



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

Luciane de Freitas Firmino

**Avaliação da Produção de Citocinas em Pacientes com a Doença de Chagas
Aguda Tratados com o Benzonidazol Após Transmissão Oral**

Recife

2023

Luciane de Freitas Firmino

**Avaliação da Produção de Citocinas em Pacientes com a Doença de Chagas
Aguda Tratados com o Benzonidazol Após Transmissão Oral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Dra. Virginia Maria de Barros Lorena

Co-Orientadora: Dra. Amanda Vasconcelos do Nascimento

Recife

2023

F525a	<p>Firmino, Luciane de Freitas.</p> <p>Avaliação da produção de citocinas em pacientes com a doença de chagas aguda tratados com o benzonidazol após transmissão oral / Luciane de Freitas Firmino – 2023. 79 p.</p> <p>Orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena Coorientadora: Amanda Vasconcelos do Nascimento Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2023. Inclui referências, apêndices e anexos.</p> <p>1. Doença de Chagas. 2. Reação de fase aguda. 3. Imunidade. Lorena, Virginia Maria Barros de (orientadora). II. Título.</p>
616.988 CDD (23.ed.)	UFPE (CCS 2023 - 305)

LUCIANE DE FREITAS FIRMINO

**Avaliação da Produção de Citocinas em Pacientes com a Doença de Chagas
Aguda Tratados com o Benzonidazol Após Transmissão Oral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Aprovado em: 28/08/2023

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Ana Karine de Araújo Soares (Examinadora Externa)
Fundação Altino Ventura (FAV)

Prof. Dra. Virginia Maria de Barros Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Agradecimentos

Primeiramente à Deus por ter me dado paz, saúde, graça e sabedoria por ter chegado até aqui, sem Ele nada disso estaria acontecendo. Sou grata por tudo!

À todos da minha família, em especial minha mãe, Natalice, pela suas orações e alegria renovadora, ao meu pai, Luciano, pela sua paciência, conselhos e benevolência para conosco.

Ao mais novo integrante da família, meu cachorro Pipo que nos alegra todo dia com sua energia, carinho e afeto. Obrigada por ter chegado à nossa família!

Essa pesquisa não estaria sendo realizada sem o apoio de todos do Laboratório de Imunoparasitologia do Aggeu Magalhães/ Fiocruz-PE onde se fez casa, abrigo, apoio emocional, ensino, muita pesquisa e debate científico! Agradeço a todos que contribuíram diretamente e indiretamente na minha passagem durante esse período de 2021-2023.

Em especial a minha orientadora Virginia que de braços abertos me aceitou para um recomeço na minha carreira como Biomédica. Agradeço pela paciência, conselhos e ensinamentos. Também a minha coorientadora Amanda que aceitou esse desafio de me ajudar nessa pesquisa, obrigada pelo seu tempo e dedicação comigo.

Agradeço ao acolhimento na Casa do Portador da Doença de Chagas/PROCAPE-UPE, em especial à Dra. Cristina Carrazzone pelo seu atendimento humano e acolhedor, à Enfermeira Maria Aucineide, Thayne, Carol e ao atendimento acolhedor de Damares que sempre será lembrada pelos seus esforços na recepção dos pacientes.

Firmino, Luciane de Freitas. **Avaliação da Produção de Citocinas em Pacientes com a Doença de Chagas Aguda Tratados com o Benzonidazol Após Transmissão Oral**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RESUMO

Em 2019, Pernambuco notificou um dos maiores surtos de doença de Chagas Aguda (DCA) no município de Ibimirim. O tratamento com o Benzonidazol deve ser realizado em todos os casos de infecção aguda, independente da forma de transmissão, pois cerca de 70-80% dos casos apresentam cura nesta fase. A cura é evidenciada através da negatização dos testes sorológicos, que podem durar muitos anos. Diante disso, a observação do comportamento de outros fatores solúveis após tratamento etiológico em um grupo de pessoas com DCA, poderia permitir a identificação de biomarcadores que comprovem a eficácia do tratamento. O objetivo do estudo foi avaliar as citocinas do perfil Th1 (TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-6), Th2 (IL-10, IL-4) e Th17 (IL-17A) em pacientes com a DCA, antes e após tratamento com Benzonidazol. Para isso, 28 indivíduos provenientes do surto ocorrido em Ibimirim foram confirmados laboratorialmente pela infecção com o *Trypanosoma cruzi*. Todos os pacientes foram atendidos e tratados no Setor de Infectologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz e acompanhados no Ambulatório de doença de Chagas (PROCAPE/UPE). As amostras de sangue foram coletadas antes (T0) e após o tratamento (T1/1 mês; T2/2 meses; T3/5-6 meses; T4/2 anos), onde as amostras biológicas foram armazenadas no Serviço de Referência de Doença de Chagas (SRDC) /FIOCRUZ. As citocinas dos perfis Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-6), Th2 (IL-10 e IL-4) e Th17 (IL-17A) foram quantificadas pelo *Cytometric Bead Array* (CBA) através da citometria de fluxo. Também foi realizada a dosagem dos anticorpos IgG por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e titulação de anticorpos IgM e IgG pela Reação de Imunofluorescência Indireta, além disso quantificamos a carga parasitária do DNA de *T. cruzi* através da Reação de Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR). Nossos resultados indicaram que o BZ diminuiu a resposta inflamatória nos pacientes, pois citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-6) e Th17 (IL-17) bem como as citocinas regulatórias do perfil Th2 (IL-4 e IL-10), diminuíram com a intervenção. Houve redução dos títulos de anticorpos IgM e IgG, sendo observado soroconversão de um paciente, dois anos após o tratamento.

Ainda, após o tratamento a carga parasitária negativou indicando o sucesso do tratamento, porém, em um dos indivíduos foi observada a reativação após dois anos de tratamento, indicando uma possível falha terapêutica. Assim, o Benzonidazol na DCA reduz a resposta inflamatória desencadeada pelo *T. cruzi*.

Palavras-chave: doença de chagas; reação de fase aguda; imunidade

ABSTRACT

In 2019, Pernambuco reported one of the largest outbreaks of acute Chagas disease (ACD) in the municipality of Ibimirim. Treatment with Benzonidazole should be carried out in all cases of acute infection, regardless of the form of transmission, as around 70-80% of cases are cured at this stage. Cure is evidenced by negative serological tests, which can last for many years. In view of this, observing the behavior of other soluble factors after etiological treatment in a group of people with ACD could allow the identification of biomarkers that prove the effectiveness of the treatment. The aim of the study was to evaluate the Th1 (TNF, IFN- γ , IL-2 and IL-6), Th2 (IL-10, IL-4) and Th17 (IL-17A) cytokines in patients with ACD, before and after treatment with Benzonidazole. To this end, 28 individuals from the outbreak in Ibimirim were laboratory-confirmed to be infected with *Trypanosoma cruzi*. All the patients were treated at the Infectious Diseases Department of the Oswaldo Cruz University Hospital and followed up at the Chagas disease outpatient clinic (PROCAPE/UPE). Blood samples were collected before (T0) and after treatment (T1/1 month; T2/2 months; T3/5-6 months; T4/2 years), where the biological samples were stored at the Chagas Disease Reference Service (SRDC)/FIOCRUZ. Cytokines from the Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 and IL-6), Th2 (IL-10 and IL-4) and Th17 (IL-17A) profiles were quantified by Cytometric Bead Array (CBA) using flow cytometry. IgG antibodies were also measured by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and IgM and IgG antibodies were titrated by Indirect Immunofluorescence Reaction, and the parasite load of *T. cruzi* DNA was quantified by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). Our results indicated that BZ reduced the inflammatory response in the patients, as Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 and IL-6) and Th17 (IL-17) cytokines, as well as Th2 (IL-4 and IL-10) regulatory cytokines, decreased with the intervention. There was a reduction in IgM and IgG antibody titres, with one patient seroconverting two years after treatment. In addition, after treatment the parasite load was negative, indicating the success of the treatment, but in one of the individuals reactivation was observed after two years of treatment, indicating a possible therapeutic failure. Benzonidazole in ACD therefore reduces the inflammatory response triggered by *T. cruzi*.

Keywords: chagas disease; acute-phase reaction; immunity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Casos globais estimados dos portadores da doença de Chagas.	12
Figura 2 –	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 3 –	Vias de transmissão da doença de Chagas.....	16
Figura 4 –	Distribuição de casos de doença de Chagas aguda.....	17
Figura 5 –	Evolução da infecção pelo <i>T. cruzi</i> e da doença de Chagas.....	19
Figura 6 –	Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	22
Figura 7 –	Detecção dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-17A antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas.....	37
Figura 8 –	Detecção dos títulos de anticorpos IgM e IgG antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas.....	38
Figura 9 –	Detecção da carga parasitária antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas.....	39
Figura 10 –	Correlação entre os títulos de anticorpos IgM e a citocina sérica IL-6 no tempo T0.....	40
Fluxograma 1 –	Triagem e seleção dos pacientes.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Confirmação sorológica, parasitológica, molecular e clínica dos pacientes com a doença de Chagas aguda.....	31
Tabela 2	–	Tempo de coleta.....	31
Tabela 3	–	Sorologia para ELISA das amostras de pacientes com DCA.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1.1	Aspectos epidemiológicos	14
1.1.2	Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.1.3	Formas de Transmissão	17
1.1.4	Aspectos Clínicos da Doença de Chagas	19
1.1.5	Tratamento Etiológico	22
1.1.6	Imunopatogênese da doença de Chagas	23
1.1.7	Impacto do tratamento etiológico sobre resposta imune na doença Chagas	26
2	JUSTIFICATIVA	28
3	HIPÓTESE	29
4	OBJETIVO GERAL	30
4.1	OBJETIVO ESPECÍFICOS	30
5	METODOLOGIA	31
5.1	Desenho do Estudo.....	31
5.2	População de Estudo.....	31
5.3	Coleta das Amostras.....	33
5.4	Técnicas de Diagnósticos sorológicos.....	33
5.4.1	Testes Imunoenzimáticos	33
5.4.2	Reação de Imunofluorescência Indireta	34

5.4.3	Quantificação das Citocinas por CBA.....	34
5.5	Diagnóstico Molecular.....	35
5.5.1	Extração de DNA.....	35
5.5.2	PCR em tempo real.....	35
5.5.3	PCR convencional do gene G3PD.....	36
5.6	Análises Estatísticas.....	36
5.7	Considerações Éticas.....	36
6	RESULTADOS.....	37
6.1	Avaliação da produção de citocinas séricas na doença de Chagas aguda antes e após tratamento com o Benzonidazol.....	37
6.2	Quantificação dos níveis de anticorpos IgM e IgG de pacientes da fase aguda da doença de Chagas após tratamento com Benzonidazol.....	40
6.3	Quantificação do DNA <i>T. cruzi</i>	40
6.4	Diagnóstico Sorológico.....	41
6.5	Correlação Anticorpos e Citocinas.....	42
7	DISCUSSÃO.....	42
8	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICE A — ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS.....	55
	APÊNDICE B — TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	77
	ANEXO A — REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA CAAE.....	79

1 INTRODUÇÃO

A DC é uma das principais infecções tropicais negligenciadas do mundo (PAHO, 2019). No Brasil, o Nordeste é a segunda região mais atingida pela doença de Chagas na fase aguda (DCA), sendo Pernambuco o estado com o segundo maior número de casos (DE OLIVEIRA et al., 2021). Em 2019, Pernambuco notificou um surto de DCA por transmissão oral no município de Ibimirim. A ocorrência de surtos da doença Chagas (DC) por transmissão oral é preocupante, alarmando a saúde pública para o ressurgimento da doença no Brasil. Todos os indivíduos confirmados através de testes laboratoriais para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* foram tratados com o Benzonidazol, por se tratar de uma infecção aguda, sendo indicado o uso do tratamento etiológico.

O II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas considera como critério de cura a negatificação dos testes sorológicos após o tratamento com o Benzonidazol (DIAS et al., 2016). Para que ocorra a negatividade sorológica, o tempo necessário é variável e depende da fase e duração da doença, sendo de 3-5 anos para a fase aguda, 5-10 anos para a fase crônica recente e mais de 20-25 anos para indivíduos que são tratados na fase crônica, ou seja, o desfecho clínico tido como marcador é a soroconversão que requer um período bastante longo de acompanhamento do paciente (DIAS et al., 2016).

Na DCA, a identificação de biomarcadores após o tratamento com o Benzonidazol continua sendo um desafio, visto que é escasso os estudos que conseguem acompanhar pacientes na fase aguda, bem como estabelecer critérios de cura para clínica médica que se correlacionem com os resultados do tratamento clínico em curto prazo (RIBEIRO & CHATELAIN, 2012).

Alguns estudos vêm demonstrando a importância de avaliar citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 como promissores marcadores de acompanhamento da DC. Velásquez et al., (2019) demonstrou que a IL-17 pode ser um possível biomarcador na evolução do tratamento em portadores crônicos.

A avaliação dos padrões de reposta imune celular através da produção das citocinas Th1, Th2 e Th17 em portadores da DC aguda, após o tratamento com o BZ, pode ser empregada como potencial ferramenta na identificação de marcadores

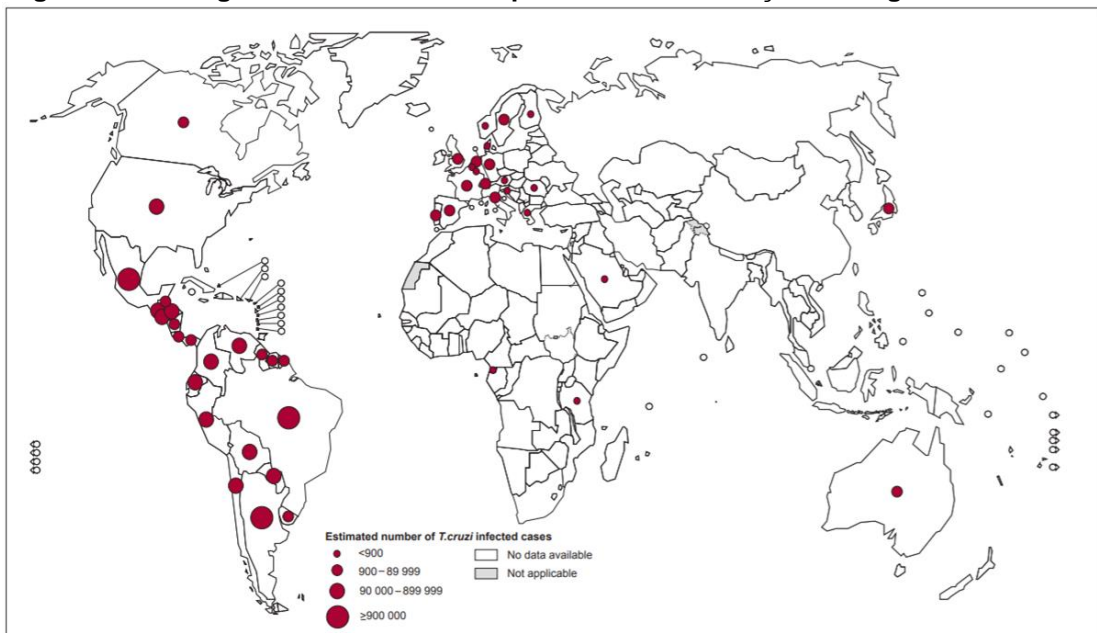
imunológicos, que possam permitir de forma precoce e segura os benefícios da utilização da medicação e o estabelecimento do critério da eficácia terapêutica. Estudos com essa finalidade são recomendados pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS, 2016) e pelo Programa Translacional em Doença de Chagas da Fiocruz (Fiochagas/Fiocruz).

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), há aproximadamente 5 e 6 milhões de pessoas infectadas no mundo pelo *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da doença de Chagas (DC). Estando entre as 17 doenças tropicais negligenciadas no mundo, essa enfermidade é endêmica em 21 países da América Latina. A migração populacional favorece a disseminação da DC, transportando para áreas não endêmicas tais como Itália, Reino Unido, Espanha, França, Austrália, Japão, Estados Unidos e Canadá (WHO, 2018; PAHO, 2019) (Figura 1).

Figura 1- Casos globais estimados dos portadores da doença de Chagas



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde, 2018.

Além disso, o subdiagnóstico é presente, pois menos de 10% dos infectados foram diagnosticados corretamente com DC, sendo que menos de 1% recebem tratamento específico e aproximadamente 12.000 evoluem para o óbito anualmente. Aproximadamente há 70 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição e correm risco de contrair a doença (PAHO, 2020).

No Brasil, segundo país da América do Sul com maior número de pessoas infectadas, há aproximadamente 1,1 milhões de casos (OMS, 2015; PAHO, 2019).

Entre outros fatores, esse fato está relacionado ao desenvolvimento de atividades antrópicas, como de desmatamentos e ocupações de áreas ambientalmente frágeis, o que reduz as fontes naturais de alimentação e abrigo dos triatomíneos, que passam a se alimentar de animais domésticos e, eventualmente, do próprio homem, condicionando os processos de peridomicialização e domicialização da doença (COURA & DIAS, 2009; COURA & JUNQUEIRA, 2012; COURA, 2015).

A DC é um problema de saúde pública com implicações socioeconômicas, principalmente devido à mortalidade precoce, perda de anos de vida por invalidez e custos elevados com a assistência médica e previdência social (VOS et al, 2020). Como reflexo, a DC está entre as quatro principais causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil (MARTINS-MELO et al., 2016, 2018; BRASIL, 2021).

Os desafios continuam na detecção precoce pela ocorrência de casos relacionados principalmente à transmissão oral devido à ingesta de alimentos contaminados, alarmando para possíveis novos casos (CONITEC, 2018). Em 2020, 146 casos da doença de Chagas aguda (DCA) foram confirmados no Brasil, com uma taxa de letalidade de 2% e todos os óbitos ocorreram no estado do Pará, local endêmico de maior prevalência da DC no Brasil, sendo a via oral (82,33%) a forma de transmissão mais frequente (BRASIL, 2021; DE VILLHENA et al., 2020).

Entre 2010 e 2019 o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) verificou que o Nordeste é a segunda região mais afetada pelo DCA no Brasil, com predominância de casos no estado do Maranhão seguido de Pernambuco, sendo a via oral a possível forma de transmissão principal (DE OLIVEIRA et al., 2021).

Em 2019, Pernambuco notificou o primeiro surto de DC na fase aguda por transmissão oral em Ibimirim, o maior já notificado no estado, onde 77 pessoas participaram de uma celebração religiosa em uma escola local no mês de abril de 2019. No evento alguns participantes apresentaram sintomatologias sugestivas da forma aguda da DC como: cefaleia, febre, dor abdominal, náuseas, hepatomegalia e esplenomegalia. Alguns pacientes ficaram internados até o diagnóstico (COSTA-OLIVEIRA, 2023; SES; 2021).

A identificação das localidades e fontes alimentares é vital para o desenvolvimento de um controle sanitário adequado para evitar surtos da DC causados pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com as formas parasitárias (PACHECO et al., 2021). Segundo inspeções sanitárias, a possível origem da contaminação não ocorreu em Ibimirim, mas no trajeto até a chegada à cidade, onde os alimentos teriam sido comprados, manipulados e levados para o local do evento (SES; 2021).

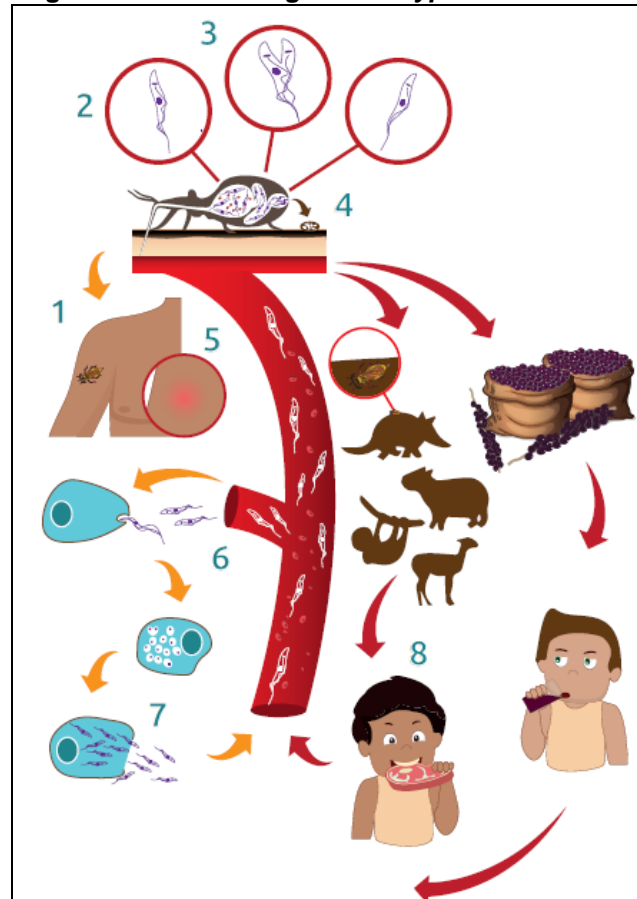
1.1.2 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário cujo ciclo de vida envolve obrigatoriamente sua passagem por hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) e invertebrados (vetores hematófagos pertencentes à família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*). O protozoário apresenta três formas evolutivas diferentes, tanto no homem quanto no inseto vetor: amastigota, epimastigota e tripomastigota.

A Figura 2 demonstra o ciclo biológico do *T. cruzi* no barbeiro (Triatomíneo), que tem (1) início quando o inseto vetor, triatomíneo, se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado infectado (humano ou animal), ingerido as formas tripomastigotas presente no sangue. (2) e (3) No estômago do barbeiro as formas tripomastigotas, se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam por divisão binária. (4) Na porção final do intestino do inseto, as formas epimastigotas se diferenciam em formas infectantes tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas juntamente com as fezes na próxima alimentação. O ciclo biológico do *T. cruzi* no homem ou animal mamífero (5) os triatomíneos infectados se alimentam e liberam em suas fezes formas tripomastigotas metacíclicas. Ao se coçar, o indivíduo leva o parasita presente nas fezes do barbeiro até o local da picada, por onde o parasita pode penetrar, invadindo células. (6) No interior das células, a forma tripomastigota perde o seu flagelo e se multiplica sob a forma amastigota. (7) Após multiplicar-se, a forma amastigota se diferencia em tripomastigota (flagelada), rompe a célula infectada e vai para a circulação sanguínea, até infectar outra célula. (8) Os alimentos contaminados (carne mal passada de animais silvestres, suco de frutos) com fezes de barbeiro infectadas com o *T. cruzi* (8a e 8b) também podem iniciar uma infecção no homem, pois os parasitos são capazes de infectar células da boca

e do estômago, se transformam em amastigotas e posteriormente vão para corrente sanguínea como formas tripomastigotas infectantes (DE MEIS; CASTRO, 2017).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

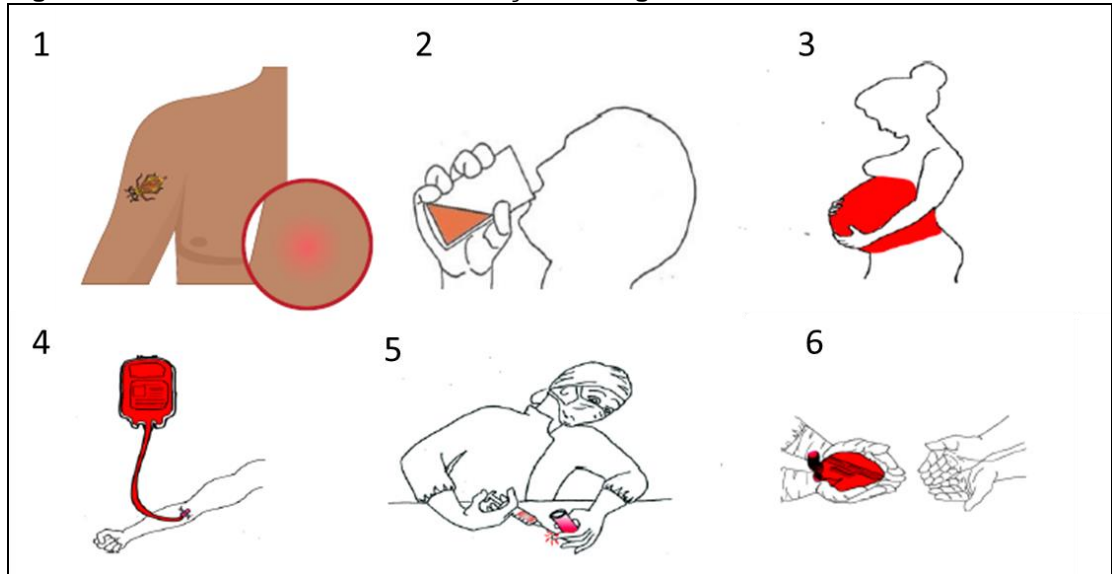


Fonte: DE MEIS; CASTRO, 2017.

1.1.3 Formas de Transmissão

Além da transmissão clássica (vetorial), por meio do inseto vetor, a DC possui mecanismos não vetoriais de transmissão, como: transmissões por transplante de órgãos, transfusão de hemoderivados, de mãe para filho durante a gravidez (vertical), ingestão de alimentos contaminados com as fezes do parasita (oral), por aleitamento materno e acidentes laboratoriais (OMS, 2013).

Figura 3 – Vias de transmissão da doença de Chagas.

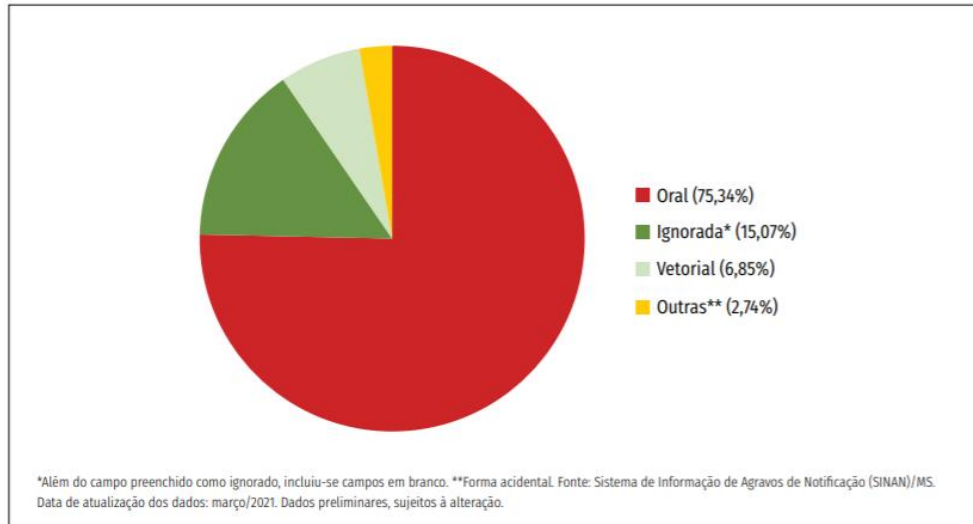


Fonte: Adaptado de De Meis & Castro, 2017.

Legenda: As principais vias de infecção são as vias vetorial clássica (1) e oral (2). Na via vetorial (1) ao picar a pessoa, o barbeiro defeca, e em suas fezes está a forma infectante (tripomastigotas metacíclica) do *T. cruzi*, ao se coçar, os parasitas invadem células da região da picada; Na via oral (2) ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, o *T. cruzi* infecta células da boca e do estômago. Outras vias de transmissão são transplacentária/congênita (3) quando gestantes infectadas podem transmitir para o feto; Transfusão de sangue contaminado (4); Acidentes laboratoriais (5); Transplante de órgãos contaminados (6).

No Brasil, dados recentes apontam que a principal via de transmissão é a oral (75,34%), seguida pela causa ignorada (15,07%), quando há desconhecimento da provável fonte de infecção e em menor proporção a via vetorial (6,85%) (Figura 2), observada de forma persistente desde 2006, ano em que o Brasil obteve a certificação de interrupção de transmissão por *Triatoma infestans* (DIAS, 2016; BRASIL, 2021).

Figura 4- Distribuição de casos de doença de Chagas aguda.



Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

A transmissão oral é geralmente relacionada ao consumo de alimentos contaminados tais como caldo de cana, açaí, palmito de babaçu, jaci (coquinho), bacaba, buriti e outros sucos e frutas, em decorrência do contato com a excreta do triatomíneo contendo o *T. cruzi* ou com o próprio inseto macerado acidentalmente junto aos alimentos (BARBOSA et al., 2015; COURA, 2015).

Xavier et al., (2014) ressaltaram que essa forma de transmissão pode ocorrer por falta de manejo sanitário durante a colheita de frutas, no caso do açaí, por exemplo, há o processamento junto com o inseto e/ou as fezes contendo os parasitas. Pacheco et al., (2021) fizeram menção a outros alimentos e bebidas com a água contaminada, suco de palmito e suco de goiaba. Também há relatos que o consumo de carnes de caça (animais silvestres infectados), como do gambá e tatu, cruas ou mal cozidas, além de alimentos contaminados com secreções de glândulas anais de marsupiais (mucura ou gambá) (DE NOYA; GONZÁLEZ; ROBERTSON, 2015; DIAS et al., 2016; RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

1.1.4 Aspectos clínicos da doença de Chagas

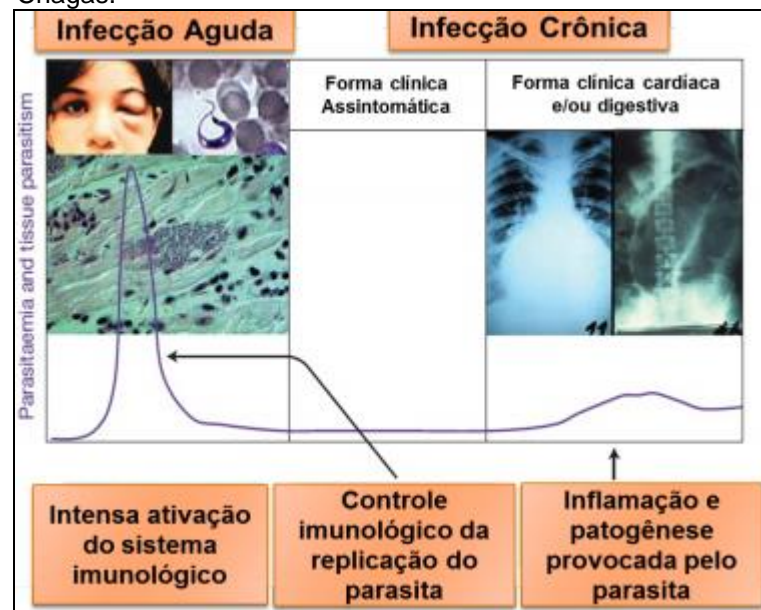
Os portadores da DC apresentam uma fase aguda que tem duração de 2-4 meses, em que os indivíduos apresentam alta parasitemia. Com relação a sintomatologia, na maioria dos casos, a doença apresenta-se de forma

assintomática ou oligossintomática, em que os sintomas surgem uma a duas semanas após a exposição aos insetos triatomíneos infectados (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Como a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomáticos, o que dificulta seu diagnóstico, os sintomáticos apresentam: febre, dor de cabeça, palidez, dor muscular, dispneia, edema das pernas ou rosto, dor abdominal, tosse, erupção cutânea, nódulos dolorosos, edema corporal generalizado, diarreia, adenopatias múltiplas, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos mais graves (COURA, 2007; RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010)

Quando a contaminação é feita por meio da transfusão sanguínea os primeiros sintomas surgem em até alguns meses após a transfusão de sangue infectado (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

Os sinais clínicos mais frequentes são os de porta de entrada do parasita, no caso da transmissão clássica vetorial: o primeiro sinal pode ser uma lesão que acomete a pele (chagoma de inoculação) ou o sinal de Romaña (Figura 3), quando a infecção pelo *T. cruzi* se inicia na conjuntiva ocular levando ao edema de pálpebras de um dos olhos (WHO, 2015).

Figura 5 – Evolução da infecção pelo *T. cruzi* e da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA (2010).

A transmissão oral destaca-se por ser uma das principais causas da doença de Chagas Aguda (DCA), durante o quadro clínico pode ocorrer sangramento digestivo (hematêmeses, hematoquezia ou melena) e, eventualmente, outros tipos de sinais hemorrágicos tais como epistaxe e petéquias, bem como a intensificação dos períodos menstruais (BRASIL, 2007). Já o agravamento dos sintomas ocorre em crianças abaixo de 5 anos de idade, idosos, imunossuprimidos, como em pessoas com HIV/AIDS e meningoencefalite ou indivíduos com alta parasitemia (WHO, 2015).

Com a redução da parasitemia e das reações inflamatórias sistêmicas, cerca de dois a quatro meses após o término da fase aguda os pacientes adentram a fase crônica da doença caracterizada pela presença do parasita nos tecidos, especialmente o coração e músculos do sistema digestivo e elevação dos títulos de anticorpos (IgG) anti-*T. cruzi* circulantes (SIMÕES et al, 2018).

Durante a fase crônica, as formas clínicas assintomática (forma indeterminada) ou sintomáticas (formas cardíacas e digestiva) podem ser observadas. A forma indeterminada ou assintomática é a mais frequente, acometendo 60-70% dos indivíduos podendo ser devido a um controle imunológico na replicação do parasita. Por outro lado, quando esses mecanismos que limitam a

multiplicação parasitária não são totalmente eficazes os indivíduos desenvolvem a inflamação e patogênese provocada pela infecção com o *T. cruzi*, resultando nas formas clínicas sintomáticas da doença (JUNQUEIRA, 2010).

A forma cardíaca ocorre em cerca de 30% dos pacientes, apresentando bradiarritmias, taquiarritmia, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, complicações tromboembólicas, miocardiopatia dilatada usualmente acompanhada de arritmias graves e morte súbita (Figura 3) (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010; SIMÕES et al., 2018). Em torno de 8-10% dos pacientes apresentam alterações anatômicas e funcionais de esôfago e cólon e são classificados na forma digestiva, podendo ocorrer destruição das fibras nervosas e musculares nas derivações do sistema digestivo, que em casos mais graves leva a dilatação de estruturas do trato digestivo e perda da motilidade do esôfago e intestino. Uma minoria, cerca de 10%, pode demonstrar os dois quadros clínicos simultaneamente, apresentando alterações cardíacas e gastrointestinais e por isso são classificados na forma mista (ROCHA, TEIXEIRA, RIBEIRO, 2007; JUNQUEIRA, 2010; RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

1.1.5 Tratamento etiológico

A medicação preconizada pelo ministério da saúde para o tratamento de casos agudos, congênitos, de reativação da infecção e em crianças infectadas, é o Benzonidazol (BZ) (DIAS, 2016). Para pacientes portadores da fase crônica na forma indeterminada da DC, há a recomendação do tratamento em indivíduos de 18 a 50 anos (BERN et al., 2007). Os resultados do tratamento variam de acordo com a fase da doença, tempo de tratamento, dose, idade e origem geográfica do paciente (COURA; CASTRO, 2002). A terapia com o antiparasitário BZ, geralmente leva à cura na infecção aguda e previne a evolução para as formas clínicas sintomáticas da fase crônica, principalmente quando administrado na forma indeterminada da doença (SIMÕES, 2018).

O mecanismo de ação específico do BZ frente ao *T. cruzi* ainda não está completamente elucidado, podendo agir por meio do mecanismo de ação estresse redutivo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas por intermediários nitroreduzidos, ou por outras interações de nitroredução com os

componentes do parasita (DE FÁTIMA OLIVEIRA et al., 2008). Assim, ocorre a redução do grupamento nitro para o grupamento amino pela ação de nitroredutases, com a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos. Esses radicais livres, principalmente a OH⁻, ligam-se a proteínas, lipídios e ao DNA do parasita, danificando-os (MAYA et al., 2007). Além disso, estudos demonstram que o BZ se distribui no meio extra e intracelular, combatendo as formas tripomastigotas e amastigotas do parasita (SILVEIRA et al., 2000; DE FÁTIMA OLIVEIRA et al., 2008).

Durante a fase aguda, deve-se ter rapidez ao acesso no tratamento e ser realizado em todos os casos, independente da forma de transmissão do parasito (DIAS, 2016). Cerca de 70% dos portadores tratados na fase aguda apresentam cura (MARIN-NETO et al., 2009).

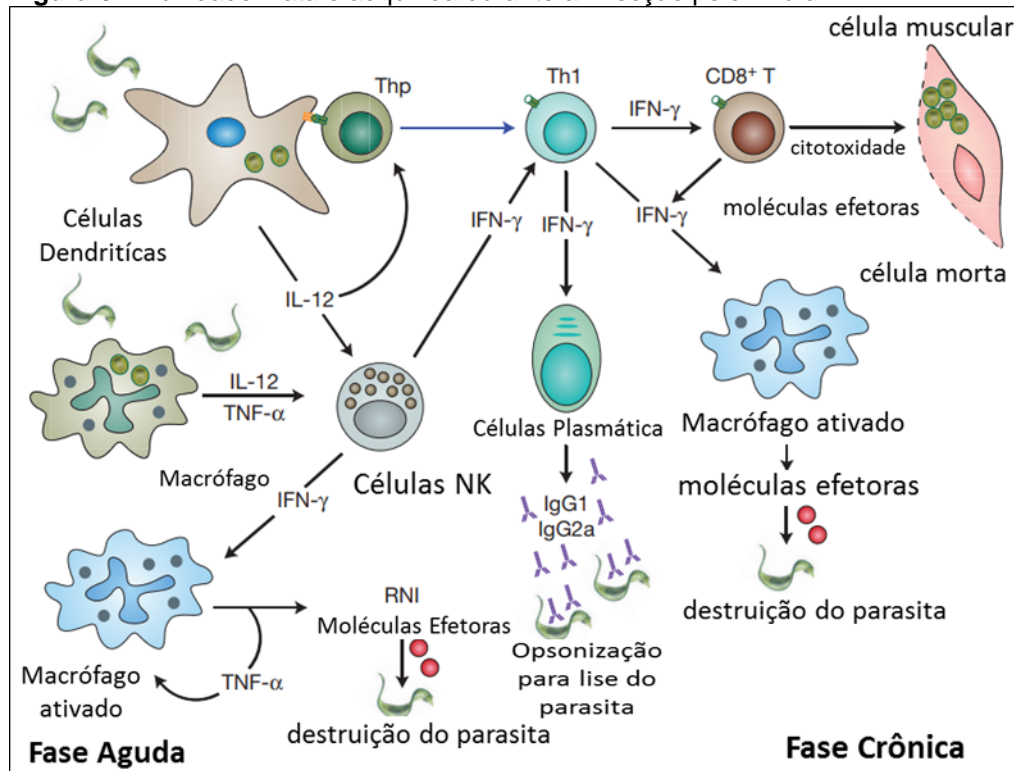
Segundo o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas os testes negativos de sorologia são considerados o único método indicador de cura após o tratamento com o BZ. A redução dos títulos de anticorpos (IgG) anti-*T. cruzi* circulantes é gradual, sendo esse declínio acompanhado de forma persistente e progressivo, acima de três diluições dos títulos dos exames sorológicos é sugestivo de que estes irão negativar. Para que isso ocorra, o tempo necessário é variável e depende da fase e do tempo da doença, sendo de um ano para a infecção congênita, 3-5 anos para a fase aguda, 5-10 anos para a fase crônica recente e acima de 10 anos (usualmente, 20-25 anos) para a fase crônica de longa duração (DIAS, 2016).

1.1.6 Imunopatogênese da doença de Chagas

O processo infeccioso causado pelo *T. cruzi* desencadeia a ativação simultânea de mecanismos de defesa do sistema imune inato e adaptativo (GUTIERREZ et al., 2009). A intensa resposta inflamatória inicial desempenha um fator determinante para a evolução na patogênese da DC (SATHLER-AVELAR et al., 2009). Ao se instalar no tecido e órgãos dos indivíduos infectados, o *T. cruzi* é interceptado pelos mecanismos da imunidade inata que desempenham um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção, atuando como a primeira barreira. As células da imunidade inata (macrófagos, células NK e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF e IFN- γ) e moléculas efetoras (intermediários

reativos de nitrogênio e GTPases), além das proteínas do sistema complemento, que atuam no controle da replicação parasitária (Figura 4) (JUNQUEIRA et al., 2010). Ao mesmo tempo, células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, fazem a ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo a IL-12, que atua na diferenciação de linfócito T CD4⁺ em células Th1 e ativação de células NK que produzem INF- γ , ativando a expansão clonal das demais populações celulares, tais como: linfócitos T CD8⁺ e células B. O INF- γ produzido por células Th1 ou T CD8⁺ ativa mecanismos efetores em macrófagos para destruir as amastigotas e os tripomastigotas que são fagócitos, enquanto a atividade citotóxica exibida pelas células T CD8⁺ destrói as células contendo as amastigotas intracelulares. Os anticorpos produzidos pelas células B lisam os tripomastigotas extracelulares, facilitando a fagocitose dos parasitas opsonizados pela IgG (Figura 4) (JUNQUEIRA et al., 2010).

Figura 6- Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *T. cruzi*



Fonte: Adaptado de Junqueira (2010).

Uma das principais características imunológicas de infecções por protozoários intracelulares, como o *T. cruzi*, é a polarização para uma resposta do tipo Th1. Este perfil é caracterizado por um repertório de citocinas pró-inflamatória, como o TNF e INF- γ , que desempenham um papel importante na eliminação do parasita e

sobrevivência do hospedeiro (CUNHA-NETO et al., 2006). Contudo, ao mesmo passo que a resposta inflamatória está associada à imunidade protetora, ela também pode desencadear processos patogênicos, através de uma resposta inflamatória exacerbada. (JUNQUEIRA et al., 2010). Para equilibrar esse processo, as células efetoras do hospedeiro durante o curso da infecção por *T. cruzi*, produzem citocinas do tipo Th2 (anti-inflamatórias), como a IL-4 e a IL-10, (GUTIERREZ et al., 2009; SATHLER-AVELAR et al., 2009). A resistência ou suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* está relacionado ao tipo de citocinas produzidas, então a resistência ao parasita dependeria de citocinas tais como o IFN- γ , TNF e IL-12, enquanto IL-10, IL-4 e TGF- β promoveriam a suscetibilidade à DC (SILVA et al., 1991 e 1994).

Estes perfis de citocinas produzidas durante a infecção da DC estão associados com o aparecimento das formas crônicas sintomáticas (SATHLER-AVELAR et al., 2009). De maneira geral, os indivíduos que permanecem na forma indeterminada são capazes de reduzir o número de parasitas na fase inicial da infecção e possuem mecanismos regulatórios que limitam o desenvolvimento da doença. Por outro lado, indivíduos que desenvolvem a forma cardíaca, apesar de serem capazes de controlar a parasitemia, podem não ser capazes de elaborar uma resposta imunorregulatória eficiente, persistindo uma resposta inflamatória exacerbada no tecido cardíaco (DUTRA; GOLLOB, 2008).

A diferenciação entre as subpopulações de linfócitos do perfil Th1 e Th2 também está relacionada à estimulação e proliferação de células B e consequentemente, à produção de anticorpos, principalmente da classe IgM na fase aguda (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; CARDILLO et al., 2015). Mesmo que a imunidade humoral ocorra 15 dias após a infecção, os linfócitos B ativados não sintetizam anticorpos específicos durante os primeiros dias de infecção pelo *T. cruzi*, só ocorrendo no final da fase aguda (BERMEJO et al., 2010). Já a imunoglobulina IgG é mais específica e estão envolvidas na eliminação local e sistêmica do parasita através da ativação do sistema complemento, mecanismos de aglutinação e citotoxicidade. Assim, o papel protetor dos anticorpos na eliminação de *T. cruzi* está associado à capacidade de reconhecerem antígenos do parasita, formarem agregados que fixam o complemento, aumentarem a opsonização e os mecanismos citotóxicos (TAKEHARA; MOTA, 1991)

Sinergicamente com a resposta imune Th1, as células Th17 desempenham também uma reposta inflamatória, afim, de controlar a infecção pelo *T. cruzi*, mas podem contribuir para uma intensa inflamação e aumentar a gravidade das lesões cardíacas (CUNHA-NETO; KALIL, 2001; GUEDES et al., 2012; GARG et al., 2018). Guedes e colaboradores demonstraram em murinos que a produção de IL-17 regula a diferenciação de células Th1, controlando a produção de IFN- γ e TNF indiretamente, ao reduzir a produção de IL-2, deste modo, estaria controlando a miocardite induzida pelo parasita, bem como, o infiltrado de células inflamatórias ao tecido cardíaco, sugerindo que a IL-17 poderia ser um marcador clínico de progressão da DC na evolução da doença cardíaca (GUEDES et al. 2010). Aliado a esse estudo, em pacientes crônicos, a IL-17 está relacionada a uma melhor função cardíaca, desempenhando um importante papel protetor (GUEDES et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2013). Recentemente, foi descoberto em camundongos que células Th17 e a IL-17A forneceram proteção contra a infecção pelo *T. cruzi* na mucosa gástrica, local inicial de invasão do parasita durante a transmissão oral da DC (CAI et al., 2021).

1.1.7 Impacto do tratamento etiológico sobre resposta imune na doença Chagas

A detecção de indivíduos durante a fase aguda da DC é rara devido aos sintomas clínicos relativamente inespecífico observados na maioria dos pacientes infectados. Esse atraso na detecção impede o diagnóstico e, conseqüentemente, limita a disponibilidade de estudos que descrevem o estado imunológico de indivíduos na fase aguda. Além disso, o diagnóstico tardio ou ausente prejudica o tratamento e, portanto, reduz as chances de cura da doença (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

Apesar dessas limitações, alguns estudos avaliaram a resposta imune do paciente portador da DC, quando o BZ é administrado. No estudo de Bahia-Oliveira et al (2000) foi relatado que 25 indivíduos tratados durante a fase aguda foram considerados curados após o tratamento com BZ e produziam altos níveis de IFN- γ quando comparados aos demais grupos de indivíduos avaliados. Além disso, o tratamento com BZ direcionou uma resposta imune do perfil Th1, sofrendo

modulação da citocina anti-inflamatória IL-10, sendo elemento chave para controlar o dano tecidual deletério que eventualmente pode ocorrer devido à resposta pró-inflamatória mediada pelo IFN- γ observada durante o tratamento com o fármaco (SATHLER-AVELAR et al., 2006).

Moretti et al., (2002) ao dosar citocinas por ELISA no soro de crianças na fase aguda verificaram níveis elevados de TNF- α , IL-6 e o receptor solúvel de IL-2 (sIL2-R) que decaem 30 dias após o tratamento com BZ, contudo não foi observado diferenças significativas para TNF- α e IL-6 apenas para sIL2-R que decaem significativamente, demonstrando a efetividade do tratamento.

Velásquez et al., (2019) demonstra a importância da IL-17 como possível biomarcador na evolução do tratamento em portadores crônicos da DC ao correlacionar IL-17 com a carga parasitária do DNA *T. cruzi* antes do tratamento e verificarem um declínio significativo da IL-17A 12 meses após a terapêutica com o BZ. Logo, a capacidade do BZ em alterar a resposta das células T específicas contra o parasita e a expressão de IL-17A foi revelada como um marcador precoce em crianças infectadas pelo *T. cruzi* para acompanhamento pós-terapêutico (VELÁSQUEZ et al., 2019). Outro achado importante foi que a IL-17 pode estar relacionada à melhora da função miocárdica em pacientes na fase crônica, reforçando os efeitos benéficos do tratamento, mesmo em pacientes com a doença cardíaca leve (CAMARA, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Com a certificação da interrupção da transmissão do *T. cruzi* por via vetorial pelo *Triatoma infestans*, a DC vem sendo vista por outras vias de transmissão, sendo a oral uma das mais preocupantes. Essa via é a causadora de surtos importantes que podem promover o aumento e o ressurgimento de casos da doença no Brasil. Apesar disso, a rápida notificação desses casos e o início precoce do tratamento etiológico podem garantir a cura dos pacientes ainda na fase aguda.

Estudos já evidenciaram a efetividade do tratamento com BZ, prevenindo ou retardando a evolução da doença em animais e humanos. No entanto, ainda não há biomarcadores que comprovem a eficácia do tratamento, visto que não existe um consenso acerca do critério de cura estabelecido.

Diante da importância da resposta imunológica do hospedeiro no controle da doença, investigações que permitam elucidar as respostas imunes que ocorrem após o uso do BZ são de grande relevância. Desta forma, a avaliação dos efeitos do BZ sobre a resposta imune de portadores na fase aguda pode ser uma ferramenta útil para apoiar a administração da medicação nesses indivíduos.

Portanto, avaliar as citocinas dos padrões Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-6), Th2 (IL-10 e IL-4) e Th17 (IL-17A), visando elucidar alguns mecanismos relacionados à resposta imune de indivíduos portadores da DC submetidos ao tratamento com o BZ, utilizando como objeto de estudo um surto ocorrido no município de Ibimirim-PE, onde os pacientes foram tratados e acompanhados. Logo, a observação do comportamento imunológico poderá permitir a identificação do impacto da terapêutica nesta fase da doença.

3 HIPÓTESE

A diminuição de citocinas séricas pró-inflamatórias e aumento das citocinas anti-inflamatórias estariam correlacionadas com a diminuição dos níveis de anticorpos IgM e IgG, e com o aumento ou diminuição da quantificação de DNA de *T. cruzi* após o tratamento com BZ.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar as citocinas do perfil Th1 (TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-6), Th2 (IL-10, IL-4) e Th17 (IL-17A) em pacientes com a doença de chagas aguda, antes e após tratamento com Benzonidazol.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar as citocinas séricas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas;
2. Quantificar os níveis de anticorpos IgG e IgM de pacientes da fase aguda da doença de Chagas antes e após tratamento com Benzonidazol;
3. Quantificar carga parasitária (DNA) dos pacientes da fase aguda da doença de Chagas tratados antes e após diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi*.
4. Correlacionar os níveis de citocinas séricas do com níveis de anticorpos IgM e IgG, permitindo observar a cinética de citocinas antes e após o tratamento com Benzonidazol.
5. Correlacionar os níveis de citocinas séricas com a quantidade de DNA de *T. cruzi* sanguíneos.

5 METODOLOGIA

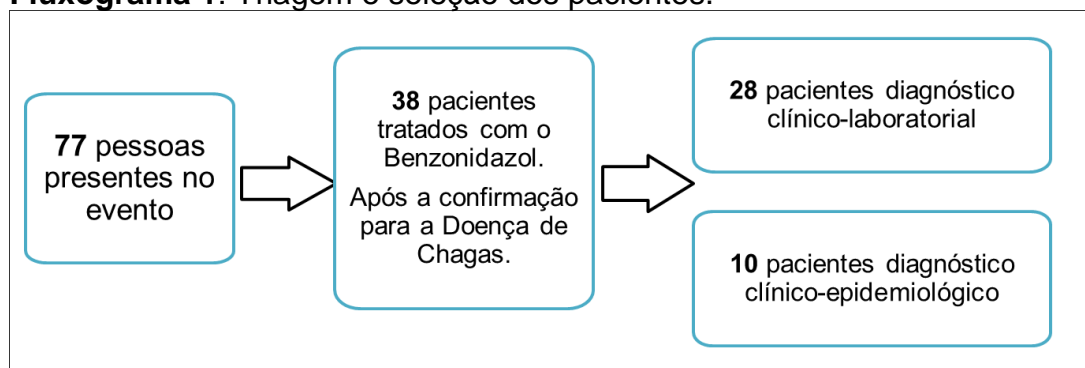
5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo longitudinal do tipo prospectivo (BONITA, BEAGLEHOLE & KJELLSTROM, 2010, p. 47).

5.2 População de Estudo

Dos 77 indivíduos expostos ao surto, 38 foram considerados portadores da infecção chagásica pelo *T. cruzi*, sendo 28 pacientes selecionados por critério laboratorial e 10 pelo clínico-epidemiológico (Fluxograma 1). Os pacientes foram atendidos na Casa do Portador de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário da Universidade de Pernambuco (Procaped/UPE). Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), onde foi explicado o propósito e a metodologia a partir da coleta do sangue periférico dos participantes. Para a nossa população de estudo, o n=28 foi considerado por apresentar algum teste sorológico ou parasitológico como confirmação laboratorial para a DC (Tabela 1).

Fluxograma 1: Triagem e seleção dos pacientes.



A confirmação diagnóstica foi realizada por sorologia e/ou métodos parasitológicos diretos e moleculares para todos os indivíduos pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE) em conjunto com o Serviço de Referência de Doença de Chagas de Pernambuco (SRDC) do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães (IAM/Fiocruz-PE) (Tabela 1). Todos foram submetidos ao tratamento com BZ. Não houve óbitos, embora 14 pacientes tenham evoluído com manifestações mais graves da DCA, necessitando de internamento. As

amostras de soro foram armazenadas em soroteca disponível no SRDC, do Instituto Aggeu Magalhães.

A maioria dos pacientes apresentaram sintomas como febre, dor de cabeça, dores musculares, edema facial e de membros inferiores, dor abdominal, diarreia, vômitos, constipação, fraqueza, três pacientes apresentaram Derrame Pericárdico e apenas dois pacientes foram assintomáticos. Após a confirmação sorológica, parasitológica e molecular (Tabela 1) os pacientes foram tratados com o BZ. A dose diária para o tratamento em adultos foi de 5 mg/kg de peso corporal e nas crianças (<12 anos) 10mg/kg, respeitando a dose máxima de 300 mg/dia e administrado duas vezes ao dia, com intervalo aproximado de 12 horas entre elas. O tratamento foi mantido por 60 dias sem interrupção. Alguns pacientes apresentaram reações como coceira, parestesia, dor de cabeça e astenia. Na presença de alguma reação, houve a redução da dose prolongando para 90 dias o tratamento. Apesar disso, não foi constatado abandono da medicação na população de estudo.

TABELA 1 - Confirmação sorológica, parasitológica, molecular e clínica dos pacientes com a doença de Chagas aguda.

Pacientes ID	Idade	Sexo	Procedência	Teste Parasitológico	Teste Sorológico	Teste Molecular	Internamento
P1	45	Feminino	Recife	-	-	PCR	Não
P2	31	Feminino	Camaragibe	-	-	PCR	Sim
P3	21	Masculino	Arcoverde	-	-	PCR	Sim
P4	20	Masculino	Paulista	Gota espessa	-	-	Não
P5	27	Feminino	Olinda	-	-	PCR	Sim
P6	39	Feminino	Olinda	Exame a fresco	-	PCR	Sim
P7	36	Feminino	Recife	Exame a fresco	-	PCR	Sim
P8	17	Feminino	Venturosa	-	-	PCR	Sim
P9	33	Feminino	Olinda	-	ELISA, IFI	PCR	Não
P10	37	Feminino	Olinda	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Sim
P11	37	Feminino	Ibimirim	-	-	PCR	Sim
P12	38	Masculino	Camaragibe	Gota espessa	-	PCR	Sim
P13	13	Masculino	Arcoverde	Gota espessa	ELISA	PCR	Não
P14	47	Masculino	Arcoverde	Gota espessa, Exame a fresco	-	PCR	Sim
P15	35	Feminino	Camaragibe	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Não
P16	20	Feminino	Olinda	Gota espessa	ELISA, IFI, IHA	-	Não
P17	17	Feminino	Recife	Hemocultura	IFI, IHA	PCR	Não
P18	21	Masculino	Recife	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Sim
P19	18	Masculino	Jaboatão	Gota espessa	-	PCR	Sim
P20	34	Feminino	Cabo de Santo Agostinho	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Sim
P21	32	Feminino	Jaboatão	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Não
P22	36	Feminino	Olinda	Gota espessa	-	PCR	Sim
P23	23	Masculino	Olinda	Gota espessa	-	-	*
P24	21	Feminino	Recife	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Não
P25	9	Feminino	Recife	Gota espessa	ELISA, IFI	-	*
P26	22	Masculino	Jaboatão	-	ELISA, IFI, IHA	-	Não
P27	34	Masculino	Recife	Gota espessa	ELISA, IFI	-	Não
P28	29	Feminino	Jaboatão	Gota espessa	-	-	Não

Fonte: A autora (2021). Legenda: ID: Identificação do paciente; * Sem informação no prontuário; - Teste Negativo.

5.3 Coleta das Amostras

Foram coletados de cada paciente 4mL de sangue em tubo seco para sorologia da infecção pelo *T. cruzi* e 4mL de sangue em tubo de EDTA para o diagnóstico molecular. As coletas foram realizadas antes, durante e após o tratamento, conforme a Tabela 2.

TABELA 2 – Tempo de coleta

Período do Tratamento	Tempo de coleta em dias e meses
Antes do Tratamento	Tempo Inicial (T0) - antes ou até 5 dias de início do tratamento para diagnóstico
Durante o Tratamento	Tempo 1 (T1) – 1 mês de Tratamento
Após o Tratamento	Tempo 2 (T2) – 2 meses logo após o término do tratamento
	Tempo 3 (T3) - 5-6 meses
	Tempo (T4) – 2 anos

Fonte: A autora (2021)

5.4 Técnicas de Diagnóstico sorológicos

5.4.1 TESTES IMUNOENZIMÁTICOS

Para confirmação da sorologia para infecção pelo *T. cruzi* foram utilizados dois testes sorológicos imunoenzimáticos (ELISA- Enzyme-linked Immunosorbent Assay) com diferentes preparações antigênicas. O kit comercial GOLD ELISA (REM Indústrias e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil) foi usado para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, sendo sua microplaca sensibilizada com antígenos de *T. cruzi*. O kit BIOLISA Chagas Recombinante (QUIBASA Química Básica Ltda, Minas Gerais, Brasil) que foi utilizado para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, contendo antígenos recombinantes revestidos em sua placa.

Para ambos os testes foi utilizado inicialmente 200µl do diluente da amostra com 10µl do soro dos pacientes, controle negativo e controle positivo nos poços previamente determinados. Incubados por 30min a 37°C, seguindo para o ciclo de lavagem (5x) com a adição de 350µl em cada poço, após a secagem 100µl do conjugado é adicionado e incubado a 37°C, repete-se o ciclo de lavagem e

secagem. A última incubação é feita com 100µl do substrato em temperatura ambiente, finalizado por 50µl de solução de parada em todos os poços, imediatamente foi lido a 450nm no leitor de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

Os resultados foram calculados seguindo as recomendações dos fabricantes. As interpretações dos resultados foram obtidas a partir do *cut off*, com o valor de 10% para mais e para menos para determinação da zona cinza. Então, para os valores acima de 10% foram considerados amostras reagentes e abaixo de 10%, amostras não reagentes, os pacientes que ficaram com os valores dentro da zona cinza, foram considerados indeterminados, sendo reavaliados por outra metodologia, conforme o II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015 (DIAS et al., 2016). Todos os testes sorológicos foram realizados no SRDC - IAM/Fiocruz-PE.

5.4.2 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Foi realizado para avaliarmos os títulos de anticorpos IgM/IgG específicos ao *T. cruzi* durante o tratamento. Para isso, utilizaremos formas epimastigotas fixadas do kit Imuno-Con (WAMA Diagnóstica, São Paulo, Brasil) que foram adicionadas às lâminas de imunofluorescência segundo o fabricante. Em seguida, 5µl da amostra de soro é diluído em 195µl de PBS do kit, iniciando a diluição seriada no repasse de 100µl do preparo inicial (1/40) diluídos em 100µl de PBS para cada microtubo 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 e 1/2560, respectivamente. Foi depositado 35µl em cada poço da lâmina seguindo a ordem de diluição para cada paciente, a lâmina é incubada a 37°C em câmara escura e úmida por 30min. Foi realizada a lavagem com PBS – 15min, sendo levemente secado o local da reação para adição do conjugado (anti-IgM/IgG humana conjugada ao Isotiocianato de Fluoresceína) para a revelação do imunocomplexo. As lâminas foram montadas em glicerina alcalina e visualizadas no microscópio de imunofluorescência no aumento de 40x. A última diluição em que ainda haja visualização de fluorescência será o título assumido para as análises.

5.4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS POR CBA

A dosagem das citocinas foi realizado a partir do soro utilizando o método do *Cytometric Bead Array* (CBA) (kit BD CBA Human Th1/Th2/Th17; BD, San Jose, CA, USA) para quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17A. A realização

da quantificação foi realizada segundo as recomendações do fabricante. Inicialmente, 15µl de soro foram adicionados a um tubo de citometria (BD Systems™- 5mL) contendo 15µl de uma mistura de *beads* de captura (microesferas com diferentes intensidades de fluorescências-FL4) recobertas por anticorpos monoclonais (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN-γ, anti-TNF e anti-IL-17A). Em seguida, foram adicionados 15µl do reagente de detecção (mistura de anticorpos anti-citocinas conjugados a um fluorocromo (FL2)). Os tubos foram incubados por 3h a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas com *buffer wash*, centrifugadas a 200 g por 5 minutos. Em seguida, as *beads* foram ressuspensas em 250µl de *buffer wash* e 1800 eventos foram adquiridas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/IAM/Fiocruz, através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems), com o software Cell Quest Pro (Beckton Dickson). As aquisições serão realizadas no citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Bioscience, Sandiego, CA, USA). Os resultados foram gerados em formato de gráficos e tabulados utilizando o BD FACS Array 3.1.

5.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

5.5.1 Extração de DNA

As amostras de sangue com EDTA foram submetidas ao processo de extração do DNA do parasita, utilizando o kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit – QIAGEN, Holanda), seguindo as instruções dos fabricantes.

5.5.2 PCR em Tempo Real

A reação ocorre utilizando dois sistemas de detecção do DNA parasitário, os sistemas TcSAT e Cruzei. Eles foram desenvolvidos e padronizados de acordo com COSTA-OLIVEIRA (2023). Para a quantificação do DNA parasitário, foi necessário a utilização de uma curva padrão em um intervalo de 1ng/µL a 1fg/µL. Os *primers* estavam na concentração de 5 pmol/µL e para cada sistema de *primers*, foi preparado um Master Mix num volume de 48 µL por amostra/poço, sendo as reações compostas por 21 µL de água ultrapura, 1 µL do *primer forward* e 1 µL do *primer reverse*, 25 µL de SYBR® Green Master Mix. Após distribuição na placa de PCR, 2 µL de DNA padrão foram adicionados a seu respectivo poço, totalizando um

volume final de 50 μ L por amostra, exceto para a amostra de controle negativo da reação de qPCR, que não conta com a adição dos 2 μ L de DNA padrão, totalizando 48 μ L. Os experimentos foram efetuados com o aparelho *QuantStudio 5 Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as condições de ciclagem padrão do aparelho: aquecimento inicial (50° / 2 Min), desnaturação inicial (95°C / 10 Min), 40 ciclos de desnaturação (95°C / 15 Seg), anelamento e extensão (60°C / 1 Min) e dissociação (95° / 1 Seg). O *software QuantStudio Design and Analysis* foi utilizado para análise, interpretação e registro dos resultados.

5.5.3 PCR convencional do gene G3PD

A amplificação do gene G3PD foi utilizada como controle de qualidade, conforme protocolo descrito por Gonçalves et al. (2012). O gene G3PD é constitutivo de células humanas, sendo assim a sua presença é a garantia que o DNA genômico foi extraído com sucesso. Após a execução da técnica de PCR convencional das amostras, foi realizado o gel de agarose 1%, para visualização das bandas do gene G3PD.

5.6 Análises Estatísticas

Nas variáveis numéricas foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. Os dados que apresentaram como verdadeira a hipótese foram considerados paramétricos, sendo empregado o teste T pareado. Aos dados que não demonstraram como verdadeira a hipótese de normalidade foi aplicado o teste pareado de Wilcoxon para amostras não-paramétricas. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

Para verificar a correlação entre as citocinas e os títulos de anticorpos foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, como nossos dados não obedeceram a curva de normalidade, foi aplicado o teste de correlação Spearman.

Toda a análise estatística foi realizada através do *GraphPad Prism v 8.0.2* (GraphPad Software, San Diego, CA)

5.7 Considerações Éticas

Para esta pesquisa utilizou amostras da Soroteca do Serviço de Referência em Doença de Chagas, do Instituto Aggeu Magalhães, sob responsabilidade da Dra.

Virginia Maria de Barros Lorena coordenadora do SRDC. O projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Humanos do Instituto Aggeu Magalhães, com parecer número C.A.A.E: 20049919.5.0000.5190; (Anexo A).

As informações sobre o destino da amostra após a assinatura voluntária do TCLE foram fornecidas individualmente antes da coleta de sangue, ressaltando a importância do estudo e esclarecer que os indivíduos eram livres para aceitar, recusar-se ou se retirarem da pesquisa em qualquer momento, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico feito no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/UPE.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da produção de citocinas séricas na doença de Chagas Aguda antes e após tratamento com o Benzonidazol

Em relação à detecção de citocinas relacionadas à resposta imune inflamatória (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-17A) e regulatória (IL-4 e IL-10), antes e após o tratamento com o BZ, realizamos as construções dos gráficos no programa GraphPad Prism, onde o eixo X ficaram os tempos de coleta T0, T1 (2 meses), T2 (5-6 meses) e T3 (2 anos) no eixo Y foram os dados da concentração de cada citocina em picograma por mililitro (pg/ml) (Figura 5).

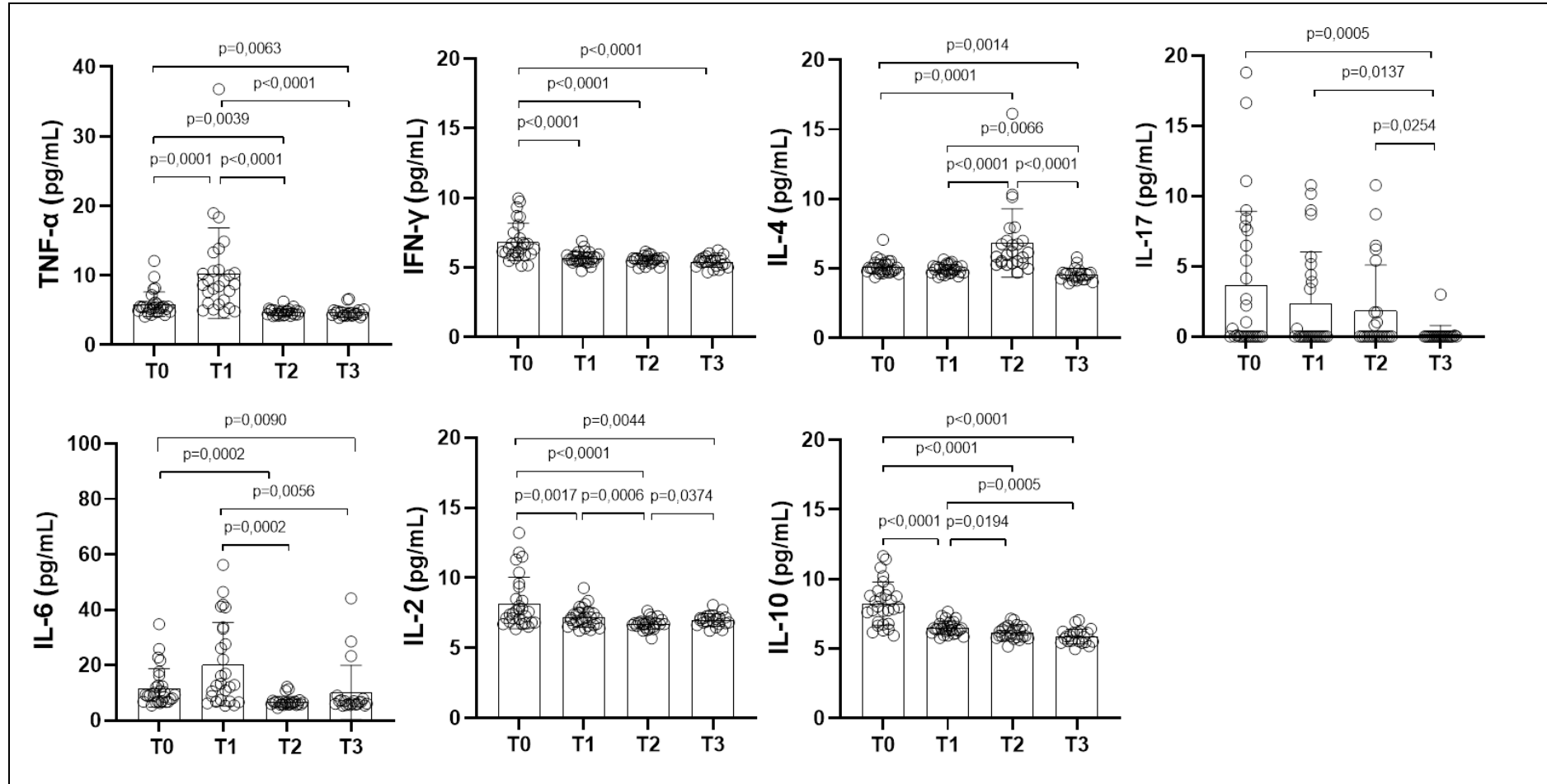
Ao avaliar a concentração sérica de IFN- γ verificamos uma redução na produção em todos os tempos após o tratamento com BZ ($p_{T0 \times T2} < 0,0001$, $p_{T0 \times T3} < 0,0001$, $p_{T0 \times T4} < 0,0001$). Quanto à produção de TNF, foi observado um aumento significativo logo após o término do tratamento ($p_{T0 \times T1} = 0,0001$), porém os níveis decaem em T2 ($p_{T0 \times T2} = 0,0039$, $p_{T1 \times T2} < 0,0001$) e T3 ($p_{T0 \times T3} = 0,0063$, $p_{T1 \times T3} < 0,0001$).

Para a citocina IL-2 foi observado redução na produção na comparação antes e após a intervenção pelo BZ ($p_{T0 \times T1} = 0,0017$, $p_{T0 \times T2} < 0,0001$, $p_{T0 \times T3} = 0,0044$, $p_{T1 \times T2} = 0,0033$, $p_{T2 \times T3} = 0,0374$). Da mesma forma, foi verificado uma redução para a citocina IL-6 nos tempos T2 e T3 ($p_{T0 \times T2} = 0,0002$, $p_{T0 \times T3} = 0,0090$), apesar de haver uma elevação aparente ao término do tratamento (T1), mesmo assim foi observada

reduções significativas nos momentos T2 e T3 ($p_{T1 \times T2}=0,0002$ e $p_{T1 \times T3}=0,0056$). Ao avaliar os níveis de citocinas do perfil Th17 só foram verificados reduções significativas quanto à produção de IL-17 tardiamente após 2 anos de tratamento com o BZ ($p_{T0 \times T3}=0,0005$, $p_{T1 \times T3}=0,0137$, $p_{T2 \times T3}=0,0254$).

Para o perfil Th2 foram observadas reduções significativas após o tratamento para a citocina IL-10 ($p_{T0 \times T1}<0,0001$, $p_{T0 \times T2}<0,0001$, $p_{T0 \times T3}<0,0001$, $p_{T1 \times T2}=0,0194$, $p_{T1 \times T3}=0,0005$) e IL-4 ($p_{T0 \times T3}=0,0014$, $p_{T1 \times T3}=0,0066$, $p_{T2 \times T3}<0,0001$), no entanto, esta última citocina se eleva 5-6 meses pós tratamento ($p_{T0 \times T2}=0,0001$ e $p_{T1 \times T2}<0,0001$).

Figura 7 – Detecção dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-17A antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas.

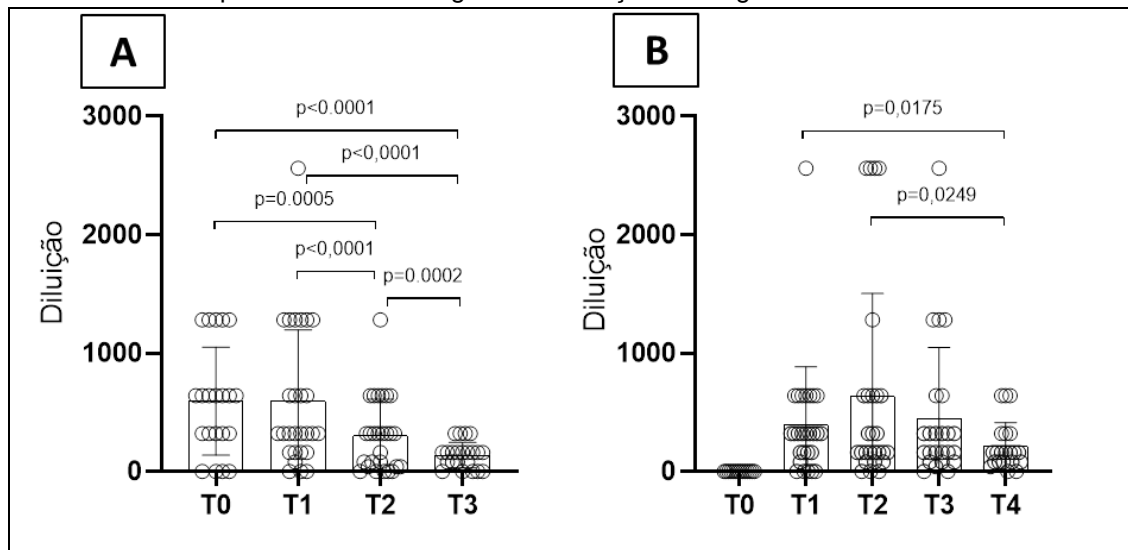


Legenda: T0 - antes do início do tratamento; T1 - segunda coleta, 2 meses após o tratamento; T2 - terceira coleta, 5-6 meses após o início do tratamento; T3 - quarta coleta, 2 anos após o tratamento. Unidade: citocinas - pg/mL. Análises estatísticas: Teste de Wilcoxon, considerando $p<0.05$.

6.2 Quantificação dos níveis de anticorpos IgM e IgG de pacientes da fase aguda da doença de Chagas após tratamento com Benzonidazol

Ao avaliar os títulos de anticorpos IgM (Figura 8A) pela RIFI pode-se observar reduções significativas pós tratamento ($p_{T0 \times T2}=0,0005$, $p_{T0 \times T3}<0,0001$, $p_{T1 \times T2}<0,0001$, $p_{T1 \times T3}<0,0001$, $p_{T2 \times T3}=0,0002$). Quanto aos títulos de anticorpos IgG (Figura 8B) verificamos reduções significativas após 2 anos de tratamento ($p_{T1 \times T4}=0,0143$ e $p_{T2 \times T4}=0,0166$).

Figura 8 - Detecção dos títulos de anticorpos IgM e IgG antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas

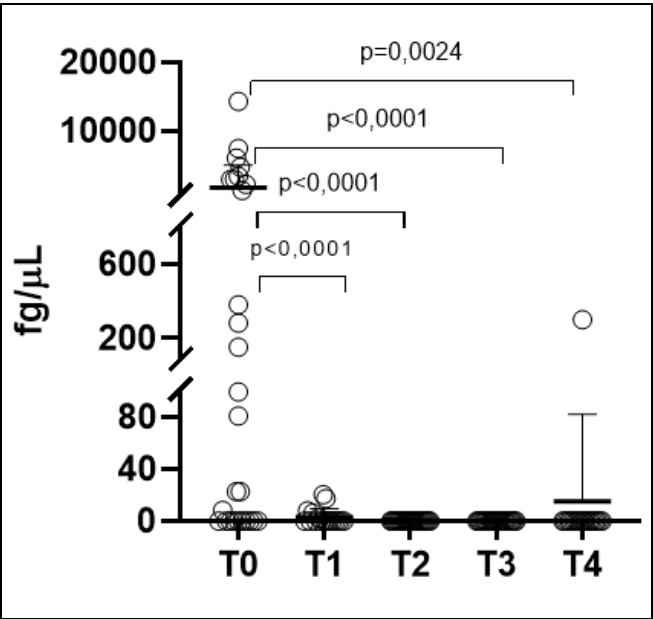


Legenda: A – gráfico da detecção do anticorpo IgM, B - gráfico da detecção do anticorpo IgG; T0 - antes do início do tratamento; T1 – primeira coleta, 1 mês de tratamento; T2 - segunda coleta, 2 meses após o tratamento; T3 - terceira coleta, 5-6 meses após o início do tratamento; T4 - quarta coleta, 2 anos após o tratamento. Análises estatísticas: Teste de Wilcoxon, considerando $p<0.05$.

6.3 Quantificação do DNA *T. cruzi*

Na avaliação foi observada uma redução da carga parasitária circulante durante e após o tratamento com o BZ ($p_{T0 \times T1}<0,0001$, $p_{T0 \times T2}<0,0001$, $p_{T0 \times T3}<0,0001$, $p_{T0 \times T4}=0,0024$). Contudo na avaliação de 2 anos (T4) após foi observado que apenas uma paciente obteve uma elevação de 300 fg/ μ L de carga parasitária do DNA *T. cruzi*, o que sugere uma reativação da doença de Chagas (Figura 9).

Figura 9 - Detecção da carga parasitária antes e após o tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas.



Legenda: T0 - antes do início do tratamento; T1 – primeira coleta, 1 mês de tratamento; T2 - segunda coleta, 2 meses após o tratamento; T3 - terceira coleta, 5-6 meses após o início do tratamento; T4 - quarta coleta, 2 anos após o tratamento. Unidade: carga parasitária - fg/μL. Análises estatísticas: Teste de Wilcoxon, considerando $p<0.05$.

6.4 Diagnóstico Sorológico

Durante o acompanhamento dos pacientes, o SRDC fez as sorologias para diagnóstico médico, realizamos a coleta do quantitativo de dados das informações dos pacientes positivos, negativos e indeterminados ao longo do tempo para doença de Chagas (Tabela 3).

Tabela 3: Sorologia para ELISA das amostras de pacientes com doença de Chagas aguda

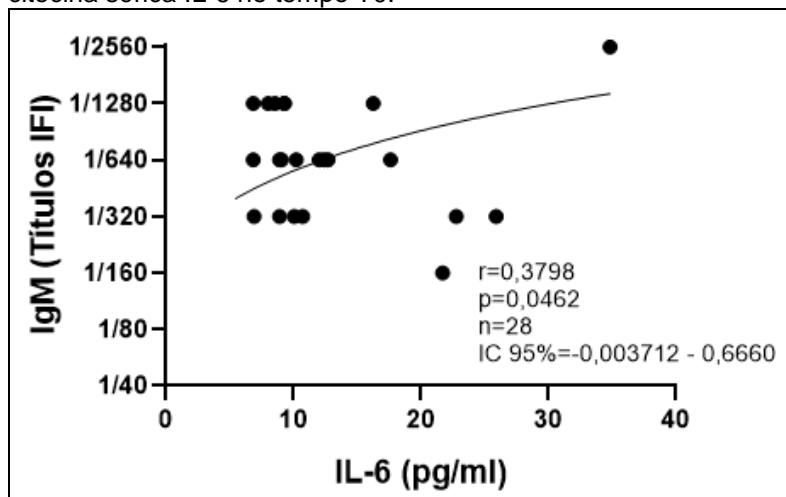
	ELISA CONVENCIONAL			ELISA RECOMBINANTE		
	Reagente	Não Reagente	Indeterminado	Reagente	Não Reagente	Indeterminado
T0 (n=28)	19	6	3	23	4	1
T1 (n=26)	22	4		11	14	1
T2 (n=23)	21	2		11	13	
T3 (n=22)	17	5		14	5	2
T4 (n=20)	15	5		15	5	

No tempo T4 observamos que ambos os testes foram concordantes, além disso, 1 paciente apresentou a soroconversão, ou seja, negativou nos 2 testes para o ELISA convencional e recombinante.

6.5 Correlação Anticorpos e Citocinas

Verificamos uma correlação positiva ($r=0,3798$; $p=0,0462$) entre os títulos de anticorpos IgM e a citocina sérica IL-6 no tempo T0 antes do tratamento com o BZ (Figura 10). Contudo, ao analisar as citocinas e a carga parasitária, não foi observado correlação.

Figura 10: Correlação entre os títulos de anticorpos IgM e a citocina sérica IL-6 no tempo T0.



Legenda: T0 - antes do início do tratamento. Unidade: citocinas - pg/mL. Análises estatísticas: Correlação de Spearman ($r=0,3798$; $p=0,0462$; IC= -0,003712 - 0,6660), considerando $p<0.05$.

7. DISCUSSÃO

Na busca por entender o que ocorre na regulação da resposta inflamatória na doença de Chagas aguda, em nosso trabalho verificamos que após a avaliação das citocinas séricas, o tratamento com o BZ diminuiu a resposta inflamatória, visto que citocinas como IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-6 diminuem com a intervenção do tratamento durante o tempo de seguimento.

O II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas considera como critério de cura a negatificação dos testes sorológicos após o tratamento com o BZ (DIAS et al., 2016). Ainda não há um método padrão-ouro para verificar a cura pelo tratamento na DC, sendo este um termo com significado complexo e amplo no meio da comunidade médica e científica. Para Brito et al. (2009), como cura parasitológica significa a

eliminação total do parasita não apenas do sangue, mas também de todos os tecidos e não existindo um método definitivo disponível.

Camundongos *knockout* para as citocinas IFN- γ , infectados e tratados na fase aguda com BZ apresentaram maior mortalidade e parasitemia quando comparados aos camundongos do grupo controle, demonstrando ineficiência do tratamento nesses animais. Esses resultados sugerem que o IFN- γ tem papel essencial na mediação da cura parasitológica e controlando a parasitemia durante a fase aguda (ROMANHA et al., 2002). Camundongos infectados e tratados durante a fase aguda apresentam níveis elevados de IFN- γ e diminuição de expressão de IL-17, IL-10, TGF- β e FoxP3 em tecidos de baço e de coração associado à diminuição de carga parasitária (GATTO et al., 2017).

Quanto aos estudos em humanos, nossos resultados discordam de Bahia-Oliveira et al., (2000) que encontraram altos níveis de IFN- γ pós tratamento com o BZ em pacientes agudos considerados curados após acompanhamento de 14-30 anos. Por outro lado, em pacientes no tratamento da infecção crônica, Laucella et al. (2009) avaliaram, por ELISPOT nas culturas estimuladas com antígenos de *T. cruzi* (lisado de amastigota), a produção global de IFN- γ de portadores crônicos da DC tratados e não tratados com o BZ e concluíram que o tratamento com o BZ diminuiu a produção de IFN- γ por células T específicas após 12 meses de tratamento.

Para TNF e IL-6, houve um aumento ao fim do tratamento, no entanto, foi verificado a diminuição após 5-6 após o início do tratamento. Podemos sugerir que durante o tratamento o BZ, por lise do parasito, uma maior exposição de antígenos induza maior inflamação pela uma produção de TNF e IL-6 controlando o parasitismo, o que comprova a sinergia entre tratamento etiológico e resposta imune do hospedeiro (ROMANHA et al., 2002). Esses dados corroboram com Moretti et al., (2002) ao dosar TNF- α e IL-6 por ELISA no soro de crianças na fase aguda após 30 dias de tratamento.

Ao estudar modelos experimentais de infecção oral da DC na fase aguda, Antunes et al. (2019) observaram um aumento nas citocinas inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-6) em conjunto com um aumento da parasitemia pós infecção. Essas citocinas elevadas estão associadas ao controle da multiplicação do parasita e ao fornecimento de resistência ao hospedeiro. Guedes et al., (2009) sugerem o

desenvolvimento da forma crônica cardíaca a uma intensa reposta Th1 durante a fase aguda, correlacionando com o aumento de citocinas IFN- γ e TNF- α e baixa produção de IL-10.

Outra citocina também avaliada foi a IL-2, que é uma molécula que participa da proliferação e diferenciação das células T, sustenta a expansão clonal por ser um fator de sobrevivência e permite a polarização das células T CD8 para células efetoras, participando do processo de ativação das células NK e no desenvolvimento de sua atividade lítica (LIAO et al., 2013; MURPHY, 2014). A depender da quantidade de citocina disponível do microambiente, a IL-2 também está envolvida na via regulatória, aumentando a proliferação de células T Foxp3+ reguladoras e ajudando a via imunorreguladora FAS/FAS-L (LIAO et al., 2013; KOSMACZEWSKA, 2014). Portanto, baixas quantidades de IL-2 pode favorecer a via imunorreguladora, enquanto que sua elevação direciona para respostas imunes efetoras (KOSMACZEWSKA, 2014). Em nosso estudo, o aumento da IL-2 antes do tratamento está relacionado a essa efetividade da resposta imune ativada pelo *T. cruzi* e que os níveis decaem pós-tratamento com BZ assumindo o seu papel imunorregulador na DC.

Em associação com a resposta inflamatória na patogênese da DC, o perfil Th17 produz a citocina pró-inflamatória IL-17 secretada por células T ativadas, sendo observada em nosso estudo uma redução significativa após o tratamento com o BZ. Nossos achados estão de acordo com Velásquez et al., (2019) que verificaram um declínio significativo da IL-17A 12 meses após o tratamento com o BZ em portadores crônicos e com o estudo de Gatto et al., (2017) que observaram a diminuição da expressão de IL-17 em tecido cardíaco e no baço de camundongos infectados e tratados na fase aguda.

Citocinas regulatórias como IL-4 e IL-10 desempenham um papel chave no balanço da resposta Th1, polarizando a resposta imune para um perfil Th2. Verificamos redução significativa da IL-10 pós-tratamento com BZ, concordando os achados de Velásquez et al., (2019), em que ocorre uma diminuição de níveis plasmáticos de IL-10 amostras de crianças bolivianas com idade entre 4-15 anos tratados na fase crônica após 12 meses de tratamento. Além disso, os autores

apresentam a diminuição de TGF- β e FoxP3, importantes moléculas associadas às células Tregs, um dos principais mecanismos de imunorregulação do hospedeiro

Quanto à produção de IL-4, verificamos níveis mais elevados desta citocina 6 meses após o tratamento com BZ e diminuição aos 2 anos de tratamento. Em modelos experimentais na DC crônica a IL-4 é uma citocina necessária para reduzir o parasitismo tecidual e modular a inflamação induzida pelo *T. cruzi* (SOARES et al., 2001). Assim, acreditamos que o aumento de IL-4 seja uma consequência do aumento de TNF e IL-6.

A geração de respostas imunes celulares e humorais à infecção com *T. cruzi* é determinada em grande parte pelas citocinas que são produzidas no microambiente da infecção. O início da imunidade adaptativa é seguido pela ativação de linfócitos B, com elevada produção de IgM, sendo este um parâmetro sorológico no diagnóstico destes pacientes agudos. Na fase inicial, o IgG também é detectado. Com relação aos anticorpos IgM e IgG, os achados foram condizentes com a literatura, visto que os níveis de IgM diminuíram logo após o início do tratamento e o IgG mais tardiamente (ANDRADE et al., 2014).

Díaz-Bello et al., (2021) verificaram a redução de anticorpos IgM e IgG após 10 anos de tratamento etiológico em 106 pacientes na fase aguda da doença de Chagas. A diminuição nos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* após o tratamento com BZ está associada a uma possível eliminação ou redução da carga parasitária (VIOTTI et al., 2011). Llaguno et al., (2021) também confirmam a redução da imunoglobulina IgG 48 meses após o tratamento com BZ em pacientes na fase crônica, o que poderia estar relacionado a uma breve soroconversão. No presente estudo apenas em uma paciente foi observado a soroconversão através da sorologia por ELISA, contudo a mesma paciente apresentou um decaimento inicial de 1/320 (T1) para 1/80 (T4), possuindo títulos positivos baixos de anticorpos IgG pela IFI.

Para que ocorra a negatividade sorológica, o tempo necessário é variável e depende da fase e duração da doença, sendo um ano para a infecção congênita, 3-5 anos para a fase aguda, 5-10 anos para a fase crônica recente e mais de geralmente de 20-25 anos para indivíduos que são tratados na fase crônica, ou seja, o desfecho clínico tido como marcador é a soroconversão que requer um período bastante longo de acompanhamento (DIAS et al., 2016). Em nosso estudo, a

avaliação do tratamento etiológico foi de 2 anos após a infecção oral, não sendo ainda observado cura nesses pacientes e análises futuras são sugeridas.

Com relação aos achados da carga parasitária, houve decaimento com o curso do tratamento, como esperado, visto que o BZ é um antiparasitário. Velásquez et al., (2019) também verificaram o declínio do DNA *T. cruzi* pela PCR convencional e PCR em tempo real após o tratamento com BZ no estudo de acompanhamento de 12 meses em crianças na fase crônica. DUFFY et al., (2009) verificaram as vantagens da PCR em tempo real para a triagem e quantificação do DNA de *T. cruzi* ao acompanhar por 6 meses pacientes crônicos tratados com BZ, monitorando também a reativação da doença pós transplante cardíaco. Diagnósticos baseados na detecção de DNA, como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), surgiram como oportunidades de monitoramento dos níveis parasitários na corrente sanguínea do indivíduo infectado (MOREIRA et al., 2017; PARRADO et al., 2018).

Em nosso estudo incorporamos para diagnóstico a qPCR TcSAT-IAM de COSTA-OLIVEIRA et al., (2023) já no acompanhamento desses pacientes durante a fase aguda e que apesar do tratamento, verificamos em dois anos após o BZ um paciente reativou, indicando falha terapêutica, visto que o *T. cruzi* pode utilizar de mecanismos de escape, além da possibilidade de algumas cepas de *T. cruzi* desenvolverem resistência contra o BZ (HABERLAND et al., 2013) e até mesmo *backgrounds* genético para aspectos imunológicos do paciente que podem favorecer a reativação da doença (ANDRADE et al., 2014), mas para isso precisamos de maiores análises imunológicas da paciente em questão.

Em 2019, PE notificou o primeiro surto de Doença de Chagas Aguda (DCA) por transmissão oral em Ibimirim e um dos maiores casos já registrado no estado e no Brasil. Os participantes do evento pertenciam a diferentes municípios da Região Metropolitana, sendo esse grupo de pacientes infectados pela mesma cepa do *T. cruzi*, visto que foram expostos ao mesmo alimento, contudo as respostas imunológicas geradas foram distintas, ou seja, não dependendo apenas do parasita e sim de vários fatores, principalmente do hospedeiro após a resposta do tratamento com o BZ (COSTA-OLIVEIRA et al., 2023), devendo esse grupo ser reavaliado afim de monitorar possíveis casos de reativação do doença de Chagas. Por fim, não verificamos uma citocina como alvo de biomarcador, mas um conjunto de citocinas que poderiam ser dosadas a fim de auxiliar a comunidade médica, parâmetros

confiáveis que poderiam reforçar em conjunto com as técnicas sorológicas e moleculares na verificação da efetividade ou falha terapêutica do Benzonidazol.

8. CONCLUSÕES

- a) Nossos resultados indicam que o BZ reduz a resposta inflamatória em pacientes tratados na fase aguda, pois citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-6) e Th17 (IL-17) diminuem com a intervenção do tratamento durante o tempo de seguimento.
- b) Citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-10), também reduzem com o tratamento e acreditamos que a elevação de IL-4 em 6 meses após o tratamento, seja uma consequência do aumento de TNF e IL-6.
- c) Os títulos de anticorpos IgM e IgG decaem após o tratamento com o BZ, sendo observado a soroconversão através da sorologia por ELISA de um paciente, dois anos após o tratamento, sugerindo que houve cura desses pacientes.
- d) O tratamento com BZ negativou a carga parasitária detectada através da PCR, indicando o sucesso do tratamento. Porém, verificamos que após dois anos um paciente reativou, indicando uma possível falha terapêutica.
- e) Acreditamos que o Benzonidazol na DCA reduz a resposta inflamatória desencadeada pelo *T. cruzi* e, isso poderia prevenir/reduzir os danos tissulares característicos da doença.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2014.
- ANTUNES, Dina et al. Oral Route Driven Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Unravels an IL-6 Dependent Hemostatic Derangement. **Frontiers in Immunology**, v. 10, Article 1073, p. 1-10, May 2019.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN-g in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. São Paulo, v. 31, p. 127-131, 1998.
- BAHIA-OLIVEIRA, Lilian MG et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14–30 years ago. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 2, p. 634-638, 2000.
- BARBOSA, Maria das Graças Vale et al. Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 27-33, 2015.
- BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **The journal of the American Medical Association**, United States, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.
- BERMEJO, Daniela A. et al. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 5, p. e679, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. Doença de Chagas Aguda. Aspectos epidemiológico, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais de saúde. **Rev Patol Trop**, v. 36, n. 3, p. 1-32, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. Brasília, DF: Ministério da Saúde. v. 50, n. 02, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2º Boletim Epidemiológico da Doença de Chagas. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/14/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf>. Acesso em: 25 de Setembro de 2021.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Brasília, DF. v. 50, p. 16-18, 2019.

BRITTO, Constança Carvalho. Utilidade de ensaios baseados em PCR para avaliar a eficácia de drogas na quimioterapia da doença de Chagas: valor e limitações. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 122-135, 2009.

BONITA R, Beaglehole R, KJELLSTROM T. Epidemiologia Básica. 2ª ed. São Paulo: Grupo Editorial Nacional; 2010.

CAI, Catherine W. et al. Th17 cells provide mucosal protection against gastric *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, p. IAI. 00738-20, 2021.

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. Relatório de Recomendação. 2018. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf>. Acesso em 28 de Outubro de 2021.

CAMARA, Edmundo JN et al. Elevated IL-17 levels and echocardiographic signs of preserved myocardial function in benznidazole-treated individuals with chronic Chagas' disease. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 123-130, 2019.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and disease**, v. 73, n. 9, p. 082, 2015.

COSTA-OLIVEIRA, CND. et al. Outbreak of Chagas disease in Brazil: Validation of a molecular diagnostic method. **Experimental Parasitology**, v. 247. 2023.

COURA, José Rodrigues; CASTRO, Solange L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 3-24, jan. 2002.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, Supl. I, p. 113-122, nov. 2007.

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, José Rodrigues; JUNQUEIRA, Angela CV. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 145-154, 2012.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. 187-192, 2001.

CUNHA-NETO E; et al. New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 59-62, 2006.

DE FÁTIMA OLIVEIRA, Maria et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

DE MEIS, Juliana; CASTRO, R. Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base do Estado do Pará. **Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICT/IOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2017.

DE NOYA, Belkisyolé Alarcón; GONZÁLEZ, Oscar Noya; ROBERTSON, Lucy J. *Trypanosoma cruzi* as a Foodborne Pathogen. 2015.

DE OLIVEIRA, Silmara Ferreira et al. Epidemiologia da Doença de Chagas Aguda no Nordeste Brasileiro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. 1-9, 2021.

DE VILHENA, Andrezza Ozela et al. Doença de Chagas aguda no estado do Pará, Brasil: série histórica de aspectos clínicos e epidemiológico em três municípios, no período de 2007 a 2015. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, p. 11-11, 2020.

DÍAZ-BELLO, Zoraida et al. Ten-year follow-up of the largest oral Chagas disease outbreak. Laboratory biomarkers of infection as indicators of therapeutic failure. **Acta Tropica**, v. 222, p. 106034, 2021.

DIAS, J. C. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.

DUFFY T, BISIO M, ALTCHER J, BURGOS JM, DIEZ M, et al. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. **PLoS Negl Trop Dis**. 3(4): e419, doi:10.1371/journal.pntd.0000419, 2009.

DUTRA WO, GOLLOB KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 21, n. 3, p. 287-292, jun. 2008.

GARG, N. J. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421–447, 2018.

GATTO, M. et al. Benznidazol afeta a expressão das citocinas Th1, Th17 e Treg durante a infecção experimental aguda pelo *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Incluindo Doenças Tropicais**, v. 23, 2018.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, São Paulo, v. 8, p. 188-197, 2012.

GUEDES, Paulo MM et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 130, n. 1-2, p. 43-52, 2009.

GUEDES, P. M. D. M. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, 2010.

GUEDES, P. M. M. et al. Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite immunology**, v. 31, n. 11, p. 673-685, 2009.

JUNQUEIRA, Caroline; et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, set. 2010.

HABERLAND, Annekathrin et al. Doença de Chagas crônica: do básico à medicina laboratorial. **Química Clínica e Medicina Laboratorial (CCLM)**, v. 51, n. 2, p. 271-294, 2013.

KOSMACZEWSKA, A. Low-dose interleukin-2 therapy: a driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. **Int. J. Mol. Sci.** 15, 18574–18592, 2014.

LAUCELLA, Susana A. et al. Alterações nas respostas imunes específicas do *Trypanosoma cruzi* após o tratamento: marcadores substitutos da eficácia do tratamento. **Doenças infecciosas clínicas**, v. 49, n. 11, pág. 1675-1684, 2009.

LIAO, W. et al. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. **Immunity**, n. 38; p: 13–25, 2013.

LLAGUNO, Maurício et al. Análise da subclasse de IgG em pacientes com doença de Chagas 4 anos após o tratamento com benznidazol. **Acta Parasitologica**, v. 66, p. 1499-1509, 2021.

MAGALHÃES, Luisa MD et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 4, p. 661-665, 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319-24, jul. 2009.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103, 2016.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlandio et al. The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016: a subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006559, 2018.

MAYA J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Nova Iorque, v. 146, p. 601-620, 2007.

MOREIRA, O. C. et al. Development of conventional and real-time multiplex PCRbased assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi*

load in triatomine vectors. **Parasites & Vectors**. 10:404, DOI 10.1186/s13071-017-2343 x, 2017.

MORETTI, Edgardo et al. Patterns of cytokines and soluble cellular receptors in the sera of children with acute Chagas' disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1324-1327, 2002.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Jeneway**. 8. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/World Health Organization et al. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>. Acesso em: 17 Agosto de 2013.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/World Health Organization. Chagas Disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Trypanosoma cruzi* infection, transmission and disease. **Weekly epidemiological record**. v. 90, n. 06, 2015.

RASSI, A. Jr; RASSI, A; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, p. 1388-1402, apr. 2010.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of anti-infective therapy**, Londres, v. 5, p. 727-743, 2007.

ROMANHA, Álvaro J. et al. Quimioterapia experimental contra infecção por *Trypanosoma cruzi*: papel essencial do interferon- γ endógeno na mediação da cura parasitológica. **O Jornal de doenças infecciosas**, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002.

RIBEIRO, Isabela; CHANTELAIN, Eric. INFORMATIVO n.2- Plataforma de Pesquisa Clínica em doença de Chagas, Rio de Janeiro/RJ/Brasil, Novembro de 2012.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. **Scandinavian journal of immunology**, v. 64, n. 5, p. 554-63, nov. 2006.

SATHLER-AVELAR, Renato et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 246-251, 2009.

SES. Secretaria de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de doença de Chagas Anual**. Recife, n. 01, p. 1-6, jul. 2021.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 539-45, 1991.

SILVA, J. S. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169 – 174, 1994.

SILVEIRA CAN, Castillo E, Castro C. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. **Rev Soc Bras Med Trop**33, p. 191-196, 2000.

SIMÕES, Marcus Vinicius et al. Cardiomiopatia da doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.

SOARES, M.B., et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am J Pathol**. Aug, v.159, n. 2, p: 703-9, 2001.

PACHECO, Luciano Vasconcellos et al. Transmissão oral da doença de Chagas: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p.1-11, 2021.

PAHO - Pan American Health Organization. **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease**. Washington, D.C, 2019.

PAHO - Pan American Health Organization, 2020. Chagas disease. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2020.

PARRADO, R. et al. Real-Time PCR for the evaluation of treatment response in clinical trials of adult chronic Chagas disease: usefulness of serial blood sampling and qPCR replicates. **American Society for Microbiology Journals**, Washington, doi.org/10.1128/AAC.01191-18, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis), 2018. 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: 04 de Julho de 2021.

TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. The possible mechanism of action of IgG antibodies and platelets protecting against *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 24, n. 8, p. 759-765, 1991.

VELÁSQUEZ, C. V. et al. IL-17A, um possível biomarcador para a avaliação da resposta ao tratamento em crianças infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*: um estudo de acompanhamento de 12 meses na Bolívia. **PLoS Negligenciou Doenças Tropicais** , v. 13, n. 9, pág. e0007715, 2019.

VOS, Theo et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, 2020.

XAVIER, S. C. C. et al. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, 2014.

APÊNDICE A — ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS

Reduction in the production of inflammatory cytokines in patients with Acute Chagas Disease treated with Benznidazole

FIRMINO, L.F.¹, NASCIMENTO, A.V.², COSTA-OLIVEIRA, C. N.³, NAKAZAWA, M.³BARROS, M.S.³, TORRES, D.J.L.¹, OLIVEIRA, K.K.S.¹, SILVA-JUNIOR, C.D.¹, BATISTA, F. P.⁴, MONTENEGRO, D.⁴, OLIVEIRA JÚNIOR, W. A.⁵LORENA, V.M.B.³.

¹Universidade Federal de Pernambuco, ²Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, ³Instituto Aggeu Magalhães de Pernambuco-FIOCRUZ/PE, ⁴HospitalUniversitário Oswaldo Cruz (HUOC) - Universidade de Pernambuco (UPE), ⁵Pronto-Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco (PROCAPE) – Universidade de Pernambuco (UPE).

RESUMO

Em 2019, PE notificou o 1º surto de doença de Chagas Aguda (DCA) por transmissão oral em Ibimirim-PE. Durante a fase aguda, deve-se ter rapidez no acesso ao tratamento e ser realizado em todos os casos, independente da forma de transmissão, pois cerca de 70-80% dos casos apresentam cura. A observação do comportamento imunológico após tratamento etiológico em um grupo de pessoas com DCA poderia permitir a identificação de biomarcadores que comprovem a eficácia do Benzonidazol (BZ). Portanto, investigações que permitam elucidar os efeitos imunes que ocorrem após o uso do BZ são relevantes. Assim o objetivo do estudo foi avaliar as citocinas do perfil Th1 (TNF, IFN-γ, IL-2 e IL-6), Th2 (IL-10, IL-4) e Th17 (IL-17A) em pacientes com a DCA, antes e após tratamento com BZ. Para atingirmos esse objetivo, foram avaliados 28 indivíduos presentes no surto de Ibimirim infectados e confirmados laboratorialmente. Nossos resultados indicam que o BZ diminuiu a resposta inflamatória nos pacientes, pois citocinas do perfil Th1 (IFN-γ, TNF, IL-2 e IL-6) e Th17 (IL-17) bem como as citocinas regulatórias do perfil Th2 (IL-4 e IL-10), também diminuíram com a intervenção do tratamento. Houve redução dos títulos de anticorpos IgM e IgG, sendo observado soroconversão de um paciente, dois anos após o tratamento. Assim, acreditamos que o BZ na DCA reduz a resposta inflamatória desencadeada pelo *T. cruzi* e, isso poderia prevenir/reduzir os danos tissulares característicos da doença.

Palavras-chave: Doença de Chagas Aguda, Benzonidazol, Resposta Imunológica.

ABSTRACT

In 2019, PE notified the 1st outbreak of Acute Chagas disease (ACD) by oral transmission in Ibimirim-PE. During the acute phase, access to treatment must be quick and performed in all cases, regardless of the form of transmission, as around 70-80% of cases are cured. The observation of immunological behavior after etiological treatment in a group of people with ACD could allow the identification of biomarkers that prove the effectiveness of Benznidazole (BZ). Therefore, investigations that allow elucidating the immune effects that occur after the use of BZ are relevant. Thus, the objective of the study was to evaluate the profile cytokines Th1 (TNF, IFN- γ , IL-2 and IL-6), Th2 (IL-10, IL-4) and Th17 (IL-17A) in patients with ACD, before and after treatment with BZ. In order to achieve this objective, 28 individuals present in the Ibimirim outbreak who were infected and laboratory confirmed were evaluated. Our results indicate that BZ decreased the inflammatory response in patients, as Th1 profile cytokines (IFN- γ , TNF, IL-2 and IL-6) and Th17 (IL-17) as well as Th2 profile regulatory cytokines (IL -4 and IL-10), also decreased with the treatment intervention. There was a reduction in IgM and IgG antibody titers, and seroconversion was observed in one patient two years after treatment. Thus, we believe that BZ in ACD reduces the inflammatory response triggered by *T. cruzi*, and this could prevent/reduce the tissue damage characteristic of the disease.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*; Outbreak in Pernambuco; Treatment

INTRODUCTION

Chagas Disease (CD) is a public health problem with socioeconomic implications, mainly due to early mortality, loss of years of life due to disability and high costs with medical care and social security (VOS et al, 2020). There are approximately 6 million people infected in the world by *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes CD. As a result, CD is among the four main causes of death from infectious and parasitic diseases in Brazil (MARTINS-MELO et al., 2016, 2018; BRASIL, 2021; WHO, 2018).

The challenges remain in the early detection due to the occurrence of cases related to oral transmission due to the ingestion of contaminated food, alarming for possible new cases (CONITEC, 2018). Oral transmission is one of the main causes of Acute Chagas Disease (ACD) and is usually related to the consumption of contaminated food such as sugarcane juice, açaí, babassu palm, jaci (coquinho),

bacaba, buriti and other juices and fruits, due to contact with triatomine (vector) excreta containing *T. cruzi* or with the insect accidentally macerated with food (BARBOSA et al., 2015; COURA, 2015).

In 2019, Pernambuco - Brazil reported the important outbreak of CD in the acute phase by oral transmission, in which 77 people participated in a religious celebration at a local school in April 2019. Our research laboratory has helped physicians by carrying out the molecular diagnosis of these patients (COSTA-OLIVEIRA et al., 2023). Oral transmission came to be considered the main route of CD infection after control of vector and transfusion infection in the 1990s. (DIAS, 2016; BRASIL, 2021). In 2020, 146 cases of ACD were confirmed in Brazil, with a case fatality rate of 2% and all deaths occurred in the state of Pará, the endemic place with the highest prevalence of CD in Brazil, with the oral route (82.33%) the most frequent form of transmission (BRASIL, 2021; VILLHENA et al., 2020).

The medication recommended by the Ministry of Health for the treatment of ACD is Benznidazole (BZ) (DIAS, 2016). Treatment results vary according to the stage of the disease, treatment time, dose, age and geographic origin of the individual (COURA; CASTRO, 2002). BZ therapy generally leads to cure in acute infection and prevents evolution to the symptomatic clinical forms of the chronic phase (SIMÕES, 2018).

Detection of individuals during the acute phase of CD is rare due to the relatively nonspecific clinical symptoms seen in most infected patients. This delay in detection prevents diagnosis and, consequently, limits the availability of studies describing the immune status of individuals in the acute phase. In addition, there is still no vaccine to prevent Chagas disease and the established cure criterion is based on a decrease in antibody titers, which can occur after years of treatment (DIAS,

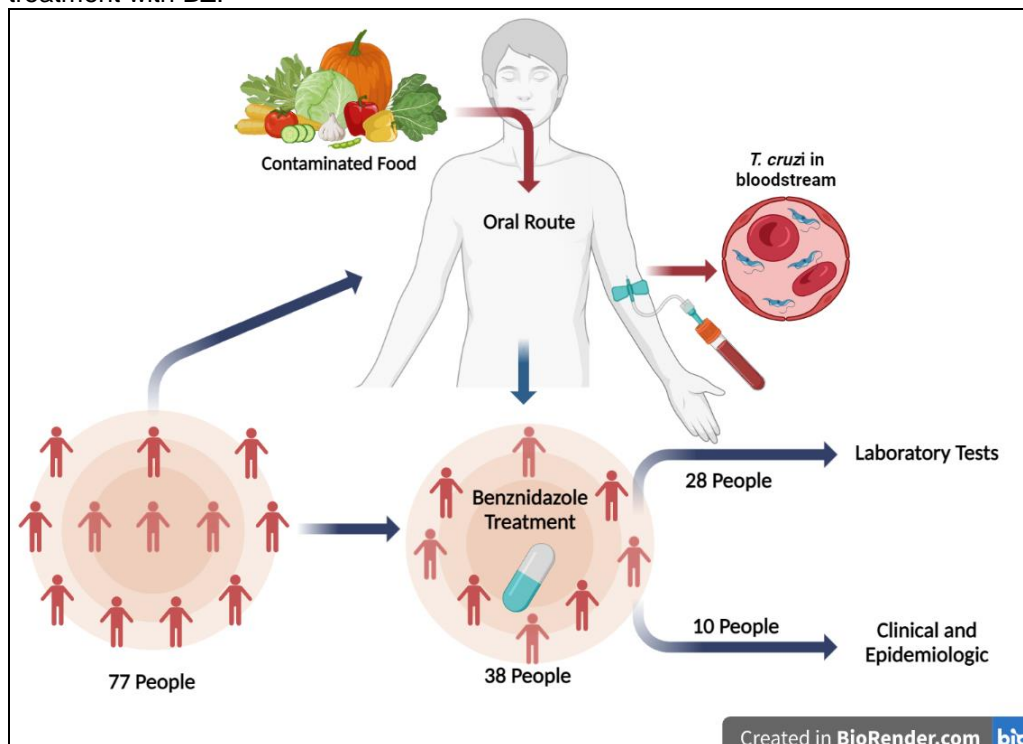
2016). The observation of the immunological behavior after etiological treatment in a group of people with ACD could allow the identification of biomarkers that prove the effectiveness of BZ.

Therefore, investigations that allow elucidating the immune effects that occur after the use of BZ are relevant. Thus, the objective of this work is to evaluate the Th1 profile cytokines (TNF, IFN- γ , IL-2 and IL-6), Th2 (IL-10, IL-4) and Th17 (IL-17A) in patients with Acute Chagas Disease, before and after treatment with Benznidazole.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Figure 1- Selection of patients after oral contamination of Chagas disease following treatment with BZ.



Of the 77 individuals exposed to the outbreak in Ibimirim, a total of 38 individuals infected with ACD, from Pernambuco - Brazil, 28 patients selected by laboratory criteria and 10 by clinical-epidemiological criteria (**Figure 1**). The patients were seen at the House for the Carrier of Chagas Disease and Heart Failure of the

University Cardiological Emergency Room of the University of Pernambuco (Procape/UPE). Those who agreed to participate in the study were invited to sign the Free and Informed Consent Form, where the purpose and methodology were explained based on the collection of peripheral blood from the participants. For our study population, n=28 was considered for presenting some serological or parasitological test as laboratory confirmation for CD (**Tabela 1**).

TABLE 1 - Serological, parasitological, molecular and clinical confirmation of patients with acute Chagas disease.

Patient ID	Age (yrs)	Patient sex	Residence	Parasitological test	Serology test	Molecular test	Internment
P1	45	Female	Recife	-	-	PCR	No
P2	31	Female	Camaragibe	-	-	PCR	Yes
P3	21	Male	Arcoverde	-	-	PCR	Yes
P4	20	Male	Paulista	Thick Blood Smear	-	-	No
P5	27	Female	Olinda	-	-	PCR	Yes
P6	39	Female	Olinda	Fresh Blood	-	PCR	Yes
P7	36	Female	Recife	Fresh Blood	-	PCR	Yes
P8	17	Female	Venturosa	-	-	PCR	Yes
P9	33	Female	Olinda	-	ELISA, IFI	PCR	No
P10	37	Female	Olinda	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	Yes
P11	37	Female	Ibimirim	-	-	PCR	Yes
P12	38	Male	Camaragibe	Thick Blood Smear	-	PCR	Yes
P13	13	Male	Arcoverde	Thick Blood Smear	ELISA	PCR	No
P14	47	Male	Arcoverde	Thick Blood Smear, Fresh Blood	-	PCR	Yes
P15	35	Female	Camaragibe	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	No
P16	20	Female	Olinda	Thick Blood Smear	ELISA, IFI, HAI	-	No
P17	17	Female	Recife	Hemoculture	IFI, HAI	PCR	No
P18	21	Male	Recife	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	Yes
P19	18	Male	Jaboatão	Thick Blood Smear	-	PCR	Yes
P20	34	Female	Cabo de Santo Agostinho	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	Yes
P21	32	Female	Jaboatão	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	No
P22	36	Female	Olinda	Thick Blood Smear	-	PCR	Yes
P23	23	Male	Olinda	Thick Blood Smear	-	-	*
P24	21	Female	Recife	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	No
P25	9	Female	Recife	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	*

P26	22	Male	Jaboatão	-	ELISA, IFI, HAI	-	No
P27	34	Male	Recife	Thick Blood Smear	ELISA, IFI	-	No
P28	29	Female	Jaboatão	Thick Blood Smear	-	-	No

Legend: ID: Patient identification; * No information in the medical record; - Test Negative.

Most patients had symptoms such as fever, headache, muscle pain, facial and lower limb swelling, abdominal pain, diarrhea, vomiting, constipation, weakness, three patients had pericardial effusion and only two were asymptomatic. After confirming the serological, all individuals were treated with BZ (5mg/Kg) for 60 days. The treatment was maintained for 60 days without interruption. Some patients had reactions such as itching, paresthesia, headache and asthenia. In the presence of any reaction, there was a reduction in the dose, extending the treatment to 90 days. Despite this, medication abandonment was not observed in the study population

These individuals were monitored at four different times: T0 (before treatment); T1 (after 60 days of treatment); T2 (after 6 months of treatment initiation) and T3 (after 2 years of treatment). At each moment, 4mL of blood was collected in a dry tube.

Serological Diagnosis

To confirm *T. cruzi* infection, two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with different antigenic preparations were used. The commercial GOLD ELISA kit (REM Indústrias e Comércio LTDA, São Paulo, Brazil) was used to detect IgM anti-*T. cruzi*, and the BIOLISA Chagas Recombinant kit (QUIBASA Química Básica Ltda, Minas Gerais, Brazil) was used to detect IgG anti-*T. cruzi*. The methodology used followed the manufacturers' recommendations. The results were interpreted according to the II Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015 (DIAS et al., 2016).

IgM/IgG antibody titration

It was carried out to assess the titers of specific IgM/IgG antibodies to *T. cruzi* during treatment. For this, we will use fixed epimastigotes forms from the Imuno-Con kit (WAMA Diagnóstica, São Paulo, Brazil) that were added to the immunofluorescence slides according to the manufacturer. Then, 5µl of the serum sample is diluted in 195µl of PBS from the kit, starting the serial dilution in the transfer of 100µl of the initial preparation (1/40) diluted in 100µl of PBS for each microtube 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 and 1/2560, respectively. 35µl was deposited in each slide well following the dilution order for each patient, the slide is incubated at 37°C in a dark and humid chamber for 30min. Washing was performed with PBS – 15min, and the reaction site was slightly dried to add the conjugate (anti-IgM/human IgG conjugated to Fluorescein Isothiocyanate) to reveal the immunocomplex. The slides were mounted in alkaline glycerin and viewed under an immunofluorescence microscope at 40x magnification. The last dilution in which fluorescence is still visible will be the assumed titer for the analyses.

Cytokine quantification

Cytokine dosage was performed from serum using the Cytometric Bead Array (CBA) method (BD CBA Human Th1/Th2/Th17 kit; BD, San Jose, CA, USA) for quantification of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ and IL-17A. The quantification was carried out according to the manufacturer's recommendations. Acquisitions will be performed using a BD FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, Sandiego, CA, USA). The results were analyzed using the BD FCAP Array 3.1.

Data Analysis

In numerical variables, the D'Agostino-Pearson normality test was applied. The analysis of variance used for the parametric data was the paired t test and for the non-parametric data the paired Wilcoxon test was applied. Differences were considered significant when $p\text{-value} < 0.05$. All statistical analysis was performed using GraphPadPrism v8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Ethical Considerations

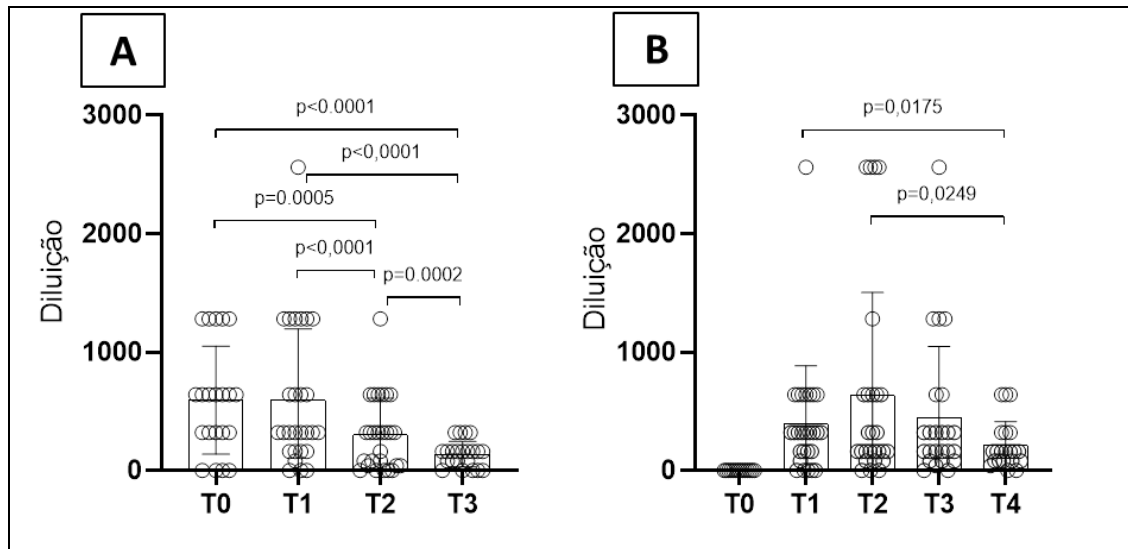
The patients were invited to participate in the research and to sign an informed consent form authorizing the use of the material collected for scientific purposes. The project was approved by the Aggeu Magalhães Institute (C.A.A.E: 20049919.5.0000.5190).

RESULTADOS

IgM/IgG antibody titration

The reduction in anti-*T. cruzi* is gradual, and this decline is persistent and progressive (Figure 1). When evaluating IgM antibody titers (Figure 1A), significant post-treatment reductions can be observed. As for IgG antibody titers (Figure 1B), we found significant reductions after 2 years of treatment.

Figura 1 - Detection of IgM and IgG antibody titers before and after treatment with Benznidazole in patients in the acute phase of Chagas disease



Legend: A – IgM antibody detection graph, B – IgG antibody detection graph; T0 - before starting treatment; T1 – first collection, 1 month of treatment; T2 - second collection, 2 months after treatment; T3 - third collection, 5-6 months after starting treatment; T4 - fourth collection, 2 years after treatment. Statistical analysis: Wilcoxon test, considering $p < 0.05$.

Serological Diagnosis

During the follow-up of the patients, the SRDC carried out the serologies for medical diagnosis, we collected quantitative data from the information of positive, negative and undetermined patients over time for Chagas disease (Table 2).

Table 2: ELISA serology of samples from patients with acute Chagas disease

	ELISA CONVENCIONAL			ELISA RECOMBINANTE		
	Reagente	Não Reagente	Indeterminado	Reagente	Não Reagente	Indeterminado
T0 (n=28)	19	6	3	23	4	1
T1 (n=26)	22	4		11	14	1
T2 (n=23)	21	2		11	13	
T3 (n=22)	17	5		14	5	2
T4 (n=20)	15	5		15	5	

At time T4, we observed that both tests were concordant, in addition, 1 patient presented seroconversion, that is, he was negative in the 2 tests for the conventional and recombinant ELISA.

Cytokines Quantification

Regarding the cytokine production, we observed that IFN- γ and IL-2 reduce after treatment (Figure 2A and 2C). Cytokines TNF and IL-6 increased production

after the end of treatment (T1) when compared to T0, and there was a reduction in subsequent collections (T2 and T3) (Figure 2B and 2E). For the Th2 profile, the cytokines IL-10 and IL-4 were observed significant reductions after treatment (Figure 2D and 2F). When evaluating the cytokine level of the Th17 profile, were observed significant reductions after treatment were found regarding the production of IL-17 (Figure 2G).

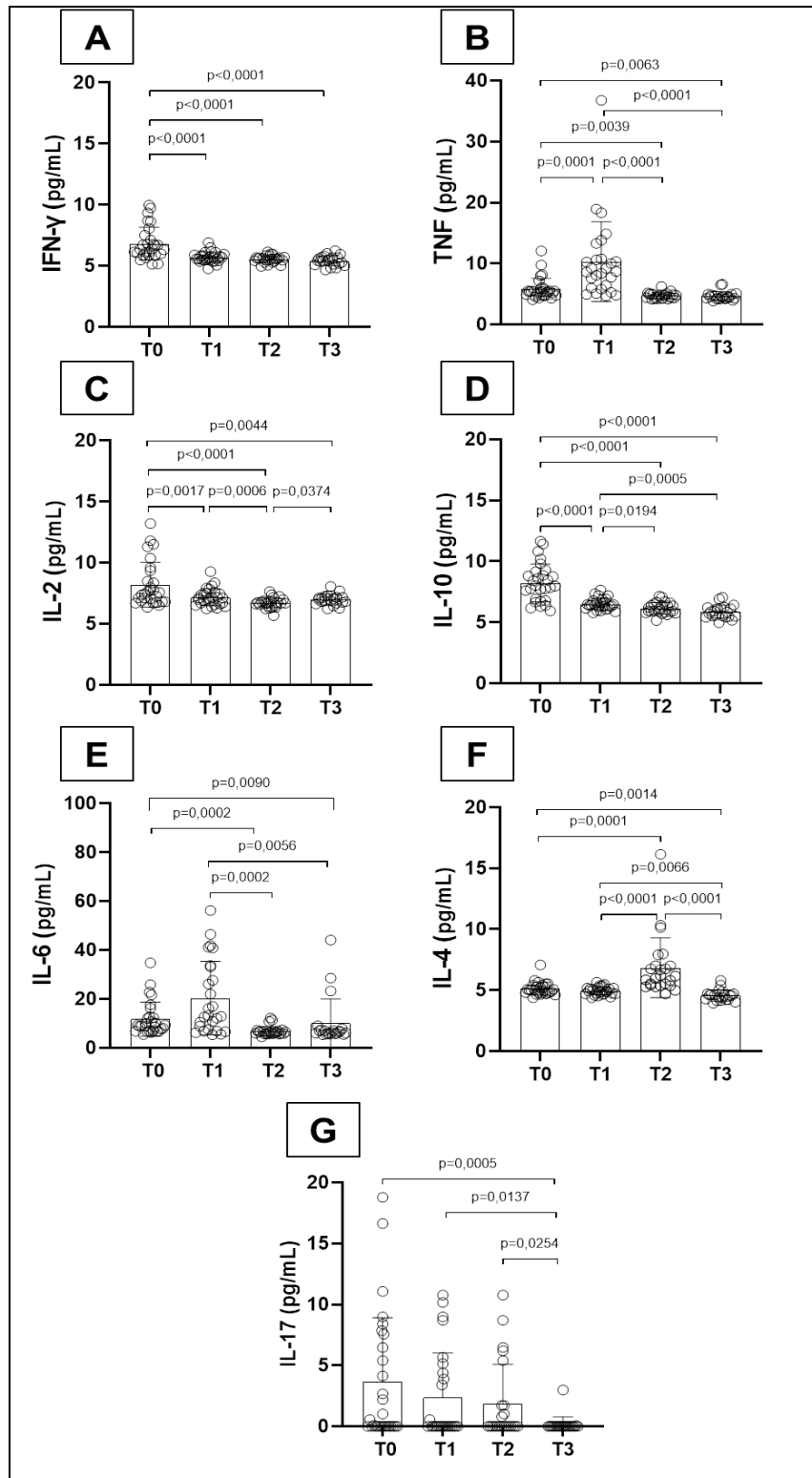


Figure 2 – Detection of serum levels of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF and IL-17A before and after treatment with Benznidazole in patients in the acute phase of Chagas disease . Legend: T0 - before starting treatment; T1 - second collection, 2 months after treatment; T2 - third collection, 5-6 months after starting treatment; T3 - fourth collection, 2 years after treatment. Unit: cytokines - pg/ml. Statistical analysis: Wilcoxon test, considering $p < 0.05$.

DISCUSSION

The II Brazilian Consensus on Chagas Disease considers negative serological tests after treatment with BZ to be a cure criterion (DIAS et al., 2016). There is still no gold-standard method to verify treatment cure in CD, which is a term with a complex and broad meaning in the medical and scientific community. For Brito et al. (2009), as a parasitological cure it means the total elimination of the parasite not only from the blood, but also from all tissues and there is no definitive method available.

For serological negativity to occur, the time required is variable and depends on the phase and duration of the disease, being one year for the congenital infection, 3-5 years for the acute phase, 5-10 years for the recent chronic phase and more than usually 20-25 years for individuals who are treated in the chronic phase, that is, the clinical outcome taken as a marker is seroconversion, which requires a very long period of follow-up (DIAS et al., 2016). In our study, the evaluation of the etiological treatment was 2 years after the oral infection, and cure has not yet been observed in these patients and future analyzes are suggested.

In the quest to understand what happens in the regulation of the inflammatory response in acute Chagas disease, in our work we verified that after the evaluation of serum cytokines, treatment with BZ decreased the inflammatory response, since cytokines such as IFN- γ , TNF, IL-2 and IL-6 decrease with treatment intervention during follow-up time.

Knockout mice for IFN- γ cytokines, infected and treated in the acute phase with BZ, showed higher mortality and parasitemia when compared to mice in the control group, demonstrating the inefficiency of the treatment in these animals. These results suggest that IFN- γ plays an essential role in mediating parasitological cure and controlling parasitemia during the acute phase (ROMANHA et al., 2002). Mice

infected and treated during the acute phase have high levels of IFN- γ and decreased expression of IL-17, IL-10, TGF- β and FoxP3 in spleen and heart tissues associated with decreased parasite load (GATTO et al., 2017).

As for studies in humans, our results disagree with Bahia-Oliveira et al., (2000) who found high levels of IFN- γ after treatment with BZ in acute patients considered cured after a follow-up of 14-30 years. On the other hand, in patients undergoing treatment for chronic infection, Laucella et al. (2009) evaluated, by ELISPOT in cultures stimulated with *T. cruzi* antigens (amastigote lysate), the global production of IFN- γ in chronic CD carriers treated and not treated with BZ and concluded that treatment with BZ decreased the production of IFN- γ by specific T cells after 12 months of treatment.

For TNF and IL-6, there was an increase at the end of treatment, however, a decrease was seen after 5-6 after the start of treatment. We can suggest that during BZ treatment, by lysing the parasite, greater exposure of antigens induces greater inflammation by producing TNF and IL-6 controlling parasitism, which proves the synergy between etiological treatment and host immune response (ROMAGNA et al., 2002). These data corroborate Moretti et al., (2002) when measuring TNF and IL-6 by ELISA in the serum of children in the acute phase after 30 days of treatment.

When studying experimental models of CD oral infection in the acute phase, Antunes et al. (2019) observed an increase in inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-6) together with an increase in post-infection parasitemia. These elevated cytokines are associated with controlling parasite multiplication and providing host resistance. Guedes et al., (2009) suggest the development of the chronic cardiac form to an intense Th1 response during the acute phase, correlating with the increase of cytokines IFN- γ and TNF- α and low production of IL-10.

Another cytokine also evaluated was IL-2, which is a molecule that participates in the proliferation and differentiation of T cells, sustains clonal expansion as it is a survival factor and allows the polarization of CD8 T cells towards effector cells, participating in the process of activation of NK cells and the development of their lytic activity (LIAO et al., 2013; MURPHY, 2014). Depending on the amount of cytokine available in the microenvironment, IL-2 is also involved in the regulatory pathway, increasing the proliferation of regulatory Foxp3+ T cells and helping the FAS/FAS-L immunoregulatory pathway (Liao et al., 2013; Kosmaczewska, 2014). Therefore, low amounts of IL-2 may favor the immunoregulatory pathway, while its elevation directs effector immune responses (Kosmaczewska, 2014). In our study, the increase in IL-2 before treatment is related to the effectiveness of the immune response activated by *T. cruzi* and that levels decline after treatment with BZ, assuming its immunoregulatory role in CD.

In association with the inflammatory response in the pathogenesis of CD, the Th17 profile produces the pro-inflammatory cytokine IL-17 secreted by activated T cells, a significant reduction being observed in our study after treatment with BZ. Our findings are in line with Velásquez et al., (2019) who found a significant decline in IL-17A 12 months after treatment with BZ in chronic carriers, and with the study by Gatto et al., (2017) who observed the decreased expression of IL-17 in cardiac tissue and spleen of mice infected and treated in the acute phase.

Regulatory cytokines such as IL-4 and IL-10 play a key role in balancing the Th1 response, biasing the immune response towards a Th2 profile. We verified a significant reduction in IL-10 after treatment with BZ, in agreement with the findings of Velásquez et al., (2019), in which there is a decrease in plasma levels of IL-10 in samples from Bolivian children aged 4-15 years treated in the chronic phase after 12

months of treatment. In addition, the authors present a decrease in TGF- β and FoxP3, important molecules associated with Treg cells, one of the main host immunoregulation mechanisms

As for the production of IL-4, we verified higher levels of this cytokine 6 months after treatment with BZ and a decrease after 2 years of treatment. In experimental models of chronic CD, IL-4 is a necessary cytokine to reduce tissue parasitism and modulate inflammation induced by *T.cruzi* (SOARES et al., 2001). Thus, we believe that the increase in IL-4 is a consequence of the increase in TNF and IL-6.

The generation of cellular and humoral immune responses to infection with *T. cruzi* is largely determined by cytokines that are produced in the microenvironment of infection. The onset of adaptive immunity is followed by the activation of B lymphocytes, with high production of IgM, which is a serological parameter in the diagnosis of these acute patients. In the initial phase, IgG is also detected. With regard to IgM and IgG antibodies, the findings were consistent with the literature, since IgM levels decreased soon after the start of treatment and IgG later (ANDRADE et al., 2014).

Díaz-Bello et al., (2021) verified the reduction of IgM and IgG antibodies after 10 years of etiological treatment, in 106 patients in the acute phase of Chagas disease. The decrease in anti-*T. cruzi* after treatment with BZ is associated with a possible elimination or reduction of the parasite load (VIOTTI et al., 2011). Llaguno et al., (2021) also confirm the reduction of IgG immunoglobulin 48 months after treatment with BZ in patients in the chronic phase, which could be related to a brief seroconversion. In the present study, seroconversion was observed in only one patient through ELISA serology, however, the same patient showed an initial decline

from 1/320 (T1) to 1/80 (T4), having low positive titers of IgG antibodies by IFI, being necessary future analyzes to observe the serological conversion in the group.

CONCLUSION

Our results indicate that BZ reduces the inflammatory response in patients treated in the acute phase, as Th1 (IFN- γ , TNF, IL-2 and IL-6) and Th17 (IL-17) cytokines decrease with treatment intervention during the follow-up time. Cytokines of the Th2 profile (IL-4 and IL-10) also decrease with treatment and we believe that the increase in IL-4 in 6 months after treatment is a consequence of the increase in TNF and IL-6. IgM and IgG antibody titers decline after treatment with BZ, and seroconversion was observed through ELISA serology of a patient, two years after treatment, suggesting that these patients were cured. We believe that Benznidazole in ACD reduces the inflammatory response triggered by *T. cruzi*, and this could prevent/reduce the tissue damage characteristic of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Nós agradecemos aos pacientes que participaram do estudo, bem como o apoio de toda a equipe do Ambulatório de Doença de Chagas (Casa de Chagas) Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco e Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest

REFERENCE

- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2014.
- ANTUNES, Dina et al. Oral Route Driven Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Unravels an IL-6 Dependent Hemostatic Derangement. **Frontiers in Immunology**, v. 10, Article 1073, p. 1-10, May 2019.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. São Paulo, v. 31, p. 127-131, 1998.
- BAHIA-OLIVEIRA, Lilian MG et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14–30 years ago. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 2, p. 634-638, 2000.
- BARBOSA, Maria das Graças Vale et al. Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 27-33, 2015.
- BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **The journal of the American Medical Association**, United States, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.
- BERMEJO, Daniela A. et al. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 5, p. e679, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso brasileiro em doença de chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. Doença de Chagas Aguda. Aspectos epidemiológico, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais de saúde. **RevPatolTrop**, v. 36, n. 3, p. 1-32, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. Brasília, DF: Ministério da Saúde. v. 50, n. 02, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2º Boletim Epidemiológico da Doença de Chagas. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/14/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf>. Acesso em: 25 de Setembro de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Brasília, DF. v. 50, p. 16-18, 2019.

BONITA R, Beaglehole R, KJELLSTROM T. Epidemiologia Básica. 2ª ed. São Paulo: Grupo Editorial Nacional; 2010.

CAI, Catherine W. et al. Th17 cells provide mucosal protection against gastric *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, p. IAI. 00738-20, 2021.

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. Relatório de Recomendação. 2018. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf>. Acesso em 28 de Outubro de 2021.

CAMARA, Edmundo JN et al. Elevated IL-17 levels and echocardiographic signs of preserved myocardial function in benznidazole-treated individuals with chronic Chagas' disease. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 123-130, 2019.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogensanddisease**, v. 73, n. 9, p. ftv082, 2015.

COSTA-OLIVEIRA, Cíntia Nascimento da. Aplicação do diagnóstico molecular para caracterização dos pacientes envolvidos no surto de doença de Chagas em Pernambuco. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

COURA, José Rodrigues; CASTRO, Solange L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 3- 24, jan. 2002.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, Suppl. I, p. 113-122, nov. 2007.

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, José Rodrigues; JUNQUEIRA, Angela CV. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 145-154, 2012.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. 187–192, 2001.

CUNHA-NETO E; et al. New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 59-62, 2006.

DE FÁTIMA OLIVEIRA, Maria et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

DE MEIS, Juliana; CASTRO, R. Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base do Estado do Pará. **Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICICT/FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2017.

DE NOYA, Belkisyolé Alarcón; GONZÁLEZ, Oscar Noya; ROBERTSON, Lucy J. *Trypanosoma cruzi* as a Foodborne Pathogen. 2015.

DE OLIVEIRA, Silmara Ferreira et al. Epidemiologia da Doença de Chagas Aguda no Nordeste Brasileiro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. 1-9, 2021.

DE VILHENA, Andreza Ozela et al. Doença de Chagas aguda no estado do Pará, Brasil: série histórica de aspectos clínicos e epidemiológico em três municípios, no período de 2007 a 2015. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, p. 11-11, 2020.

DIAS, J. C. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.

DUTRA WO, GOLLOB KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 21, n. 3, p. 287-292, jun. 2008.

GARG, N. J. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421–447, 2018.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, São Paulo, v. 8, p. 188-197, 2012.

GUEDES, P. M. D. M. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, 2010.

GUEDES, P. M. M. et al. Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite immunology**, v. 31, n. 11, p. 673-685, 2009.

JUNQUEIRA, Caroline; et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, set. 2010.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infect Disease**, USA, v. 13, p. 342-348, 2013.

MAGALHÃES, Luisa MD et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 4, p. 661-665, 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319-24, jul. 2009.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103, 2016.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlandio et al. The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016: a subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006559, 2018.

MAYA J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Psychology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Nova Iorque, v. 146, p. 601-620, 2007.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/World Health Organization et al. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>. Acesso em: 17 Agosto de 2013.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/World Health Organization. Chagas Disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Trypanosoma cruzi* infection, transmission and disease. Weekly epidemiological record. v. 90, n. 06, 2015.

RASSI, A. Jr; RASSI, A; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet*, London, v. 375, p. 1388-1402, apr. 2010.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of anti-infective therapy**, Londres, v. 5, p. 727-743, 2007.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. **Scandinavian journal of immunology**, v. 64, n. 5, p. 554-63, nov. 2006.

SATHLER-AVELAR, Renato et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 246-251, 2009.

SES, 2021. Secretaria de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de doença de Chagas Anual**. Recife, n. 01, p. 1-6, jul. 2015.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 539-45, 1991.

SILVA, J. S. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169 - 174, 1994.

SILVEIRA CAN, Castillo E, Castro C. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. **RevSocBras Med Trop**33, p. 191-196, 2000.

SIMÕES, Marcus Vinicius et al. Cardiomiopatia da doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.

PACHECO, Luciano Vasconcellos et al. Transmissão oral da doença de Chagas: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p.1-11, 2021.

PAHO - Pan American Health Organization. **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease**. Washington, D.C, 2019.

PAHO - Pan American Health Organization, 2020. Chagas disease. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis), 2018. 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: 04 de Julho de 2021.

TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. The possible mechanism of action of IgG antibodies and platelets protecting against *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 24, n. 8, p. 759-765, 1991.

VOS, Theo et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, 2020.

XAVIER, S. C. C. et al. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, 2014

APÊNDICE B — Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Portador da doença de Chagas

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES DE EVOLUÇÃO CLÍNICA E DE TRATAMENTO ETIOLÓGICO NA DOENÇA DE CHAGAS**, sob a responsabilidade da pesquisadora Virginia Lorena do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Essa pesquisa pretende investigar biomarcadores de progressão da Doença de Chagas em portadores da fase crônica e evolução clínica do tratamento.

Sua participação é muito importante, pois, como portador da doença de Chagas, o (a) Sr (a) possui o parasita que causa essa doença. É com seu sangue e de outros portadores da doença que conseguiremos identificar uma ou mais substâncias que o seu corpo produz em resposta ao parasita, compreendendo os mecanismos da sua imunidade e possibilitando, assim, um direcionamento terapêutico. Desta forma como benefício há a possibilidade de tratamento mais precoce evitando que ocorra o agravamento da doença e principalmente saber se este tratamento está sendo eficaz. Sua participação é totalmente voluntária e se dará através de um formulário de pesquisa, onde algumas perguntas sobre seus hábitos de vida e aspectos clínicos serão analisados, que pode lhe causar constrangimento pelo conteúdo abordado, entretanto realizaremos em um local acolhedor apenas você e o pesquisador de forma discreta e sigilosa. Caso o (a) Sr (a) não se sinta a vontade para responder uma ou mais perguntas não haverá nenhum problema e isso não prejudicará seu atendimento no ambulatório. Além disso, iremos coletar até 4 tubos de sangue (30 mL) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento traz poucos riscos, mas pode causar dor no local da coleta ou mancha vermelha (hematoma), caso aconteçam, poderão ser realizadas compressas frias no local. Esse sangue será utilizado para: obtenção de soro (parte líquida) para confirmação da infecção e os resultados dos seus exames clínicos como raio-X (tórax e esôfago), eletrocardiograma e ecocardiograma, entre outros, serão consultados através do seu prontuário médico e avaliados pelos pesquisadores e seu médico.

A amostra de sangue será armazenada a -20°C para utilizações em pesquisas futuras, com o objetivo de realizar novos estudos que complementem os objetivos propostos nessa nossa pesquisa, que busca a investigação de biomarcadores de progressão clínica da doença de Chagas crônica e avaliação após o tratamento. Desta forma, se no futuro, sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato para preenchimento de outro TCLE. Informações sobre o andamento e resultados das pesquisas podem ser fornecidas para o (a) Sr (a) quando desejar, através das formas de contato conosco, disponibilizadas ao final deste documento.

Rubrica do participante: _____

Rubrica do pesquisador responsável: _____

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o (a) Sr (a) aceitar participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre o diagnóstico da doença de Chagas. Caso o (a) Sr (a) não aceite participar da pesquisa o seu atendimento no ambulatório continuará acontecendo normalmente. Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. No entanto, caso tenha qualquer necessidade de despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento pelo grupo de pesquisa. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da sua participação no estudo, será devidamente indenizado judicialmente.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada em hipótese alguma, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato conosco através do endereço: Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2563 com a pesquisadora Dra Virginia Lorena, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/IAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado (a) sobre o que o pesquisador quer fazer e o porquê precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair do projeto quando quiser.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/____

Assinatura do participante ou Impressão do dedo polegar



Virginia Maria Barros de Lorena

Pesquisadora Responsável - IAM/Fiocruz

Telefone: (81) 2101-2563

E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br



ANEXO A — Registro no comitê de ética caae**DECLARAÇÃO**

O CEP-IAM/Fiocruz, declara para os devidos fins, que o projeto abaixo discriminado, atende às exigências legais e demais solicitações demandadas por este Comitê de Ética, para que possa dar início a pesquisa, a partir de 05 de fevereiro de 2020.

Título da Pesquisa: Prospecção de biomarcadores de evolução clínica e de tratamento etiológico na doença de Chagas

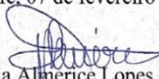
Pesquisador Responsável: Virginia Maria Barros de Lorena

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

CAAE: 20049919.5.0000.5190

Número do Parecer: 3.822.710

Recife, 07 de fevereiro de 2020


Maria Almerice Lopes da Silva
Coordenação CEP/IAM

Maria Almerice Lopes da Silva
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Mat. Signo 1362520
IAM / FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

