardiográficas, arritmias, síncope, anomalias no ecocardiograma, insuficiência cardíaca, disfunções ventriculares e fibrilação atrial (BERN, 2015; PELLEGRINI et al., 2015). O acometimento cardíaco pode ocorrer com ou sem disfunção

ventricular global. Comumente, ocorrem manifestações arrítmicas junto ao quadro congestivo, entretanto alguns indivíduos apresentam arritmias e distúrbios de condução intraventricular/atrioventricular, porém a função ventricular se mantém normal (KASHIWABARA et al., 2013). A apresentação clínica biventricular é a mais frequente. As principais queixas apresentadas pelos pacientes com acometimento cardíaco são: fraqueza, dor torácica (angina típica) e dispnéia. A fibrilação atrial é comum em estágios mais avançados, contribuindo para manifestações tromboembólicas sistêmicas, ocorrendo também dilatação ventricular e aneurismas. A progressão da insuficiência cardíaca resulta em piores prognósticos (KASHIWABARA et al., 2013; SIMÕES et al., 2018).

2.3.2.2 Forma digestiva

A infecção crônica em sua forma digestiva, caracterizada principalmente pelo acometimento do esôfago e do intestino grosso, também pode afetar glândulas salivares, estômago, intestino delgado, vesícula biliar e árvore biliar, além de ocasionar as mega síndromes, como megaesôfago e/ou megacólon (MATSUDA et al., 1995; MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009). O envolvimento esofágico pode ter manifestações desde distúrbios de motilidade leve, disfagia, dor epigástrica, regurgitação e, em casos graves, desnutrição até o megaesofago. O acometimento do intestino pode envolver o segmento sigmóide, reto ou cólon descendente, ou uma combinação destes, e produz obstipação prolongada, distensão abdominal, obstrução intestinal decorrente da presença de volvo de sigmóide ou fecalomas, isquemia intestinal ou megacólon (BERN et al., 2020). Durante a fase crônica da DC, o megacólon é identificado clinicamente por constipação lenta e progressiva (DE OLIVEIRA et al. 1998). Lesões nos neurônios da cadeia parassimpática do plexo intramural (musculatura lisa) que ocorrem devido a presença do parasito são responsáveis pelo dano na forma digestiva, conseqüentemente levando a alterações peristálticas, alteração do fluxo de alimentos no sistema gastrointestinal e acalásia. Assim, a doença promove alterações que geram obstáculos para um correto esvaziamento digestivo, ocorrendo estase, atonia e dilatação dos segmentos que promovem a formação do megaesôfago e/ou megacólon. As lesões crônicas do sistema nervoso entérico levam a hipercontração de fibras musculares, resultando em hipomotilidade do sistema digestivo e dilatação

dos órgãos (DE OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; PINAZO et al., 2010). Para o diagnóstico da forma digestiva, são considerados os exames radiológicos esofágicos e enema de bário, além de observação visual e medidas de cólon e reto sigmóide (MATSUDA et al., 2009; LIDANI et al., 2020).

2.3.2.3 Forma cardiodigestiva

A forma cardiodigestiva se caracteriza pela associação do acometimento cardíaco e digestivo, tem prognóstico limitado e se mostra menos frequente que a forma cardíaca em diferentes regiões do Brasil (ANDRADE et al., 2015; LIDANI et al., 2020).

2.4 DIAGNÓSTICO

A doença de Chagas é diagnosticada através de métodos que indicam a presença do *T. cruzi* de forma direta ou indireta em amostras biológicas. A fase da doença determina o método a ser utilizado (Figura 9). Na fase aguda, caracterizada por alta parasitemia, a visualização direta é facilitada, já métodos indiretos (sorológicos) são mais indicados na fase crônica devido à baixa parasitemia (BRASIL et al., 2010). Os principais métodos diagnósticos para identificação do *T. cruzi* são: parasitológico, sorológico e molecular. Os métodos parasitológicos visam visualizar a presença de tripomastigotas, comumente encontrados na circulação periférica 4-8 semanas após o início da infecção, em amostras de sangue fresco por exame microscópico (DIAS; COURA, 1997; BECERRIL et al., 201; PEREZ-MOLINA et al., 2015). Os métodos imunológicos ou sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio de hemaglutinação indireta (HAI), baseiam-se na busca de anticorpos anti-*T. cruzi*, IgM e IgG, dependendo da fase da infecção, no sangue do paciente (GUHL, 2007; BRASIL et al., 2010). Para a confirmação do diagnóstico da DC, recomenda-se a aplicação de pelo menos duas metodologias sorológicas diferentes, e, em caso de resultados divergentes, um terceiro método para confirmação do diagnóstico (SGUASSERO et al., 2015; WHO, 2020). A detecção do DNA do parasito utilizando

ferramentas de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e Western Blot, pode ser uma alternativa complementar sensível e específica para a DC, porém sua implementação em regiões endêmicas em grande escala permanece limitada, devido à complexidade, falta de padronização e alto custo (PEREIRA; NAVARRO, 2013; PICADO et al., 2018). No dia 20 de junho de 2022, foi concedido o registro ao primeiro *kit* brasileiro de diagnóstico molecular para a DC, denominado *Kit NAT Chagas (Nucleic Acid Test for Chagas Disease)*, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), esta concessão é um dos primeiros passos necessários para que o exame seja incorporado ao Sistema Único (SUS). A metodologia ainda passará por avaliação de custo e benefício pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC) e, posteriormente, aprovação no Ministério da Saúde antes da sua efetiva aplicação no SUS, entretanto, alguns benefícios como a redução de custos com importação de insumos, assim como, a possibilidade de aplicação para o acompanhamento da parasitemia em pacientes crônicos, reativação da doença e transmissão vertical, são ressaltados pelo grupo desenvolvedor do produto da Fiocruz (ANVISA, 2022).

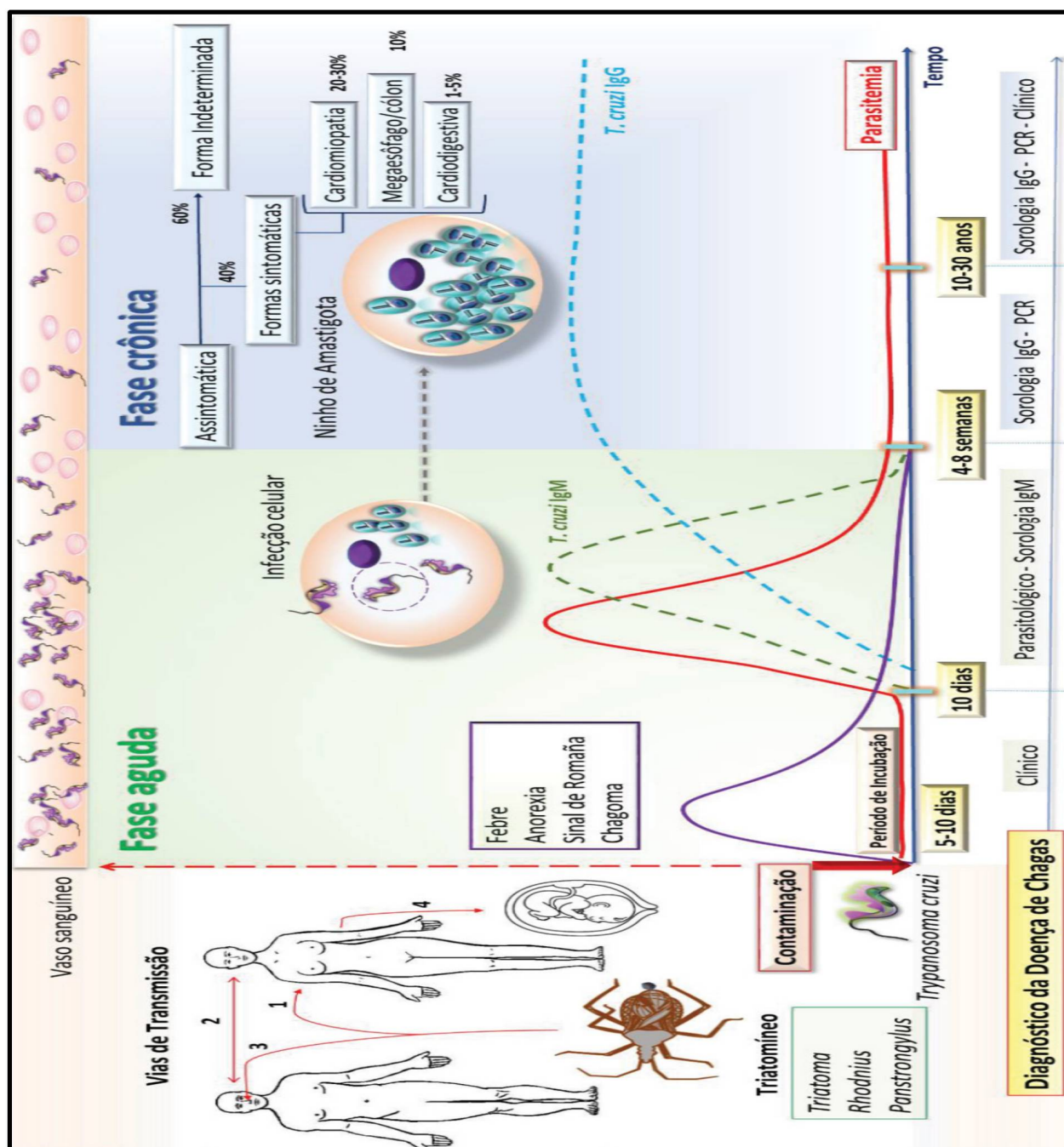


FIGURA 9. Curso da Infecção humana pelo *T. cruzi* e metodologia apropriada para o diagnóstico da DC. NOTA: Formas de transmissão 1) vetorial, 2) transfusão de sangue/transplante de órgãos, 3) oral, ou 4) congênita. O primeiro contato do parasito com o hospedeiro humano é seguido por um período de incubação de 5 a 10 dias, iniciando a fase aguda da doença, caracterizada pela detecção de tripomastigotas circulantes por visualização direta, e detecção de IgM contra antígenos do *T. cruzi* após 10 dias do contato com o parasito. A queda da parasitemia abaixo dos níveis detectáveis ocorre na fase crônica, após cerca de 4 a 8 semanas da infecção inicial, neste momento a detecção de IgG contra antígenos do *T. cruzi* e testes moleculares norteiam o diagnóstico. Fonte: LIDANI et al (2017).

2.5 TRATAMENTO

Os medicamentos benzonidazol (Figura 10A) (Rochagan ou Radanil, N-benzyl-2-nitroimidazol-1-acetamida) e nifurtimox (Figura 10B) (Lampit, derivado 5-nitrofurano), desenvolvidos na década de 70 pelas empresas Roche e Bayer, são os únicos medicamentos considerados eficazes contra o *T. cruzi* e, podem resultar na cura da DC se administrados no início da fase aguda, inclusive nos casos de transmissão congênita (COURA, 2009; PEREIRA; NAVARRO, 2013; LIDANI et al., 2019).

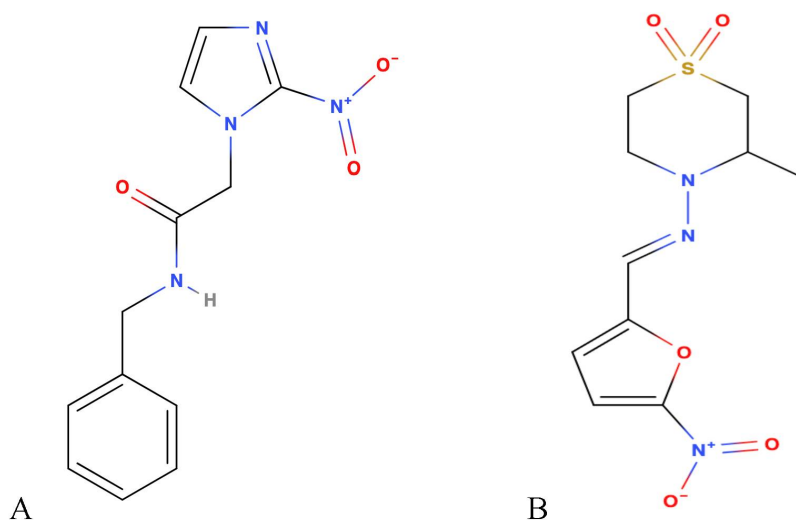


FIGURA 10. Estruturas químicas dos medicamentos benzonidazol (a) e nifurtimox (b). Fonte: Imagens obtidas pelo autor através do aplicativo MolView (<https://molview.org>).

Ambos os medicamentos têm uma taxa de suspensão de cerca de 20% devido a efeitos colaterais mal tolerados (JACKSON et al., 2010; PINAZO et al., 2013). O benzonidazol é metabolizado por enzimas do parasito para se tornar ativo; os metabólitos agem através de vários mecanismos bloqueando as vias da glutathiona e tripanotiona (KRATZ et al. 2018), a tripanotiona é um dos principais mecanismos contra o estresse oxidativo em tripanossomatídeos (MELOS; ECHEVARRIA, 2012). Já o Nifurtimox impede o metabolismo de carboidratos do *T. cruzi* através

da inibição da síntese de ácido pirúvico (FORSYTH et al., 2016; BERN et al., 2020). Atualmente, benznidazol é a droga de primeira escolha contra a DC na maioria dos países da América Latina devido à maior toxicidade do nifurtimox. No Brasil, o nifurtimox teve seu uso proibido na década de 80, somente o uso do benznidazol é aprovado pelos órgãos reguladores, sendo ofertado gratuitamente pelo SUS aos pacientes chagásicos (COURA; CASTRO, 2002; SILVA et al; 2021). É produzido e distribuído unicamente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), beneficiando também Bolívia, Paraguai, Equador, Colômbia, Venezuela, Honduras, El Salvador, Chile, México, Argentina e Estados Unidos (LAFEPE, 2016; ALPERN et al, 2017).

Embora a eficácia de ambos seja reduzida consideravelmente com o tempo de infecção, o tratamento também pode ser instituído durante a reativação *de T. cruzi* devido à imunossupressão, e durante a fase crônica precoce, considerado precoce o período de 5-12 anos após a contaminação inicial (DIAS et al., 2016). Além disso, para adultos infectados, independentemente dos sintomas, algumas diretrizes recomendam o tratamento antiparasitário para prevenir ou coibir a progressão da doença e prevenir a transmissão congênita em gestantes pela diminuição da carga parasitária (DIAS et al., 2016). Infelizmente, menos de 10% dos pacientes com DC nas Américas foram diagnosticados e apenas cerca de 1% deles obtêm acesso ao tratamento antiparasitário na fase aguda (DNDi, 2018). A alta taxa de reações adversas é a principal barreira ao uso do medicamento em adultos, incluindo dermatites, mialgias e púrpura trombocitopênica (Pinazo et al., 2010). Os potenciais benefícios da medicação devem ser ponderados na duração do tratamento (até 2 meses), contraindicações (como gestantes e pacientes imunocomprometidos) e possíveis reações adversas que ocorrem em até 40% dos pacientes adultos tratados, ressalta-se que os pacientes tratados devem ser monitorados rigorosamente durante todo período de uso do medicamento (BERN et al., 2007; PINAZO et al., 2010; TORRICO et al., 2018).

Cinco décadas sem novas soluções medicamentosas para o tratamento da DC evidenciam a posição DC como uma das principais doenças negligenciadas e a urgência de investimento em pesquisas que possam resultar na otimização do tratamento existente e auxiliar na busca de novas opções para o tratamento dos pacientes chagásicos.

2.6 ENDOTELINAS: ENDOTELINA 1

Em 1988, os pesquisadores Yanagisawa et al. (1988) isolaram um peptídeo denominado endotelina a partir de culturas de células endoteliais de porco. As endotelinas são uma família de peptídeos formados por 21 aminoácidos com potente ação vasoconstritora, composta pela endotelina-1 (EDN-1), endotelina-2 (EDN-2) e endotelina-3 (EDN-3). As endotelinas possuem inúmeros efeitos biológicos nos diversos tecidos do organismo humano conforme sintetizado na Tabela 1.

TABELA 01. Efeitos biológicos das endotelinas.

| |
|--|
| <i>Efeitos hemodinâmicos</i> |
| Vasodilatação e hipotensão inicial seguida de vasoconstrição potente e efeito pressor sustentado |
| <i>Efeitos cardíacos</i> |
| Inotropismo e cronotropismo miocárdico positivos |
| Vasoconstrição das artérias coronárias |
| <i>Efeitos renais</i> |
| Aumento da resistência vascular renal |
| Redução do fluxo plasmático renal, ritmo de filtração glomerular e do coeficiente de ultrafiltração glomerular |
| Aumento da reabsorção de Na ⁺ através de efeitos hemodinâmicos |
| Redução da reabsorção de Na ⁺ via inibição da Na ⁺ K ⁺ -ATPase |
| <i>Efeitos neuroendócrinos</i> |
| Aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas, renina, aldosterona e fator natriurético atrial |
| Modulação da transmissão sináptica |
| <i>Efeitos nas células musculares lisas</i> |
| Contração das células musculares lisas vasculares; veias possivelmente mais sensíveis que artérias |
| Contração da musculatura lisa não-vascular |

Fonte: Adaptado pelo autor de Batlouni, 2001.

A isoforma mais abundante das endotelinas é a EDN-1 (Figura 11), codificada pelo gene *EDN1* localizado no cromossomo 6 (Figura 12). A EDN-1 apresenta efeito vasoconstritor 100 vezes mais potente do que a norepinefrina e 10 vezes mais potente do que a angiotensina-II (LEVIN, 1995), sendo implicada na fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares devido ao seu papel em processos de remodelação da matriz extracelular, cicatrização de feridas e angiogênese. A principal fonte de EDN1 é o próprio endotélio, onde atua modulando o tônus vascular, a proliferação celular e a produção hormonal, porém sua produção pode ocorrer também em células musculares lisas vasculares, cardiomiócitos, fibroblastos, macrófagos e leucócitos (LEVIN, 1995; KIRKBY et al., 2008; VALDEZ, 2013; BALTOGIANNIS et al., 2015).

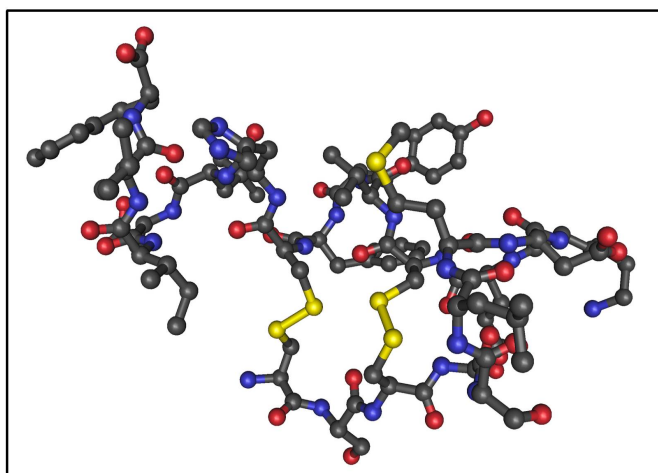


FIGURA 11. Estrutura molecular da endotelina-1. Fonte: Wikimedia commons.



FIGURA 12. Gene codificador da endotelina-1. Fonte: Ensembl.

A EDN-1 e suas isoformas atuam no processo de vasoconstrição endotélio-dependente e são potentes mitógenos para os fibroblastos e células musculares (VARGA; LAFYATIS, 2015). A hipóxia, isquemia ou estresse induzem a transcrição do RNA mensageiro de *EDN1* (mRNA) e a síntese e secreção da EDN-1 em poucos minutos, a meia-vida do mRNA é de cerca de 15 a 20 minutos, e a meia-vida plasmática de 4 a 7 minutos; portanto, as células vasculares apresentam capacidade de rápida produção de EDN-1 (LEVIN, 1995).

A EDN-1 exerce seus efeitos biológicos através da interação com os seus receptores ET-A e ET-B. Conforme necessidade de regulação do tônus, a EDN-1, através dos receptores ET-A e ET-B acoplados à proteína G, atua em células musculares lisas promovendo a contração vascular (LEVIN, 1995). O teor atrial elevado de EDN-1 foi associado ao aumento do tamanho de átrio esquerdo, fibrilação atrial, fibrose e hipertrofia, podendo contribuir para a persistência da fibrilação atrial (MAYYAS et al., 2010).

Na figura 13 é representado o processo de produção da EDN-1 em células endoteliais, porém, sua produção também ocorre, em escala reduzida, por células vasculares no músculo liso, neurônios, células endometriais, células mesangiais, células de Sertoli nos testículos, assim como nas células epiteliais do pulmão e das mamas (LEVIN, 1995; ZANATTA et al., 2008). Hormônios e fatores vasculares modulam a síntese da pré-endotelina-1 pelo gene *EDNI*, regulando a vinculação de fatores de transcrição como GATA-2 e AP-1 a elementos específicos no gene promotor. O mRNA é traduzido para uma proteína pré-endotelina-1 de 203 aminoácidos, que é então convertida em um pró-hormônio de 39 aminoácidos, a *big*-endotelina-1. A enzima conversora de endotelina converte a pré-endotelina, também conhecida como *big* endotelina, na proteína endotelina-1 de 21 aminoácidos. A endotelina-1 e a pré-endotelina são secretadas principalmente em direção à camada muscular lisa adjacente da parede do vaso sanguíneo. Quantidades menores dos peptídeos são secretadas no lúmen do vaso (LEVIN et al., 1995).

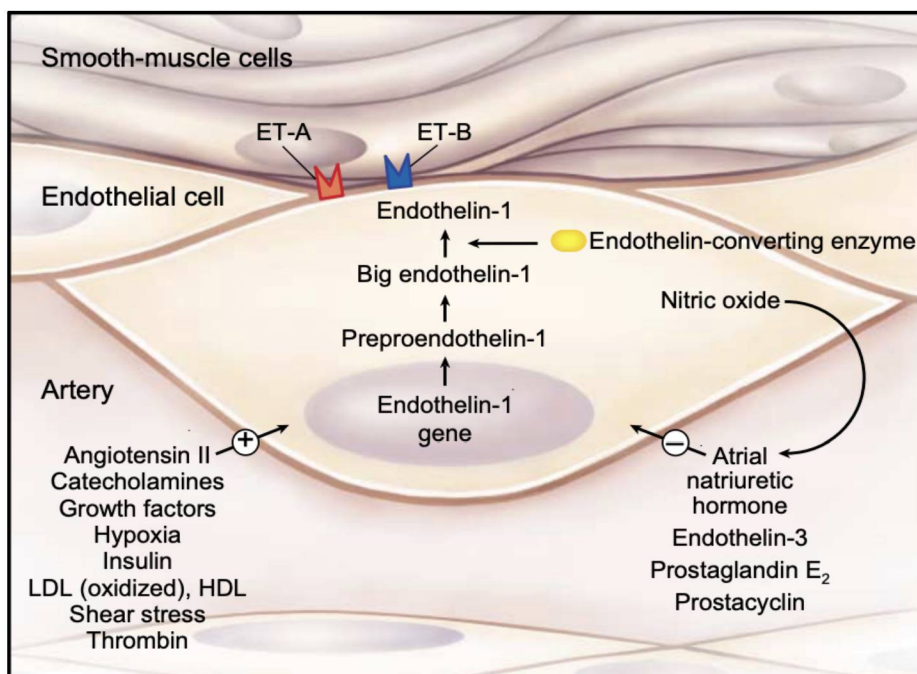


FIGURA 13: Representação da regulação, processamento e secreção de proteínas relacionadas a Endotelina-1 em células endoteliais. ET-A: receptores de endotelina tipo A; ET-B: os receptores da endotelina tipo B; LDL: lipoproteínas de baixa densidade; HDL: lipoproteínas de alta densidade. Os itens que estimulam a transcrição estão listados no canto inferior esquerdo da figura, e a lista no canto inferior direito representa itens que inibem a transcrição do gene *EDN1*. FONTE: Adaptado de Levin (1995).

A EDN-1 pode causar disfunção e inflamação endotelial, contribuindo para a formação de placas ateroscleróticas (KOLETTIS et al., 2013). A concentração plasmática aumentada de EDN-1 tem se correlacionado com severidade de diversas doenças e seus sintomas, tais como insuficiência cardíaca, diabetes, hipertensão, tromboembolismo, aterosclerose, hipertensão pulmonar e fibrilação arterial (SCHNEIDER et al., 2002; MAYYAS et al., 2010; DRION et al., 2012; KUMARI et al., 2016; ZHANG et al., 2017; PENGUE et al., 2019; EBRAHIMI et al., 2019; SONG et al., 2019; PEK et al., 2020). Estudos clínicos e experimentais mostram o envolvimento da EDN-1 em processos inflamatórios e na patogênese de pneumonias virais e bacterianas, sepse, e no processo infeccioso da DC (WANECEK et al., 2000; PETKOVA et al., 2001; FREEMAN et al., 2014; KOWALCZYK et al., 2015). O aumento dos níveis de EDN-1 na DC foi identificado como uma consequência da invasão inicial do sistema cardiovascular, sendo, possivelmente, um dos mecanismos envolvidos com a disfunção miocárdica associada à infecção pelo *T. cruzi* (PETKOVA et al., 2000).

A EDN-1 foi associada à resposta inflamatória e processos inflamatórios vasculares (BELLISAI et al., 2011), envolvendo a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kB (NF-kB) e expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (YEAGER et al., 2012; LIU et al., 2017), substâncias classicamente envolvidas na resposta imune, que por sua vez, já foram relacionadas experimentalmente com o estímulo à produção de EDN-1 *in vitro* por células endoteliais, pelo músculo liso vascular e células epiteliais tubulares renais (VIRDIS; SCHIFFRIN, 2003; WORT et al., 2009; KOWALCZYK et al., 2015).

Fatores indicados na Figura 14, como a hipóxia, o estresse de cisalhamento ou "*shear stress*", e hormônios, estão associados ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva e estimulam a produção de endotelina-1 (LEVIN et al., 1995). A angiotensina II aumenta a produção de endotelina na parede dos vasos sanguíneos, através dos receptores ET-A, gerando alterações na estrutura vascular da circulação cerebral e mesentérica (MOREAU et al., 1997; LIN et al., 2014). A endotelina-1 pode estimular a secreção de aldosterona, diminuir a perfusão e a função renal, contribuindo para a retenção de sódio, água e aumento do volume intravascular. A endotelina-1 também estimula a hipertrofia do coração, aumentando a atividade simpática e a vasoconstrição arterial. Por consequência, o aumento da resistência vascular sistêmica reduz o débito cardíaco (LEVIN et al., 1995).

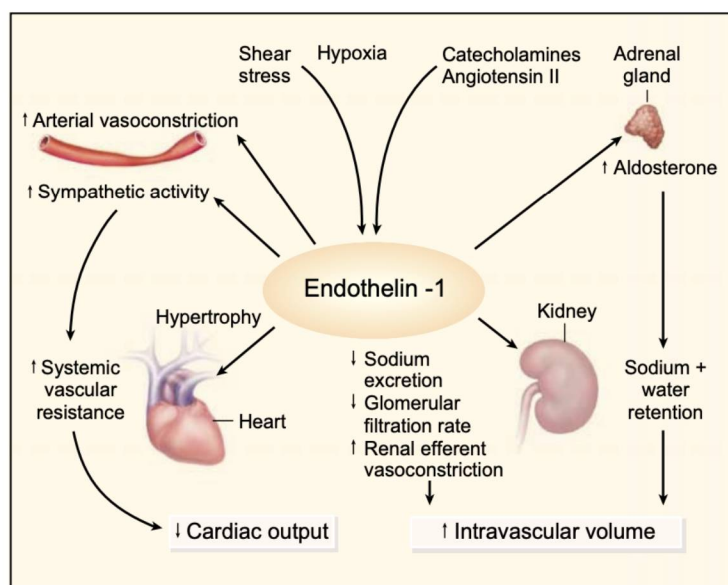


FIGURA 14: Atividades da endotelina-1 que podem contribuir para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva. FONTE: Levin (1995).

Diversos estudos apontam associações de polimorfismos do gene *EDNI* com doenças cardio e cerebrovasculares conforme sintetizado na Tabela 02.

TABELA 02. SNPs do gene *EDNI* e associações com doenças cardio e cerebrovasculares.

| SNP <i>EDNI</i> | Associação | Referência |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| rs5370 | Pré-eclampsia | Li et al., 2020 |
| rs5370 | Hipertensão pulmonar | Pousada et al., 2013 |
| rs5370 | AVC | Dubovick et al., 2018 |
| rs5370 | Síncope vasovagal | Lazurova et al., 2021 |
| rs1800997 | Hipertensão | Oo et al., 2022 |
| rs5370, rs10478694 | Aterosclerose e hipertensão | Ebrahimi et al., 2019 |
| rs10478694, rs5369 | Hipertensão | Tobe et al., 2011 |
| rs3087459 | Síndrome coronária aguda | Vargas-Alarcon et al., 2013 |
| rs2070699 | Hipertensão pulmonar | Mei et al., 2016 |
| rs1800543 | Aterosclerose | Gumanova et al., 2019 |
| rs3918166 | AVC e enxaqueca | MacClellan et al., 2009 |
| rs5370 | AVC | Oleshko et al., 2020 |
| rs1800541 | Tromboembolismo | Kumari et al., 2016 |
| rs6458155 | Doença cardíaca coronária | Liang et al., 2018 |
| rs5369 | Doença cardíaca coronária | Monterrosas, 2017 |
| rs9349379 | Disfunção microvascular coronariana | Ford et al., 2020 |

2.6.1 EDN-1 e a doença de Chagas

No início da infecção pelo *T. cruzi*, antes da detecção dos parasitos no sangue, os protozoários já são evidentes nas células endoteliais microvasculares coronárias, sugerindo que o endotélio coronário pode ser um alvo primário da infecção (ROSSI et al., 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a infecção do endotélio resulta na expressão de componentes importantes da resposta inflamatória, como citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão vascular (HUANG et al, 1999; TANOWITZ et al., 1992). Também foi demonstrado que

a infecção por *T. cruzi* pode provocar lesões vasculares e endoteliais, especialmente na microvasculatura, com aumento da tromboxana A2 e indução da liberação de endotelina-1 (EDN-1) por células endoteliais, causando vasoconstrição e agregação plaquetária, o que contribui para a aterosclerose, lesões vasculares e hipertensão (WITTNER, et al., 1995).

A presença de microlesões foram descritas pela primeira vez por ROSSI et al. (1984), vasospasmos e aneurismas saculares foram observados na microvasculatura subendocardial em modelo murino de infecção aguda de *T. cruzi*, semelhante a outras cardiomiopatias dilatadas (FACTOR et al., 1985; PRADO et al., 2011). Vários autores (WITTNER et al., 1995; TANOWITZ et al., 1999; Salomone et al., 2001; PETKOVA et al., 2001; HUANG et al., 2000; MUKHERJEE et al., 2003; TANOWITZ et al., 2005) descobriram que os vasoespasmos microvasculares associados ao *T. cruzi* provavelmente envolve o peptídeo vasoconstritor EDN-1.

Ratos infectados desenvolveram alterações na camada endotelial, caracterizadas por inchaço e pontos de descontinuidade citoplasmática, expondo o colágeno subendotelial associado à agregados plaquetários e fibrina, o que pode afetar a geração de substâncias com ação vasoativa, como a EDN-1 (ROSSI et al., 1997).

As células endoteliais são a principal fonte de EDN-1, seu papel na patogênese da cardiomiopatia chagásica foi demonstrado ativando vias de inflamação através dos cardiomiócitos (CORRAL et al., 2013). A presença da EDN-1 foi verificada tanto na fase aguda como nas fases crônicas da DC, mostrando elevados níveis plasmáticos e alta concentração no tecido cardíaco murino (PETKOVA et al., 2000; PETKOVA et al., 2001). Camundongos tratados nos 15 dias iniciais após a infecção por cepa brasileira de *T. cruzi* com um potente inibidor da enzima conversora de EDN-1, o fosforamidon, tiveram redução de anormalidades estruturais, tais como fibrose, inflamação no miocárdio, diâmetro do ventrículo direito e ventrículo esquerdo, entretanto não foi verificada diferença na parasitemia entre os grupos (JELICKS et al., 2003). Quando o gene *EDN-1* foi silenciado em cardiomiócitos de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, houve redução da fibrose, da inflamação no miocárdio e do alargamento cardíaco (cardiomegalia) verificado através de ecocardiografia e ressonância magnética (TANOWITZ et al., 2005).

2.7 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento (SC), um componente crucial da imunidade inata, é um sistema complexo constituído por mais de 50 proteínas e fragmentos proteicos que afetam a opsonização, inflamação e citólise. O complemento pode ser ativado através de três vias principais: clássica, alternativa e lectina, todas convergindo na formação de C3 convertase, C5 convertase e o complexo de ataque de membrana (MAC) (LING; MURALI, 2019; BORDRON et al., 2020). A atividade proteolítica de C3 convertase produz C3a e C3b, possibilitando a formação de C5 convertase com posterior decote e geração de C5a e C5b e a constituição de MAC para lise patógena (LING; MURALI, 2019; BORDRON et al., 2020; GAYA DA COSTA et al. , 2018). A ativação exacerbada do SC pode levar a uma resposta inflamatória excessiva resultando em falhas na defesa do hospedeiro (PETTIGREW, TEUBER, GERSHWIN, 2009; RICKLIN, LAMBRIS, 2013; CONIGLIARO, et al. , 2019). A Figura 15 apresenta uma visão geral dos mecanismos de ativação do SC, suas principais proteínas reguladoras e ações biológicas.

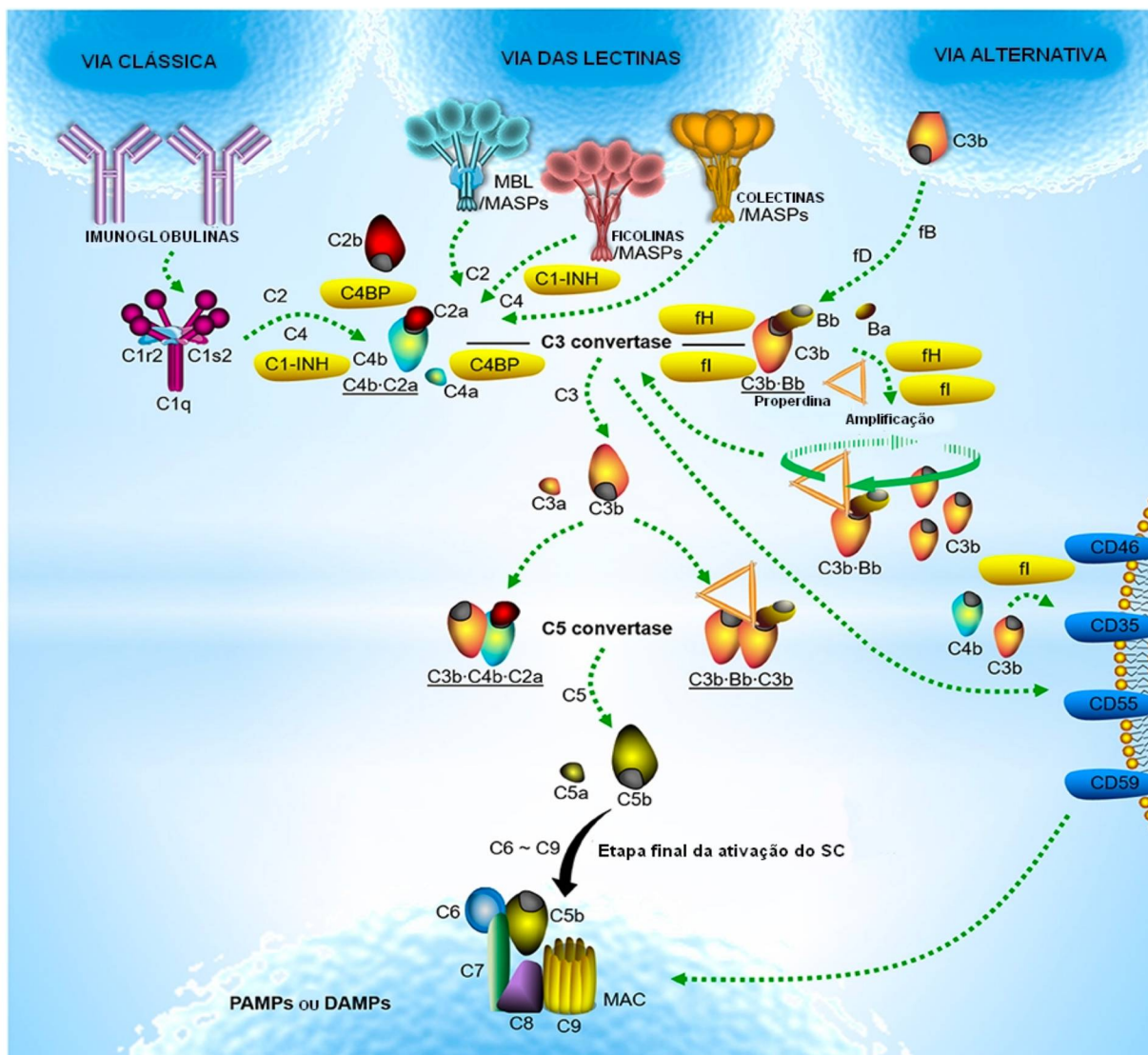


FIGURA 15. Visão geral do sistema complemento e suas proteínas reguladoras. As três vias de ativação: clássica, alternativa e via das lectinas. A via clássica é iniciada através do complexo C1 (C1qrs), a via alternativa pode ser ativada por hidrólise espontânea de C3 ou por C3 formada através das vias clássica e da lectina; a via das lectinas é acionada por uma série de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como as ficolinas e a MBL que se ligam a superfície do patógeno, resultando na associação das MASPs (1 e 2), similares a C1r e C1s, respectivamente, ocorre a clivagem da C4 resultando na formação da C3 convertase da VL. Assim, a ativação do complemento resulta na C3 convertase (C4b2a) nas vias clássica e das lectinas, e C3 convertase (C3bBb) na via alternativa, ambas possuem atividade proteolítica para C3 e formam suas respectivas C5 convertases através da C3b (C4b2a3b e C3bBb3b). A clivagem de C5 leva à via terminal comum, que produz o MAC citolítico. Proteínas regulatórias estão presentes em todas as fases, tanto na fase fluida quanto ligadas à superfície celular. Os principais reguladores são apresentados na imagem (C1INH, fator H, fator I, CD55 (DAF), CD59 (MAC-IP ou protectina), MCP (ou CD46), CR1 (ou CD35). Fonte: Adaptado pelo autor de MA e GARRED (2018).

2.7.1 O sistema complemento e a doença de Chagas

Múltiplas evidências apontam para o envolvimento do SC, uma das principais frentes de defesa imunológica do organismo humano, componente crucial da resposta imune inata e adaptativa, no estabelecimento da infecção pelo protozoário *T. cruzi* e seu impacto no desenvolvimento das manifestações clínicas da DC. Os efeitos do SC se devem, especialmente, à sua capacidade de aumentar a resposta inflamatória fisiológica, estimular a fagocitose, promover a lise celular e melhorar a imunogenicidade dos patógenos (MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007; MERLE et al, 2015). Entretanto, muitos agentes infecciosos resistem à ativação do SC, expressando proteínas que inibem a ação do complemento (RAMIREZ et al., 2012; LIDANI et al., 2017; RAMIREZ-TOLOZA et al., 2020).

O *Trypanosoma cruzi* possui fatores de virulência com capacidade de inibir o complemento em diferentes estágios de ativação (RAMIREZ-TOLOZA et al., 2020). Foi verificada a inibição das vias clássica e das lectinas do SC, através da ligação da proteína calreticulina do *T. cruzi* à C1 e as PRRs solúveis do complemento, como as ficolinas e a MBL. Usando uma estratégia de mimica apoptótica, a associação entre a calreticulina do parasita e a C1 facilita a infecção de células-alvo, aumentando a infectividade do parasito (RAMIREZ et al., 2012; RAMIREZ-TOLOZA et al., 2020).

Alta parasitemia e mortalidade precoce foram previamente associadas à falhas na ativação do SC ou ausência/depleção dos seus componentes *in vivo*. Experimentalmente foi demonstrado que a depleção de C3 decorrente da ação do CVF (Cobra venom fator), um análogo estrutural de C3, resultou em alta parasitemia, exacerbação da doença e aumento da mortalidade em camundongos infectados com *T. cruzi* (BUDZKO, PIZZIMENTI; KIERSZENBAUM, 1975). A ativação do SC por anticorpos específicos IgG e IgM produzidos em resposta à presença do parasita *in vitro* ao longo do processo infeccioso já foi demonstrada (KIPNIS et al., 1992; MARINHO et al., 1999; CESTARI et al., 2013). O SC, *in vitro*, é capaz de reconhecer formas tripomastigotas do *T. cruzi*, ocorrendo a ativação do complemento pela via das lectinas e alternativa, com limitada participação da via clássica (CESTARI; RAMIREZ, 2010). Sugerindo participação do complemento na remoção inicial das formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*

na fase aguda da DC. Entretanto, foi verificada também, a capacidade de evasão do parasito à ação lítica do complemento através da produção de substâncias que interferem na ação da enzima C3 convertase pela forma tripomastigota metacíclica (KIPNIS et al., 1986; KIPNIS et al., 1988). Desta forma, parte dos parasitos consegue evadir e sobreviver à ação lítica do SC causando danos ao organismo infectado a longo prazo.

2.7.2 Via das lectinas

A via das lectinas (VL), uma das três vias pelas quais ocorre a ativação do SC, descoberta apenas no final dos anos 90, tem um papel crucial na defesa do organismo contra protozoários. Sua ativação ocorre pelo reconhecimento de patógenos através de moléculas de superfície, oligossacarídeos da superfície do parasito e resíduos acetilados, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados à danos (DAMPs) em células apoptóticas, são identificados por cinco moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs), a lectina ligante de manose (MBL), a colectina-11 e as ficolinas (ficolina-1, ficolina-2 e ficolina-3), acionando mecanismos de defesa da imunidade inata e diversas estratégias de evasão do parasito (LAMBRIS et al., 2008, CESTARI et al., 2013, BELTRAME et al., 2015). Ao vincular-se às moléculas-alvo, a MBL, CL-K1 e ficolinas formam complexos com serino-proteases 1 e 2 associadas à MBL (MASP-1 e MASP-2). Sequencialmente, inicia-se a reação em cascata pela ativação da MASP-1 e MASP-2, clivagem do C4 e C2, com a formação da C3 convertase (C4b2a). Subsequentemente, ocorre a formação do complexo de ataque de membrana (MAC) promovendo a lise celular. Além disso, a ativação do complemento pode induzir diversos efeitos inflamatórios, como expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia, ativação de leucócitos, liberação de espécies reativas de oxigênio e secreção de citocinas (BELTRAME et al., 2015; GAYA DA COSTA *et al.*, 2018; GIANG *et al.*, 2020; ALI *et al.*, 2021).

2.7.2.1 Ficolinas

As ficolinas são receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que atuam na defesa contra patógenos ao se associarem as MASP's ativando o sistema complemento através da via das lectinas, também agem como sensores do sistema imune inato regulando várias funções patofisiológicas pela interação com PAMPs ou DAMPs (MATSUSHITA; FUJITA, 2002; BIDULA; SEXTON; SCHELENZ, 2019). Podem acionar ainda a resposta imune estimulando a secreção de citocinas inflamatórias, tais como o interferon, interleucina-17 (IL-17), IL-6, TNF- α , e a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (REN et al., 2014).

As ficolinas contêm um domínio semelhante ao colágeno e um domínio semelhante ao fibrinogênio que apresentam afinidade específica para n-acetilglucosamina (Figura 16). São conhecidas três ficolinas humanas: a M-ficolina ou ficolina-1 que é sintetizada nos monócitos, na medula óssea, no pulmão e no baço; a L-ficolin ou ficolina-2, sintetizada pelo fígado e presente no soro; e, a H-ficolin ou ficolina-3, também sintetizada no fígado e pelo ducto biliar, adicionalmente é produzida no pulmão (MATSUSHITA, 2012).

Todas as três ficolinas oligomerizam-se para formar tetrâmeros e hexâmeros devido a ligações de dissulfeto formadas por cisteínas da região terminal N e compartilham uma afinidade comum com compostos acetilados (GARRED et al., 2016). A FCN-1 exerce um efeito local quando secretada por monócitos e granulócitos durante a inflamação e é encontrada em baixos níveis no soro. Cada ficolina reconhece um espectro de ligantes e microrganismos através do domínio semelhante ao fibrinogênio (MATSUSHITA, 2012; GARRED et al, 2016).

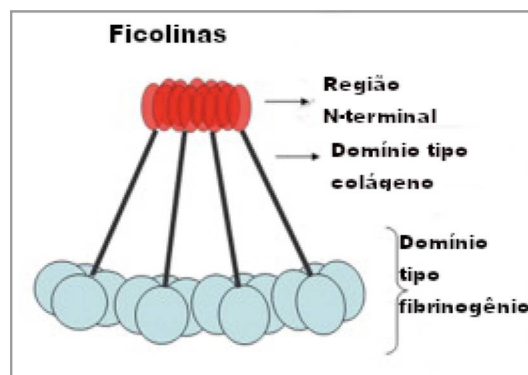


FIGURA 16. As ficolinas são compostas de uma região n-terminal curta com um ou dois resíduos de cisteína seguidos por um domínio tipo colágeno, uma região de ligação curta e um domínio terminal tipo fibrinogênio. As ficolinas formam subunidades triméricas através da ligação do domínio tipo colágeno. Essas subunidades se reúnem em oligômeros ativos através da ligação de quatro subunidades através de pontes dissulfeto na região N-terminal e reconhecem carboidratos acetilados através do domínio tipo fibrinogênio. FONTE: Adaptado pelo autor de Cestari et al. (2013).

2.7.2.2 Ficolina-1

A ficolina-1 (FCN-1), também chamada M-ficolina, é codificada pelo gene *FCN1*, localizado no cromossomo 9q34 com nove exons (AMMITZBOLL et al., 2012; CATARINO *et al.*, 2018). Predominantemente expressa nos leucócitos sanguíneos periféricos e postulada para funcionar como uma proteína plasmática com atividade de ligação da elastina, a FCN-1 é uma molécula de reconhecimento do sistema complemento pertencente ao grupo de lectinas oligoméricas e geralmente está associada à membrana de monócitos, granulócitos, neutrófilos e macrófagos, mas também pode ser encontrada em forma solúvel (HOWARD; FARRAR; SACKS, 2018; TIZZOT et al., 2018). Ficolina-1 pode interagir com polissacarídeos da superfície do patógeno e células imunes (KATAYAMA et al., 2019). O aumento da ativação do complemento através da VL pela interação das ficolinas já foi observado em pacientes com DC em comparação com controles saudáveis quando comparadas às formas clínicas indeterminada e sintomáticas (POLACHINI et al., 2022). Níveis reduzidos de ficolina-1 foram descritos em pacientes infectados coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da Hepatite C (HCV) no sul do Brasil (TIZZOT et al., 2018).

Sabe-se que proteínas do *T. cruzi*, tais como a calreticulina, se ligam às ficolinas -2 e -3, como forma de inibir a ativação do complemento pela VL. Foi demonstrada a capacidade de ligação da FCN-1 à proteína C-reativa (PCR), à fibrina e ativação independente da VL (LIU et al., 2005; RUNZA; SCHWAEBLE; MÄNNEL, 2008; CESTARI et al., 2013; EVANS-OSENS et al., 2013; CASTRO NETO; SILVEIRA; MORTARA, 2021).

A FCN-1 reconhece carboidratos acetilados e o ácido siálico (AS) (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). Glicointerações envolvendo resíduos de AS são fundamentais para a infectividade do *T. cruzi*, fuga da vigilância imunológica e patogênese. Embora seja incapaz de sintetizar o ácido siálico, o parasito apresenta a enzima trans-sialidase (TS), que é capaz de clivar resíduos terminais do ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro e transferí-los para mucinas superficiais do parasito, gerando assim estruturas de adesão e proteção (CAMPETELLA et al., 2020). As mucinas e a TS são substrato e enzima, respectivamente, do sistema glicobiológico que retira o ácido siálico do hospedeiro em uma interação crucial para o ciclo de vida de *T. cruzi*. A aquisição do resíduo siálico permite que o parasita evite a lise por fatores do soro e interaja com a célula hospedeira (LANTOS et al., 2016).

Além disso, o parasito lança a enzima TS na corrente sanguínea, como uma forma de modificar a assinatura de superfície do AS, e, assim, as propriedades de sinalização/funcionais das células-alvo hospedeiras de mamíferos em sua própria vantagem (CAMPETELLA et al., 2020). A TS do *T. cruzi* se mostra aumentada nos estágio de forma infectante do parasita, reforçando seu papel como um fator de virulência garantindo a manutenção do ciclo do protozoário no hospedeiro humano (CAMPETELLA et al., 2020).

SNPs da *FCNI*, especialmente da região promotora, têm sido associados a doenças infecciosas e autoimunes (CATARINO et al., 2018). O polimorfismo rs10120023 na região promotora do gene foi associado à suscetibilidade à artrite reumatoide, provavelmente impactando a expressão genética de *FCNI* (PIECZARKA et al., 2020). O SNP rs2989727 esteve associado à suscetibilidade aditiva à artrite reumatoide, à estenose valvar e insuficiência mitral e ao início precoce da colonização crônica na fibrose cística (VANDER CRUYSSSEN et al., 2007; HAERYNCK et al., 2012). Além disso, os alelos rs2989727A, rs10120023A, rs1017466A e rs10858293T, os quais estão associados à maior expressão de *FCNI* na base de dados GTEX (<https://gtexportal.org/home/>), foram associados à proteção contra Febre Reumática. (CATARINO

et al., 2018). Os SNPs rs2989727 (G>A) e rs17039495 (G>A) também mostraram tendências de associação com a hanseníase virchowiana, enquanto o SNP rs10858293 G>T demonstrou um efeito protetor recessivo (BOLDT et al., 2013). Estes trabalhos indicam que a ficolina-1 tem um duplo impacto na imunidade do hospedeiro, podendo gerar ações contra patógenos ao mesmo tempo que pode favorecer a ativação excessiva de SC e a inflamação crônica.

2.8 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS (SNPs)

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são porções do genoma onde ocorre variação entre populações de um único par de nucleotídeos, é o tipo mais comum de variação genética, constituindo cerca de 90% das variações no genoma humano (TfELT-HANSEN; BROSEN, 2008; NAIDOO et al., 2011; AUTON et al, 2015). Por exemplo, um SNP pode substituir a citosina (C) pela timina (T) em um determinado trecho de DNA. Há cerca de dez milhões de SNPs que ocorrem em média a cada 300 nucleotídeos no genoma humano (PENEGAR et al., 2007; PRATT et al., 2014). Mais comumente, essas variações são encontradas no DNA entre genes. Eles podem agir como marcadores biológicos, contribuindo para a localização de genes associados à doenças. Quando os SNPs ocorrem dentro de um gene ou em uma região regulatória perto de um gene, eles podem desempenhar um papel mais direto no desenvolvimento e progressão das doenças, afetando a função do gene. A maioria dos SNPs não tem efeito na saúde ou no desenvolvimento humano; no entanto, alguns têm se mostrado muito importantes para melhor compreensão dos processos de doença e da saúde humana. Alguns SNPs podem ajudar a prever a resposta de um indivíduo a certos medicamentos, a suscetibilidade a fatores ambientais, como toxinas, e o risco de desenvolvimento de doenças específicas. As pesquisas na área permitem identificar SNPs associados à doenças complexas, como doenças infecciosas, cardíacas, diabetes e câncer, que podem contribuir para melhora da efetividade dos tratamentos e prognóstico dos pacientes (PENEGAR et al., 2007, PONOMARENKO et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

A aprovação ética para a pesquisa foi concedida pelo comitê de ética médica local do hospital de clínicas da Universidade Federal do Paraná (número de aprovação do Comitê de Ética: 3918387). O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido por escrito.

3.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

Estudo observacional do tipo caso-controle.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

3.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos indivíduos com idade igual ou superior à 18 anos, com diagnóstico laboratorial e clínico de doença de Chagas crônica apresentando uma das quatro formas clínicas da fase crônica da doença. No grupo controle foram incluídos doadores de sangue voluntários com idade igual ou superior a 18 anos, negativos em testes sorológicos para a doença de Chagas e outras doenças infecciosas, provenientes do Banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e do Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR). Pacientes chagásicos com menos de 18 anos e pacientes com infecção na fase aguda ou sem diagnóstico estabelecido da forma clínica crônica da doença foram excluídos da pesquisa.

3.3.2 Pacientes incluídos nas análises de polimorfismos do gene FCNI

Um total de 200 pacientes chagásicos do ambulatório de doença de Chagas do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 84 (42%) do sexo masculino e 116 (58%) do sexo feminino; com idade média de 64 anos (faixa = 34-90 anos), 142 (71%) euro-brasileiro, 47 (23,5%) afro-brasileiro, 5 (2,5%) asiático e 6 (3%) ameríndio. Entre os 200 pacientes chagásicos, 47 (23,5%) apresentavam a forma indeterminada da doença de Chagas, 104 (52%) tinham forma cardíaca, 20 (10%) tinham a forma digestiva e 29 (14,5%) tinham a forma cardiodigestiva (Tabela 3).

A caracterização do grupo foi realizada através de questionário epidemiológico aplicado no momento da realização das coletas de sangue e consulta aos prontuários médicos dos pacientes. As formas clínicas foram registradas conforme o diagnóstico médico apontado no prontuário do paciente. O registro médico da DC crônica foi realizado através da anotação dos códigos estipulados pela classificação internacional de doenças (CID) para as diversas manifestações da DC, conforme publicado pela OMS (WHO, 2019), B.57 para identificação da forma indeterminada (assintomática); o B.57-2 indicou a forma cardíaca, B.57-3 a forma digestiva, e o registro concomitante de B57-2 e B.57-3, ou registro de alterações cardíacas e digestivas concomitantemente, determinou a forma cardiodigestiva.

TABELA 3. Pacientes e formas clínicas da DC incluídos nas análises do gene *FCNI*

| Forma Clínica da DC | N= 200 | % |
|----------------------------|---------------|----------|
| Indeterminada | 47 | 23.5 |
| Cardíaca | 104 | 52.0 |
| Digestiva | 20 | 10.0 |
| Cardiodigestiva | 29 | 14.5 |

3.3.3 Controles incluídos nas análises de polimorfismos do gene FCNI

O grupo controle, composto por 210 indivíduos não chagásicos provenientes do banco de sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná e do Centro de Hematoterapia

e Hematologia do Paraná (HEMEPAR), pareados por sexo e etnia com os pacientes chagásicos incluídos na pesquisa, foram representados por 75 (35,7%) indivíduos do sexo masculino e 135 (64,3%) do sexo feminino; com idade média de 38 anos (faixa = 18-76 anos), 166 (79%) euro-brasileiro, 41 (19,5%) afro-brasileiro, 1 (0,5%) asiático-brasileiro e 2 (1%) ameríndio (Tabela 4).

TABELA 4. Caracterização pacientes chagásicos e controles.

| | Total | Masculino | Feminino | Euro-bra ¹ | Afro-bra ² | Asia-bra ³ | Ame ⁴ | Idade ⁵ | Mín-máx ⁶ |
|-----------|-------|-----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| Pacientes | 200 | 84 | 116 | 142 | 47 | 5 | 6 | 64.34 | 34-90 |
| FCN1 | | (42,0%) | (58,0 %) | (71,0%) | (23,5%) | (2,5%) | (3,0%) | | |
| Controles | 210 | 75 | 135 | 166 | 41 | 1 | 2 | 38 | 18-72 |
| FCN1 | | (35,7%) | (64,3%) | (79,0%) | (19,5%) | (0,5%) | (1,0%) | | |
| Pacientes | 160 | 93 | 67 | 122 | 29 | 1 | 8 | 56.19 | 34-90 |
| EDN1 | | 58,12% | 41,88% | 76,25% | 18,13% | 0,63% | 5% | | |

LEGENDA: ¹euro-brasileiros; ²afro-brasileiros; ³asiáticos-brasileiros; ⁴ameríndios; ⁵ Média de idade; ⁶Intervalo de idade.

3.3.4 Pacientes - EDN1

Na avaliação dos SNPs do gene *EDN1*, através do método de sequenciamento de Sanger, foram incluídos 160 pacientes diagnosticados com doença de Chagas crônica entre os anos de 2007-2020, com média de idade de 56,2 anos (34-90anos), 93 (58,1%) pacientes do sexo feminino e 67 (41,9%) masculino, 89 (55,6%) dos pacientes com hipertensão arterial sistêmica (HAS), atendidos no ambulatório de doença de Chagas situado no Complexo Hospital de Clínicas da UFPR (CHC-UFPR) (TABELA 3). Todos os pacientes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) onde constavam informações sobre o projeto aprovado no Comitê de Ética do CHC-UFPR. Todos os pacientes incluídos tiveram seus dados coletados dos prontuários e questionários aplicados durante as coletas de sangue.

Os pacientes foram classificados dentro das formas clínicas e estadiamento cardíaco segundo ACQUATELLA et al. (2007) conforme adaptado por LIDANI et al. (2020) (Tabela 5) em: (A) assintomático, eletrocardiograma (ECG) normal; (B) alterações assintomáticas, porém

com alterações características do ECG; (C) disfunção sistólica leve a moderada com fração de ejeção (FE) entre 40-54% e/ou dilatação ventricular esquerda, e categorizados pela New York Heart Association (NYHA) como classe II; (D) disfunção sistólica grave (diâmetro diastólico final ventricular esquerdo >57mm, FE <40%, classificação NYHA III ou IV). Indivíduos assintomáticos crônicos (estágio A), foram incluídos na forma indeterminada, apresentando testes sorológicos positivos, porém com ausência de manifestações clínicas relacionadas à DC e anormalidades no ECG, ecocardiograma, estudos radiológicos de tórax, esôfago e cólon. A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) foi definida como eletrocardiograma e/ou ecocardiograma sugestivos de envolvimento cardíaco em pacientes infectados por *T. cruzi*, sendo os assintomáticos classificados no estágio B, e oligossintomáticos nos estágios C ou D. A classificação para a insuficiência cardíaca (IC) postulada pela NYHA categoriza os pacientes de acordo com a severidade de sintomas relatados, em níveis que variam de I a IV (SCRUTINIO et al., 1994; NASO et al., 2011).

Para a inclusão na forma digestiva, os exames radiológicos, esofágico e enema de bário foram analisados através da observação visual e medidas de cólon e reto sigmóide. A forma digestiva foi caracterizada pela observação de dilatação do trato gastrointestinal e distúrbios motores gastrointestinais, incluindo as mega síndromes, megaesôfago e megacólon. A associação entre as formas digestiva e cardíaca determinou a forma cardiodigestiva (LIDANI et al.; 2020). A distribuição dos pacientes por forma clínica da doença e estadiamento cardíaco é apresentada na Tabela 6.

TABELA 5. Critérios da classificação clínica dos pacientes chagásicos e estadiamento cardíaco, conforme detalhado por LIDANI et al. (2020). Classificação adotada para as análises do grupo do gene *EDNI*.

| Fase crônica da DC | | | | | |
|--|--|--|--|---|---|
| Forma indeterminada ou A | Estadiamento - Forma cardíaca | | | Forma Digestiva | Forma Cardiodigestiva |
| | B | C | D | | |
| Indivíduos assintomáticos crônicos, porém com ausência de manifestações clínicas relacionadas à DC e anormalidades no ECG, estudos radiológicos de tórax, esôfago e cólon. | Teste eletrocardiográfico sugestivo de envolvimento cardíaco, porém assintomático. | Envolvimento cardíaco sintomático. Disfunção sistólica leve a moderada com fração de ejeção (FE) entre 40-54% e/ou dilatação ventricular esquerda, e (NYHA) classe II. | Envolvimento cardíaco, sintomático, com disfunção sistólica grave (diâmetro diastólico final ventricular esquerdo >57mm, FE <40%, classificação NYHA III ou IV). | Presença de dilatação do trato gastrointestinal e distúrbios motores gastrointestinais, incluindo megaesôfago e megacólon O envolvimento digestivo foi classificado como megaesôfago ou megacólon | Indivíduos com associação entre as formas cardíaca e digestiva. |

TABELA 6. Distribuição dos pacientes incluídos nas análises de *EDNI* por forma clínica da DC e estadiamento cardíaco conforme LIDANI et al., 2020.

| Forma Clínica | n= 160 | % |
|-----------------|--------|------|
| A | 67 | 41.9 |
| B | 32 | 20.0 |
| C | 11 | 6.9 |
| D | 10 | 6.3 |
| Digestiva | 16 | 10.0 |
| Cardiodigestiva | 24 | 15.0 |

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PARA ANÁLISE DO GENES *FCNI* E *EDNI*

Amostras de sangue total com anticoagulante (EDTA) dos pacientes chagásicos foram coletadas previamente no ambulatório de Chagas do CHC/UFPR, e amostras dos controles, fornecidas pelo HEMEPAR, foram centrifugadas para isolamento da camada leuco-plaquetária e extração do DNA genômico através do kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen (Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, através do uso do espectrofotômetro NanoDrop 1000 versão 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) foi determinada a concentração das amostras, o DNA extraído foi em seguida diluído e armazenado em refrigerador com temperatura controlada de -20°C até sua utilização. As extrações de DNA das amostras para ambos os genes estudados foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE SEQUÊNCIA ESPECÍFICA (PCR-SSP) PARA ANALISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE *FCNI*

O método multiplex PCR-SSP foi adaptado de Schafranski MD et al (2004) como descrito por Catarino et al. (2020). As análises da expressão genética foram realizadas através de dois protocolos de PCR-SSP, identificando três SNPs da região promotora do gene *FCNI*: rs2989727 (-1981 G>A), na região promotora dista do gene *FCNI*; rs17039495 (-399 G>A) e rs10858293 (+33 G>T), na região promotora proximal do gene. Os SNPs de *FCNI* pesquisados e suas respectivas frequências alélicas em diferentes populações são apresentados na tabela 7.

TABELA 7. Frequências alélicas em diferentes populações dos SNPS de *FCN1* considerando a base de dados Ensembl.

| dbSNP | ALELO ¹ | GERAL | EUROPEUS | | AFRICANOS | | EAS ⁶ |
|------------|--------------------|--------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | Ibéricos ² | CEU ³ | YRI ⁴ | ACB ⁵ | Geral |
| rs2989727 | G.3109 G>A | G: 49% | G: 39% | G: 41% | G: 49% | G: 58% | G: 57% |
| | (-1981 G>A) | A: 51% | A: 61% | A: 59% | A: 51% | A: 42% | A: 43% |
| rs17039495 | g.4691G>A | G: 95% | G: 99% | G: 100% | G: 78% | G: 87% | G: 100% |
| | (-399 G>A) | A: 5% | A: 1% | A: 0% | A: 22% | A: 13% | A: 0% |
| rs10858293 | g.5122G>T | G: 75% | G: 67% | G: 70% | G: 66% | G: 75% | G: 88% |
| | (+33 G>T) | T: 25% | T: 33% | T: 30% | T: 34% | T: 25% | T: 12% |

LEGENDA: dbSNP: nomenclatura de acordo com Single Nucleotide Polymorphism database; ¹ NG_046982.2; ²: população ibérica - Espanha; ³: residentes de Utah com ascendência europeia do norte e ocidental; ⁴: Yoruba em Ibadan, Nigéria; ⁵: caribenhos africanos em Barbados; ⁶: leste da Ásia. FONTE: Adaptado de Catarino et al. (2020).

Os primers/iniciadores específicos utilizados na PCR-SSP estão listados na Tabela 8. A combinação dos oligonucleotídeos FCN1 Prom_-1981Gf ou FCN1 Prom_-1981Af com FCN1 Promr gera o fragmento de 729 pb, ocorrendo a haplotipagem de 2 alelos por reação. Simultaneamente, o controle endógeno da PCR de 500pb com o gene FCN2 (direto: 5'GCCAGGCCTCAGGTATAAAG3' e reverso: 5'AAAGGGTTGATTGCGGAAAC3') é gerado. A combinação entre o FCN1_Prom-399Af ou FCN1_Prom-399Gf com o FCN1_Prom+33Gr ou FCN1_Prom+33Tr gera um fragmento de 470 pb. Sendo gerado simultaneamente, o controle endógeno da reação de 1059pb com o gene MBL (direto: 5'ATGGGGCTAGGCTGCTGAG 3' e reverso: 5'CCAACACGTACCTGGTCCC3' (CATARINO et al., 2020).

TABELA 8. Primers/iniciadores das PCRs relacionadas ao gene *FCN1*

| PRIMERS | Sequência 5'- 3' |
|-------------------|----------------------------|
| FCN1 Prom_-1981Gf | 5' CCCATGAGCCTGGTTATCG 3' |
| FCN1 Prom_-1981Af | 5' CCCATGAGCCTGGTTATCA 3' |
| FCN1 Promr | 5' ACCTCCTCTTCCTTGCAACA 3' |
| FCN1 Prom_-399Gf | 5' AGATGAGGCAAGGAAGCG 3' |
| FCN1Prom_-399Af | 5' AGATGAGGCAAGGAAGCA 3' |
| FCN1 Ex1_+33Gr | 5' ACTAGCAGGACAGCGAGC 3' |
| FCN1 Ex1_+33Tr | 5' ACTAGCAGGACAGCGAGA 3' |

As reações foram realizadas conforme detalhado por Catarino et al. (2020). Para a PCR referente ao rs2989727 (-1981 G>A) foi utilizado 0,2 µM de oligonucleotídeo 1X tampão Coral Load (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,6 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5% glicerol, 0,2 mM deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Invitrogen, SP, Brasil), 0,03 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1 µg/mL de DNA, e para completar o volume final de 15 µL foi utilizada água ultrapura. A amplificação se iniciou com a desnaturação por 5 min a 94°C, seguida por 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 56°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 52°C e 30s a 72°C, processo concluído com 5 min a 72°C para finalização da extensão do DNA, garantindo alta especificidade de amplificação e ampla quantidade de produto resultante da PCR, de acordo com o descrito por BOLDT e PETZLER (2002).

Para a PCR referente aos SNPs rs17039495 (-399 G>A) e rs10858293 (+33 G>T) os seguintes itens tiveram sua concentração alterada: 0,4 µM de oligonucleotídeo, 1,75 mM MgCl₂, 0,5% glicerol. Nesta PCR os parâmetros da amplificação diferiram apenas nas temperaturas de anelamento, sendo 58°C nos primeiros 10 ciclos, 56°C nos 10 seguintes e 54°C nos 15 ciclos finais. Todas as PCRs incluíram soluções controle sem DNA, e amostras controles com genótipo conhecido negativas ou positivas para os genótipos analisados. Os resultados foram observados através da leitura do padrão eletroforético da corrida dos fragmentos aplicados, utilizando o

marcador de peso molecular de 100pb (KASVI) em gel de agarose 1,5%, usando como corante SybrSafe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) conforme representado pela FIGURA 13. As PCRs foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular, localizado no Departamento de Patologia Médica, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

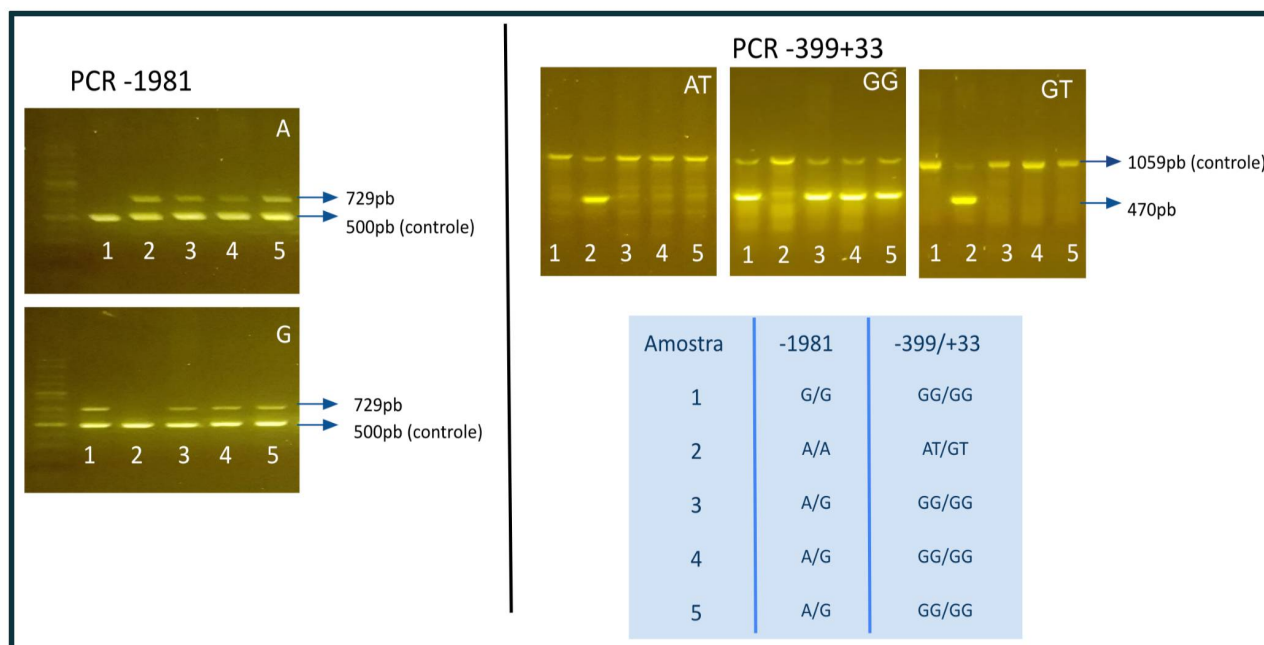


FIGURA 17. Padrão eletroforético das PCRs para o gene *FCNI*.

NOTA: Eletroforese em gel de agarose, exemplificando possíveis produtos das reações PCR-SSP realizadas para investigação do gene *FCNI*, indicando o produto amplificado do gene e interpretação do resultado de cada amostra. Fonte: o autor (2022).

3.6 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO PARA ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE EDN1

Para a avaliação dos SNPs de EDN1 foi utilizado o sequenciamento tradicional ou enzimático automatizado, também conhecido como método Sanger ou dideoxi, descrito pelo ganhador do Nobel, o cientista Fred Sanger em 1977 (SANGER et al., 1977). Os seguintes itens são necessários para a aplicação da técnica: DNA Enzima (Taq Pol), primer dATP (desoxiadenosina trifosfato), dTTP (desoxitimidina trifosfato), dCTP (desoxicitosina trifosfato), dGTP (desoxiguanosina trifosfato) e ddNTP (dideoxinucleotídeo trifosfato).

As sequências de referência do gene *EDN1* foram encontradas no banco de dados Ensembl

(www.ensembl.org). As amplificações pela técnica PCR foram realizadas da seguinte forma: 100 ng de DNA genômico, 1,1 mM de cada primer (Tabela 7), mastermix comercial de PCR (AmpliTaq Gold PCR Mastermix, Applied Biosystems, Califórnia, EUA) contendo GeneAmp PCR Gold Buffer [30 mM Tris/HCl (pH 8.05), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 400 μM de trifosfatos desoxinucleotídeos, 1U AmpliTaq Gold DNA Polimerase] em um volume final de 20.8 μl. Os parâmetros de ciclagem foram a desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 61°C por 25 segundos, alongamento a 68 °C por 3 minutos e etapa final de alongamento a 72 °C por 3 minutos. Os fragmentos de PCR foram verificados com gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídio. Todos os produtos de PCR foram primeiramente purificados com ExoSAP-IT (www.affymetrix.com) e posteriormente sequenciados pela empresa GENEWIZ (www.genewiz.com). Os primers usados para a PCR e sequenciamento pela metodologia Sanger estão listados na Tabela 9. O software Sequencher v 5.4.6 (www.genecodes.com) foi utilizado para montar as sequências do gene e identificar substituições de nucleotídeos; com confirmação visual.

O sequenciamento do gene *EDN1* foi realizado em parceria com o laboratório do Dr. Robert Gilman da Universidade Johns Hopkins em Baltimore, EUA.

TABELA 9. Primers utilizados na amplificação e no sequenciamento Sanger.

| INICIADORES | Sequência 5'-3' | pb |
|-------------|------------------------|------|
| EDN1_F1 | AATTATTGGAGAGCCCTCTGGC | 1119 |
| EDN1_R1 | CATCACTGACTGGGGCTAGTTG | |
| EDN1_F2 | CCATATGGTACCACCGACTGG | 888 |
| EDN1_R2 | CCATAATGTCTTCAGCCCTGTT | |

Nota: F- forward; R - reverso.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A contagem direta foi executada para determinação das frequências gênicas e genotípicas. O equilíbrio de Hardy e Weinberg, modelo matemático que utiliza a frequência dos alelos de determinada população para prever suas frequências genotípicas, foi verificado através do software Arlequin v. 3.1. através da aplicação dos testes exatos de Guo e Thompson (GUO; THOMPSON,

1992; RAYMOND; ROUSSET, 1995). O equilíbrio de Hardy e Weinberg em determinada população é verificado quando as frequências genóticas são distribuídas segundo a equação de Hardy-Weinberg, $p^2+2pq+q^2=1$, locus bialélico onde p e q representam a frequência gênica. As frequências alélicas de uma população tendem a se manter estáveis entre as gerações na ausência da influência de fatores evolutivos. Desta forma, a metodologia considera a Lei de Hardy e Weinberg a fim de verificar se uma amostra populacional poderia representar a população geral estudada, verificar a qualidade da genotipagem, auxiliando na identificação de fatores que resultam em desequilíbrio, tais como a seleção da população, casamentos consanguíneos e/ou associação com a doença estudada (GRAFFELMAN; WEIR, 2018; CATARINO et al., 2018). Os haplótipos foram inferidos através dos algoritmos EML e EBL utilizando o programa 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, calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. Os dados também foram avaliados por análise de regressão logística através do programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA), incluindo idade, sexo e etnia como covariáveis na análise do gene *FCNI* e, adicionalmente, HAS na análise para *EDNI*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. A correção de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicada quando o valor de p foi significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi escrito conforme recomendação do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Os resultados serão apresentados nas próximas páginas.

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES *FCNI*

Diversos estudos indicam a associação de componentes da via das lectinas com a DC, no entanto, a função do gene *FCNI* e seus polimorfismos no processo da doença ainda não foi completamente elucidada (LUZ et al., 2010; BOLDT et al., 2011; LUZ et al., 2013; BELTRAME et al. 2015b; LUZ et al., 2016; SANDRI et al., 2019; LIDANI et al., 2021). Este é o primeiro estudo sobre o sistema complemento com foco na investigação da associação de polimorfismos genéticos no gene *FCNI* com a DC e suas formas clínicas.

Para melhor compreender o papel deste gene, analisamos três polimorfismos da região promotora de *FCNI*, os SNPs foram haplotipados em 200 pacientes, dos quais 47 (23,5%) tinham a forma indeterminada da doença de Chagas, 104 (52%) a forma cardíaca, 20 (10%) a forma digestiva, e 29 (14,5%) a forma cardiodigestiva, e também em 210 controles. A distribuição genotípica, nos pacientes chagásicos e controles, não diferiu da esperada conforme o modelo de Hardy-Weinberg.

Observamos uma frequência significativamente maior do alelos G ($p=0,004$; OR 1,49 [IC 95% 1,14-1,99]) e genótipo GG ($p=0,010$; OR 1,82 [IC 95% 1,10-3,03]) do SNP rs2989727 do gene *FCNI* em pacientes, quando comparado a controles. Além disso, o alelo G e os genótipo GG também foram mais frequentes em pacientes sintomáticos ($p=0,008$; OR 1,51 [IC 95% 1,11-2,03], $p=0,012$; OR 2,05 [IC 95% 1,17-3,59]), e cardíacos ($p=0,013$; OR 1,54 [IC 95% 1,10-2,16], $p=0,013$; OR 2,16 [IC 95% 1,18-3,97]) que em controles. Nossos resultados indicam o alelo G, do SNP rs2989727 (c.-1981G>A) como fator de risco para a DC crônica, bem como à presença de manifestações clínicas sintomáticas da doença, especialmente a forma cardíaca. Interessantemente, a base de dados de expressão gênica GTEx (<https://gtexportal.org/home/>), indica que a concentração de mRNA de *FCNI* encontra-se diminuída no genótipos GG em relação ao AA/AG do SNP rs2989727 em amostras de sangue total e tecido adiposo ($p=0,00001$), sugerindo impacto

da variante na expressão proteica.

Embora a ligação de ficolina-1 ao *T. cruzi* não tenha sido demonstrada até o momento, diversos componentes da VL, tais como MBL, Ficolina-2 e -3, já foram descritos ligando-se à superfície da forma epimastigotas de *T. cruzi*, desencadeando a ativação da VL e morte do parasito mediada pelo complemento (CESTARI et al., 2009). Além disso, a ficolina-1 reconhece carboidratos tais como N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-Acetylgalactosamine (GalNAc) e o ácido siálico (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015), os quais estão presentes na superfície do *T. cruzi* (LEDERKREMER; BERTELLO, 2001; BUSCAGLIA et al., 2006; FONSECA et al., 2019; RIO-BARROS et al., 2022). Considerando o possível papel da ficolina-1 no reconhecimento do *T. cruzi*, sugere-se que a reduzida concentração de ficolina-1, devido ao alelo G do SNP rs2989727 em pacientes, poderia contribuir com o sucesso da infecção pelo *T. cruzi* e sua progressão para as formas clínicas na fase crônica da doença. Entretanto, esta hipótese deve ser considerada com cautela, visto que a concentração de ficolina-1 não foi investigada no presente estudo. Por outro lado, TSAKANNOVA et al. (2021) observou o alelo A do SNP rs2989727 associado a menor concentração plasmática de ficolina-1 em controles e pacientes com AVC isquêmico. A avaliação dos níveis de ficolina-1 em controles e pacientes com DC genotipados para o SNP rs2989727 se faz necessária para um melhor entendimento do impacto dessa variante na expressão da proteína.

A associação do SNP rs2989727 (c.-1981G>A) de *FCNI* com outras doenças infecciosas e inflamatórias foi observada previamente. O risco para início precoce da colonização crônica pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística foi associado ao alelo G (HAERYNCK et al., 2012;), enquanto o alelo A parece conferir proteção contra a febre reumática, e suscetibilidade à estenose valvar e insuficiência mitral nesses pacientes (CATARINO et al. 2018), bem como, à artrite reumatóide (VANDER CRUYSSSEN et al., 2007)

Estudos anteriores, empregando a mesma coorte de pacientes com DC crônica, observaram menor concentração de ficolina-2 associada a estágios mais graves de CCC (LUZ et al., 2013), e de ficolina-3 à insuficiência cardíaca chagásica (LIDANI et al., 2021), possivelmente devido ao consumo frente a resposta à infecção e processos inflamatórios relacionados à DC crônica. Esses resultados, somados ao obtido no presente estudo, indicam um duplo papel das ficolinas, promovendo a defesa do organismo contra a infecção pelo *T. cruzi*, bem como, favorecendo

ativação local do complemento levando à dano no miocárdio (LUZ et al., 2013; LIDANI et al., 2017, PROHÁSZKA et al 2013).

Os SNPs rs17039495 (c.-399G > A) e rs10858293 (c.+33T > G) de *FCNI*, já foram associados a outras doenças infecciosas (CATARINO et al. 2018, BOLDT et al., 2013), entretanto, parecem não estar associados à DC ou suas formas clínicas. A análise dos polimorfismos estudados resultou em cinco haplótipos (GGG, AGT, AGG, GAT e AAT) em pacientes e quatro (GGG, AGT, AGG e AAT) nos controles. No entanto, não foi encontrada diferença significativa na análise dos haplótipos entre os grupos avaliados (Tabela 10).

Este estudo apresenta algumas limitações, como a falta de quantificação sérica de ficolina-1 em controles e pacientes. Além disso, a suposição de um possível impacto na expressão gênica e níveis de ficolina-1 devido ao alelo G do SNP rs2989727 foi baseado em dados de expressão gênica da base GTEx (<https://gtexportal.org/home/>) e, portanto, deve ser comprovado experimentalmente em uma coorte de pacientes. Além disso, a avaliação de variantes de *FCNI* e sua interação com polimorfismos de *FCN2* e *FCN3* ainda não foi realizada e deve acrescentar um melhor entendimento sobre a atuação das ficolinas na DC.

TABELA 10. Frequência de genótipos, alelos e haplótipos de *FCNI* e suas associações com a DC crônica e suas formas clínicas.

| dbSNP | Controles | Pac | Sintomático | Indeterminada | Cardíaca | Digestiva | Cardio digestiva | Expressão mRNA | Pacientes x Controles | Cardíaca x Controle | Sintomática x Controle | | | |
|----------------------------------|-----------|-------|-------------|---------------|----------|-----------|------------------|----------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------------|----------------------------|
| | N=210 (%) | N=200 | N=153 | N=47 | N=104 | N=20 | N=29 | NES (GTEX) | | | | | | |
| rs2989727 (c.-1981G>A) | | | | | | | | | P value | OR [95% CI] | P value | OR [95% CI] | P value | OR [95% CI] |
| G/G | 34 | 54 | 41 | 13 | 27 | 4 | 10 | 0.13 | 0,010* | OR 1,82 (1,10-3,03) | 0,013* | OR 2,16 (1,18-3,97) | 0,012* | OR 2,05 (1,17-3,59) |
| A/G | 99 | 92 | 70 | 22 | 51 | 10 | 10 | (p=0.000022) | 0,091** | - | 0,065** | - | 0,052** | - |
| A/A | 77 | 54 | 42 | 12 | 26 | 6 | 9 | em ST | 0,031\$** | - | 0,026\$** | - | 0,027\$** | - |
| A | 253 | 200 | 154 | 46 | 103 | 22 | 28 | - | - | - | - | - | - | - |
| G | 167 | 200 | 152 | 48 | 105 | 18 | 30 | - | 0,004 | OR 1,49 (1,14-1,99) | 0,013 | OR 1,54 (1,10-2,16) | 0,008 | OR 1,51 (1,11-2,03) |
| rs17039495 (c.-399G>A) | | | | | | | | | | | | | | |
| G/G | 207 | 181 | 138 | 43 | 91 | 18 | 29 | | 0,057* | - | 0,056* | - | 0,103* | - |
| A/G | 3 | 19 | 15 | 4 | 13 | 2 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| A/A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| G | 417 | 381 | 291 | 90 | 195 | 38 | 58 | - | 0,070 | - | 0,058 | - | 0,082 | - |
| A | 3 | 19 | 15 | 4 | 13 | 2 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| rs10858293 (c.+33G>T) | | | | | | | | | | | | | | |
| G/G | 89 | 101 | 78 | 23 | 50 | 10 | 18 | 0.2 | 0,209* | - | 0,582* | - | 0,260* | - |
| G/T | 100 | 85 | 63 | 22 | 46 | 8 | 9 | (p=2.7e-11) | 0,294** | - | 0,544** | - | 0,580** | - |
| T/T | 21 | 14 | 12 | 2 | 8 | 2 | 2 | em ST | 0,113** | - | 0,398** | - | 0,111** | - |
| G | 278 | 287 | 219 | 68 | 146 | 29 | 45 | - | 0,096 | - | 0,321 | - | 0,125 | - |
| T | 142 | 113 | 87 | 26 | 62 | 12 | 13 | - | - | - | - | - | - | - |
| Haplot | | | | | | | | | | | | | | |
| GGG | n=167 | n=183 | n=139 | n=44 | n=94 | n=16 | n=29 | 0,090 | - | - | 0,198 | - | 0,129 | - |
| AGT | 139 | 94 | 72 | 22 | 50 | 10 | 13 | 0,039\$ | - | - | 0,041\$ | - | 0,035\$ | - |
| AGG | 111 | 104 | 80 | 24 | 52 | 12 | 16 | 0,936 | - | - | 0,772 | - | 1,000 | - |
| GAT | 0 | 17 | 13 | 4 | 11 | 2 | 0 | 0,119 | - | - | 0,140 | - | 0,202 | - |
| AAT | 3 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1,000 | - | - | 1,000 | - | 1,000 | - |

DC: Doença de Chagas. ST: Sangue total. *Modelo genético codominante, **modelo genético dominante, ***modelo genético recessivo. Os valores de P foram obtidos por análise de regressão logística e considerados significativos após correção de Bonferroni quando $p \leq 0.016$ N- número de indivíduos; n- número de cromossomos. \$ não satisfaz o limiar de Bonferroni.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES DO GENE *EDNI*

Apesar de existirem estudos relacionando a endotelina-1 com a DC, a função do gene *EDNI* no processo da doença ainda não foi completamente esclarecida. Neste contexto, esta pesquisa é pioneira na avaliação da associação de polimorfismos genéticos da *EDNI* com a DC.

Um fragmento do gene *EDNI* (intron 2 e exon 3) foi sequenciado pelo método Sanger, possibilitando a análise dos SNPs rs10478718, rs10478720, rs1800543, no intron 2, e o SNP rs5369 (exon 3). Os alelos, genótipos e haplótipos dos SNPs citados foram verificados em 160 pacientes com DC crônica. A distribuição genotípica dos SNP de *EDNI* foi avaliada e se mostrou de acordo com o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que a amostragem de pacientes foi aleatória e refletiu a estrutura populacional real a que os mesmos pertencem. A frequência de genótipos e alelos estão detalhados na Tabela 11.

TABELA 11. Frequência de genótipos e alelos de *EDNI*.

| SNP | TOTAL | A | B | C | D | Dig | Cardiodig |
|----------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| N | 160 | 67 | 32 | 11 | 10 | 16 | 24 |
| rs10478718 (C>T) | | | | | | | |
| <i>C/C</i> | 91.25% | 95.5% | 93.75% | 63.6% | 90.0% | 87.5% | 91.7% |
| <i>C/T</i> | 8.75% | 4.5% | 6.25% | 36.4% | 10.0% | 12.5% | 8.3% |
| <i>T/T</i> | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>C</i> | 95.6% | 97.8% | 96.9% | 81.8% | 95.0% | 93.75% | 95.8% |
| <i>T</i> | 4.4% | 2.2% | 3.1% | 18.2% | 5.0% | 6.25% | 4.2% |
| rs10478720 (C>T) | | | | | | | |
| <i>C/C</i> | 96.25% | 97.0% | 93.75% | 100.0% | 90.0% | 93.8% | 100.0% |
| <i>C/T</i> | 3.75% | 3.0% | 6.25% | 0.0% | 10.0% | 6.3% | 0.0% |
| <i>T/T</i> | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>C</i> | 98.1% | 98.5% | 96.9% | 100.0% | 95.0% | 96.9% | 100.0% |
| <i>T</i> | 1.9% | 1.5% | 3.1% | 0.0% | 5.0% | 3.1% | 0.0% |
| rs1800543 (T>C) | | | | | | | |
| <i>C/C</i> | 3.1% | 3.0% | 9.4% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>C/T</i> | 29.4% | 35.8% | 28.1% | 9.1% | 20.0% | 18.8% | 33.3% |
| <i>T/T</i> | 67.5% | 61.2% | 62.5% | 90.9% | 80.0% | 81.3% | 66.7% |
| <i>C</i> | 17.8% | 20.9% | 23.4% | 4.5% | 10.0% | 9.4% | 16.7% |
| <i>T</i> | 82.2% | 79.1% | 76.6% | 95.5% | 90.0% | 90.6% | 83.3% |
| rs5369 (A>G) | | | | | | | |
| <i>G/G</i> | 76.3% | 85.1% | 71.9% | 54.5% | 70.0% | 87.5% | 62.5% |
| <i>G/A</i> | 23.1% | 14.9% | 28.1% | 45.5% | 30.0% | 12.5% | 33.3% |
| <i>A/A</i> | 0.6% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 4.2% |
| <i>G</i> | 87.8% | 92.5% | 85.9% | 77.3% | 85.0% | 93.8% | 79.2% |
| <i>A</i> | 12.2% | 7.5% | 14.1% | 22.7% | 15.0% | 6.3% | 20.8% |

Observamos resultados significativos nas análises de associação do SNPs rs10478718 quando comparados os grupos assintomáticos cardíacos (A+B) com os grupos sintomáticos cardíacos (C+D) ($p < 0,005$; OR [IC 95%] da DC, a associação se manteve significativa quando analisamos o grupo assintomático cardíaco B em relação aos grupos sintomáticos cardíacos C e D ($p = 0,049$). Além disso, também foi observada associação significativa do polimorfismo com a forma cardiodigestiva ($p = 0,036$; OR 9,96) em relação à forma indeterminada da DC, conforme detalhado na tabela 12.

Neste trabalho, a análise do SNP rs5369 mostrou associação com a forma clínica cardiodigestiva ($p = 0,013$; OR 4,43) da DC quando comparado com o grupo A (forma indeterminada). O SNP 5369, localizado na região codificante do gene (exon 3), já foi associado à asma e à hipertensão arterial sistêmica (ZHU et al., 2008; TOBE et al., 2011).

TABELA 12. Associações EDN1 com as formas clínicas e estadiamento da DC crônica.

| SNP | MODELO | A+B vs C+D | | B vs C+D | | A vs Cardiodig | |
|----------------------------|--|----------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | | <i>P</i> value | OR [95% CI] | <i>P</i> value | OR [95% CI] | <i>P</i> value | OR [95% CI] |
| rs10478718 (C>T) | | | | | | | |
| <i>C/C</i> | 55_CC_rs10478718 (C>T) (CC 1, CT/TT 0) | $p < 0,005$ | 0.13 [0.03-0.54] | $p = 0,049$ | 0.16 [0.28-0.99] | $p = 0,036$ | 0.10 [0.01-0.86] |
| <i>C/T</i> | 55_TG_rs10478718 (C>T) (TG 1, CC/TT 0) | $p < 0,005$ | 7.88 [1.85-33.58] | $p = 0,049$ | 6.03 [1.01-36.19] | $p = 0,036$ | 9.96 [1.16-85.25] |
| <i>T/T</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>C</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>T</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| rs5369 (A>G) | | | | | | | |
| <i>G/G</i> | 525_GG_rs5369 (A>G) GG-1, AA+GA 0 | - | - | - | - | $p = 0,036$ | 0.25 [0.07-0.91] |
| <i>G/A</i> | 525_GEN_rs5369 (A>G) GG-0, GA-1, AA-2 | - | - | - | - | $p = 0,013$ | 4.43 [1.37-14.42] |
| <i>A/A</i> | 525_REC_rs5369 (A>G) AA+GA-1, GG-0 | - | - | - | - | $p = 0,036$ | 3.93 [1.09-14.18] |
| <i>G</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>A</i> | - | - | - | - | - | - | - |

Não foram observados resultados significativos na avaliação de associações dos demais SNPs (rs10478720 e rs1800543) de *EDN1* estudados. No entanto, o rs1800543 do gene *EDN1* foi previamente associado aos níveis circulantes de metabólitos estáveis do óxido nítrico (nitrito e nitrato - NOx) em mulheres. Os níveis de NOx por sua vez foram associados à mortalidade cardiovascular, sendo indicado como potencial fator de risco resultando no desequilíbrio de mediadores vasoativos que contribuem para o desenvolvimento de manifestações clínicas da aterosclerose (GUMANOVA et al., 2019).

A análise dos polimorfismos estudados resultou em cinco haplótipos, CCTG, CCCG,

CCTA, TCTA e CTTG. O haplótipo TCTA foi significativamente associado às formas sintomáticas cardíacas ($p < 0,005$; OR 7,80) e à forma cardiodigestiva da DC ($p = 0,036$; OR 9,96) (Tabela 13).

TABELA 13. Frequência de haplótipos de *EDNI* e associação com a DC crônica e formas clínicas.

| Haplótipos | Total | A | B | C | D | Dig | Cardiodig | A+B vs C+D | | B vs C+D | | A vs Cardiodig | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------------|-------------------|----------|--------------|----------------|-------------------|
| | | | | | | | | P value | OR [95% CI] | P value | OR [95% CI] | P value | OR [95% CI] |
| CCTG | 68.1% | 70.1% | 59.4% | 72.7% | 70.0% | 81.3% | 62.5% | - | - | - | - | - | - |
| CCCG | 17.5% | 20.1% | 23.4% | 4.5% | 10.0% | 9.4% | 16.7% | - | - | - | - | - | - |
| CCTA | 8.1% | 6.0% | 10.9% | 4.5% | 10.0% | 0.0% | 16.7% | - | - | - | - | - | - |
| TCTA | 4.4% | 2.2% | 3.1% | 18.2% | 5.0% | 6.3% | 4.2% | $p < 0,005$ | 7.80 [1.83-33.16] | - | - | $p = 0.036$ | 9.96 [1.16-85.25] |
| CTTG | 1.9% | 1.5% | 3.1% | 0.0% | 5.0% | 3.1% | 0.0% | - | - | - | - | - | - |

Considerando que níveis aumentados de endotelina-1 foram verificados em pacientes com cardiomiopatia chagásica grave (PENGUE et al., 2019), sugere-se que os polimorfismos rs10478718 e rs 5369 no gene *EDNI* e a presença do haplótipo TCTA atuam como fatores de risco para o desenvolvimento das formas sintomáticas cardíacas da DC, provavelmente afetando a expressão genética e concentração da EDN-1 que por sua vez atua no endotélio e na patogênese da cardiomiopatia chagásica ativando vias de inflamação e estimulando a fibrose através dos cardiomiócitos (CORRAL et al., 2013). Entretanto, para melhor entender os mecanismos envolvidos, é necessário realizar a dosagem sorológica da EDN-1 e avaliar a relação entre os SNPs estudados e a expressão do peptídeo no soro.

6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar o impacto de polimorfismos nos genes *FCNI* e *EDNI* na DC. Nossos resultados sugerem que o alelo G do SNP rs2989727 (c.-1981G>A) da região promotora de *FCNI* seria um fator de risco para a DC crônica, bem como à presença de manifestações clínicas sintomáticas da doença, especialmente a forma cardíaca. O alelo G provavelmente afeta a expressão gênica contribuindo para o sucesso da infecção pelo *T. cruzi* e a

progressão para as diferentes formas clínicas da doença.

As análises, relacionadas ao gene *EDNI*, demonstraram que os polimorfismos rs10478718 e rs5369 estão associados às formas cardíacas sintomáticas e à forma cardiodigestiva da DC, respectivamente. O haplótipo TCTA do gene *EDNI* também foi associado às formas cardíacas sintomáticas (grupos C e D) e com a forma cardiodigestiva da doença.

PERSPECTIVAS

Há mais de 20 anos, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia Molecular, situado no Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e chefiado pela profa. Dra Iara Messias Reason, trabalha em parceria com o ambulatório de Chagas do Hospital de clínicas da UFPR, buscando identificar informações relevantes que possam beneficiar e auxiliar no acompanhamento dos pacientes do ambulatório de doença de Chagas. Uma das linhas de pesquisa é a identificação e avaliação de possíveis marcadores biológicos em doenças infecciosas. O gene *FCNI* foi anteriormente investigado pelo nosso grupo de pesquisa na febre reumática (Catarino et al., 2018), entretanto este foi o primeiro trabalho a investigar associação da DC e os polimorfismos descritos do genes *FCNI* e da *EDNI* em pacientes com a DC crônica. Neste contexto, os resultados apresentados nesta pesquisa contribuem para elucidar a fisiopatologia da DC.

Há perspectivas de continuidade desta pesquisa, com a quantificação dos níveis séricos de ficolina-1 e endotelina-1 por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) em pacientes e controles avaliados no presente estudo. Assim, permitindo confirmar o impacto dos polimorfismos estudados nos genes *EDNI* e *FCNI* nas respectivas concentrações séricas de endotelina-1 e ficolina-1 nas diferentes formas clínicas da DC.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, I. C. et al. Chagas' heart disease: Descriptive analysis of 141 patients in a hospital of Madrid, Spain. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 37, p. 101690, 1 set. 2020.

ANDRADE, C. DE M. et al. Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 706–715, 1 nov. 2015.

ALPERN, J. D.; LOPEZ-VELEZ, R.; STAUFFER, W. M. Access to benznidazole for Chagas disease in the United States-Cautious optimism? 2017.

ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, v. 13, n. 4, p. 540–550, 1 out. 2015.

ALI, Y. M. et al. Lectin Pathway Mediates Complement Activation by SARS-CoV-2 Proteins. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 2645, 5 jul. 2021.

AMMITZBØLL, C. G. et al. Non-Synonymous Polymorphisms in the FCN1 Gene Determine Ligand-Binding Ability and Serum Levels of M-Ficolin. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50585, 28 nov. 2012.

ANVISA. **Anvisa approves first kit for molecular diagnosis of Chagas disease - SBMT**. 2022. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/anvisa-aprova-primeiro-kit-para-diagnostico-molecular-da-doenca-de-chagas/?locale=en-US&lang=en>. Acesso em: 12 out. 2022.

ASAI, T. et al. Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 38, n. 6, p. 1321–1324, 2001.

AUTON, A. et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68, 30 set. 2015.

BALLINAS-VERDUGO, M. A. et al. Circulating miR-146a as a possible candidate biomarker in the indeterminate phase of Chagas disease. **Biological Research**, v. 54, n. 1, p. 21, 1 dez. 2021.

BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Advances in parasitology**, v. 97, p. 1–45, 2017.

BALTOGIANNIS, G. G. et al. Contribution of the Endothelin System to the Genesis and Maintenance of Atrial Fibrillation: Review of the Literature and Clinical Implications. **Hellenic Journal of Cardiology HJC • 279 Hellenic J Cardiol**, v. 56, p. 279–284, 2015.

BARDEN, A. E. et al. Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy. **Journal of hypertension**, v. 19, n. 10, p. 1775–1782, 2001.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 328–38, 2001.

BELLISAI, F. et al. Evaluation of the effect of Bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by Systemic Sclerosis. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 261–264, 2011.

BELTRAME, M. H. et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, n. JAN, p. 148, 1 jan. 2015a.

BELTRAME, M. H. et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 1, p. 85–100, 8 abr. 2015b.

BERILLO, O. et al. Aldosterone contributes to hypertension in male mice inducibly overexpressing human endothelin-1 in endothelium. **Journal of hypertension**, v. 39, n. 9, p. 1908–1917, 1 set. 2021.

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, 14 nov. 2007.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.

BERN, C. et al. Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, 1 jan. 2020.

BIDULA, S.; SEXTON, D. W.; SCHELENZ, S. Ficolins and the Recognition of Pathogenic Microorganisms: An Overview of the Innate Immune Response and Contribution of Single Nucleotide Polymorphisms. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

BOLDT, A. B. W.; PETZL-ERLER, M. L. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. **Human mutation**, v. 19, n. 3, p. 296–306, 2002.

BOLDT, A. B. W.; LUZ, P. R.; MESSIAS-REASON, I. J. T. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 140, n. 1, p. 63–70, jul. 2011.

BOLDT, A. B. W. et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. **Journal of clinical immunology**, v. 33, n. 1, p. 210–219, 1 jan. 2013.

BORDRON, A. et al. Complement System: a Neglected Pathway in Immunotherapy. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology 2019 58:2**, v. 58, n. 2, p. 155–171, 29 maio 2019.

BOZELLI, C. E. et al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com doença de Chagas no Hospital Universitário de Maringá, Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 1027–1034, 2006.

BRASIL, P. E. A. A. et al. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 10, 25 nov. 2010.

BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C.; KIERSZENBAUM, F. Effects of complement depletion in experimental chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 1, p. 86–91, 1 jan. 1975.

BUSCAGLIA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology 2006 4:3**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006.

CAMPBELL, D.; WESTENBERGER, S.; STURM, N. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 549–562, 18 mar. 2004.

CAMPETELLA, O. et al. Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165692, 1 maio 2020.

CANGERI, F. et al. A classe da NYHA tem relação com a condição funcional e qualidade de vida na insuficiência cardíaca. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 18, n. 2, p. 157–163, jun. 2011.

CARTER, A. M.; STANDEVEN, K. F.; GRANT, P. J. Common Genetic Determinants of Coagulation and Fibrinolysis. **Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics**, p. 1–20, 1 jan. 2013.

CASTRO NETO, A. L.; DA SILVEIRA, J. F.; MORTARA, R. A. Comparative Analysis of Virulence Mechanisms of Trypanosomatids Pathogenic to Humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 313, 16 abr. 2021.

CATARINO, S. J. et al. Sickening or Healing the Heart? The Association of Ficolin-1 and Rheumatic Fever. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3009–3009, 18 dez. 2018.

CATARINO, S. J. DOS SANTOS. **Avaliação do papel da Ficolina-1 e Ficolina-3 na febre reumática e cardiopatia reumática crônica**. 2020.

CAVALCANTI, E. O. et al. MASP1 Gene Polymorphism and MASP-3 Serum Levels in Patients with Chronic Chagas Disease. <https://doi.org/10.1080/08820139.2022.2110503>, v. 51, n. 7, p. 2108–2121, 3 out. 2022.

CESTARI, I. et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular immunology**, v. 53, n. 4, p. 328–334, abr. 2013.

CIELO, R.; IVÁN, M.; BELKISYOLÉ, A. DE N. Chagas Disease by Oral Transmission: Cardiovascular Manifestations. **Cardiology and current research**, v. 8, n. 1, 20 jan. 2017.

CORRAL, R. S. et al. Trypanosoma cruzi infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 2, 2013.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

CRUYSSSEN, B. VANDER et al. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 46, n. 12, p. 1792–1795, 1 dez. 2007.

CULLINGFORD, T. E. et al. Temporal regulation of expression of immediate early and second phase transcripts by endothelin-1 in cardiomyocytes. **Genome biology**, v. 9, n. 2, 14 fev. 2008.

- CZECH, M. M. et al. Reactivation of Chagas Disease in a Patient With an Autoimmune Rheumatic Disease: Case Report and Review of the Literature. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2021.
- DAKA, B. et al. Circulating concentrations of endothelin-1 predict coronary heart disease in women but not in men: A longitudinal observational study in the Vara-Skövde Cohort. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 14 nov. 2015.
- DAVÌ, G. et al. Enhanced thromboxane biosynthesis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. The Chronic Obstructive Bronchitis and Haemostasis Study Group. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, n. 6, p. 1794–9, dez. 1997.
- DE BONA, E. et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, 6 ago. 2018.
- DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. ESP, p. 7–86, 2016.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**, 1997.
- DIEFENBACH, K. et al. Systematic analysis of sequence variability of the endothelin-1 gene: a prerequisite for association studies. **Genetic testing**, v. 10, n. 3, p. 163–168, set. 2006.
- DIETMANN, A. et al. Opposed circulating plasma levels of endothelin-1 and C-type natriuretic peptide in children with Plasmodium falciparum malaria. **Malaria Journal**, v. 7, p. 253, 2008.
- DOCAMPO, R. et al. **Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , mar. 2005. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1097>>. Acesso em: 16 maio. 2021
- DRION, I. et al. Plasma COOH-Terminal Proendothelin-1: A marker of fatal cardiovascular events, all-cause mortality, and new-onset albuminuria in type 2 diabetes? (ZODIAC-29). **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2354, nov. 2012.
- DUBOVYK, Y. I. et al. Positive Association between EDN1 rs5370 (Lys198Asn) Polymorphism and Large Artery Stroke in a Ukrainian Population. **Disease markers**, v. 2018, 2018.

EBRAHIMI, N. et al. The association of endothelin-1 gene polymorphism and its plasma levels with hypertension and coronary atherosclerosis. **Archives of Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 613–620, 6 maio 2021.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. New Insights into the Role of Ficolins in the Lectin Pathway of Innate Immunity. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 316, p. 49–110, 1 jan. 2015.

FACTOR, S. M. et al. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 2, p. 246–253, 1985.

FANG, Z. et al. Association of endothelin-1 gene polymorphisms with essential hypertension in a Chinese population. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 16037446, 2017.

FELDMAN, A. M.; MCNAMARA, D. Myocarditis.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431908>, v. 343, n. 19, p. 1388–1398, 9 nov. 2000.

FLORES VALDEZ, N. A ENDOTELINA-1: ENDOTELIAL VASCULAR VASOCONSTRICTOR INTRÍNSECO. **Revista Med**, v. 21, n. 2, p. 64–78, 2013.

FONSECA, L. M. et al. Theft and reception of host cell's sialic acid: Dynamics of trypanosoma cruzi trans-sialidases and mucin-like molecules on chagas' disease immunomodulation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 164, 2019.

FORD, T. J. et al. Genetic dysregulation of endothelin-1 is implicated in coronary microvascular dysfunction. **European Heart Journal**, v. 41, n. 34, p. 3239–3252, 7 set. 2020.

FORSYTH, C. J. et al. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n. 8, p. 1056–1062, 15 out. 2016.

FREEMAN, B. D. et al. Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. **Life Sciences**, v. 118, n. 2, p. 110–119, 24 nov. 2014.

GARRED, P. et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. **Immunological reviews**, v. 274, n. 1, p. 74–97, 1 nov. 2016.

GASPARIM, A. Z. et al. Epidemiological and clinical profile of patients with Chagas disease in the Central-North area of Paraná, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 225–230, 1 mar. 2018.

GIANG, N. T. et al. Complement protein levels and MBL2 polymorphisms are associated with dengue and disease severity. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 10 set. 2020.

GIRALDO, A. et al. Feedback regulation by Atf3 in the endothelin-1-responsive transcriptome of cardiomyocytes: Egr1 is a principal Atf3 target. **Biochemical Journal**, v. 444, n. Pt 2, p. 343, 1 jun. 2012.

GÓMEZ-OCHOA, S. A. et al. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. **Global Heart**, v. 17, n. 1, 24 ago. 2022.

GOUDET, J. et al. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 1933–1940, dez. 1996.

GRAFFELMAN, J.; WEIR, B. S. Multi-allelic exact tests for Hardy-Weinberg equilibrium that account for gender. **Molecular ecology resources**, v. 18, n. 3, p. 461–473, 1 maio 2018.

GUMANOVA, N. G. et al. Levels of nitric oxide metabolites, adiponectin and endothelin are associated with SNPs of the adiponectin and endothelin genes. **Biomedical reports**, v. 11, n. 4, p. 154–164, 1 out. 2019.

GUHL, F. Chagas disease in Andean countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 29–38, 2007.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles - PubMed. **Biometrics**, p. 361–72, jun. 1992.

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, nov. 2012.

HOFFMAN, K. A. et al. Improved Biomarker and Imaging Analysis for Characterizing Progressive Cardiac Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Chagasic Cardiomyopathy. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 22, 19 nov. 2019.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 8, p. 601–606, 1 ago. 2014.

HOWARD, M.; FARRAR, C. A.; SACKS, S. H. Structural and functional diversity of collectins and ficolins and their relationship to disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 1, p. 75–85, 1 jan. 2018.

HUANG, H. et al. Trypanosoma cruzi infection (Chagas' disease) of mice causes activation of the mitogen-activated protein kinase cascade and expression of endothelin-1 in the myocardium. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S148–S150, 2000.

IKEDIONWU, C. et al. Trends and associated characteristics for Chagas disease among women of reproductive age in the United States, 2002 to 2017. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 11, p. e00167, 1 nov. 2020.

JACKSON, Y. et al. Prevalence, Clinical Staging and Risk for Blood-Borne Transmission of Chagas Disease among Latin American Migrants in Geneva, Switzerland. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e592, fev. 2010.

JELICKS, L. A. et al. Cardioprotective effects of phosphoramidon on myocardial structure and function in murine Chagas' disease. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1497–1506, 2002.

KATAYAMA, M. et al. Ficolin-1 is a promising therapeutic target for autoimmune diseases. **International immunology**, v. 31, n. 1, p. 23–32, 25 set. 2019.

KEDZIERSKI, R. M.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, p. 851–876, 2001.

KIAN, W. et al. Cardiomyopathy Etiologies, Symptoms and Management. **Cardiomyopathy - Disease of the Heart Muscle**, 1 fev. 2021.

KIM, F. Y. et al. Pulmonary artery smooth muscle cell endothelin-1 expression modulates the pulmonary vascular response to chronic hypoxia. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 4, p. L368–L377, 2015.

KOLETTIS, T. M. et al. Endothelin in coronary artery disease and myocardial infarction. **Cardiology in review**, v. 21, n. 5, p. 249–256, set. 2013.

KOWALCZYK, A. et al. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, n. 1, p. 41–52, 7 out. 2015.

KUCZMARSKI, A. V. et al. ET-1 as a Sex-Specific Mechanism Impacting Age-Related Changes in Vascular Function. **Frontiers in Aging**, v. 2, 31 ago. 2021.

KUMARI, B. et al. Endothelin-1 Gene Polymorphism and Its Level Predict the Risk of Venous Thromboembolism in Male Indian Population. [s.d.].

LANTOS, A. B. et al. Sialic Acid Glycobiology Unveils Trypanosoma cruzi Trypomastigote Membrane Physiology. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2016.

LAZUROVA, Z. et al. Association of Polymorphisms in Endothelin-1 and Endothelin Receptor A Genes With Vasovagal Syncope. [s.d.].

LEASK, A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. **Circulation Research**, v. 106, n. 11, p. 1675–1680, 11 jun. 2010.

LAFEPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco. (2016). Guia de Compras do Benznidazol. Disponível em: <http://www.lafepe.pe.gov.br/wp-content/uploads/2016/08/Guia-de-Compras-BZD-27082010_revis%C3%A3o-Ago16.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2021.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, abr. 2013.

LEDERKREMER, R.; BERTELLO, L. Glycoinositolphospholipids, Free and as Anchors of Proteins, in Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1165–1179, 25 mar. 2005.

LEVIN, E. R. Endothelins. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508103330607>, v. 333, n. 6, p. 356–363, 10 ago. 1995.

LIANG, L. L. et al. Genetic susceptibility of five tagSNPs in the endothelin-1 (EDN1) gene to coronary artery disease in a Chinese Han population. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, 17 out. 2018.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of Trypanosoma cruzi. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. APR, 20 abr. 2017.

- LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in public health**, v. 7, n. 6, 2019.
- LIDANI, K. C. F. et al. Clinical and epidemiological aspects of chronic Chagas disease from Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–9, 21 out. 2020.
- 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, 1 jun. 2021.
- LIN, Y. J. et al. Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, n. 2, p. 263–269, 22 ago. 2014.
- LING, M.; MURALI, M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 4, p. 579–590, 1 dez. 2019.
- LIU, Y. et al. Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3150–3156, 1 set. 2005.
- LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy** **2017 2:1**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 14 jul. 2017.
- LUQUETTI, A. O. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 369–376, 14 mar. 2015.
- LUZ, P. R. et al. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. **International journal of cardiology**, v. 143, n. 3, p. 448–450, 3 set. 2010.
- LUZ, P. R. et al. Association of L-Ficolin Levels and FCN2 Genotypes with Chronic Chagas Disease. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60237, 4 abr. 2013.
- LUZ, P. R. et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, 8 jan. 2016.

- MA, Y. J.; GARRED, P. Pentraxins in Complement Activation and Regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3046, 19 dez. 2018.
- MACCLELLAN, L. R. et al. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine and stroke: the Stroke Prevention in Young Women study. **Stroke**, v. 40, n. 10, out. 2009.
- MANITSOPOULOS, N. et al. Highly Selective Endothelin-1 Receptor A Inhibition Prevents Bleomycin-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice. **Respiration**, v. 95, n. 2, p. 122–136, 1 fev. 2018.
- MARINHO, C. R. F. et al. Influence of Acute-Phase Parasite Load on Pathology, Parasitism, and Activation of the Immune System at the Late Chronic Phase of Chagas' Disease. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 308, 1999.
- MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.
- MARTINS-MELO, F. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 2014.
- MARTINS-MELO, F. R.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105948, 1 ago. 2021.
- MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 3, p. 715, 2007.
- MATSUDA, N. M. et al. Effect of isosorbide dinitrate on gastroesophageal reflux in healthy volunteers and patients with Chagas' disease. **Digestive Diseases and Sciences** 1995 40:1, v. 40, n. 1, p. 177–182, 1995.
- MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, 2009.
- MATSUSHITA, M. Ficolins in complement activation. **Molecular immunology**, v. 55, n. 1, p. 22–26, ago. 2013.

- MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in innate immunity. **Immunobiology**, v. 205, n. 4–5, p. 490–497, 2002.
- MAYYAS, F. et al. Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size and fibrosis in patients with structural heart disease. **Circulation. Arrhythmia and electrophysiology**, v. 3, n. 4, p. 369, 8 ago. 2010.
- MEDEIROS, C. A. et al. Mapping the morbidity and mortality of Chagas disease in an endemic area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, 2 fev. 2022.
- MEI, M. et al. EDN1 Gene Variant is Associated with Neonatal Persistent Pulmonary Hypertension. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29877–29877, 18 jul. 2016.
- MELOS, J. L. R. ;; ECHEVARRIA, A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos Trypanosomatids Metabolic Systems as Potential Chemotherapeutic Targets. **Rev. Virtual Quim**, v. 2012, n. 4, p. 374–392, 2012.
- MERLE, N. S. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 262, 2015.
- MIRANDA-ARBOLEDA, A. F. et al. Roadblocks in Chagas disease care in endemic and nonendemic countries: Argentina, Colombia, Spain, and the United States. The NET-Heart project. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 12, 1 dez. 2021.
- MORA, G. Chagas cardiomyopathy. **E-Journal of Cardiology Practice**, v. 14, n. 31, nov. 2016.
- MOREAU, P. et al. Angiotensin II Increases Tissue Endothelin and Induces Vascular Hypertrophy. **Circulation**, v. 96, n. 5, p. 1593–1597, 2 set. 1997.
- MUKHERJEE, S. et al. Role of vasoactive mediators in the pathogenesis of Chagas' disease. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 8, n. 5, p. 410–419, 1 maio 2003.
- MÜLLER KRATZ, J. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>, v. 11, n. 10, p. 943–957, 3 out. 2018.
- MUÑOZ-CALDERÓN, A. et al. Oral transmission of Chagas disease: Typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 113–122, 2013.

NAIDOO, N. et al. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. **Human Genomics** 2011 **5:6**, v. 5, n. 6, p. 1–46, 1 out. 2011.

NEPAL, G. et al. Association between Lys198Asn polymorphism of endothelin-1 gene and ischemic stroke: A meta-analysis. **Brain and Behavior**, v. 9, n. 10, 1 out. 2019.

OLIVEIRA, R. B. et al. Gastrointestinal manifestations of chagas' disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 6, p. 884–889, 1 jun. 1998.

OLIVEIRA, G. M. et al. Applicability of the use of charcoal for the evaluation of intestinal motility in a murine model of Trypanosoma cruzi infection. **Parasitology research**, v. 102, n. 4, p. 747–750, mar. 2008.

OLIVEIRA, E. C. et al. Neuropathy of Gastrointestinal Chagas' Disease: Immune Response to Myelin Antigens. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 1, p. 54–62, jan. 2009.

OLIVEIRA, I. et al. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 8, p. 945–956, ago. 2010.

OLLIER, W. E. R. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**, v. 28, n. 4–5, p. 174–178, 21 nov. 2004.

OPAS-OMS. **70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 9 set. 2022.

PACHECO, L. et al. Oral transmission of Chagas disease: A literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e31910212636–e31910212636, 17 fev. 2021.

PARÉ, G. et al. Genetic analysis of 103 candidate genes for coronary artery disease and associated phenotypes in a founder population reveals a new association between endothelin-1 and high-density lipoprotein cholesterol. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 4, p. 673–682, 2007.

PEDROSA, R. C. et al. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox report : communications in free radical research**, v. 6, n. 4, p. 265–270, 2001.

PEK, S. L. T. et al. Endothelin-1 predicts incident diabetic peripheral neuropathy in Type 2 Diabetes: a cohort study. **European Journal of Endocrinology**, v. 182, n. 4, p. 429–438, 1 abr. 2020.

PELLEGRINI, D.; JORDAN, R.; BRUETMAN, J. E. Chagas' Disease. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 19, p. 1881–2, 5 nov. 2015.

PENEGAR, S. et al. National study of colorectal cancer genetics. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 9, p. 1305, 11 nov. 2007.

PENGUE, C. et al. Impaired frequencies and function of platelets and tissue remodeling in chronic Chagas disease. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0218260, 1 jun. 2019.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–17, 19 dez. 2013.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Old and new challenges in Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 15, n. 11, p. 1347–1356, 1 nov. 2015.

PETKOVA, S. B. et al. Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 9, n. 5, p. 257–265, 2000.

PETKOVA, S. B. et al. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 499–511, 1 maio 2001.

PICADO, A. et al. The burden of congenital Chagas disease and implementation of molecular diagnostic tools in Latin America. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 5, p. e001069, 1 out. 2018.

PIECZARKA, C. et al. Ficolin-1 and ficolin-3 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. **Autoimmunity**, v. 53, n. 7, p. 400–407, 2 out. 2020.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, nov. 2010.

PINAZO, M. J. et al. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 422–432, 2015.

- PRADO, C. M. et al. The Vasculature in Chagas Disease. **Advances in parasitology**, v. 76, p. 83, 2011.
- PROHÁSZKA, Z. et al. Association of Ficolin-3 with Severity and Outcome of Chronic Heart Failure. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60976, 15 abr. 2013.
- POLACHINI, R. et al. Avaliação da via das lectinas no soro de pacientes com doença de Chagas crônica pela detecção de C4 por Elisa. **J Bras Patol Med Lab**, v. 58, p. 1–7, 2022.
- PONOMARENKO, M. et al. How to Use SNP_TATA_Comparator to Find a Significant Change in Gene Expression Caused by the Regulatory SNP of This Gene's Promoter via a Change in Affinity of the TATA-Binding Protein for This Promoter. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- PRADO, C. M. et al. The Vasculature in Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 76, p. 83–99, 1 jan. 2011.
- PRATT, C. W. et al. Symptoms and Etiology of Serious Mental Illness. **Psychiatric Rehabilitation**, p. 33–74, 1 jan. 2014.
- PROHÁSZKA, Z. et al. Association of Ficolin-3 with Severity and Outcome of Chronic Heart Failure. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60976, 15 abr. 2013.
- RAMIREZ-TOLOZA, G. et al. Trypanosoma cruzi Calreticulin: Immune Evasion, Infectivity, and Tumorigenesis. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 368–381, 1 abr. 2020.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- RASSI, A. J.; RASSI, S. G.; RASSI, A. SciELO - Brazil -. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 76, n. 1, 2001.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An Exact Test for Population Differentiation. **Evolution**, v. 49, n. 6, p. 1280, dez. 1995.
- REN, Y.; DING, Q.; ZHANG, X. Ficolins and infectious diseases. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 1, p. 25, fev. 2014.

RIOS-BARROS, L. V. et al. How to get away with murder: The multiple strategies employed by pathogenic protozoa to avoid complement killing. **Molecular Immunology**, v. 149, p. 27–38, 1 set. 2022.

ROJAS, L. Z. et al. Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2018.

ROSSI, M. A.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis - PubMed. **Am J Pathol**, v. 114, n. 2, p. 209–16, fev. 1984.

ROSSI, M. A. et al. Coronary Microvascular Disease in Chronic Chagas Cardiomyopathy Including an Overview on History, Pathology, and Other Proposed Pathogenic Mechanisms. 2010.

ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G.; BESTETTI, R. B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 8, 2003.

RUNZA, V. L.; SCHWAEBLE, WILHELM.; MÄNNEL, D. N. Ficolins: novel pattern recognition molecules of the innate immune response. **Immunobiology**, v. 213, n. 3–4, p. 297–306, 14 maio 2008.

SAINANI, S. G.; MARU, G. V.; MEHRA, P. A. Role of endothelin-1 in genesis of coronary artery disease - PubMed. **Indian Heart J.**, p. 121–7, 2005.

SALOMONE, O. A. et al. High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas' cardiomyopathy. **American Journal of Cardiology**, v. 87, n. 10, p. 1217–1220, 15 maio 2001.

SAMPAIO, G. H. F. et al. Epidemiological profile of acute Chagas disease in individuals infected by oral transmission in northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–7, 11 set. 2020.

SAMRANSAMRUAJKIT, R. et al. **Plasma endothelin-1 in infants and young children with acute bronchiolitis and viral pneumonia - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12744623/>>. Acesso em: 8 jun. 2022.

SANDRI, T. L. et al. 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.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687–695, 1977.

SANTOS, E. F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008445, 1 ago. 2020.

SCHAFRANSKI, M. D. et al. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 3, p. 521, dez. 2004.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 75–86, 2007.

SCHNEIDER, J. G. et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. **American journal of hypertension**, v. 15, n. 11, p. 967–972, 1 nov. 2002.

SCHUETZ, P. et al. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 22, 28 fev. 2008.

SCRUTENID, D. et al. Prediction of mortality in mild to moderately symptomatic patients with left ventricular dysfunction. The role of the New York Heart Association classification, cardiopulmonary exercise testing, two-dimensional echocardiography and Holter monitoring. **European heart journal**, v. 15, n. 8, p. 1089–1095, 1994.

SGUASSERO, Y. et al. Course of Chronic Trypanosoma cruzi Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139363, 5 out. 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 15 mar. 2012.

SILVA, A. P. DA et al. Neglected diseases and pharmaceutical industry: the case of Chagas Disease. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e21110212419–e21110212419, 10 fev. 2021.

SPIRIG, R. et al. TLR2 and TLR4 agonists induce production of the vasoactive peptide endothelin-1 by human dendritic cells. **Molecular immunology**, v. 46, n. 15, p. 3178–3182, set. 2009.

STEVENS, P.A. BROWN, M. J. **Genetic variability of the ET-1 and the ETA receptor genes in essential hypertension - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8587478/>>. Acesso em: 4 dez. 2021.

SOUSA JÚNIOR, A. DA S. et al. Space-temporal analysis of Chagas disease and its environmental and demographic risk factors in the municipality of Barcarena, Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 4, p. 742–755, 1 out. 2017.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global heart**, v. 10, n. 3, p. 139–144, 1 set. 2015.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 317, 10 jul. 2014.

SUGDEN, P. H.; CLERK, A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 76, n. 11, p. 725–746, 1998.

SVS-MS. Doença de Chagas - Boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Doença de Chagas. 2021.

SVS-MS. **Boletim Epidemiológico – Territorialização e vulnerabilidade para doenças de Chagas crônica - SBMT**, 2022. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/boletim-epidemiologico-territorializacao-e-vulnerabilidade-para-doencas-de-chagas-cronica/>>. Acesso em: 7 nov. 2022.

TANAKA, C. et al. Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 27, n. 5, p. 367–371, maio 2004.

TANOWITZ, H. B. et al. The Putative Mechanistic Basis for the Modulatory Role of Endothelin-1 in the Altered Vascular Tone Induced by Trypanosoma cruzi. **<http://dx.doi.org/10.3109/10623329909053412>**, v. 6, n. 3, p. 217–230, 1998.

- TANOWITZ, H. B. et al. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2496–2503, abr. 2005.
- TANOWITZ, H. B. et al. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 13, n. 12, p. 1393, 2 dez. 2015.
- TARLETON, R. L. Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 10, p. 835, 1 out. 2016.
- TEIXEIRA, A. R. L. et al. Trypanosoma cruzi in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in the Absence of Parasitism. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e1000, mar. 2011.
- TFELT-HANSEN, P.; BRØSEN, K. Pharmacogenomics and migraine: Possible implications. **Journal of Headache and Pain**, v. 9, n. 1, p. 13–18, 24 fev. 2008.
- TIRET, L. et al. The Lys198Asn Polymorphism in the Endothelin-1 Gene Is Associated With Blood Pressure in Overweight People. **Hypertension**, v. 33, n. 5, p. 1169–1174, 1999b.
- TOBE, S. W. et al. The impact of endothelin-1 genetic analysis and job strain on ambulatory blood pressure. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 71, n. 2, p. 97–101, 15 mar. 2011.
- TSAKANNOVA, G. et al. Pattern Recognition Molecules of Lectin Complement Pathway in Ischemic Stroke. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 14, p. 1347–1368, 21 out. 2021.
- TUCCI, A. R. et al. *braz j infect dis* 2020;24(5):386-397 Role of FAK signaling in chagasic cardiac hypertrophy. 2020.
- VARGA, J.; LAFYATIS, R. Etiology and pathogenesis of systemic sclerosis. **Rheumatology: Sixth Edition**, v. 2–2, p. 1177–1189, 1 jan. 2015.
- VARGAS-ALARCON, G. et al. The -974C>A (rs3087459) gene polymorphism in the endothelin gene (EDN1) is associated with risk of developing acute coronary syndrome in Mexican patients. **Gene**, v. 542, n. 2, p. 258–262, 12 set. 2013.
- VÁŠKŮ, A. et al. The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A and -3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. **Experimental and molecular pathology**, v. 73, n. 3, p. 230–233, dez. 2002.

VIRDIS, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 12, n. 2, p. 181–187, mar. 2003.

WANECEK, M. et al. The endothelin system in septic and endotoxin shock. **European journal of pharmacology**, v. 407, n. 1–2, p. 1–15, 27 out. 2000.

WILTSHIRE, S. et al. Investigating the association between K198N coding polymorphism in EDN1 and hypertension, lipoprotein levels, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Human genetics**, v. 123, n. 3, p. 307–313, abr. 2008.

WITTNER, M. et al. Trypanosoma cruzi Induces Endothelin Release from Endothelial Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 493–497, 1 fev. 1995.

WORT, S. J. et al. Endogenously Released Endothelin-1 from Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Promotes Cellular Proliferation. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.1.4331>, v. 25, n. 1, p. 104–110, 14 dez. 2001.

WORT, S. J. et al. Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 36, p. 24297–24305, 4 set. 2009.

WHO. **ICD-10. Chapter I- Certain infectious and parasitic diseases**, 2019. Disponível em: <<https://icd.who.int/browse10/2019/en#/I>>. Acesso em: 08 out. 2022.

WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**, 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 28 nov. 2021.

WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**, 2022. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 12 out. 2022.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411–415, 1988.

ZANATTA, C. M. et al. Papel do sistema endotelina na nefropatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 4, p. 581–588, jun. 2008.

ZHANG, C. L. et al. Plasma endothelin-1-related peptides as the prognostic biomarkers for heart failure: A PRISMA-compliant meta-analysis. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 50, 1 dez. 2017.

ZHU, G. et al. Polymorphisms in the endothelin-1 (EDN1) are associated with asthma in two populations. **Genes and immunity**, v. 9, n. 1, p. 23–29, jan. 2008.