

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

ISABELA MACHADO SERRANO

Salvador – Bahia

2022

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

ISABELA MACHADO SERRANO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves
Santos

**Salvador – Bahia
2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

S487c Serrano, Isabela Machado

Caracterização do perfil de imunoglobulinas de indivíduos infectados pelo trypanosoma cruzi/ Isabela Machado Serrano. _ Salvador, 2022.

60 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Anticorpos. 2. Isotipos. 3. Imunidade humoral. 4. Doença de chagas cardíaca crônica. I. Título.

CDU 616.937

“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO
Trypanosoma cruzi”.

ISABELA MACHADO SERRANO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 01 de junho de 2022.

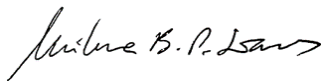
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Roque Aras Júnior
Professor
UFBA



Dr. Claudilson José de Carvalho Bastos
Professor
UNEB



Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq) – Código de Financiamento 001”

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, minha eterna gratidão, por sempre acreditar em mim e me permitir fazer o que amo.

Ao meu pai, que me ensinou a levar a vida da melhor forma que posso, e que sei que está sempre comigo e orgulhoso de minha trajetória.

Agradeço também a toda a minha família e meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivaram, apoiaram minhas decisões e nunca mediram esforços para que eu buscasse meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pela oportunidade de aprendizado, pelo exemplo de profissionalismo, ética, benevolência e humanidade, e por ter me aceitado em sua brilhante equipe.

Aos colegas do grupo de pesquisa em doença de Chagas, pela parceria, cumplicidade e apoio: Gilmar Ribeiro Jr., Fernanda Lanza, Ianei Carneiro, Jorgana Soares, Márcio Almeida, Renato Reis e Ronnei Santos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos, por todo ensinamento e por tudo que me permitiu executar esse trabalho, além da paciência, humildade e integridade.

Agradeço também a sua equipe, que me ajudou nos experimentos: Emily Santos, Leonardo Leony, Natália Freitas e Ângelo Silva.

Agradeço a todos os colegas do LPBM, em especial a Jaqueline Cruz e Patrícia Moreira, que sempre se propuseram a me ajudar de infinitas formas.

À PGBSMI e à Cleiton Carneiro, pelo apoio e todo auxílio durante esse período.

À FAPESB, por me acompanhar nas pesquisas desde a iniciação científica.

A todos esses acima: meu muito obrigada por não desistirem da ciência e por acreditarem na pesquisa, mesmo num momento tão difícil no nosso país. Esse trabalho teve início e fim na pandemia, então, por fim, o dedico a todas as vítimas da COVID-19 e da doença de Chagas.

SERRANO, Isabela Machado. **Caracterização do perfil de imunoglobulinas de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi***. 2022. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e sua manifestação clínica varia de assintomática até o comprometimento cardíaco grave, que depende, dentre outros fatores, da resposta imune do hospedeiro durante o curso da infecção. Os isotipos de imunoglobulinas possuem características distintas de estrutura, função e grau de participação na patogenia da doença, e o estudo acerca destes componentes pode elucidar os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na DC. **OBJETIVO:** correlacionar o perfil de imunoglobulinas de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* com as formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas. **MATERIAL E MÉTODOS:** as amostras séricas foram oriundas de Instituições parceiras, localizadas em diferentes estados do Brasil (Pernambuco, Bahia e Goiás) no período de 1978 a 2020. Os indivíduos diagnosticados com DC crônica foram classificados quanto à forma clínica da doença. Para identificação do perfil de imunoglobulinas (IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), foi realizado o método ELISA indireto utilizando o antígeno recombinante quimérico IBMP-8.4 como agente de captura. Para correlação do quantitativo de anticorpos com as fases clínicas, foram utilizados os testes estatísticos Spearman e Fisher, paralelamente. **RESULTADOS:** Foram obtidas 97 amostras de soro, classificadas após sorologia para *T. cruzi* e análise clínica como: negativas (NEG, n = 38); forma indeterminada (IND, n = 24); forma cardíaca leve (CL, n = 20) e forma cardíaca grave (CG, n = 15). Os isotipos de IgG foram encontradas em quase todas as amostras e o isotipo IgG1 apresentou maiores índices de reatividade em relação aos outros isotipos, com diferença significativa entre os grupos CL e IND. O isotipo IgG3 apresentou-se mais elevada nos indivíduos CL, quando comparados aos do grupo CG. **CONCLUSÕES:** os isotipos IgG1 e IgG3 são biomarcadores que podem ser utilizados na avaliação da progressão da DC, ao demonstrarem diferenças entre os grupos clínicos. Sugere-se estudos de acompanhamento dos casos, com avaliação da associação da cinética dos anticorpos com a evolução de lesões teciduais.

Palavras-chave: Anticorpos. Isotipos. Imunidade humoral. Doença de chagas cardíaca crônica.

SERRANO, Isabela Machado. **Characterization of the immunoglobulin profile of individuals infected by *Trypanosoma cruzi***. 2022. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chagas disease (CD) is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and its clinical expression varies from asymptomatic to severe cardiac involvement, depending in part on the host immune response during the course of infection. Immunoglobulin isotypes have different properties in terms of structure, function, and degree of involvement in disease pathogenesis, and the study of these components may elucidate the immunopathogenic mechanisms involved in CD. **AIM:** To correlate the immunoglobulin profile of individuals infected with *T. cruzi* with the clinical forms of the chronic phase of Chagas disease. **MATERIAL AND METHODS:** Serum samples were collected from partner institutions in different states of Brazil (Pernambuco, Bahia, and Goiás) from 1978 to 2020. Individuals diagnosed with chronic CD were classified according to the clinical form of the disease. The indirect ELISA method was performed to determine the immunoglobulin profile (total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) using the recombinant chimeric antigen IBMP-8.4 as antigen. To correlate the title of the antibodies with the clinical phases, Spearman and Fisher statistical tests were used in parallel. **RESULTS:** Ninety-seven serum samples were obtained, classified by serology for *T. cruzi* and clinical analysis as follows: negative (NEG, n = 38); indeterminate form (IND, n = 24); mild cardiac form (CL, n = 20); and severe cardiac form (CG, n = 15). IgG isotypes were found in almost all samples, and the IgG1 isotype had higher levels compared with the other isotypes, with a significant difference between the CL and IND groups. IgG3 was higher in the individuals from CL than in the group CG. **CONCLUSIONS:** IgG1 and IgG3 isotypes could be used as biomarkers to assess the progression of CD as they reveal differences between clinical groups. Follow-up studies are proposed to investigate the relationship between antibody kinetics and the development of tissue damage.

Key words: Antibody. Isotypes Humoral immunity. Chronic Chagas heart disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático das formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2	Mecanismos patogênicos da cardiomiopatia chagásica.....	19
Figura 3	Patogênese e mecanismos inflamatórios na doença de Chagas cardíaca.....	20
Quadro 1	Composição dos antígenos recombinantes IBMP.....	23
Figura 4	Mecanismos de resposta das células T CD8 ⁺	26
Figura 5	Mecanismos de resposta de linfócitos T CD4 ⁺	27
Figura 6	Modulação da resposta imune pelos linfócitos Treg.....	28
Figura 7	Mecanismos de resposta imune pelas células B.....	29
Figura 8	Principais mecanismos de evasão do <i>Trypanosoma cruzi</i> à resposta imune do hospedeiro.....	30
Figura 9	Diferença de estruturas de classes de anticorpos.....	31
Quadro 2	Valores de sinal-ruído (SNR) estabelecidos para padronização do título de anticorpo secundário marcado com peroxidase para determinação dos isotipos de IgG.....	41
Figura 10	Análise gráfica dos valores médios das densidades óticas dos controles positivos e negativos em diferentes diluições dos conjugados para cada isotipo de IgG.....	41
Figura 11	Índice de reatividade de IgG total por forma clínica e controles, utilizando a molécula IBMP-8.4.....	42
Figura 12	Índice de reatividade dos isotipos de IgG anti- <i>T. cruzi</i> IBMP-8.4 por forma clinica e controles	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas dos indivíduos, por classificação clínica da doença de Chagas crônica	40
Tabela 2	Média geométrica e comparação entre os índices de reatividade de IgG total por grupo clínico	42
Tabela 3	Média dos índices de reatividade dos isotipos de IgG nos diferentes grupos clínicos, comparados aos controles	43
Tabela 4	Diferença entre os índices de reatividade entre as formas clínicas por isotipo de IgG	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
ADCP	Fagocitose dependente de anticorpo
BA	Bahia
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
CRA	<i>Cytoplasmatic Repetitive Antigen</i>
CL	Cardiopatía leve
CG	Cardiopatía grave
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade ótica
DP	Desvio-padrão
ECG	Eletrocardiografia
ECO	Ecocardiografia
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRA	<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>
GO	Goiás
HAI	Hemaglutinação indireta
HEMOBA	Centro de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGM	Instituto Gonçalo Moniz

IL	Interleucina
IFN	Interferon
IND	Forma indeterminada
IR	Índice de reatividade
NEG	Negativos
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salina
PBST-T	Tampão fosfato-Tween 20 (<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Pernambuco
RJ	Rio de Janeiro
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SNC	Sistema nervoso central
SNR	Relação sinal-ruído
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i> (<i>Toll-like receptors</i>)
Th	Linfócito T-auxiliar (<i>T-helper</i>)
TMB	Tetra-metil-benzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócitos T regulatórios
UFG	Universidade Federal de Goiás
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 ASPECTOS GERAIS	15
2.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
2.3 PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS DA DC	17
2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	21
2.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DO <i>T. cruzi</i>	22
2.6 MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE AO <i>T. cruzi</i>	24
2.7 RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO <i>T. cruzi</i>	30
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 TIPO DE ESTUDO	36
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	36
4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI- <i>T. cruzi</i>	37
4.4 ELISA INDIRETO COM A PROTEÍNA IBMP-8.4	37
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	39
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) e denota relevância para a saúde pública, principalmente pela alta prevalência em regiões de elevados índices de pobreza. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas vivam em áreas de exposição e correm o risco de contrair a infecção (WHO, 2017). O *T. cruzi* é transmitido a hospedeiros vertebrados (animais e humanos) pelas fezes contaminadas de insetos triatomíneos, por transmissão congênita, ingestão de alimentos e bebidas contaminadas, transfusões de sangue, doação de órgãos e, menos frequentemente, acidentes laboratoriais (WHO, 2019).

As manifestações clínicas da DC variam de quadros assintomáticos até o comprometimento cardíaco grave, que depende, dentre outros fatores, da resposta imune do hospedeiro durante a infecção e da expressão diferencial de proteínas por cepas distintas do *T. cruzi* (MARTINEZ; ROMANO; ENGMAN, 2020). A fase aguda persiste em média por dois meses e normalmente apresenta elevada parasitemia. Na maioria dos casos, os sintomas são subclínicos, porém, quando presentes, tendem a ser inespecíficos (com exceção do chagoma de inoculação e do sinal de Romana), e geralmente desaparecem por conta própria dentro de algumas semanas ou meses (NUNES *et al.*, 2018).

Após a fase aguda, os indivíduos evoluem para a fase crônica, que pode ser assintomática (chamada de forma indeterminada) e permanecer nela pelo resto da vida. Entretanto, 30-40% destes indivíduos desenvolvem manifestações clínicas, sendo a cardiomiopatia (forma cardíaca), o megaesôfago e o megacólon (formas digestivas) as mais comumente descritas (BONNEY *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2019).

A resposta imune na DC dispõe de mecanismos que envolvem a imunidade inata e adaptativa (humoral e celular) do hospedeiro (VILLALOBOS *et al.*, 2020). O *T. cruzi*, assim como outros protozoários, possui mecanismos de modulação e evasão desta resposta, em prol de sua sobrevivência (NISHIKAWA *et al.*, 2001; PINCETIC *et al.*, 2014). Diante de tais mecanismos, o patógeno estimula a produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, que podem contribuir para a resistência do hospedeiro contra a infecção ou causar danos teciduais decorrentes de reações inflamatórias exacerbadas (PÉREZ-ANTÓN *et al.*, 2019).

A escolha do método para diagnóstico laboratorial da DC depende do estágio da doença. A fase aguda pode ser diagnosticada mediante exames parasitológicos diretos, biologia molecular, xenodiagnóstico ou hemoculturas (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Na fase crônica, os métodos de escolha são os sorológicos, sendo o ensaio imunoenzimático

(*enzyme linked-immunosorbent assay* – ELISA) indireto o mais utilizado. No entanto, seu desempenho é desafiador e depende do tipo e qualidade dos antígenos utilizados. Uma forma para ultrapassar esta limitação é utilizando antígenos recombinantes quiméricos, compostos por sequências peptídicas antigênicas, imunodominantes, conservadas e repetitivas de múltiplas proteínas do parasito (SANTOS *et al.*, 2016).

A divergência entre os resultados do perfil de imunoglobulinas nas diferentes formas clínicas pode ser explicada por fatores como o tipo de cepa, a localização geográfica, os diferentes métodos empregados, a preparação dos antígenos e o perfil genético das populações estudadas (WANG *et al.*, 2021). A utilização de proteínas quiméricas do *T. cruzi* como agentes de captura de anticorpos anti-*T. cruzi* tem sido cada vez mais comprovada com alta acurácia na detecção da DC crônica (SANTOS *et al.*, 2018), entretanto, ainda não há estudos sobre quais isotipos de IgG estão envolvidos na presença deste tipo de antígeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os isotipos de imunoglobulinas presentes nas diferentes formas clínicas da DC crônica, a fim de possivelmente identificar marcadores imunológicos para progressão da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

A doença de Chagas (DC) foi descoberta e relatada no ano de 1909, quando Carlos Chagas encontrou, em Minas Gerais, protozoários flagelados no intestino de triatomíneos. Ao suspeitar de uma possível zoonose, inoculou os protozoários em primatas, que desenvolveram parasitemia e síndrome febril (CHAGAS, 1909). O primeiro caso humano da DC descrito por Carlos Chagas foi em uma criança de 2 anos de idade, em 1909, permitindo que o pesquisador diagnosticasse e estudasse clinicamente a doença. A partir destes estudos, foi possível identificar a etiologia, o ciclo parasitário, insetos vetores, reservatórios domésticos e silvestres, bem como a doença e o seu diagnóstico, estabelecendo os aspectos básicos de sua patologia e epidemiologia (PÉREZ-MOLINA, MOLINA, 2018).

A DC é considerada endêmica em 21 países da América Latina, com incidência anual de 30 mil casos novos e ocasiona, em média, 7.500 mortes/ano e 8.000 recém-nascidos infectados durante a gestação. Aproximadamente, 5,7 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo *T. cruzi* e estima-se cerca de 70 milhões de pessoas em risco de infecção (WHO, 2017).

Em humanos, o *T. cruzi* pode ser transmitido por vetores, alimentos contaminados, transfusão de sangue, transplante de órgãos e por transmissão vertical. Na transmissão vetorial, as formas metacíclicas do parasito penetram mucosas, conjuntivas ou pele através da solução de continuidade formada durante o repasto sanguíneo. O prurido motivado pela resposta alérgica à saliva do triatomíneo causa feridas ou escoriações, que são pontos favoráveis à infecção (RANGEL-GAMBOA *et al.*, 2019).

Os vetores da DC são insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, com 153 espécies reconhecidas, e popularmente conhecidos no Brasil como barbeiro, bicudo, chupão, cascudo, bicho-de-frade e bicho-de-parede (OLIVEIRA; ALEVI, 2017). Dentre os gêneros epidemiologicamente relevantes para a DC, destacam-se *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (SANTOS *et al.*, 2022b). Estes habitam o intra e peridomicílio, além de ambiente silvestre, onde encontram animais e humanos como fontes de alimento, os quais estão suscetíveis à transmissão vetorial do *T. cruzi* (NOIREAU *et al.*, 2009).

A transmissão oral pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados com fezes dos triatomíneos infectados ou pelo inseto triturado no processo de preparo de alimentos e sucos (COURA, 2015). Epidemiologicamente, esta é a principal via de transmissão do *T. cruzi*

no Brasil na atualidade, em especial na região norte do país, o que denota necessidade de medidas higiênico-sanitárias nos programas de prevenção e controle da DC (SANTOS *et al.*, 2020). Além disso, ressalta-se a participação de outros reservatórios no ciclo de transmissão oral da DC, a exemplo de um estudo realizado na Paraíba, que identificou um surto de DC por infecção alimentar de caldo de cana, possivelmente contaminado com fezes de gambás infectados (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991).

No Brasil, destacaram-se também as microepidemias em indivíduos que consumiram açaí contaminado com fezes de triatomíneos na região Amazônica (PINTO; VALENTE; VALENTE, 2004) e em estados do Sul do país (NERY-GUIMARÃES *et al.*, 1968). Vale salientar ainda um surto relatado no interior da Bahia, no ano de 2006, que inferiu o consumo de água e alimentos contaminados, como caldo de cana, como prováveis fontes de infecção (BASTOS *et al.*, 2010). Ademais, a partir do ano de 2007, a transmissão oral da DC teve repercussão internacional a partir do surto que envolveu 103 casos agudos da DC em Caracas, Venezuela (ALARCÓN DE NOYA *et al.* 2010).

A prevalência da transmissão por transfusão sanguínea e transplante de órgãos teve maior notoriedade a partir da década de 1950 (DIAS; BRENER, 1984) e foi considerada um problema de saúde pública em países indenes que recebem imigrantes provenientes de regiões endêmicas (COURA; DIAS, 2009). Além disso, a transmissão congênita também é notória, e estima-se que represente 22% dos novos casos (WHO, 2015) e pode apresentar altas taxas de morbi-mortalidade aos recém-nascidos (TORRICO *et al.*, 2004).

No Brasil, a profilaxia da DC consiste em ações de controle vetorial e da vigilância na triagem de candidatos à doação de sangue, tecidos e órgãos (DIAS *et al.*, 2016). Além disso, medidas educacionais em saúde e o controle de alimentos, pela pasteurização do açaí proveniente da região Amazônica contribuem consideravelmente para a prevenção da DC (DIAS, 2006; PEREIRA *et al.*, 2010).

2.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2010). O parasito possui ciclo heterógeno e apresenta formas evolutivas com variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, que são resultado de adaptações a diversos habitats, como tipo de tecido e hospedeiro (BALOUZ *et al.*, 2021).

O *T. cruzi* pode infectar insetos triatomíneos, humanos e mamíferos selvagens e domésticos (RANGEL et al., 2019). Seus estágios evolutivos correspondem às formas tripomastigota metacíclica (estágio infectante do parasito), amastigota (estágio reprodutivo intracelular) e epimastigota (estágio reprodutivo nos vetores). Estas formas são morfológicamente distintas, principalmente pela presença de flagelo e pela localização do cinetoplasto, organela que contém aproximadamente 30% do DNA da célula e é capaz de auto-replicação (DE SOUZA, 1999). Na forma tripomastigota, o cinetoplasto localiza-se na região posterior e há presença de flagelo. A forma amastigota não possui flagelo visível e a epimastigota possui cinetoplasto na região anterior e flagelo presente (Figura 1) (TEIXEIRA et al., 2012).

Além das diferenças entre as formas evolutivas do *T. cruzi*, há aproximadamente 6.000 linhagens descritas, que se divergem por particularidades, a exemplo de origem geográfica, sintomas, virulência, expressão diferencial de antígenos e patogenicidade do parasito (DE PABLOS; OSUNA, 2012; BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016; WANG et al., 2021).

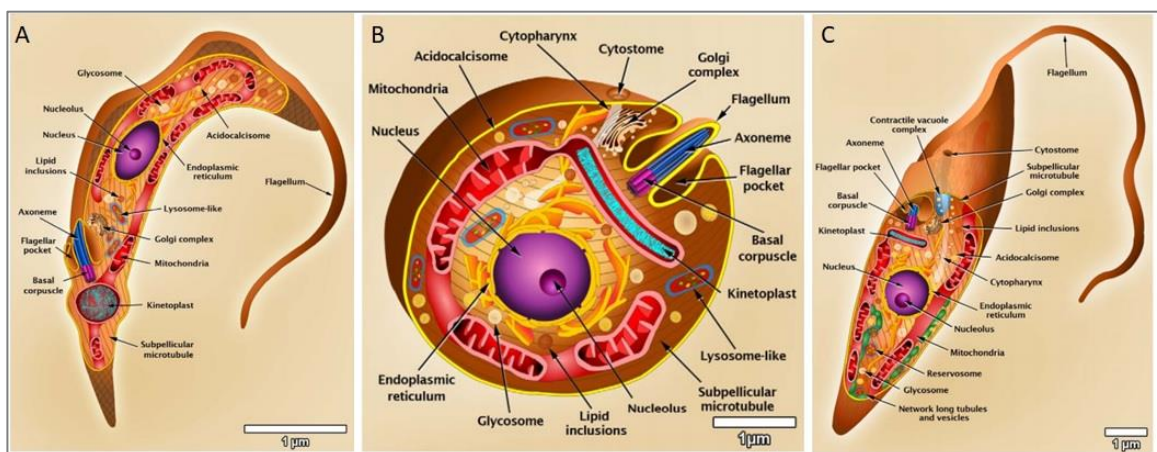


Figura 1 - Desenho esquemático das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: adaptado de Teixeira et al. (2012)

Nota: (A) tripomastigota, (B) amastigota, (C) epimastigota.

2.3 PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS DA DC

Os mecanismos patogênicos da DC variam de acordo com a cepa infectante, do estado imunitário do hospedeiro e de fatores socioambientais. Ao infectarem e se multiplicarem em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), os parasitos causam rompimento celular e, conseqüentemente, desencadeiam resposta inflamatória intensa, a qual é um fator determinante para o desenvolvimento de lesões teciduais (DO CARMO NETO et al., 2021).

Após repetidas invasões celulares, o *T. cruzi* pode migrar pela corrente sanguínea para diversos tecidos, onde infectam diferentes tipos celulares, inclusive as fibras nervosas e musculares lisas e estriadas, que ganham destaque pelas manifestações mais graves da doença, como cardiomiopatia, megaesôfago e megacólon (ANDRADE *et al.*, 2010). O seguimento da doença e o aparecimento dos sinais clínicos diferenciam-se entre as fases aguda e crônica, podendo esta última ser classificada nas formas cardíaca, digestiva, cardio-digestiva (mista), nervosa e indeterminada (COURA, 2007).

Na fase aguda, a DC pode ser assintomática ou apresentar poucos e inespecíficos sintomas, como febre, astenia, cefaleia, poliadenite e hepatoesplenomegalia, o que geralmente ocorre em áreas endêmicas (GONÇALVES *et al.*, 2010). Importantes sinais clínicos, característicos do período agudo e restritos à transmissão vetorial, são o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña. Este último ocorre em função da penetração do parasito ou pela inoculação da saliva do triatomíneo em região periocular, e desencadeia uma reação de hipersensibilidade com rápido surgimento de edema e conjuntivite. A cadeia inflamatória pode se propagar pela via linfática para linfonodos regionais e instalar quadro de adenite satélite generalizada (RANGEL-GAMBOA *et al.*, 2019). Apesar de raros, os casos agudos mais graves manifestam-se com miocardite, efusão pericárdica e meningoencefalite, com risco de mortalidade inferior a 1% (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Após a fase parasitêmica, a maioria dos indivíduos permanece como portadores assintomáticos da DC, enquanto outros desenvolvem lesões graves e progressivas, manifestadas imediatamente após a fase aguda, ou depois de longo período do início da infecção (BASTOS *et al.*, 2010). A forma indeterminada é assintomática e diagnosticada ocasionalmente pela presença de parasitos diretamente ou por exames sorológicos. Estes casos podem permanecer sem manifestação clínica, ou podem evoluir para uma sintomatologia crônica típica em 30-40% dos portadores (NUNES *et al.*, 2018).

Quando manifestada, a forma crônica apresenta sinais de hipersensibilidade tardia, com inflamações granulomatosas em diferentes órgãos, principalmente coração e trato gastrointestinal, com possíveis consequências como arterites, trombozes e necrose (RASSI; LITTLE, 2000; DE BONA *et al.*, 2018). Nesta fase, diversos autores enfatizam a desproporcionalidade entre o baixo parasitismo e a extensão das lesões teciduais, que pode ser explicada pela autoimunidade provocada por produtos antigênicos do parasito e da reação cruzada com componentes próprios do hospedeiro, que sofreram modificação pelos efeitos parasitários (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; OLIVERA *et al.*, 2021).

A patogênese da forma cardíaca da DC crônica é complexa e ainda requer elucidação dos mecanismos de lesão e evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro. Dentre os mecanismos apontados, estão: a lise celular provocada pelo parasito; a resposta imune específica estimulada pela persistência de antígenos parasitários; os danos na microvasculatura decorrentes da reação inflamatória; a citotoxicidade dependente de anticorpo; a autoimunidade por reação cruzada com antígenos próprios; e ainda os danos neuronais primários pela invasão do *T. cruzi* nas células do sistema nervoso (Figura 2) (BONNEY; ENGMAN, 2008; NIBORSKI *et al.*, 2021).

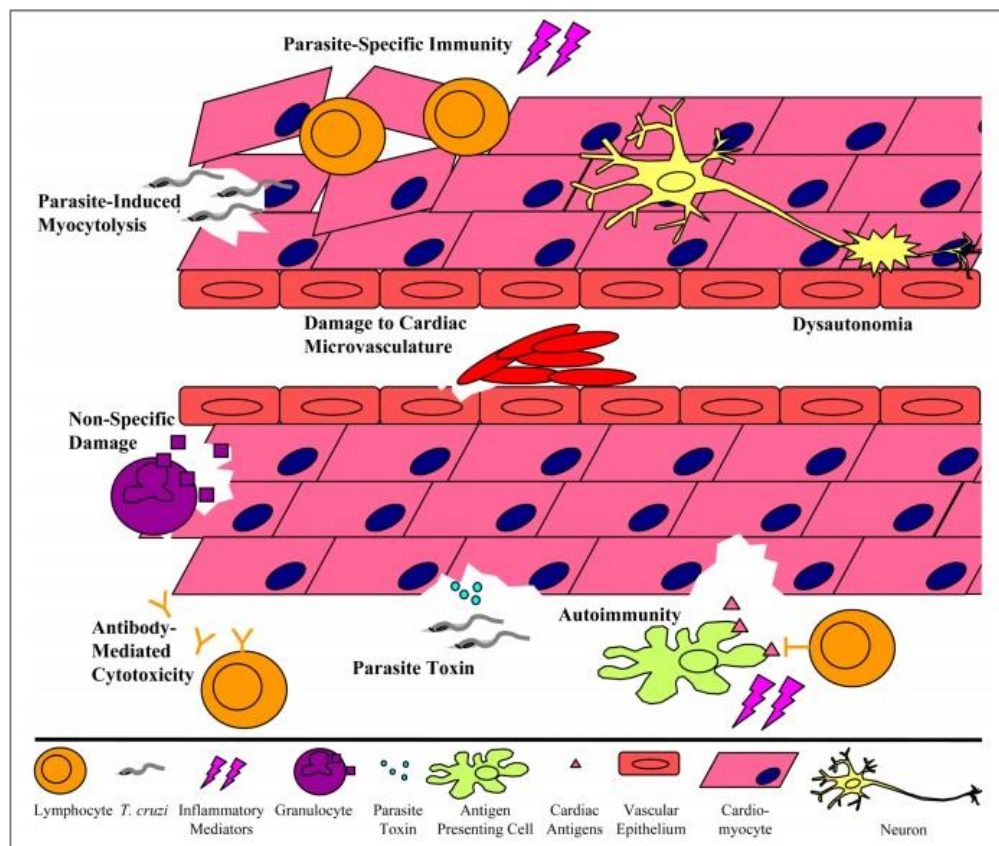


Figura 2 - Mecanismos patogênicos da cardiomiopatia chagásica
Fonte: BONNEY; ENGMAN, 2008

Ao parasitarem as fibras cardíacas, as formas amastigotas mantêm-se quiescentes por um longo período e somente causarão sinais de inflamação local caso diferenciem-se em tripomastigotas e rompam as células hospedeiras (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Uma vez estimulado, o infiltrado inflamatório pode causar lesões isquêmicas e degeneração das miofibrilas, que ativam mecanismos compensatórios, com aparecimento de dilatação cardíaca, hipertrofia da parede e taquicardia (Figura 3) (BOCCHI *et al.*, 2017).

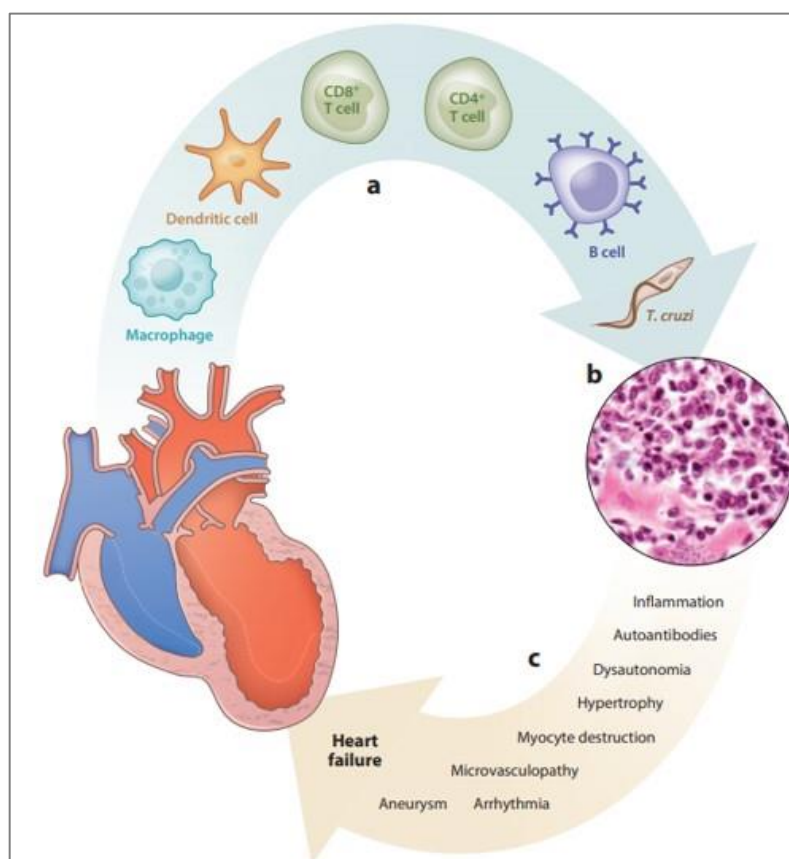


Figura 3 - Patogênese e mecanismos inflamatórios na doença de Chagas cardíaca

Fonte: BONNEY *et al.*, 2019

As alterações no aparelho digestório seguem a mesma patogenia das fibras cardíacas, com parasitos localizados na musculatura lisa e nas células nervosas (DO CARMO NETO *et al.*, 2021). As lesões podem ocorrer em qualquer região do trato, mas predominam os sinais clínicos do esôfago e cólon, com processos de miosite crônica e destruição de plexos nervosos de parede, alteração nos movimentos peristálticos, dilatação visceral e hipertrofia muscular compensatórias e atonia (PINTO *et al.*, 2019), que caracterizam as megalias, manifestadas em 10 a 20% dos casos da DC crônica (PRATA, 2001).

Ainda na fase crônica, as alterações observadas no sistema nervoso central (SNC) sugerem como causas o parasitismo com presença de amastigotas e inflamação ativa local, com pontos de necrose (DA MATA *et al.*, 2000), e os embolismos cerebrais decorrentes de alterações cardiovasculares nas encefalites (ARAS *et al.*, 2003). Além disso, estudos acerca da disfunção cognitiva da DC relacionaram maior gravidade desse déficit tanto à atrofia cerebral quanto aos processos inflamatórios desencadeados pela presença do parasito no SNC (DIAS *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2021).

Por fim, vale ressaltar que portadores assintomáticos da DC podem sofrer reativação da parasitemia, acompanhada de sinais clínicos agudos, em uma situação de imunossupressão (PITTELLA, 2009). Há relatos de indivíduos assintomáticos que, após utilizarem terapia imunossupressiva ou adquirirem comorbidades como toxoplasmose, leucemia e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), apresentaram quadros de encefalite ou miocardite grave, além de outros sinais típicos da DC, caracterizando a reagudização da doença (LAZO *et al.*, 1998; FERREIRA; BORGES, 2002; BRITO; PIRES; PACHECO, 2003; RINGER *et al.*, 2021).

2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Para o diagnóstico da DC, deve-se considerar aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, como a região de procedência do indivíduo e histórico de transfusão sanguínea e de comorbidades (PINAZO *et al.*, 2010). A depender da fase clínica e do tempo de aparecimento dos sintomas, a escolha do teste mais apropriado é fator crucial para o sucesso do diagnóstico laboratorial da DC (MARTINEZ; ROMANO; ENGMAN, 2020).

A fase aguda é marcada por elevada parasitemia, e o diagnóstico pode ser realizado por exames parasitológicos direto e indiretos (D'ÁVILA *et al.*, 2018). O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido promissor, entretanto, somente usado em centros de pesquisa e laboratórios de referência (DIAS *et al.*, 2016). Na fase crônica, os métodos de escolha são os sorológicos, que apresentam elevada sensibilidade e especificidade, visto que anticorpos da classe IgG podem ser detectados em elevadas titulações (FLORES-CHÁVEZ *et al.*, 2010).

Dentre os imunodiagnósticos mais utilizados, destaca-se o ensaio imunoenzimático (*enzyme linked-immunosorbent assay* – ELISA), por ser um método simples, de baixo custo e que pode ser automatizado para processar grande número de amostras (DIAS *et al.*, 2016). Outros imunoensaíes comumente utilizados para diagnóstico da fase crônica são os testes de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e a quimiluminescência (FLORES-CHÁVEZ *et al.*, 2010). Este último, apesar do alto custo, é um método promissor por apresentar maiores sensibilidade e especificidade, devido a sua elevada sensibilidade analítica (ABRAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2021).

Dada a ausência de um teste que seja considerado padrão-ouro, o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, a Organização Mundial da Saúde e a Organização Pan-Americana da Saúde recomendam que, pelo menos, dois dos testes sorológicos sejam realizados em paralelo,

a fim de fornecer um diagnóstico mais preciso (DIAS *et al.*, 2016; PAHO, 2019). Além dos exames laboratoriais, todos os casos suspeitos e confirmados, mesmo os assintomáticos, devem ser acompanhados clinicamente por exames complementares, para detecção de alterações viscerais (NUNES *et al.*, 2018). Os exames de imagem recomendados são endoscopia, manometria esofágica, ultrassonografia e enema opaco (PINAZO *et al.*, 2010). Os sinais cardíacos da DC podem ser detectados por eletrocardiografia, ultrassonografia cardíaca, ecocardiografia e radiografia torácica (PUNUKOLLU *et al.*, 2007; BORGES-PEREIRA *et al.*, 2020).

O tratamento da DC, mesmo após mais de 110 anos da primeira descrição da doença por Carlos Chagas, ainda é um desafio no âmbito de pacientes crônicos. Os dois medicamentos disponíveis para a fase aguda são o nifurtimox e o benzonidazol (DIAS *et al.*, 2016). Após diversas pesquisas desenvolvidas ao longo dos anos e aprimoramentos terapêuticos no Brasil, o benzonidazol ocupou o lugar do nifurtimox, que possui baixa eficácia e efeitos colaterais. Contudo, o nifurtimox ainda é utilizado como alternativa nos casos de indivíduos não responsivos ou que apresentem intolerância ao benzonidazol. Contudo, esses medicamentos não são eficazes na fase crônica, portanto, outros medicamentos e terapias são utilizadas no manejo sintomático de portadores da DC crônica cardíaca e/ou digestiva (CRESPILLO-ANDÚJAR *et al.*, 2018).

2.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DO *T. cruzi*

Há dois tipos de técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*: testes convencionais, que utilizam extratos brutos do parasito como antígeno, e testes não convencionais, baseados em antígenos quiméricos recombinantes (LONGHI *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2016). Os desafios acerca dos testes sorológicos envolvem, dentre outros fatores, o tipo e qualidade dos antígenos utilizados na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, com relatos frequentes de reação cruzada, levando a resultados falso-positivos e falso-negativos (FRASCH *et al.*, 1991). Com o objetivo de ultrapassar estas limitações, estudos utilizaram antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi*, denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (acrônimos para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná), compostos por sequências peptídicas antigênicas, imunodominantes, conservadas e repetitivas de múltiplas proteínas do parasito (Quadro 1).

Quadro 1 - Composição dos antígenos recombinantes IBMP

IBMP	Segmentos	Denominação
8.1	SAPA RPL19 Ag2/B13/CA-2	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S Proteínas de superfície de tripomastigota
8.2	Ag1/H49/JL7 SAPA Ag2/B13/CA-2	Proteínas associadas ao citoesqueleto Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase Proteínas de superfície de tripomastigota
8.3	Ag2/B13/CA-2 CRA/JL8/Ag30 TcD RPL19	Proteínas de superfície de tripomastigota Antígenos repetitivos citoplasmático Trans-sialidase Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S
8.4	SAPA RPL19 Ag2/B13/CA-2 FRA MAP KMP-11	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S Proteínas de superfície de tripomastigota Proteína de antígeno repetitivo flagelar Proteína associada ao microtúbulo Proteína da membrana do cinetoplasto

Fonte: adaptado de Santos *et al.* (2016)

O desempenho diagnóstico das quatro moléculas já foi extensivamente avaliado, tanto para a identificação da DC em humanos (SANTOS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; SANTOS *et al.*, 2018; DALTRO *et al.*, 2019; CORDEIRO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; CELEDON *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2022a) quanto em cães (LEONY *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022b) com resultados promissores.

Dentre os quatro antígenos, dois deles ofereceram os maiores valores de sensibilidade e especificidade (IBMP-8.1 e IBMP-8.4), os quais foram selecionados para a composição do Teste Rápido (TR) Chagas Bio-Manguinhos. Trata-se de um teste rápido para diagnóstico humano que está disponível para uso no SUS pelo Ministério da Saúde. De fato, tais estudos demonstraram que a molécula IBMP-8.4 ofereceu o mais alto desempenho entre os quatro antígenos quiméricos para fins de triagem e diagnóstico laboratorial da DC, enquanto o IBMP-8.1 demonstrou maior potencial como teste confirmatório da DC (SANTOS *et al.*, 2016). Em seguida, outros estudos validaram e avaliaram a performance das moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.4, em diferentes regiões endêmicas do Brasil e da América Latina (DEL-REI *et al.*, 2019) e em regiões indenes (DOPICO *et al.*, 2019), comprovando uma excelente acurácia diagnóstica desses antígenos. Devido aos resultados encontrados e maior repertório de epítomos

em sua composição proteica, a molécula IBMP-8.4 foi selecionada para a realização do presente estudo.

2.6 MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE AO *T. cruzi*

O *T. cruzi* é capaz de interagir com os diferentes componentes do sistema imune, de maneira que este pode ser um dos fatores determinantes na patogênese de indivíduos que desenvolvem doença grave ou permanecem assintomáticos (MARTINEZ; ROMANO; ENGMAN, 2020). A literatura descreve tanto a presença do parasito constantemente induzindo a inflamação crônica, quanto a possibilidade de reação cruzada de fragmentos de antígenos parasitários com moléculas do hospedeiro, que leva à autoimunidade (BONNEY; ENGMAN, 2008; DE BONA *et al.*, 2018; NIBORSKI *et al.*, 2021; OLIVERA *et al.*, 2021).

Após ultrapassar as barreiras físicas da pele e mucosas, o parasito induz uma resposta inflamatória pela imunidade inata e adaptativa humoral e celular do hospedeiro, dispondo de diversos mecanismos para evadir e modular a resposta imune em prol de sua sobrevivência (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). O sistema complemento é um dos principais componentes da resposta imune inata, exercendo papel na opsonização do patógeno, no recrutamento de fagócitos e ao provocar a lise parasitária por meio de uma cascata de eventos proteolíticos, a fim de cessar a infecção (CESTARI; RAMIREZ, 2010). O processo de ativação deste conjunto de proteínas plasmáticas pode ocorrer por três vias (clássica, alternativa e da lectina), as quais estão suscetíveis à interferência e modulação por moléculas expressas na superfície do parasito (LIDANI *et al.*, 2017).

Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas expressam em suas membranas receptores *Toll-like* (TLR), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). No reconhecimento do *T. cruzi*, destacam-se os receptores de glicoproteínas de membrana (TLR-2 e TLR-4) e dos componentes de material genético (TLR-7 e TLR-9), os quais permitem a detecção da infecção e posterior fagocitose do protozoário (CASTILLO *et al.*, 2017). Após internalização, o parasito fica contido no fagossomo e pode eventualmente ser morto e digerido, o que ocorre quando as formas epimastigotas são fagocitadas (ROMANO *et al.*, 2012). No entanto, as formas tripomastigotas conseguem evadir do fagolisossomo por mecanismos metabólicos antioxidantes, mediante produção de peroxidases, que oferecem proteção aos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

De todo modo, células do SFM produzem diversas citocinas para estabelecer uma resposta à invasão tecidual. Dentre as principais citocinas que participam da resposta ao *T. cruzi*, a interleucina 12 (IL-12) exerce um papel pleiotrópico e lidera o perfil celular pró-inflamatório (Th1) frente à infecção (HASEGAWA *et al.*, 2016). Outras citocinas pró-inflamatórias mais conhecidas são IL-2, interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são alvos dos fatores produzidos pelo parasito, que diminuem a sua produção e estimulam a produção de citocinas regulatórias, a exemplo da IL-10 (ERDMANN *et al.*, 2009).

As células *Natural Killer* (NK) são componentes celulares da imunidade inata que exercem papel citotóxico central contra os patógenos intracelulares (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). Um estudo realizado por Vitelli-Avelar *et al.* (2006) relatou maiores níveis de células NK em portadores assintomáticos da DC quando comparados aos sintomáticos na forma crônica cardíaca, e associou esta diferença ao papel protetor destas células.

A resposta imune adaptativa é ativada sob estímulo de citocinas secretadas por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, bem como pela apresentação de antígenos aos linfócitos, os quais sofrem expansão clonal formando células de memória (LAIDLAW; CRAFT; KAECH, 2016). A resposta adaptativa celular é caracterizada pela diferenciação de linfócitos T imaturos em linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺. Os linfócitos TCD8⁺ produzem granzimas, perforinas, óxido nítrico (NO), IFN- γ e TNF- α , com o intuito de eliminar a célula hospedeira infectada pelo parasito (KAECH; AHMED, 2001).

Em teoria, os efeitos citotóxicos das células TCD8⁺ poderiam ser competentes na prevenção de lesões progressivas provocadas pelo *T. cruzi*. Entretanto, muitos autores discutem as falhas da proteção pelo fato da infecção inicial passar despercebida pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) e, conseqüentemente, a resposta citotóxica ser tardia (SANMARCO *et al.*, 2016), sem contar com a exaustão progressiva destas células devido ao estímulo persistente de antígenos (Figura 4) (PÉREZ-ANTÓN *et al.*, 2019).

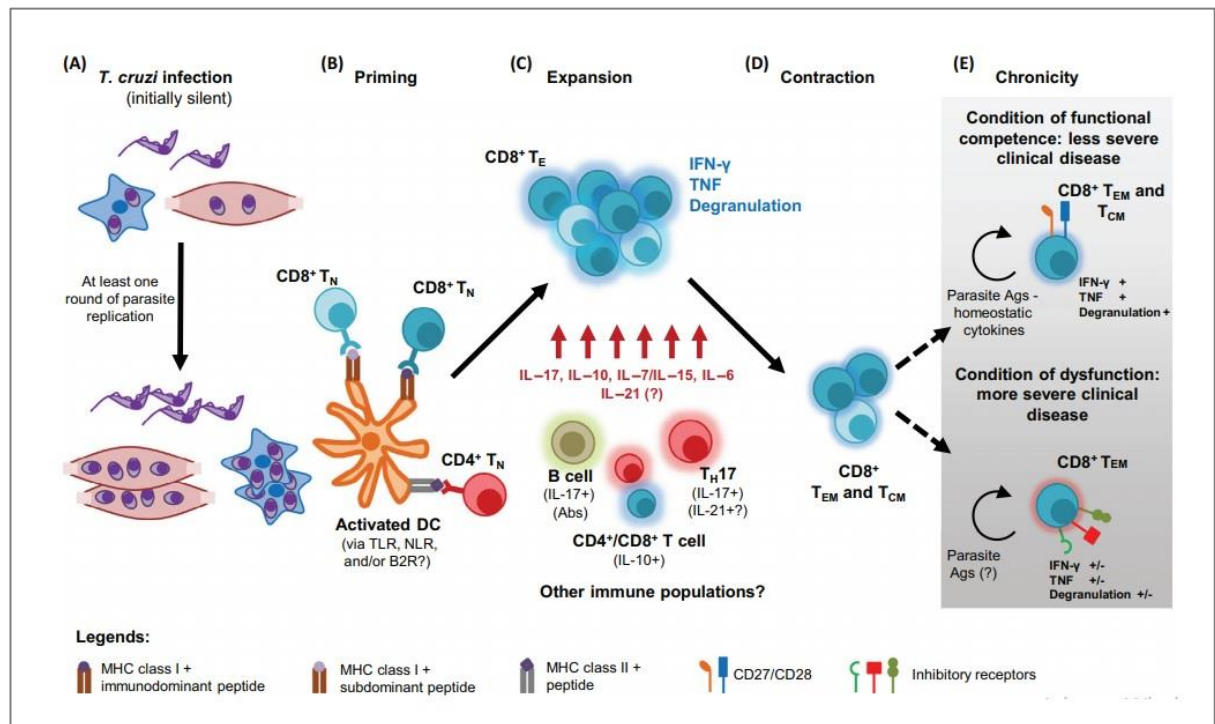


Figura 4 - Mecanismos de resposta das células T CD8⁺

Fonte: RODRÍGUEZ *et al.*, 2019

Os linfócitos TCD4⁺ são os mediadores da resposta imune adaptativa, direcionada pela secreção de citocinas e modulação de macrófagos, linfócitos B, linfócitos TCD8⁺ e outras células (Figura 5) (SALLUSTO, 2016). Visto que a resposta imune efetora contra o *T. cruzi* segue o perfil Th1, modelos murinos demonstraram que o parasito induz a produção de citocinas regulatórias IL-10 e IL-4 que, por sua vez, instalam uma resposta predominante de perfil Th2 e inibe a resposta Th1 efetora, levando à diminuição da secreção de IFN- γ e IL-2 (DÍAZ *et al.*, 2015).

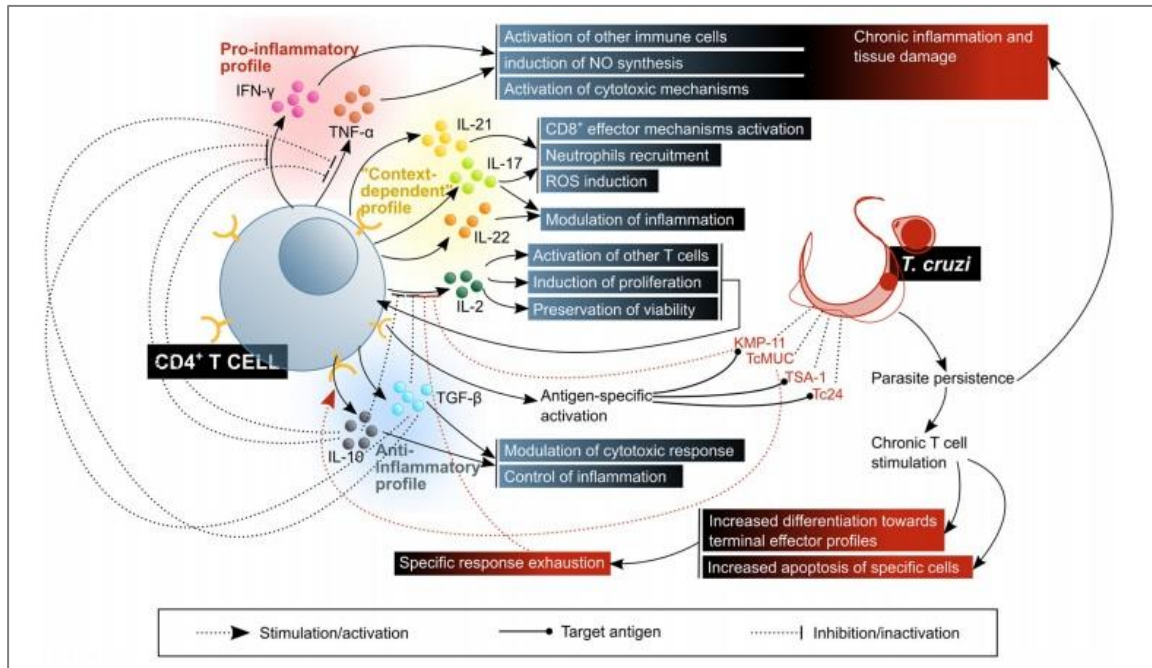


Figura 5 - Mecanismos de resposta de linfócitos T CD4⁺

Fonte: ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018.

Em condições normais, células T CD4⁺ regulatórias (Treg), mediadas pela IL-10, atuam na modulação da resposta imune e nos mecanismos de tolerância de reações patogênicas (Figura 6). Um estudo realizado por de Araújo *et al.* (2011) demonstrou que indivíduos com a forma indeterminada da doença possuíam maiores níveis de IL-10 e de Treg, em relação aos portadores da forma cardíaca, e ressaltaram o possível papel limitante desses componentes na reação inflamatória ao *T. cruzi*. Em uma situação de falha das células Treg, a resposta exacerbada e o reconhecimento de antígenos próprios como impróprios são fatores cruciais nas lesões cardíacas crônicas da DC (NEVES *et al.*, 2022).

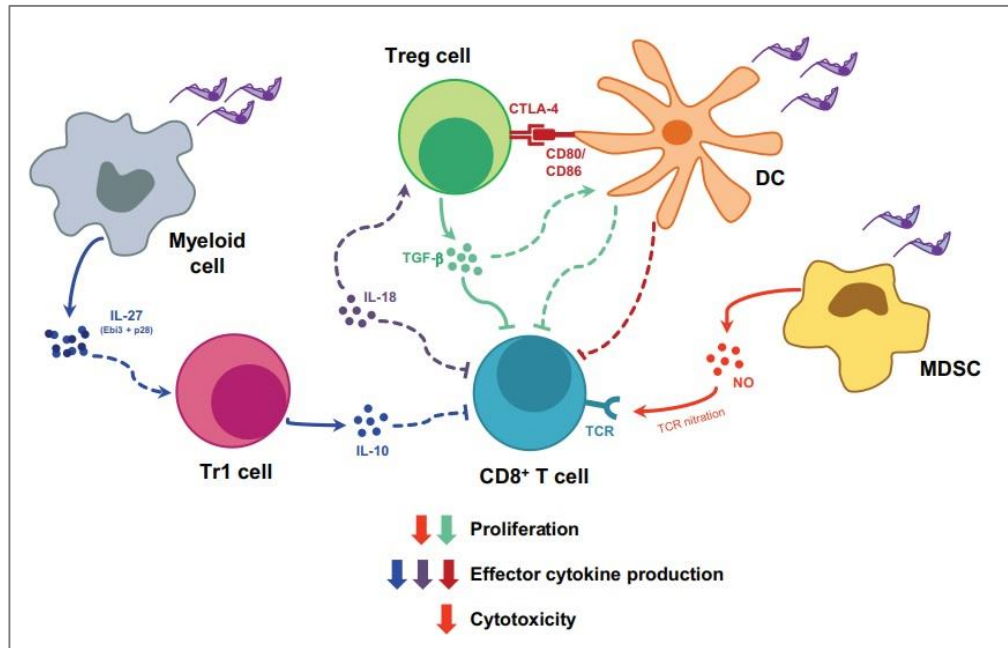


Figura 6 - Modulação da resposta imune pelos linfócitos Treg
Fonte: RODRÍGUEZ *et al.*, 2019.

É importante denotar um terceiro perfil imune (Th17) que, apesar de ter sido descrito por sua participação em reações autoimunes e em lesões crônicas bacterianas e fúngicas (SALLUSTO, 2016), sua função foi elucidada em modelos murinos como potente protetor contra a infecção pelo *T. cruzi*, mediante secreção das citocinas IL-17 e IL-21 (CAI *et al.*, 2016). Ademais, um estudo realizado por Sousa *et al.* (2017) demonstrou que portadores assintomáticos da DC possuem maiores níveis plasmáticos de IL-17, em comparação a portadores com disfunções cardíacas, e também relatou um possível perfil supressor da doença.

As principais funções dos linfócitos B são: produção de anticorpos, secreção de citocinas, promoção de memória imune e apresentação de antígenos (Figura 7) (WORTEL; HEIDT, 2017). Anticorpos secretados por estas células exercem papel de opsonização, além de estarem relacionados à atividade lítica mediada pelo sistema complemento e aos mecanismos de bloqueio da evasão do parasito aos efeitos imunes (KRAUTZ; KISSINGER; KRETTLI, 2000). Assim como os linfócitos T, as células B também possuem uma linhagem regulatória (Breg), que provoca supressão de reações autoimunes, pela secreção de IL-10, IL-35 e fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) (WORTEL; HEIDT, 2017).

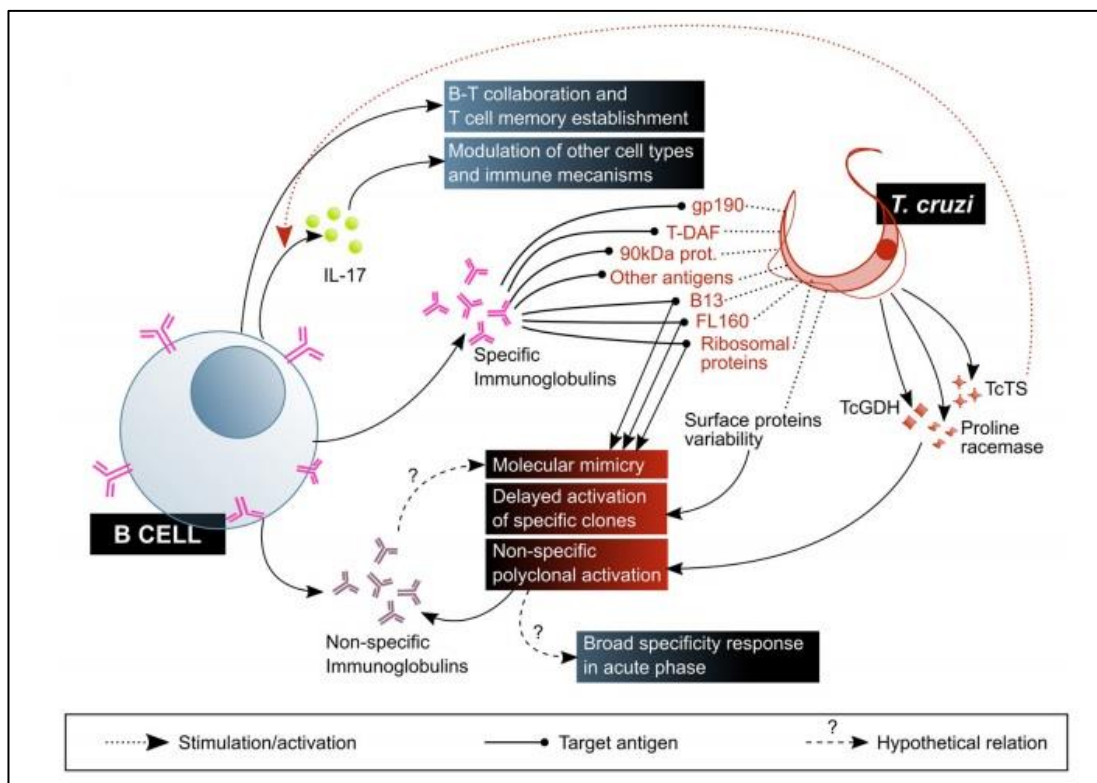


Figura 7 - Mecanismos de resposta imune pelas células B

Fonte: ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018

Apesar do cenário protetor, a resposta imune humoral é alvo de muitas pesquisas acerca dos danos teciduais gerados pela inflamação crônica persistente na DC. Uma falha nessa resposta levanta hipóteses sobre um mecanismo de evasão do parasito em promover expansão generalizada de células B policlonais, ao produzirem anticorpos não específicos e incapazes de eliminar o parasito (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Outras hipóteses referem-se à citotoxicidade dependente de anticorpo e à mimetização de moléculas do hospedeiro, e conseqüente reação cruzada com ação deletéria por anticorpos (Figura 8) (BONNEY *et al.*, 2019). Ressalta-se que esta reatividade cruzada foi encontrada contra moléculas como a miosina, actina e tubulina, componentes do tecido muscular, que é alvo principal do *T. cruzi* (OLIVERA *et al.*, 2021). Neste contexto, associa-se que as lesões encontradas após longos períodos de infecção na fase indeterminada sejam decorrentes de uma reatividade cruzada constante e de baixa intensidade, estimulada ao longo da fase crônica (LEON; ENGMAN, 2001; MONTALVÃO *et al.*, 2018).

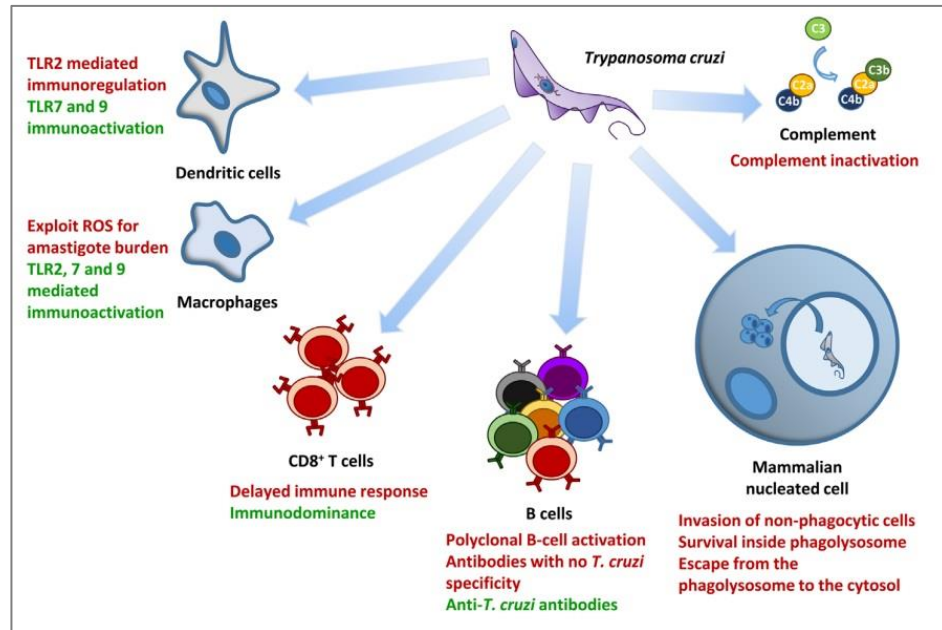


Figura 8 - Principais mecanismos de evasão do *Trypanosoma cruzi* à resposta imune do hospedeiro.

Fonte: CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016

2.7 RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO *T. cruzi*

A imunidade humoral é ativada pelo reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B, e então inicia-se a diferenciação e proliferação de plasmócitos produtores de anticorpos. Os anticorpos apresentam estrutura tetramérica, composta por duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves, que possuem domínios variáveis e constantes, ligados por pontes dissulfeto (CHIU *et al.*, 2019). A região variável Fab possui um sítio denominado parátopo, que liga-se ao epítipo dos diferentes antígenos do *T. cruzi*, a exemplo de glicoproteínas, gp190, T-DAF e a proteína de superfície 90 kDa. Após o reconhecimento de antígenos pela porção Fab, a região constante Fc liga-se a receptores de superfície celular dos diferentes componentes do sistema imune, com o intuito de ativar as células efetoras para exercerem suas funções específicas e debelarem o patógeno (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018).

Os anticorpos são classificados de acordo com suas cadeias pesadas, nas regiões constantes, em que cada classe possui sequências de aminoácidos diferentes, com propriedades distintas. De acordo com as especificidades do antígeno reconhecido e das citocinas liberadas por células TCD4⁺, a diferenciação das células B pode sofrer mudança de classe, mediante deleções nas sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA), o que permite a produção de isotipos adequados para a infecção (SIMPSON *et al.*, 2013). As imunoglobulinas G, D e E possuem estrutura monomérica e têm dois sítios de ligação na porção Fab, enquanto a IgA

apresenta forma dimérica e quatro sítios Fab e a IgM é pentamérica, com 10 sítios de ligação a antígenos (Figura 9).

Além das diferenças estruturais, as classes de imunoglobulinas diferem-se também em propriedades funcionais, a exemplo da IgA, que exerce proteção de mucosas e tecidos epiteliais; a IgM, presente na fase aguda da infecção por *T. cruzi* e outros patógenos; IgE, que media reações alérgicas e infecções parasitárias; e IgG, importante biomarcador de fase crônica na DC, que possui funções de neutralização, opsonização de patógenos e ativação de complemento (BREZSKI; GEORGIU, 2016). Foi elucidado mais recentemente que a IgD contribui para a homeostase de mucosas, ao mediar as células efetoras mieloides, como basófilos e mastócitos (GUTZEIT; CHEN; CERUTTI, 2018).

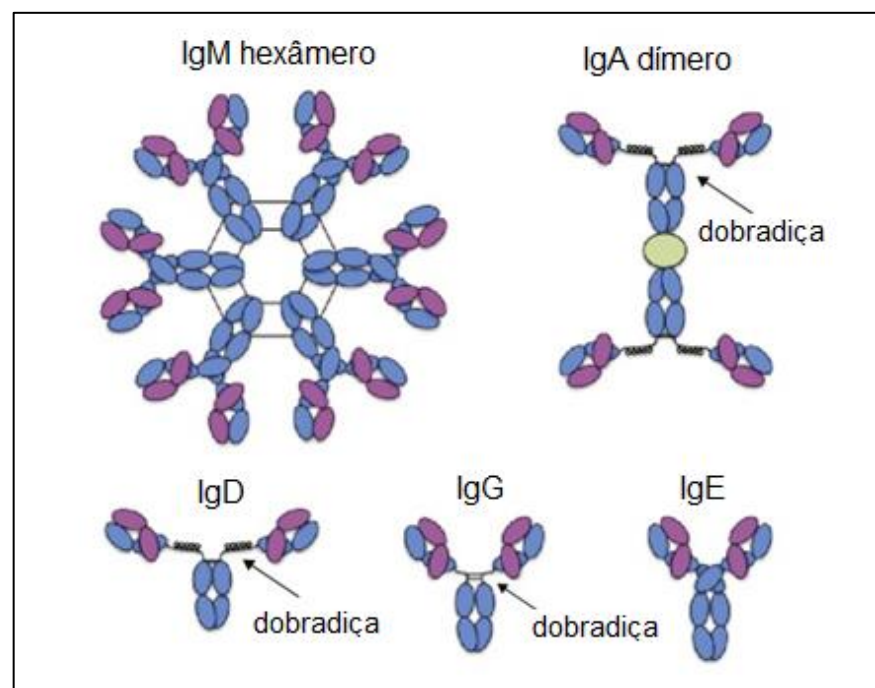


Figura 9 - Diferença de estruturas de classes de anticorpos

Fonte: adaptado de Brezski; Georgiou (2016)

A cadeia pesada dos anticorpos contém uma pequena sequência de aminoácidos que forma um domínio em dobradiça e confere flexibilidade na interação com o antígeno. Essa região dobradiça “*hinge*” é onde são diferenciados os isotipos das IgGs, cuja geometria afeta significativamente suas propriedades funcionais e biofísicas (WHITE *et al.*, 2015). A diferenciação de cada isotipo é orquestrada com a produção de diferentes citocinas em nível pós-transcricional, pela reprogramação metabólica distinta de células imunes mieloides. Desta forma, os isotipos de IgG fornecem imunidade específica ao patógeno, de acordo com o microambiente e os receptores expressos por cada tipo celular (HOEPEL *et al.*, 2020).

De forma geral, IL-4 é a principal citocina mediadora de resposta humoral e, dentre os isotipos de IgG, possui papel substancial na diferenciação de IgG1 e IgG4 (AKIYAMA *et al.*, 2018). Em relação à IgG1, além da IL-4, IFN- γ também media a diferenciação deste isotipo, o qual possui capacidades de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), de fagocitose dependente de anticorpo (ADCP) e de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) (BRUHNS *et al.*, 2009). A IgG2, mediada por TNF e IL-1 β , possui região de dobradiça mais curta, rígida e resistente que IgG1 e possui fraca capacidade de ADCC e ADCP (KINDER *et al.*, 2015; HOEPEL *et al.*, 2020).

O isotipo IgG3 é mediado principalmente por IFN- γ e IL-6 e possui capacidade melhor que a IgG1 de ADCC, ADCP e CDC, entretanto, apresenta região de dobradiça extensa e suscetível à clivagem (KAWANO *et al.*, 1994; BREZSKI; GEORGIU, 2016). Por fim, o isotipo IgG4, considerado não inflamatório, possui região de dobradiça curta e não ativa CDC nem ADCC por células NK, entretanto, ativa ADCP por macrófago (BREZSKI *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2020).

Os isotipos de anticorpos se tornaram alvo de estudos que buscam explorar e aprimorar estas moléculas para gerar novas aplicabilidades diagnósticas, como biomarcadores ou para finalidades terapêuticas (ECKER; JONES; LEVINE, 2015). Um dos primeiros estudos que propuseram caracterizar o perfil de imunoglobulinas gerados a partir da infecção pelo *T. cruzi* ocorreu no início da década de 80, em que foi realizada pesquisa com 36 portadores da DC residentes do estado de Goiás, pelo método de imunodifusão, o qual encontrou níveis elevados de IgA em 50% dos pacientes com a forma crônica digestiva da DC e demonstrou uma correlação positiva destes achados com a gravidade do envolvimento do esôfago (SÁ FERREIRA *et al.*, 1983). Visto que a IgA é a imunoglobulina relacionada à proteção de mucosas, Primavera *et al.* (1988) corroboraram com estes resultados, ao utilizarem a cepa Y pelo método de ELISA e encontrarem IgA elevada em 92% dos pacientes com a forma crônica digestiva.

Com o objetivo de avaliar a reatividade de isotipos de IgG em soro de portadores da DC na forma crônica cardíaca, em estudo realizado na Argentina, Cerban *et al.* (1993) utilizaram epimastigotas da cepa Tulahuen e fração de antígenos de citosol ácido, pelo método de ELISA, e encontraram a IgG1 mais elevada nos pacientes do grupo que apresentou danos cardíacos. Os autores ressaltaram a importância destes dados, visto que diferentes isotipos de IgG possuem características distintas de estrutura, função e grau de participação na patogenia da infecção pelo *T. cruzi*. Em contrapartida, estudo realizado pelo mesmo método,

com epimastigotas da cepa Y, encontrou IgG2 elevada em portadores com envolvimento cardíaco, além de IgA elevada nos portadores com a forma digestiva (MORGAN *et al.*, 1996).

Outro estudo realizado na Áustria avaliou o envolvimento de mecanismos autoimunes na patogenia da cardiomiopatia chagásica. Foram analisados 36 portadores e os resultados demonstraram que IgG2 e IgG3 apresentaram reatividade ao antígeno da miosina anti-cardíaca, indicando uma resposta imune Th1 pela citotoxicidade dependente de anticorpo, sugestiva de auto-reatividade e autoimunidade (SKYLLOURIOTIS *et al.*, 1999). Posteriormente, Hernández-Becerril *et al.* (2001) também encontraram correlação entre altos níveis de IgG2 e uma tendência à cardiomegalia grave. Este estudo utilizou o método de ELISA e IFI, com antígenos brutos de epimastigotas, em 12 portadores de cardiomiopatia provenientes de área rural endêmica do México.

A associação dos níveis de IgG2 com os portadores cardíacos também foram encontrados em pesquisa realizada em Recife-PE, que utilizou os antígenos recombinantes *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA) e *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), também pelo método ELISA (VERÇOSA *et al.*, 2007). Estudos realizados no mesmo local e sob mesma metodologia encontraram associação positiva dos níveis de IgA com a forma digestiva da DC (VASCONCELOS *et al.*, 2010), porém não houve diferença significativa dos níveis de IgM nas diferentes formas crônicas, devido a esse isotipo ser relacionado às fases iniciais da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

Por outro lado, pesquisa desenvolvida no Rio de Janeiro-RJ, pela metodologia de ELISA com a cepa Y, encontrou IgG3 em todos os indivíduos infectados, sem correlação com a progressão da DC, além de não detectarem reatividade de IgM, por serem indivíduos crônicos. Ademais, os pesquisadores correlacionaram maiores níveis de IgG1 com a diminuição da função de ejeção ventricular nos portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, e ainda demonstraram IgE com tendência a ser mais reativa em indivíduos na forma indeterminada da DC (GEORG *et al.*, 2017).

A variação das imunoglobulinas indica ter correlação com as citocinas produzidas e liberadas frente à infecção pelo *T. cruzi*. A fim de determinar os níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-10, TNF- α , NO e de IgG total e específica em portadores da DC com diferentes formas clínicas, Pissetti *et al.* (2009) encontraram níveis mais elevados de IgG4 e IL-10 em indivíduos com a forma digestiva, além de níveis significativamente mais altos de IgG3 nos infectados, em relação aos controles, independente da forma clínica. Os autores sinalizaram que a utilização da IgG3 poderia ser sugerida como marcador para a fase crônica da DC.

Portanto, ressalta-se a necessidade da continuação de pesquisas que busquem um padrão convergente dos resultados encontrados na literatura, considerando os fatores associados à patogenia da DC. Assim, o entendimento do perfil dos isotipos de IgG pode contribuir para a identificação de marcadores imunológicos e ser utilizado como prognóstico de evolução para as formas clínicas da DC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o perfil de IgG de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* de acordo com as formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar o perfil de IgG total anti-*T. cruzi* IBMP-8.4 em indivíduos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica;
2. Padronizar as reações imunoenzimáticas indiretas para detecção dos isotipos de IgG anti-*T. cruzi* IBMP-8.4;
3. Identificar o perfil dos isotipos de IgG anti-*T. cruzi* IBMP-8.4 em indivíduos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica;
4. Analisar possíveis associações entre o perfil isotípico de imunoglobulinas com as formas clínicas da doença de Chagas crônica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal exploratório realizado com amostras séricas de indivíduos submetidos à sorologia para *T. cruzi* de diferentes estados do Brasil.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras séricas foram oriundas de Instituições parceiras localizadas em diferentes estados do Brasil (Pernambuco, Bahia e Goiás), no período de 1978 a 2020. As amostras foram obtidas de indivíduos atendidos nos Ambulatórios de Chagas do Hospital das Clínicas da UFG (Goiânia-GO) e do Hospital Oswaldo Cruz (Recife-PE), bem como de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA; Salvador-BA). As amostras foram categorizadas de acordo a forma clínica apresentada pelos portadores: indeterminada (IND), cardíaca leve (CL), cardíaca grave (CG), além de amostras negativas provenientes de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE; Recife-PE) e HEMOBA, como controles negativos (NEG).

A classificação das formas clínicas foi confirmada por exames clínico/complementares realizados pelas instituições parceiras, com resultados compatíveis com a infecção pelo *T. cruzi*, mediante testes sorológicos (HAI, IFI, ELISA e quimiluminescência). Assim, foram utilizadas 24 amostras de indivíduos na forma indeterminada (IND), 20 amostras de indivíduos na forma cardíaca leve (CL) e 15 amostras oriundas de indivíduos na forma cardíaca grave (CG) da DC.

Segundo a II Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (DIAS *et al.*, 2016), a forma IND é caracterizada por indivíduos classificados no estágio A de envolvimento cardíaco, ou seja, aqueles sem sintomas presentes ou progressos de insuficiência cardíaca e com eletrocardiografia (ECG), ecocardiografia (ECO) e radiografia de tórax e esôfago normais. No grupo CL, estão os portadores classificados no estágio B1, ou seja, aqueles que apresentam alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), mas que não possuem disfunção ventricular. Além disso, estes indivíduos podem apresentar alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades da contratilidade regional), porém a função ventricular global preservada. Por fim, os indivíduos com CG são classificados no estágio C de envolvimento cardíaco, ou seja, apresentam sintomas

prévios ou atuais de insuficiência cardíaca e que apresentam disfunção ventricular (New York Heart Association I, II, III e IV). Todas as informações acerca dos aspectos clínicos e sociodemográficos dos indivíduos (idade, gênero e estado de origem) foram registradas em formulário de pesquisa específicos, no momento da coleta de sangue. As amostras foram processadas e os soros foram estocados em biorrepositório a -20°C.

4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ISOTIPO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*T. cruzi*

A detecção dos isotipos de anticorpos anti-*T. cruzi* IgG (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4) foi realizada pelo método de ELISA indireto, utilizando o antígeno recombinante quimérico IBMP-8.4 como agente de captura, conforme descrito previamente (SANTOS *et al.*, 2016).

4.4 ELISA INDIRETO COM A PROTEÍNA IBMP-8.4

Os ensaios imunoenzimáticos indiretos foram padronizados de forma a determinar a melhor diluição dos anticorpos secundários, utilizando uma matriz de decisão ou *checkerboard titration*. Esta matriz baseia-se no cruzamento das variáveis utilizadas no ajuste do teste, com objetivo de identificar as melhores condições de reatividade da proteína na plataforma proposta. Em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Nunc MaxiSorp®, EUA) foram distribuídos 100 µl da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo 25 ng do antígeno do *T. cruzi* a molécula IBMP-8.4. Após a sua adição, a sensibilização ocorreu mediante acréscimo de 100 µl da solução WellChampion™ (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) por poço. Após um período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, as microplacas foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37 °C por 20 minutos para secagem (NovaInstruments®, NI 1720, São Paulo-SP, Brasil). Ao final da secagem, as microplacas encontravam-se prontas para uso.

Para a padronização do ELISA indireto, foram utilizadas quatro amostras séricas positivas e três negativas para a doença de Chagas na diluição de 1:100 utilizando o tampão PBS pH 7.4 (fosfato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 150 mM). Foram utilizados 12 poços sem adição de amostra sérica (“branco”) para análise do sinal de *background* do antígeno. Depois da sensibilização das microplacas, 100 µl das amostras séricas previamente diluídas foram adicionadas em cada poço. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37 °C por 60 minutos (NovaInstruments®, NI 1720, São Paulo-SP, Brasil). Ao final desta etapa, as placas

foram lavadas cinco vezes com adição de 200 µl de tampão PBS-Tween (fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e 0,5% de Tween-20) para retirada do material não adsorvido.

Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário conjugado à peroxidase (anti-IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) diluídos em PBS-T. O anti-IgG total marcado com peroxidase (lote 167EXCJHPCC6Z) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED; Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ) para a realização deste estudo. Para a análise de IgG total não foi necessária a padronização do título deste anticorpo secundário, visto que foi utilizada a padronização realizada anteriormente (SANTOS *et al.*, 2016), sendo utilizada a diluição de 1:40.000 em PBS-T. Contudo, os anticorpos anti-IgG1 (A-10648/lote: 2188171, Thermo Scientific-EUA), anti-IgG2 (MH1722/lote:2282075, Thermo Scientific-EUA), anti-IgG3 (MH1732/lote: 22822059, Thermo Scientific-EUA) e anti-IgG4 (A-10654/lote: 2260950, Thermo Scientific-EUA) foram avaliados nas diluições de 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 em PBS-T.

As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37 °C por 30 minutos (NovaInstruments®, NI 1720, São Paulo-SP, Brasil). Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito anteriormente. A cada poço foram adicionados 100 µl do cromógeno TMB Plus (lote 111011; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) e, após 10 minutos de incubação sob abrigo da luz, adicionou-se 50 µl de H₂SO₄ 0.3 M com objetivo de interromper as reações, que foram quantificadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (Sunrise™, Tecan, Suíça).

Para a interpretação dos dados, as médias aritméticas dos valores das densidades óticas (DOs) das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios-padrão, utilizando planilhas eletrônicas pelo programa Microsoft Office® Excel 2010. O critério para determinar as condições ótimas na padronização dos imunossaios utilizando isotipos anti-IgG baseou-se no maior valor do sinal-ruído (SNR), o qual foi determinado pela razão entre a média aritmética das DOs das amostras positivas pela média aritmética das DOs das amostras negativas.

Uma vez estabelecidas as condições dos ensaios, os testes foram realizados conforme os critérios acima e considerando as peculiaridades determinadas para cada isotipo. Os pontos de corte (*cut-off*) foram estabelecidos individualmente para cada placa, calculando a média das DOs de cinco controles negativos, acrescida à dois desvios-padrão (DP). Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR), a fim de possibilitar a comparação entre placas. Os valores de IR foram obtidos pela relação da DO da amostra pelo *cut-off* de cada placa; valores abaixo de 1,00 indicam negatividade, enquanto que os iguais ou superiores a 1,00 denotam

positividade no teste. Cada amostra foi analisada em dois ensaios independentes, para confirmação do resultado.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características dos indivíduos (sexo, idade e origem geográfica) foram analisadas mediante medidas descritivas, como frequência, para a variável qualitativa, e médias aritmética e geométrica, desvio-padrão e coeficiente de variação, para as variáveis quantitativas. As diferenças das características foram calculadas por teste *t* não pareado ou teste Mann-Whitney. As médias geométricas foram calculadas com os seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para testar a normalidade dos dados. Para avaliar as diferenças entre as formas clínicas para cada isotipo, foi utilizado o teste de Mann-Whitney não pareado. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de $p < 0,05$. A ausência de sobreposição dos valores dos IC95% foi considerada significância estatística. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 8 para Windows® versão 8.01 (GraphPad Software Inc., San Diego-CA, EUA) para realização dos testes estatísticos.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do IGM/FIOCRUZ-BA (CAAE 67809417.0.0000.0040). Não houve riscos físicos para a saúde dos participantes, pois somente amostras previamente coletadas foram utilizadas. Os dados que os identifiquem foram mantidos em absoluto sigilo e, em vez do nome, o material biológico foi identificado por um código numérico, mantendo, desta forma, a sua confidencialidade.

5 RESULTADOS

Foi obtido um total de 97 amostras de soro, classificadas após sorologia para *T. cruzi* e análise clínica como: NEG (n = 38); IND (n = 24); CL (n = 20) e CG (n = 15). As amostras NEG foram provenientes de Pernambuco (76,3%) e da Bahia (23,7%). O grupo IND teve origem geográfica na Bahia (83,3%) e em Pernambuco (16,7%). Todos os portadores da forma CL foram provenientes do estado de Pernambuco. O grupo CG foi composto por indivíduos oriundos dos estados de Pernambuco (60%), Goiás (33,3%) e Bahia (6,7%).

Os indivíduos NEG tiveram idade média de $34,6 \pm 10,9$ anos; os IND tiveram idade média de $36,9 \pm 8,2$ anos; os CL tiveram idade média de $54,3 \pm 11,1$ anos e os CG tiveram idade média de $51,7 \pm 10,6$ anos. Todos os grupos apresentaram diferença significativa de idade ($p < 0,0001$) entre si, com exceção dos grupos NEG versus (vs.) IND ($p = 0,1956$) e CL vs. CG ($p = 0,5809$). Quanto ao gênero, não houve diferença significativa e o sexo masculino teve maior ou igual frequência em todos os grupos, com 73,6% dos indivíduos NEG; 62,5% dos portadores da forma IND; 50% do grupo CL e 53,3% do grupo CG.

Tabela 1 - Características demográficas dos indivíduos por classificação clínica da doença de Chagas crônica

Formas clínicas da DC crônica	n	Idade média (anos)	Sexo masculino (%)
NEG	38	$34,6 \pm 10,9$	73,6
IND	24	$36,9 \pm 8,2$	62,5
CL	20	$54,3 \pm 11,1$	50
CG	15	$51,7 \pm 10,6$	53,3

Nota: NEG, negativos; IND, forma indeterminada; CL, forma cardíaca leve; CG, forma cardíaca grave

Fonte: elaboração da autora

As diluições dos isotipos foram avaliadas por uma matriz de decisão (*checkerboard titration*). As condições ótimas de ensaio foram estabelecidas considerando o maior valor de sinal-ruído (SNR), determinado pela razão entre a média aritmética das DOs das amostras positivas pela média aritmética das DOs das amostras negativas. As condições selecionadas encontram-se destacadas em vermelho na Tabela 1. A Figura 10 ilustra a análise gráfica dos valores médios obtidos para cada isotipo de IgG utilizando diferentes diluições dos anticorpos marcados com peroxidase.

Quadro 2 - Valores de sinal-ruído (SNR) estabelecidos para padronização do título de anticorpo secundário marcado com peroxidase para determinação dos isotipos de IgG

SNR	0.5k	1k	2k	10k	20k	40k
IgG1	5.34	5.16	4.75	2.61	1.81	1.56
IgG2	3.73	2.90	2.38	1.00	1.20	1.88
IgG3	2.56	1.75	1.40	1.78	1.31	1.42
IgG4	2.26	1.74	1.20	1.02	0.77	1.01

Legenda: 0,5k (1:500), 1 (1:1.000); 2k (1:2.000); 10k (1:10.000); 20k (1:20.000); 40k (1:40.000).
Condições escolhidas destacadas em vermelho

Fonte: elaboração da autora

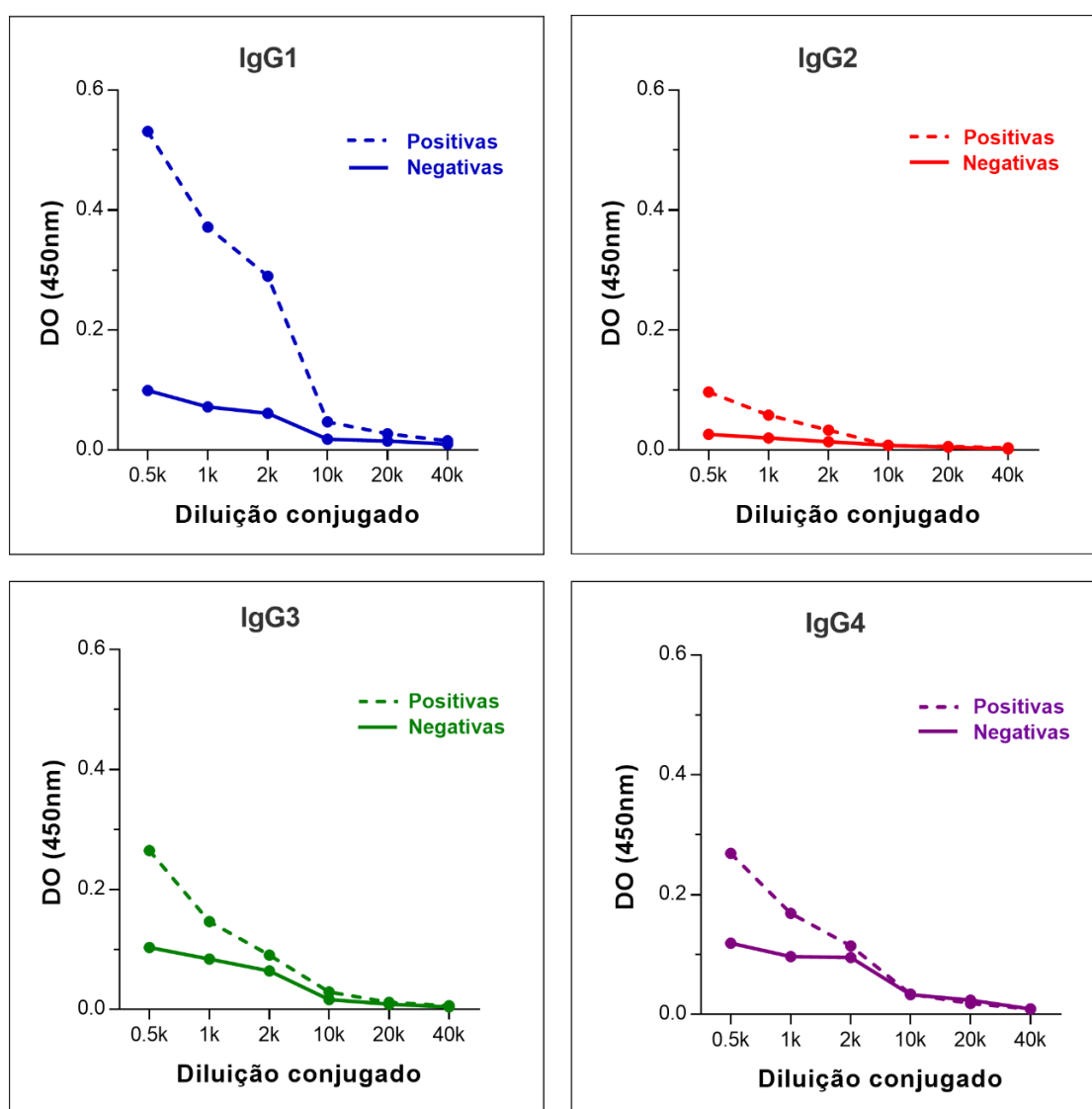


Figura 10 - Análise gráfica dos valores médios das densidades óticas dos controles positivos e negativos em diferentes diluições dos conjugados para cada isotipo de IgG

Nota: 0,5k (1:500), 1 (1:1.000); 2k (1:2.000); 10k (1:10.000); 20k (1:20.000); 40k (1:40.000)

Fonte: elaboração da autora

O IR de IgG total (Figura 11) demonstrou diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparado o grupo NEG com todas as formas clínicas, e entre os grupos IND e CL entre si (Tabela 2). Todos os isotipos apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparado o grupo NEG a todas as formas clínicas, com exceção do grupo IND ($p = 0,2633$), no isotipo IgG4 (Tabela 3).

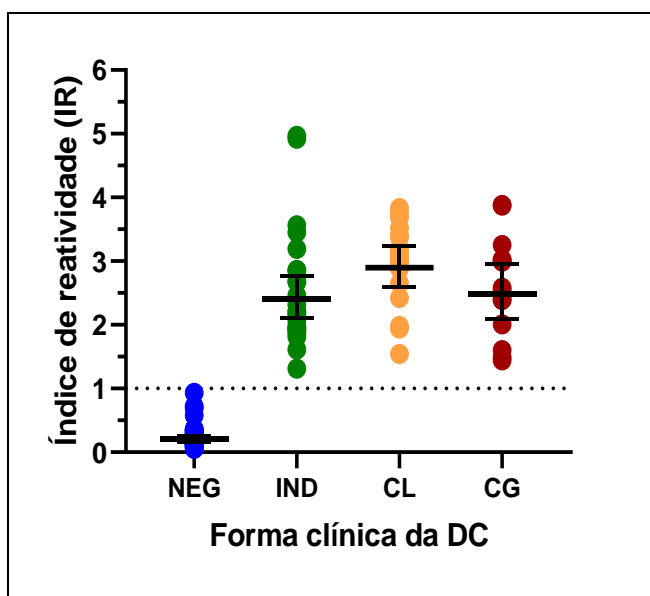


Figura 11 - Índice de reatividade de IgG total por forma clínica e controles, utilizando a molécula IBMP-8.4

Nota: NEG, negativos; IND, forma indeterminada; CL, forma cardíaca leve; CG, forma cardíaca grave

Fonte: elaboração da autora

Tabela 2 - Média geométrica e comparação entre os índices de reatividade de IgG total por grupo clínico

	Grupos			
	NEG	IND	CL	CG
Média geométrica	0,20 ± 0,18	2,4 ± 0,92	2,89 ± 0,61	2,48 ± 0,76
CG	< 0,0001*	0,4885	0,1201	
CL	< 0,0001*	0,0149*		
IND	< 0,0001*			

*diferença significativa. Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Nota: NEG, negativos; IND, forma indeterminada; CL, forma cardíaca leve; CG, forma cardíaca grave

Fonte: elaboração da autora

Tabela 3 - Média dos índices de reatividade dos isotipos de IgG nos diferentes grupos clínicos, comparados aos controles

Grupos	n	Isotipos							
		IgG1	<i>p</i>	IgG2	<i>p</i>	IgG3	<i>P</i>	IgG4	<i>p</i>
CG	15	8,42	< 0,0001*	1,21	< 0,0001*	0,83	0,0005*	1,04	0,0217*
CL	20	13,10	< 0,0001*	1,96	< 0,0001*	1,71	< 0,0001*	1,19	0,0302*
IND	24	6,77	< 0,0001*	1,40	< 0,0001*	1,29	< 0,0001*	0,86	0,2633
NEG	38	0,50		0,54		0,50		0,78	

*diferença significativa. Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Nota: NEG, negativos; IND, forma indeterminada; CL, forma cardíaca leve; CG, forma cardíaca grave

Fonte: elaboração da autora

O isotipo IgG1 apresentou os IRs mais elevados entre os isotipos, com os portadores da DC variando de 0,54 (grupo IND) a 21,85 (grupo CG) (Figura 12). A IgG2 apresentou média similar de IR entre as formas clínicas da DC, entretanto, obteve menor valor quando comparada aos índices de IgG1. O maior IR de IgG2 foi 7,66 (grupo CL) e o menor, 0,49 (grupo IND). O isotipo IgG3 também apresentou IRs mais elevados no grupo CL (máximo de 5,68), quando comparado às outras formas clínicas, e com o menor IR também do grupo IND (0,39). IgG4 apresentou níveis de IR basais em todas as formas clínicas, com nível máximo de 3,36 (forma CL). Entre os portadores da DC, o grupo CL obteve os maiores IRs, em que IgG1 apresentou diferença significativa entre os grupos IND e CL, e IgG3 apresentou diferença significativa entre os grupos CL e CG (Tabela 4).

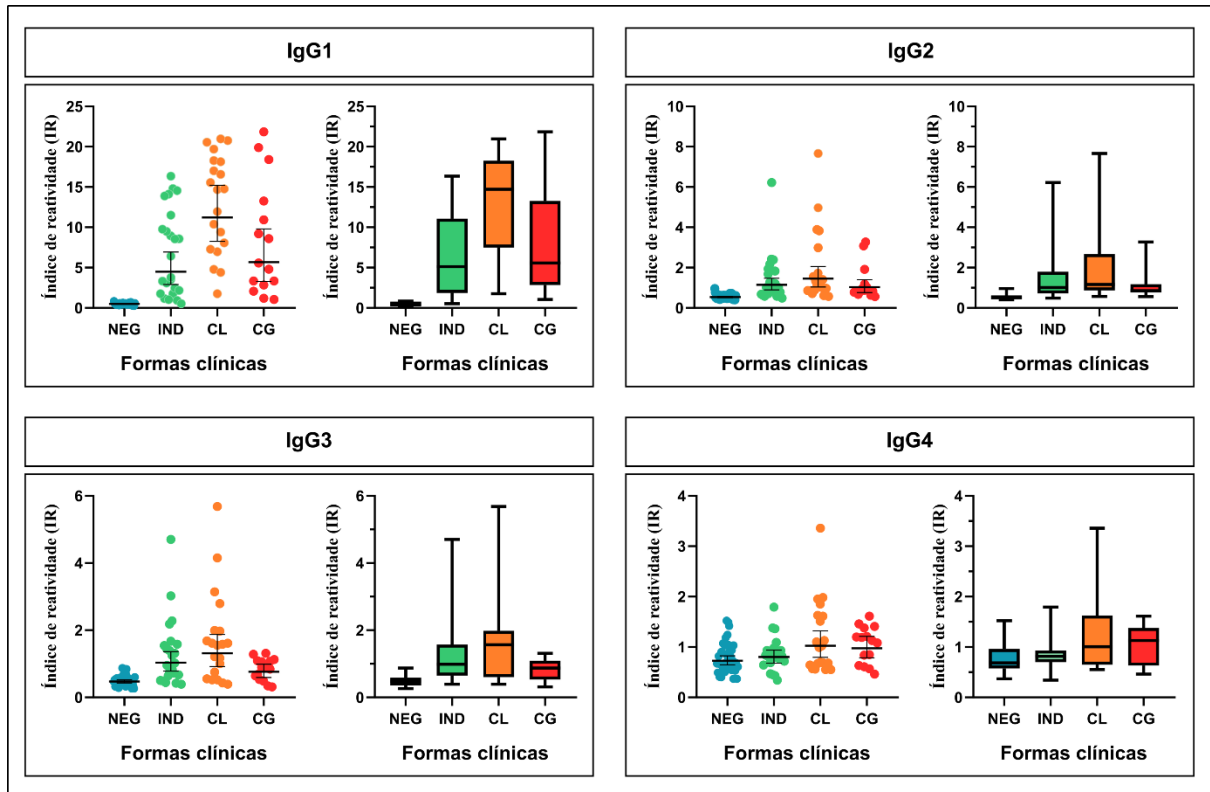


Figura 12 - Índice de reatividade dos isotipos de IgG anti-T. cruzi IBMP-8.4 por forma clínica e controles

Nota: NEG, negativos; IND, forma indeterminada; CL, forma cardíaca leve; CG, forma cardíaca grave

Fonte: elaboração da autora

Tabela 4 - Diferença entre os índices de reatividade entre as formas clínicas por isotipo de IgG

Grupos	Isotipos							
	IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	IND	CL	IND	CL	IND	CL	IND	CL
CG	0,4797	0,0535	0,4618	0,0815	0,1889	0,0186*	0,0957	0,8888
CL	0,0007*		0,3057		0,2295		0,2532	

*diferença significativa. Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Nota: NEG, negativos; IND, forma indeterminada; CL, forma cardíaca leve; CG, forma cardíaca grave

Fonte: elaboração da autora

6 DISCUSSÃO

Os aspectos sociodemográficos dos indivíduos deste estudo apresentaram maior frequência do sexo masculino em todas as formas clínicas, com média de idade mais jovem nos indivíduos NEG e IND, e uma faixa etária mais avançada nos portadores das formas cardíacas. Devido ao mecanismo fisiopatológico da inflamação crônica persistente nas miofibrilas cardíacas, nota-se que as manifestações clínicas são mais relevantes em faixas etárias mais tardias, pelo processo de cronificação da DC (MARTINEZ; ROMANO; ENGMAN, 2020). As amostras utilizadas no presente estudo foram majoritariamente provenientes dos estados da Bahia e de Pernambuco e, em menor número, de Goiás. Em virtude da discrepância do número de amostras de cada região e suas classificações clínicas, a comparação entre elas geraria um viés no estudo.

Uma pesquisa epidemiológica realizada em Pernambuco, nos anos de 2016 a 2018, relatou predominância do sexo feminino e média de 62 anos de idade (MEDEIROS *et al.*, 2022), ao contrário dos achados no presente estudo. Já um estudo realizado na Bahia, com doadores de sangue, demonstrou predominância do sexo masculino entre os indivíduos soropositivos para *T. cruzi* e média de idade de 40,4 anos (SANTOS *et al.*, 2022a). Os indivíduos assintomáticos, ou seja, portadores da forma indeterminada, tendem a ser mais jovens e do sexo masculino, como mostrado no presente estudo, bem como em pesquisa supracitada realizada na Bahia. Neste contexto, os grupos clínicos utilizados apresentaram diferença significativa de idade e a comparação entre eles também poderia gerar associações espúrias.

Os portadores da forma CL tiveram maiores índices de reatividade de IgG total e de todos os isotipos, ao contrário dos indivíduos IND, que tiveram os menores IRs. IgG1 foi predominante em todas as formas clínicas e isto pode ser explicado pela distribuição fisiológica dos isotipos de IgG no organismo humano, no qual a IgG1 é a mais abundante, representando até 70% do total de IgG circulante (RAYNER *et al.*, 2015). Elevados títulos deste isotipo foram observados em pesquisa realizada por Cordeiro *et al.* (2007) quando utilizados diferentes tipos de antígenos, ressaltando a atividade lítica e de ativação do sistema complemento e, portanto, a capacidade de distinguir indivíduos positivos e negativos para infecção por *T. cruzi* a partir da dosagem de IgG1.

Verçosa *et al.* (2007) encontraram maiores níveis de IgG1 no soro de indivíduos portadores da DC, em Pernambuco, utilizando os antígenos CRA e FRA. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos clínicos. Por outro lado, IgG2 foi identificada com

possível associação com a forma cardíaca, divergindo do nosso estudo, em que não houve diferença entre as formas clínicas da DC. Em relação à IgG4, ambos os estudos encontraram níveis basais de anticorpos e nenhuma diferença significativa entre os grupos clínicos.

Diversas pesquisas discutem o antagonismo entre os papéis protetores ou agressivos dos anticorpos frente à infecção por *T. cruzi*. Neste contexto, IgG1 é reconhecida por suas funções principais de opsonização, ligação a receptores Fc de fagócitos, neutralização e ativação do sistema complemento (HAMILTON, 2001), desempenhando papel fundamental nos mecanismos inflamatórios.

Nosso estudo identificou IgG1 com IR significativamente maior no grupo CL, em relação ao IND, provavelmente por essas características majoritariamente pró-inflamatórias. Apesar dos grupos CL e CG não apresentarem diferença significativa, o grupo CG apresentou IR máximo maior que CL e maior variabilidade entre todos os grupos. Essa variação reforça a complexidade dos mecanismos parasitários e inflamatórios nas fibras cardíacas e os diversos fatores que contribuem para a progressão da DC cardíaca grave, cuja definição de prognóstico ainda requer elucidação (OLIVERA *et al.*, 2021).

Em paralelo, IgG3, apesar de apresentar menores concentrações séricas totais, possui uma capacidade de ativação do complemento maior que IgG1, além de estar associada à citotoxicidade e à fagocitose dependentes de anticorpo (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2019). No nosso estudo, o IR médio de IgG3 foi significativamente maior no grupo CL, em relação ao grupo CG, sugerindo que há participação desses anticorpos nos danos cardíacos, mas que ainda há um papel regulador que pode atenuar a severidade das lesões. Esses mecanismos podem ser influenciados por fatores produzidos e liberados pelos parasito, além da possível participação do perfil citotóxico (Th1) de células TCD8⁺ nas lesões cardíacas dos indivíduos portadores da forma CG, não identificada pela reatividade de anticorpos.

Georg *et al.* (2017) realizaram um estudo de coorte e também encontraram elevados níveis de IgG1 em pacientes com disfunção na fração de ejeção ventricular esquerda, e ressaltaram a possibilidade de associação com manifestações clínicas mais graves, como cardiomiopatias. A avaliação da cinética desse isotipo, mediante variações de titulação, sugeriu uma progressão de lesão cardíaca severa, o que pode auxiliar no prognóstico da doença cardíaca. Ao avaliarem IgG3, também foram encontradas elevadas titulações, mas sem associação clínica. No presente estudo, as amostras pré-caracterizadas clinicamente foram avaliadas sem acompanhamento dos indivíduos, portanto, não foi possível avaliar a progressão dos casos. A partir desta limitação, um estudo de coorte pode fornecer maiores informações acerca do comportamento do sistema imune humoral na DC.

Por outro lado, nossos resultados contribuíram para evidenciar que os isotipos IgG1 e IgG3 possuem papel patogênico na resposta imune mediada por anticorpos no miocárdio dos indivíduos portadores da DC e podem ter associação com gravidade. De fato, estes isotipos já foram considerados como marcadores de falência cardíaca, em pré-estágio e em progressão, em estudo que não realizou associação causal com doenças infecciosas (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2019). Portanto, estudos que avaliem outros isotipos e diferentes citocinas, quimiocinas e marcadores celulares, na presença e ausência do parasito nas fibras cardíacas podem contribuir para uma melhor caracterização dos mecanismos utilizados pelo *T. cruzi* e pelo sistema imune, com grupos clínicos representativos e comparáveis, a fim de identificar biomarcadores de progressão da DC e marcadores de prognóstico eficazes.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados contribuem para caracterização do perfil de imunoglobulinas presentes nos indivíduos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas, utilizando a molécula IBMP-8.4 como antígeno. Nós observamos maiores índices de reatividade de IgG1 em relação aos outros isotipos, principalmente nos indivíduos portadores da forma cardíaca leve, em relação aos portadores da forma indeterminada. IgG3 apresentou-se mais elevada nos indivíduos portadores da forma cardíaca leve, quando comparada à forma cardíaca grave. Nossos resultados sugerem que maiores estudos acerca da progressão das lesões, associada aos níveis de anticorpos, são necessários para subsidiar a identificação de biomarcadores para o prognóstico da DC.

REFERÊNCIAS

- ABRAS, A. *et al.* Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a change? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1566-1572, Oct. 2016.
- ACEVEDO, G.R., GIRARD, M.C.; GÓMEZ, K.A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. **Frontiers in Immunology**, Laussane, v. 9, n. 1929, Aug. 2018.
- AKIYAMA, M. *et al.* Interleukin-4 contributes to the shift of balance of IgG subclasses toward IgG4 in IgG4-related disease. **Cytokine**, Philadelphia, v. 110, p. 416-419, May. 2018.
- ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, May. 2010.
- ANDRADE, L. O. *et al.* Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 834-837, set. 2010.
- ARAS, R. *et al.* Cerebral infarction in autopsies of chagasic patients with heart failure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 81, n. 4, p. 14, out. 2003.
- BALOUZ, V. *et al.* Serological approaches for *Trypanosoma cruzi* strain typing. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 214-225, Mar. 2021.
- BASTOS, C. J. C. *et al.* Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. 711, Jun. 2010.
- BOCCHI, E. A. *et al.* Chronic Chagas heart disease management. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 70, n. 12, p. 1510–1524, Sep. 2017.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Current molecular medicine**, Netherlands, v. 8, n. 6, p. 510–518, Sep. 2008.
- BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and pathogenesis of chagas heart disease. **Annual review of pathology**, Palo Alto, v. 14, p. 421–447, Jan. 2019.
- BORGES-PEREIRA, J. *et al.* Chagas disease in Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brazil: left ventricle aneurysm and the risk of death in the 24-year interval. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online], Rio de Janeiro, vol.115, Jun. 2020.
- BRENIÈRE, S. F., WALECKX, E., BARNABÉ, C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): attempt at an inventory. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 8, e0004792, Aug. 2016.
- BREZSKI, R. J.; GEORGIU, G. Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 40, p. 62–69, Jun. 2016.

- BREZSKI, R.J *et al.* The in vitro resistance of IgG2 to proteolytic attack concurs with a comparative paucity of autoantibodies against peptide analogs of the IgG2 hinge. **Monoclonal Antibodies**, Austin, v. 3, n. 6, p. 558-567, Nov. 2011.
- BRITO, C. M. M.; PIRES, M. Q.; PACHECO, R. S. Chagas disease and HIV coinfection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastid Biology and Disease**, London, v. 2, n. 17, Oct. 2003.
- BRUHNS, P. *et al.* Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**, New York, v. 113, n. 16, p. 3716-3725, Apr. 2009.
- CAI, C. W *et al.* Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.12, n. 10, e:1005902 ,Oct. 2016.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, Laussane, v. 6, p. 659, Jan. 2016.
- CASTILLO, C. *et al.* Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 78, n. 1, e12660, Jul. 2017.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, London, v. 6, n. 3, p. 342-345, Jun. 2010.
- CELEDON, P. A. F. *et al.* Stability assessment of four chimeric proteins for human Chagas disease immunodiagnosis. **Biosensors**, v. 11, n. 8, p. 289, Aug. 2021.
- CERBAN, F. M. *et al.* Chagas' Disease: IgG Isotypes against *Trypanosoma cruzi* Cytosol Acidic Antigens in Patients with Different Degrees of Heart Damage. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York. v. 67, n. 1, p. 25–30, Apr. 1993.
- CESTARI, I.; RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, :e9721, Mar. 2010.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**; v. 1 n. 2 p. 159–218, Aug. 1909.
- CHIU, M. L. *et al.* Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies**, Basel. v. 8, n. 4, p. 55, Dec. 2019.
- CORDEIRO, T. A. R. *et al.* Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors & Bioelectronics**, Barking. v. 169, p. 112573, Dec. 2020.

COSTA, T. F. *et al.* Seroprevalence and detection of *Trypanosoma cruzi* in dogs living in a non-endemic area for Chagas disease in the legal Amazon region, Brazil.

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, v. 26, p. 1-8, Dec. 2021.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 102(Suppl. I): p. 113-122, Oct. 2007.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 110, n. 3, p. 277-282, May. 2015.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 (Suppl. I), p. 31–40, Jul. 2009.

CRESPILLO-ANDÚJAR, C. *et al.* Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 24, n. 12: p. 1344, e1–1344.e4, Dec. 2018.

D'ÁVILA, D. A. *et al.* Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 11: e0208133, Nov. 2018.

DA MATA, J. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. **Brain research bulletin**, New York, v. 53, n. 2: p. 153-162, Sep. 2000.

DALTRO, R. T. *et al.* Cross-reactivity using chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens: diagnostic performance in settings co-endemic for Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 57, p. 8, Jul. 2019.

DE ARAÚJO, F. F. *et al.* Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5 n. 5: e992, May. 2011.

DE BONA, E. *et al.* Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, Aug. 2018.

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 80, n. 7, p. 2258–2264, Jul. 2012.

DE SOUZA, W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I, p. 17-36, 1999.

DEL-REI, R. P. *et al.* Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 4, p. 1–12, Apr. 2019.

DIAS, J. C. P.; BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl. p. 139-147, 1984.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 370–375, Jul-Aug. 2006.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde**. Brasília, v. 25(núm esp.): p. 7-86, Jun. 2016.

DIAS, J. S. *et al.* Cognitive dysfunction in chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Dementia & Neuropsychologia**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 27-33, Mar. 2009.

DÍAZ, P. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells. **Infection and Immunity**. Bethesda, v. 83, n. 5, p. 2099–2108, May. 2015.

DO CARMO NETO, J. R. *et al.* Correlation between intestinal BMP2, IFN γ , and ne ural death in experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 16, n. 2: e0246692, Feb. 2021.

DOPICO, E. *et al.* Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, Mar. 2019.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, Austin, v. 7, n. 1, p. 9-14, 2015.

ERDMANN, H. *et al.* Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 11, p.1600–1611, Nov. 2009.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 443-457, Jun. 2002.

FLORES-CHÁVEZ, M. *et al.* Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 28, n. 5, p. 284–293, May. 2010.

FRASCH, A. C. *et al.* Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 148-151, Jun. 1991.

FREITAS, N. E. M. *et al.* Double-antigen sandwich ELISA based on chimeric antigens for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in human sera. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 16, p. e0010290, Mar. 2022.

GARCIA, K.O. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in chagasic cardiomyopathy. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 105, n. 3, p. 638-642, Jul. 2021.

GEORG, I *et al.* Evolution of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody production in patients with chronic Chagas disease: Correlation between antibody titers and development of cardiac disease severity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, v. 11, n. 7, Jul. 2017.

GOMES Y.M.; LORENA V.M.; LUQUETTI A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, suppl 1, p. 115-121, jul. 2009.

GONÇALVES, J. G. F. *et al.* Mortality indicators among chronic Chagas patients living in an endemic area. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 235–242, Sep. 2010.

GUTZEIT, C.; CHEN, K.; CERUTTI, A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 48, n. 7, p. 1101–1113, Jul. 2018.

HAMILTON, R. G. The Human IgG Subclasses, **Calbiochem Corp.**, La Jolla, CA, 2001.

HASEGAWA, H. *et al.* Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL6/IL-12 heterodimeric cytokine family, **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 7, p. 479, Nov. 2016.

HERNÁNDEZ-BECERRIL, N. *et al.* IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. **Archivos de Cardiología de México**, México, v. 71, n. 3: p. 199–205, Jul-Sep. 2001.

HOEPEL, W. *et al.* IgG Subclasses Shape Cytokine Responses by Human Myeloid Immune Cells through Differential Metabolic Reprogramming. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 205, n. 12, p. 3400-3407, Dec. 2020.

KAECH, S. M.; AHMED, R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 5, p. 415–422, May. 2001.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153, n. 11, p. 4948-4958, Dec. 1994.

KINDER, M. *et al.* An Fc engineering approach that modulates antibody-dependent cytokine release without altering cell-killing functions. **mAbs**, Austin, v. 7, n. 3, p. 494–504, 2015.

KRAUTZ, G. M.; KISSINGER, J. C; KRETTLI, A. U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 31–34, Jan. 2000.

LIDLAW, B. J.; CRAFT, J. E.; KAECH, S. M. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 16, n. 2, p. 102–111, Feb. 2016.

LARANJA, F. S. *et al.* Chagas' disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, Dallas, v. 14, n. 6, p. 1035–1060, Dec. 1956.

LAZO, J. E. *et al.* Meningoencefalites toxoplásmica e chagásica em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana: diagnóstico diferencial anatomopatológico e tomográfico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 163–171, Apr. 1998.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Autoimmunity in Chagas heart disease. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 5-6, p.555–561, May. 2001.

LEONY, L. M. *et al.* Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 6, e0007545, Jun. 2019.

LIDANI, K. C. F. *et al.* The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol**, Lausanne, v. 8, p. 607, Apr. 2017.

LONGHI, S. A. *et al.* Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 87, n. 2, p. 267–271, Aug. 2012.

MARTINEZ, S. J.; ROMANO, P. S.; ENGMAN, D. M. Precision Health for Chagas Disease: Integrating Parasite and Host Factors to Predict Outcome of Infection and Response to Therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Lausanne, v. 10, p. 210, May. 2020.

MEDEIROS, C. A. *et al.* Mapping the morbidity and mortality of Chagas disease in an endemic area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 64, n. 5, 2022.

MONTALVÃO, F. *et al.* Antibody Repertoires Identify β -Tubulin as a Host Protective Parasite Antigen in Mice Infected With *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Immunology**. Lausanne, v. 9, p. 671, Apr. 2018.

MORGAN, J. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 355–9, Oct. 1996.

NERY-GUIMARÃES, F. *et al.* Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). **Hospital**, v. 73, p. 1767-1804, 1968.

NEVES, E.G.A. *et al.* T-Cell Subpopulations Exhibit Distinct Recruitment Potential, Immunoregulatory Profile and Functional Characteristics in Chagas versus Idiopathic Dilated Cardiomyopathies. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, Lausanne, v. 9, e. 787423, Feb. 2022.

NIBORSKI, L. L. *et al.* Recombinant antibody against *Trypanosoma cruzi* from patients with chronic Chagas heart disease recognizes mammalian nervous system. **EBioMedicine**, v. 63, e.103206, Jan. 2021.

NISHIKAWA, Y. *et al.* In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington v. 8, n. 4, p. 811, Jul. 2001.

NOIREAU, F.; DIOSQUE P.; JANSEN A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, Paris, v. 40, n. 2, p. 26, Mar-Apr. 2009.

NUNES, M. C. P. *et al.* Chagas cardiomyopathy: an update of current clinical knowledge and management: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. 169–209, Aug. 2018.

OLIVEIRA, J. D.; ALEVI, K. C. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 434–435, May-Jun. 2017.

OLIVERA, V. Levels of anti-B13 antibodies over time in a cohort of chronic infected by *Trypanosoma cruzi*. Its relationship with specific treatment and clinical status. **Acta Tropica**, v. 218, p. 105908, ISSN 0001-706X, Jun. 2021.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, D.C.: PAHO; v. 393, n. 10180, p. 1486-1487, Apr. 2019.

PAN, Q. *et al.* IgG4 Autoantibodies attenuate systemic lupus erythematosus progression by suppressing complement consumption and inflammatory cytokine production. **Frontiers in Immunology**, Laussane, v.11, n. 1047, Jun. 2020.

PEREIRA, K. S. *et al.* Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by Food. In: Advances in Food and Nutrition Research. **Elsevier Inc**, v. 59, p. 63-65, 2010.

PÉREZ-ANTÓN, E. *et al.* Immunological exhaustion and functional profile of CD8+ T lymphocytes as cellular biomarkers of therapeutic efficacy in chronic Chagas patients. **Acta Tropica**, Basel, v. 202, p. 105242, Feb. 2020.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 391, n. 10115, p. 82–94, Jan. 2018.

PINAZO, M.J. *et al.* Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterol Hepatol**, Barcelona, v. 33, n. 3, p. 191–200, Mar. 2010.

PINCETIC, A. *et al.* Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**. New York, v.15, n. 8, p. 707–716, Aug. 2014.

PINTO, A. Y. C.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 454-460, Dec. 2004.

PINTO, J. J. *et al.* Characterization of digestive disorders of patients with chronic Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. **Heliyon**, London, v. 5, n. 2, e01206, Feb. 2019.

PISSETTI, C. W. *et al.* Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p.425-430, Jul-Aug. 2009.

PITTELLA, J. E. H. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 10, p. 973–978, Oct. 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 1, n. 2, p. 92–100, Sep. 2001.

PRIMAVERA, K. S. *et al.* Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2101–2104, Oct. 1988. PUNUKOLLU, G. *et al.* Clinical aspects of the Chagas' heart disease, **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 115, n. 3, Feb. 2007.

RANGEL, D. A. *et al.* Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellificae*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 7: e0007527, Jul. 2019.

RANGEL-GAMBOA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. **Parasites Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 506, Oct. 2019.

RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, New York, v. 23, n. 12, p. 883–889, Dec. 2000.

RAYNER, L. E. *et al.* The Solution Structures of Two Human IgG1 Antibodies Show Conformational Stability and Accommodate Their C1q and FcγR Ligands. **Journal of Biological Chemistry**. Baltimore, v. 290, n. 13, p. 8420–8438, Mar. 2015.

RINGER, A. *et al.* Chagas disease reactivation in rheumatologic patients: association with immunosuppressive therapy and humoral response. **Clinical Rheumatology**. Brussels, v. 40, n. 7, p. 2955-2963, Jul. 2021.

RODRÍGUEZ, E. V. A. *et al.* Understanding CD8+ T Cell Immunity to *Trypanosoma cruzi* and How to Improve It. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 899-917, Nov. 2019.

ROMANO, P. S. *et al.* Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **IUBMB Life**, London, v. 64, n. 5, p. 387–396, May. 2012.

- SÁ FERREIRA, J. A. *et al.* Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas' disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 266-270, May. 1983.
- SALLUSTO, F. Heterogeneity of human CD4⁺ T Cells against microbes. **Annual Review of Immunology**. Palo Alto, v. 34, p. 317–334, May. 2016.
- SANMARCO, L. M. *et al.* IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8⁺ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**. Lausanne, v. 7: p. 626, Dec. 2016.
- SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, v. 14, n. 8:e0008445, Aug. 2020.
- SANTOS, E. F. *et al.* Assessment of Liaison XL Murex Chagas diagnostic performance in blood screening for Chagas disease using a reference array of chimeric antigens. **Transfusion**, Arlington, v. 61, n. 9, p. 2701–2709, Sep. 2021.
- SANTOS, E. F. *et al.* Performance of Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens in Serological Screening for Chagas Disease in Blood Banks. **Frontiers in Medicine**. v. 9, p. 852-864, Mar. 2022.
- SANTOS, F. *et al.* Eco-epidemiology of vectorial *Trypanosoma cruzi* transmission in a region of northeast Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 225, Jan. 2022.
- SANTOS, F. L. N. *et al.* Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease - a Phase II study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco v. 11, n. 3, e0005433, Mar. 2017.
- SANTOS, F. L. N. *et al.* Highly Accurate Chimeric Proteins for the Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: A Latent Class Analysis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, v. 99, n. 5, p. 1174–1179, Nov. 2018.
- SANTOS, F. L. N. *et al.* Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2934-2945, JCM.00851-17, Oct. 2017.
- SANTOS, F. L. *et al.* Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 8:e01611002016, Aug. 2016.
- SIMPSON, T. R. *et al.* Fc dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 210, n. 9, p. 1695-1710, Aug. 2013.
- SHIKANAI-YASUDA, M. P. *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 351–357, Sep-Oct. 1991.

SILVA, E. D. *et al.* Development of a new lateral flow assay based on IBMP-8.1 and IBMP-8.4 chimeric antigens to diagnose Chagas disease. **Biomed Research International**, v. 1, p. 1-9, Aug. 2020.

SKYLLOURIOTIS, P. *et al.* IgG subclass reactivity to human cardiac myosin in cardiomyopathy patients is indicative of a Th1-like autoimmune disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 115, n. 2: p. 236–247, Dec. 1999.

SOUSA, G. R. *et al.* The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: high level is correlated with better left ventricular function. **PLoS ONE**, v. 12:e0172833, Mar. 2017.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 8, e1749, Aug. 2012.

TORRICO, F. *et al.* Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 2, p.201–209, Feb. 2004.

VAN DEN HOOGEN, P. *et al.* Increased circulating IgG levels, myocardial immune cells and IgG deposits support a role for an immune response in pre- and end-stage heart failure. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 23, n. 11, p. 7505-7516, Nov. 2019.

VASCONCELOS, R. H. T. *et al.* Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. **Human Immunology**, New York, v. 71, n. 10, p. 964–967, Oct. 2010.

VASCONCELOS, R. H. T. *et al.* Immunoglobulin M antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. **Human Immunology**, New York, v. 72, n. 5, p. 402–405, May. 2011.

VERÇOSA, A. F. A. *et al.* Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 21, n. 5, p. 271–276, Sep. 2007.

VILLALOBOS, G. *et al.* Prevalence and Epitope Recognition of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies in Two Procyonid Species: Implications for Host Resistance. **Pathogens**, Basel, v. 9, n. 6, p. 464, Jun. 2020.

WANG, W. *et al.* Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 17, n. 1: e1009254, Jan. 2021.

WHITE, A. L. *et al.* Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 27, n. 1, p. 138-148, Jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **The Weekly Epidemiological Record**; Genève, v. 90, n. 6, p. 33–44, Feb. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas in the Americas for Public Health Workers; 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2019. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/news/Chagas-Preventing-mother-to-child-transmission/en/>.

WORTEL, C. M.; HEIDT, S. Regulatory B cells: phenotype, function and role in transplantation. **Transplant Immunology**, Dunton Green, v. 41, p. 1–9, Mar. 2017.