

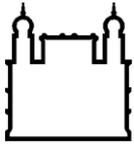
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**DOSAGEM DE CITOCINAS E TITULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA IGG ANTI-  
*TRYPANOSOMA CRUZI* ENTRE EXTRATIVISTAS DA PIAÇAVA NO MÉDIO RIO  
NEGRO-AMAZÔNIA**

**EVANDRO DA ROCHA DIAS**

Rio de Janeiro  
Agosto de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**EVANDRO DA ROCHA DIAS**

**Dosagem de citocinas e titulação de imunoglobulina IgG anti-*Trypanosoma cruzi* entre extrativistas da piaçava no médio Rio Negro-  
Amazônia**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Medicina Tropical).

**Orientador (es):** Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira  
Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

**RIO DE JANEIRO**  
Agosto de 2018

Dias, Evandro da Rocha.

Dosagem de citocinas e titulação de imunoglobulina IgG anti-*Trypanosoma cruzi* entre extrativistas da piaçava no médio Rio Negro-  
Amazônia / Evandro da Rocha Dias. - Rio de Janeiro, 2018.

132 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Medicina Tropical, 2018.

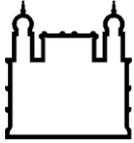
Orientadora: Angela Cristina Verissimo Junqueira.

Co-orientador: Pedro Hernan Cabello Acero.

Bibliografia: f. 83-96

1. Citocinas. 2. Doença de Chagas. 3. Piaçaval. 4. Rio Negro. 5.  
Amazônia. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: EVANDRO DA ROCHA DIAS**

**DOSAGEM DE CITOCINAS E TITULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA  
IGG ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* ENTRE EXTRATIVISTAS DA  
PIAÇAVA NO MÉDIO RIO NEGRO-AMAZÔNIA**

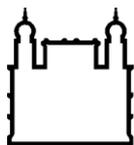
**ORIENTADOR (ES): Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira  
Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero**

**Aprovada em: 02/08/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana de Meis – Presidente (IOC)**  
**Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC)**  
**Prof. Dr. Alejandro Marcel Hasslocher Moreno (INI)**  
**Prof. Dr. Adeilton Alves Brandão – Suplente (IOC)**  
**Prof. Dr. David William Provance Junior – Suplente (CDTS)**

Rio de Janeiro, 02 de agosto de 2018.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**A Barcelos, cidade menina.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por suportar e compreender cada momento de ausência e reclusão devido às aulas, às viagens e ao estresse inerentes à vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro por meio de bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), Amanda, Cristina, Laura e Maria José, pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Coura pela paciência e investimento na realização desta pesquisa e por sua preocupação manifestada, tanto por meio de telefonemas, enquanto eu estava no Amazonas e ele no Rio de Janeiro, quanto por encontros na sede do instituto.

Ao Dr. Hugo Caire pela atenção e posição durante todo o processo dessa dissertação, desde sua elaboração até sua conclusão, sem medir esforços, mesmo quando suas condições de saúde estavam comprometidas. Por sua paciência e atenção, concedendo sugestões e orientações por vários meios, tanto quando eu estava próximo ao seu laboratório quanto durante o período que eu estava em campo a quilômetros de distância.

Ao Edson Fernandes, gerente da Plataforma Tecnológica PDTIS-Luminex, por sua disponibilidade em realizar os testes de citocinas, armazenar as amostras e esclarecer minhas dúvidas.

Ao Júlio César, técnico do LDP, pela realização dos testes sorológicos e esclarecimento sobre os procedimentos.

Ao José Nogueira por sua atenção e ajuda na organização das amostras para os testes sorológicos.

À Marizete, do Instituto Leônidas, e Maria Deane por sua paciência e suporte logístico no encaminhamento das amostras para o Rio de Janeiro.

Ao Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) pelo custeio de material para coleta e armazenamento das amostras.

Ao Dr. João Marcos Benfica e sua equipe do Hospital Universitário Francisca Mendes-AM pela avaliação dos exames ECG, emissão dos laudos e esclarecimento de dúvidas.

Ao senhor Vanir Quintanilha Lamarão por sua atenção e suporte no serviço de encadernação.

Aos amigos colaboradores conquistados no município de Barcelos. Como são muitos para mencionar aqui, aponto suas unidades: Secretaria Municipal de Saúde, Secretaria Municipal de Educação, Unidade Mista Hospitalar de Barcelos, Distrito Sanitário Especial Indígena do Alto Rio Negro, Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami, Fundação Nacional do Índio, Fundação de Vigilância em Saúde, Cooperativa dos Piaçabeiros, 3º Batalhão de Infantaria de Selva, Pousada Água Negra e Unidades Básicas de Saúde dos bairros Aparecida, São Francisco e São Sebastião.

Às líderes comunitárias, dona Leonora, Isabel e dona Maria do Rosário, por toda atenção dispensada e acolhimento nas comunidades de Nova Jerusalém, Tapera e Piloto, respectivamente, bem como pelo auxílio, incentivando os moradores dessas comunidades a participar do estudo e organizando o atendimento.

Ao Edson Costa (Edinho) pelo suporte no recrutamento de participantes, na aplicação de questionário e na coleta sanguínea.

À Edvalda pelo suporte na aplicação dos questionários.

À Ivone e à Milka pela realização dos eletrocardiogramas.

Ao Hospital Geral de Barcelos por nos ceder espaço para trabalharmos e disponibilizar aparelho para realização dos ECG.

Aos médicos do 3º Batalhão de Infantaria de Selva, Drs. Regina Zlot, Simone Louro, André Tunes de Paula e Alberto Cerqueira, pelo transporte e atendimento médico dos participantes da pesquisa.

À Pousada Água Negra por nos oferecer condições especiais para hospedagem.

Aos momentos de descanso convertidos em lazer, que amenizaram a saudade e a distância da família, proporcionados por Edinho, Edvalda, Leônidas, Vicência, Branca, Vanilson, Leonilson, Marina, Micael e Sebastian.

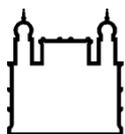
Ao senhor Gomes, taxista de Manaus, por nos atender em todas as solicitações.

À Dra. Juliana de Meis pela revisão da dissertação, sugestões e contribuições.

Por fim, mas em hipótese alguma menos importante, aos meus orientadores, Dr. Pedro Cabello e Dra. Angela Junqueira, pela paciência que se mostrou infinita comigo, mesmo nas situações em que, reconhecidamente, eu não me aturaria.

**"Não vai demorar que passemos  
adiante uma grande e bela ciência, que  
faz arte em defesa da vida."**

**Carlos Chagas (1928)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### DOSAGEM DE CITOCINAS E TITULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA IGG ANTI- *TRYPANOSOMA CRUZI* ENTRE EXTRATIVISTAS DA PIAÇAVA NO MÉDIO RIO NEGRO-AMAZÔNIA

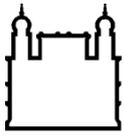
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Evandro da Rocha Dias

Mediadoras da resposta imune, as citocinas apresentam diferentes padrões de expressão conforme os estágios de infecção e quadros clínicos da doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao humano pelo triatomíneo. Diante disso, este estudo buscou quantificar os níveis plasmáticos das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  e da quimiocina IL-8 em um grupo de extrativistas da piaçava, cuja palmeira é ecótopo de triatomíneos, visto que essa é uma das principais fontes de economia na Região do Rio Negro, Amazônia. Para isso, foi tomada uma amostragem de 513 habitantes do município de Barcelos, dos quais 448 são extrativistas e 65 não são extrativistas, para fins comparativos. A pesquisa de IgG para *Trypanosoma cruzi*, realizada por técnicas de Imunofluorescência Indireta e Ensaio Imunoenzimático, apresentou 8% (45) de positividade. Análises estatísticas mostraram aumento significativo ( $p=0,021$ ) dos níveis de IL-10 em relação ao tempo de exposição, com média de 53,15 pg/ml entre os participantes expostos por até 10 anos. Indivíduos IgG positivos apresentaram níveis significativamente mais baixos de IFN- $\gamma$  ( $p=0,021$ , média=27,74 pg/ml) e aumento de IL-8 ( $p=0,032$ , média=95,93 pg/ml) comparados aos negativos. Por outro lado, IL-6 esteve em maiores concentrações entre os participantes com alteração eletrocardiográfica ( $p=0,019$ , média=34,48) em comparação aos não alterados. Na amostragem, 115 participantes apresentaram alterações eletrocardiográficas, envolvendo alterações do ritmo cardíaco (30%), alterações na repolarização ventricular (45%), bloqueios intraventriculares (24%) e sobrecarga das câmaras cardíacas (13%). A avaliação médica diagnosticou dois participantes soropositivos do grupo extrativista com cardiomegalia. Eles receberam cuidados médicos, mas foram a óbito posteriormente. Não há relatos de estudos de citocinas na Região do Rio Negro, e nossos resultados diferem dos estudos realizados por outros pesquisadores em outras localidades, inclusive brasileiras. Dessa forma, aponta-se a necessidade da ampliação do estudo comparativo do perfil de expressão de citocinas plasmáticas entre indivíduos expostos e não expostos à infecção, comparando os resultados sorológicos, eletrocardiográficos e manifestações clínicas no Rio Negro, Amazonas.

**Palavras-chave:** Citocinas. Doença de Chagas. Piaçabal. Rio Negro. Amazônia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CYTOKINES' DOSAGE AND TITULATION OF IMMUNOGLOBULIN IGG ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* IN PIAÇAVA'S FIBER EXTRATIVISTS AT MEDIO RIO NEGRO-AMAZONIA

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Evandro da Rocha Dias

Mediators of the immune response, cytokines present different expression patterns according to the stages of infection and clinical signs of Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* and transmitted to humans by triatomines. Therefore, this study aimed to quantify the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$  and chemokine IL-8 plasma levels in a group of piassava's extractivists, whose palm tree is triatomine's ecotope, one of the main sources of economy in Rio Negro region, Amazon. For that, a sample of 513 inhabitants of the municipality of Barcelos was taken, of which 448 extractivists and 65 non-extractivists, for comparative purposes. The IgG test for *Trypanosoma cruzi*, performed by Indirect Immunofluorescence and Immunoenzymatic Assay techniques, presented 8% (45) of positivity. Statistical analyzes showed a significant increase ( $p = 0.021$ ) of IL-10 levels in relation to the exposure time, with an average of 53.15 pg/ml among participants exposed for up to 10 years. Positive IgG subjects had presented significantly lower IFN- $\gamma$  levels ( $p = 0.021$ , average = 27.74 pg/ml) and increased IL-8 ( $p = 0.032$ , average = 95.93 pg/ml) compared to the negative ones. On the other hand, IL-6 was in higher concentrations among participants with electrocardiographic alteration ( $p = 0.019$ , average = 34.48) compared to non-altered ones. In the sample, 115 participants had electrocardiographic alterations involving changes in heart rate (30%) and supraventricular (3%), changes in ventricular repolarization (45%), intraventricular blocks (24%) and cardiac chamber overload. (13%). The medical evaluation diagnosed two seropositive participants in the extractive group with cardiomegaly. They received medical care, but later died. There are no reports of cytokine studies in the Rio Negro region and our results differ from studies conducted by other researchers in other localities, including in Brazil. Thus, the need to expand the comparative study of the expression profile of plasma cytokines among individuals exposed and not exposed to the infection is necessary, comparing the serological, electrocardiographic results and clinical manifestations in Rio Negro, Amazonas.

**Keywords:** Cytokines. Chagas disease. Piaçabal. Rio Negro. Amazon.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Doença de Chagas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 O agente etiológico da doença de Chagas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Vias de transmissão do <i>trypanossoma cruzi</i></b> .....	<b>3</b>
1.3.1 Transmissão vetorial.....	3
1.3.2 Infecção oral .....	5
<b>1.4 Prevalência da doença de Chagas</b> .....	<b>7</b>
1.4.1 Doença de Chagas no Brasil .....	10
1.4.2 Doença de Chagas na Amazônia Brasileira .....	11
1.4.3 Diagnóstico da doença de Chagas .....	13
1.4.4 Testes realizados em casos suspeitos de infecção aguda .....	15
1.4.4.1 <i>Teste sorológico</i> .....	15
1.4.4.2 <i>Teste parasitológico direto</i> .....	16
1.4.4.3 <i>Teste molecular</i> .....	17
1.4.4.4 <i>Western blot</i> .....	17
1.4.5 Testes realizados em casos suspeitos de infecção crônica.....	18
1.4.5.1 <i>Testes sorológicos</i> .....	18
1.4.5.2 <i>Exame parasitológico indireto</i> .....	19
1.4.5.3 <i>Teste xenodiagnóstico para detecção do t. cruzi</i> .....	20
1.4.5.4 <i>Técnica de hemocultura</i> .....	20
1.4.5.5 <i>Xenocultura para detecção de t. cruzi</i> .....	21
1.4.5.6 <i>Reação em cadeia da polimerase - PCR</i> .....	21
<b>1.5 Fases da doença de Chagas</b> .....	<b>21</b>
1.5.1 Fase aguda .....	21
1.5.2 Fase crônica .....	22
<b>1.6 Resposta imunológica na infecção por <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>23</b>
<b>1.7 Variabilidade genética como fator de risco para doença de Chagas</b> .....	<b>27</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>

<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b>	<b>30</b>
3.1	Hipótese nula.....	30
3.2	Hipótese alternativa .....	30
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
4.1	Objetivo geral.....	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
5.1	Desenho do estudo .....	32
5.2	Amostragem estudada.....	32
5.2.1	Critério de inclusão .....	33
5.2.2	Critério de exclusão .....	34
5.3	Aplicação de questionário.....	34
5.4	Exame eletrocardiográfico .....	34
5.5	Exame clínico.....	35
5.6	Coleta e processamento da amostra sanguínea .....	35
5.6.1	Transporte do material para o Laboratório de Doenças Parasitárias no Rio de Janeiro.....	36
5.6.2	Armazenamento do material nas dependências do laboratório.....	36
5.7	Pesquisa sorológica (IGG) <i>anti-trypanosoma cruzi</i> .....	36
5.7.1	Técnica de Imunofluorescência Indireta .....	36
5.7.2	Ensaio Imunoenzimático.....	39
5.8	Ensaio da concentração de citocinas plasmáticas .....	42
5.9	Armazenamento dos dados.....	43
5.10	Análises estatísticas .....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
6.1	Análise descritiva do universo amostral.....	44
6.2	Sorologia (IGG) <i>anti-trypanosoma cruzi</i> pela técnica de imunofluorescência indireta.....	48
6.3	Sorologia (IGG) <i>anti-trypanosoma cruzi</i> pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	50
6.4	Análise dos eletrocardiogramas .....	54

6.6	Quantificação de citocinas plasmáticas.....	60
7	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
7.1	Análise descritiva do universo amostral.....	71
7.2	Análise dos eletrocardiogramas .....	73
7.3	Sorologia (IGG) <i>anti-trypanosoma cruzi</i> .....	75
7.4	Descrição dos resultados do exame clínico .....	76
7.5	Quantificação de citocinas plasmáticas.....	77
8	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS</b>	<b>80</b>
9	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>81</b>
10	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>82</b>
11	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>
12	<b>ANEXOS</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>98</b>
	<b>ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>101</b>
	<b>ANEXO D – QUESTIONÁRIO</b>	<b>103</b>
	<b>ANEXO E – FICHA MÉDICA</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO F – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BARCELOS</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXO G – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA UNIDADE MISTA DE BARCELOS</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXO H – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA FUNAI- BARCELOS-AM</b>	<b>109</b>
	<b>ANEXO I – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO DSEI-ARN</b>	<b>110</b>
	<b>ANEXO J – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO DSEI-YANOMAMI</b>	<b>111</b>
	<b>ANEXO K – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA FVS-AMAZONAS</b>	<b>112</b>
	<b>ANEXO L – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO 3ºBIS</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.....	2
Figura 2 – Distribuição de casos de infecção por <i>T. cruzi</i> segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde – 2006 – 2009. ....	9
Figura 3 – Representação das curvas de parasitemia, imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) nas fases aguda e crônica da infecção por <i>T. cruzi</i> ....	14
Figura 4 – Imunidade inata e adquirida durante infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
Figura 5 – Exemplo de uma amostra com IgG positivo apresentada por técnica de Imunofluorescência indireta .....	39
Figura 6 – Visualização de reações de amostras em placa de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG .....	41
Figura 7: Titulação de IgG anti <i>T. cruzi</i> por ELISA conforme o tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM .....	52
Figura 8 – Titulação de IgG comparada à idade do indivíduo (Região do Médio Rio Negro-AM) .....	53
Figura 9 – Concentração de citocinas comparada entre indivíduos expostos e não expostos à infecção vetorial por <i>T. cruzi</i> em áreas de piaçaval na Região do Médio Rio Negro-AM.....	61
Figura 10 – Concentrações de citocinas conforme faixa de tempo de exposição vetorial por <i>T. cruzi</i> na Região Médio do Rio Negro-AM.....	64
Figura 11 – Concentrações de citonas plasmáticas comparada entre indivíduos masculinos e femininos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM.....	65
Figura 12 – Dosagem de citocinas comparada à sorologia IgG anti- <i>T. cruzi</i> entre a população do Médio Rio Negro-AM .....	66

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Compilação de casos de transmissão oral do <i>T. cruzi</i> no Brasil ocorridos entre o ano de 1965 e 2018. ....	6
Quadro 2 – Estimativa de prevalência da doença de Chagas no Brasil no período de 1975 a 1980 .....	10
Quadro 3 – Representação resumida da fonte celular e funções das citocinas selecionadas para esse estudo.....	25
Quadro 4 – Apresentação de alguns genes polimórficos que possam atuar sobre a infecção por <i>T. cruzi</i> e sobre a progressão para quadros de CCC (cardiopatía chagásica crônica).....	28
Quadro 5 – Categorização das alterações eletrocardiográficas apresentadas pelos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM .....	55
Quadro 6 – Síntese dos resultados observados referentes à concentração de citocina plasmática da população do Médio Rio Negro-AM.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Casos confirmados de doença de Chagas aguda no Brasil por Região de notificação. Período: 2006-2018.....	11
Tabela 2 – Descrição da amostragem estudada na Região do Médio Rio Negro-AM quanto ao gênero (masculino e feminino) e média de idade .....	44
Tabela 3 – Descrição da amostragem definida por faixa-etária e gênero, destacando a faixa com maior percentual na população estudada na Região do Médio Rio Negro-AM .....	44
Tabela 4 – Cor autodeclarada pelos participantes, mensurada por gêneros masculino e feminino na Região do Médio Rio Negro-AM .....	45
Tabela 5 – Classificação dos participantes por etnia na Região do Médio Rio Negro-AM .....	45
Tabela 6 – Classificação por gênero entre expostos e não expostos à infecção por <i>T. cruzi</i> em área de extrativismo de produtos de palmeira na Região do Médio Rio Negro-AM .....	46
Tabela 7 – Distribuição de tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM, classificada por faixa com intervalo de 10 anos até a faixa de 41 a 50.....	46
Tabela 8 – Análise de relação entre o fator exposição e o risco de ser picado por triatomíneos na Região do Médio Rio Negro-AM .....	47
Tabela 9 – Média de picadas por triatomíneos dentro das faixas de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM.....	47
Tabela 10 – Análise de relação entre o fator exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a sorologia IgG pela técnica de imunofluorescência indireta .....	48
Tabela 11 – Análise de prevalência de sorologia IgG pela técnica de imunofluorescência indireta entre indivíduos “picados” por triatomíneos na Região do Médio Rio Negro-AM.....	49
Tabela 12 – Correlação entre o tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a prevalência de amostras com IgG positiva pela técnica de imunofluorescência indireta.....	49
Tabela 13 – Análise de relação entre a faixa etária e a prevalência de amostras reagentes à técnica de IFI na Região do Médio Rio Negro-AM .....	50
Tabela 14 – Análise de relação entre o fator exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a reação ao ELISA para <i>T. cruzi</i> .....	50

Tabela 15 – Análise da influência da picada por triatomíneo na Região do Médio Rio Negro-AM sobre o resultado de ELISA .....	51
Tabela 16 – Análise de relação entre o tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a sorologia IgG anti- <i>T. cruzi</i> .....	51
Tabela 17 – Titulação de IgG por ELISA: média comparada à faixa de tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM .....	52
Tabela 18 – Análise de relação entre a faixa etária e a reação ao ELISA para <i>T. cruzi</i> na população da Região do Médio Rio Negro-AM .....	53
Tabela 19 – Análise de resultado do teste ELISA comparado ao número de agravos apresentados pelo participante na Região do Médio Rio Negro-AM ...	54
Tabela 20 – Análise de relação entre o gênero e alterações eletrocardiográficas dos moradores na Região do Médio Rio Negro-AM.....	54
Tabela 21 – Arritmias cardíacas entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM .....	55
Tabela 22 – Alterações do ritmo supraventricular entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM.....	56
Tabela 23 – Arritmias ventriculares apresentadas pelos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM.....	56
Tabela 24 – Alteração da repolarização ventricular entre moradores da Região do Médio Rio Negro-AM.....	56
Tabela 25 – Bloqueios intraventriculares apresentadas pelos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM.....	57
Tabela 26 – Análise de sobrecarga das câmaras cardíacas apresentadas pelos participantes na Região do Médio Rio Negro-AM .....	57
Tabela 27 – Análise de relação entre o fator exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e alterações no ECG .....	57
Tabela 28 – Comparação dos resultados do eletrocardiograma com a sorologia IgG anti- <i>T. cruzi</i> entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM .....	58
Tabela 29 – Alterações eletrocardiográficas apresentadas entre os participantes com sorologias IgG positiva e negativa para <i>T. cruzi</i> , moradores da Região do Médio Rio Negro-AM.....	58
Tabela 30 – Média da pressão arterial (sistólica e diastólica) dos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM comparada entre gênero, exposição e sorologia IgG anti- <i>T. cruzi</i> .....	59

<b>Tabela 31 – Caracterização dos indivíduos considerados hipertensos (PAS &gt; 140 mmHg e/ou PAD &gt; 90 mmHg) na Região do Médio Rio Negro-AM .....</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 32 – Média de concentração de citocinas (pg/ml) nos grupos exposto e não exposto à infecção vetorial por <i>T. cruzi</i> na Região do Médio Rio Negro-AM .....</b>	<b>60</b>
<b>Tabela 33 – Análise de significância estatística do tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e da concentração média de citocinas.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 34 – Comparação de médias (pg/ml) de citocinas plasmáticas entre os grupos masculino e feminino moradores da Região do Médio Rio Negro-AM..</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 35 – Comparação das médias na dosagem de citocinas da população do Médio Rio Negro-AM mediante sorologia IgG .....</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 36 – Comparação das concentrações de citocinas entre indivíduos “picados” e não “picados” por triatomíneos na Região do Médio Rio Negro-AM .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 37 – Concentração de citocinas entre os grupos com ECG normal e alterado na população do Médio Rio Negro-AM.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 38 – Análise estatística da concentração de citocinas entre os participantes com e sem histórico de Malária, moradores da Região do Médio Rio Negro-AM .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 39 – Concentração de citocinas entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM, com e sem histórico de Leishmaniose Tegumentar Americana</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 40 – Concentração de citocinas entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM que relataram dengue e aqueles que negaram a doença. ....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

No ano de 1909, o pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas descreveu a doença de Chagas (DCh), que foi observada no município de Lassance no estado de Minas Gerais. Essa era uma “nova” doença causada por um inseto hematófago que atacava o povo daquela região durante a noite. Chagas também apontou o agente etiológico da DCh, o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; DIAS, 1940). A DCh foi então definida como uma infecção parasitária, provocada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e transmitida por vetores triatomíneos, também conhecidos popularmente como “barbeiro, bicudo, chupança, furão”, entre outros, dependendo da região geográfica (DIAS, 1940).

A evolução clínica natural da doença apresenta duas fases bem definidas: a aguda e a crônica (TORRES, 1941). Sua gravidade e evolução dependem da idade do doente, da cepa infectante, da via de transmissão e da existência de outras doenças que levam à imunossupressão, como a co-infecção *T. cruzi*/HIV (MADY *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1997; DEVERA *et al.*, 2002; ALBUQUERQUE, 2013).

Coura (2003) sugere que a reinfecção exerça papel importante, induzindo as formas mais graves da doença, uma vez que indivíduos residentes em áreas endêmicas evoluem para quadros mais graves que aqueles não residentes. Contudo, ainda são necessários novos estudos em torno dessa afirmativa.

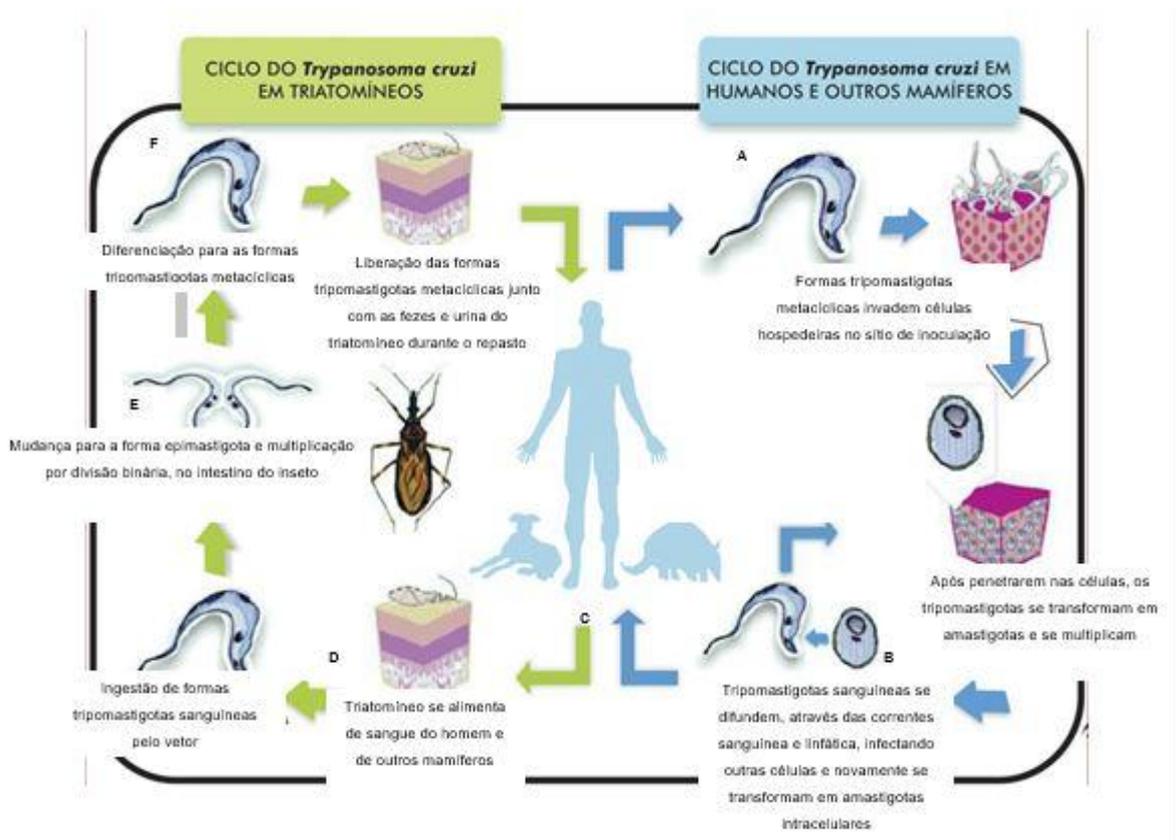
## 1.2 O agente etiológico da doença de Chagas

O agente etiológico da DCh, como comentado anteriormente, é o *T. cruzi*. Esse parasito apresenta diferentes formas durante seu ciclo de vida, que pode ocorrer no hospedeiro vertebrado ou invertebrado (CHAGAS, 1909; ROMAÑA; MEYER, 1942).

As quatro principais formas do parasito são: amastigota (forma de multiplicação em tecidos do hospedeiro); tripomastigota metacíclico (infectante, encontrado no inseto vetor); tripomastigota sanguínea (encontrado no sangue do hospedeiro mamífero) e epimastigota (forma de multiplicação no vetor) (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

O ciclo biológico (Figura 1) desse protozoário é apresentado da seguinte forma: quando o triatomíneo infectado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado (mamífero), elimina, em suas fezes e urina, o parasito na forma tripomastigota metacíclica. Ao ter como porta de entrada o tecido epitelial lesionado ou mucosa íntegra, o parasito chega à corrente sanguínea, infectando macrófagos, fibroblastos, células musculares esqueléticas, epiteliais e neuronais (CASTRO, 2016). Na célula parasitada, o *T. cruzi* passa para o estágio amastigota, multiplicando-se binariamente. Saturando a célula, o protozoário sofre nova mudança, passa para a forma tripomastigota sanguínea, rompe a célula hospedeira e ganha a corrente sanguínea, podendo infectar outros órgãos e tecidos. Quando o parasito, na forma tripomastigota sanguínea, é ingerido pelo triatomíneo, continua seu ciclo no vetor (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

**Figura 1 – Representação do ciclo biológico do *T. cruzi* no inseto vetor e no hospedeiro mamífero**



Pela via clássica de infecção (vetorial), o tripomastigota metacíclico (A) parasita a célula do hospedeiro, assumindo a forma amastigota (B). Na célula hospedeira, amastigotas multiplicam-se, passam para a forma tripomastigota, saturando e evadindo, chegando às correntes sanguínea e linfática (C), infectando novas células. Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere o tripomastigota (D) que, chegando ao intestino do inseto, transforma-se em epimastigota. Por divisão binária, as formas epimastigota se multiplicam (E) e transformam-se em tripomastigota metacíclico (F), forma infectante, excretada junto às fezes e urina do inseto. Adaptado de Castro (2016).

Fonte: Jesus *et al.* (2015) apud Castro (2016). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

### 1.3 Vias de transmissão do *trypanossoma cruzi*

As principais vias de transmissão do *T. cruzi* conhecidas no Brasil são: vetorial e oral (DIAS *et al.*, 2016).

#### 1.3.1 Transmissão vetorial

A transmissão vetorial ocorre através do repasto sanguíneo do triatomíneo hematófago. Enquanto se alimenta do sangue humano, o triatomíneo excreta o parasito na forma tripomastigota, que é levado ao local da lesão ou à mucosa pelo ato de coçar (REY, 2001).

Manifestações macroscópicas, caracterizadas por edemas endurecidos e eritematosos, podem ser observadas na porta de entrada do parasito. Quando o sítio de inoculação é a conjuntiva, manifesta-se o Sinal de Romana, classicamente em crianças. Trata-se de um edema palpebral unilateral, decorrente de uma reação de hipersensibilidade, que tende a regredir em até dois meses (TALICE *et al.*, 1952; ALBAJAR, 2003).

Atualmente, são conhecidas, aproximadamente, 152 espécies de triatomíneos, sendo 62 identificadas no Brasil (SILVA *et al.*, 2017). Esses insetos vivem associados a abrigos de animais silvestres ou ao peridomicílio, como: chiqueiros, galinheiros, depósitos, palmeiras e troncos de árvores (CHAGAS, 1909; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018).

Na década de 1970, a espécie triatomínea *T. infestans* (*Triatoma infestans*) foi considerada a principal responsável pela transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. Nessa época, o inseto podia ser encontrado em domicílios de 700 municípios, distribuídos em 12 estados brasileiros, causando 100.000 novos casos ao ano (ROSSI, 2014). Atualmente, essa espécie já não é mais endêmica no Brasil graças ao controle por meio de inseticidas, movido pelo Programa Nacional de Controle da doença de Chagas, ocorrido entre os anos de 1975 e 1983. No ano 2011, *T. infestans* foi encontrado em apenas dois estados brasileiros, Bahia e Rio Grande do Sul (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Existe uma grande variedade de espécies de triatomíneos no Brasil, distribuída em todo o território, sendo que a maior parte foi encontrada nos estados da Bahia, Mato Grosso, Pará, Minas Gerais, Tocantins, Maranhão, Mato Grosso do Sul e Goiás. Em um levantamento da distribuição geográfica de triatomíneos, no

qual 3.563 exemplares foram observados, 37% (1.336) eram constituídos por *Panstrongylus megistus*, distribuídos entre 21 estados e o Distrito Federal (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Considerando que, no momento, não haja meio de proteção vacinal contra a DCh e que o tratamento seja mais eficaz na fase aguda ou inicial da doença, a melhor medida a ser tomada é a adoção de controle e de vigilância vetorial, visando detectar a presença do inseto e prevenir a formação de suas colônias domiciliares. Dessa forma, seria amenizado o risco de infecção por triatomíneos domiciliados (DIAS *et al.*, 2001; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2018).

O controle vetorial é realizado com o emprego de ações que se complementam (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014), tais como atividades educativas, pesquisa passiva, pesquisa ativa, controle químico e manejo ambiental. As ações educativas consistem no envolvimento e participação da comunidade. A pesquisa passiva integra a notificação da presença dos triatomíneos nas residências. Contando com apoio institucional, recomendando-se que cada localidade tenha um Posto de Identificação de Triatomíneos (PIT), preferencialmente, em unidades de saúde, escolas e comunidades. Já a pesquisa ativa envolve a busca por vetores, na qual pode ser empregado o controle químico, procedimento utilizado desde a década de 1940 que evita o contato do vetor com o homem (SILVEIRA; DIAS, 2011).

Por sua vez, o manejo ambiental prevê a melhoria das condições de habitação, impedindo o abrigo de triatomíneos nas residências (DIAS *et al.*, 2016). Nesse propósito, foi promovido o Programa de Melhorias Habitacionais para o Controle da Doença de Chagas (PMHCDCh), que investe na restauração e reconstrução das moradias por iniciativa da Fundação Nacional de Saúde. O programa oferece fomento tanto para reforma quanto para reconstrução do domicílio (BRASIL, 2013).

Com relação à domiciliação do triatomíneo, de acordo com Coura (2003), no período de ciclo da mineração no Brasil (século XVII), quando ocorria pouco desmatamento, não havia evidências de adaptação de triatomíneos ao domicílio. Essa adaptação ocorreu a partir dos ciclos da agricultura e da pecuária uma vez que se intensificaram os desmatamentos. Nesse contexto, é possível sugerir que alterações na paisagem natural, como o desmatamento, restringem as fontes alimentares dos triatomíneos, estimulando esses insetos a procurar novas fontes de

alimentação, como o homem e o animal doméstico, e a colonizar domicílios (COURA; PEREIRA, 2010).

### 1.3.2 Infecção oral

Essa via de infecção tem sido reportada, principalmente, na Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa, Bolívia, Argentina, Equador e Brasil. Alguns sucos, como o de bacaba, açaí, caldo de cana e goiaba têm sido identificados como veículo de transmissão. Além disso, o consumo de carne de caça malcozida, como a do tatu e da mucura, também tem sido atribuído à infecção oral (SILVA *et al.*, 1968; FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017).

Em alguns casos, durante o preparo do alimento, como o suco do açaí ou caldo de cana, o triatomíneo é triturado junto com a fruta. Dessa forma, o concentrado de parasito a ser ingerido é muito maior que aquele que infecta o humano em decorrência das excretas do inseto durante o repasto, o que justifica a exacerbação de sintomas em casos de infecção oral (COURA, 2015). Os sintomas envolvidos nessa via de infecção incluem febre, dor de cabeça, tosse, dor abdominal, edema de membros inferiores, edema de face, mialgia, hemorragia, meningoencefalite e miocardite (RUEDA *et al.*, 2014; PINTO, 2006; SANTOS *et al.*, 2018).

A infecção oral geralmente ocorre em situações de surto, e o período de incubação varia de 3 a 22 dias (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018). De acordo com o Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net, 1.978 casos foram notificados, no período de 2007 a 2018, com provável transmissão oral. Desse total, 1.925 (97%) concentram-se na Região Norte brasileira (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVO DE NOTIFICAÇÃO, 2016). Contudo, esse número pode estar subnotificado devido à falta de diagnóstico e registro.

Ferreira, Branquinho e Leite (2014) apontam 529 casos de DCh aguda ocasionados por transmissão oral no território brasileiro no período entre 1965 e 2010, corroborando Toso, Vial e Galanti (2011) em seus estudos de revisão e demonstrando a transmissão oral como uma via importante no Brasil (Quadro 1).

**Quadro 1 – Compilação de casos de transmissão oral do *T. cruzi* no Brasil ocorridos entre o ano de 1965 e 2018.**

Região/Localidade	Nº de casos	Ano	Referência
Teotônia-RS	17	1965	Silveira (2006)
Catolé do Rocha-PA	26	1986	Valente, Valente e Pinto (2006); Shikanai-Yasuda <i>et al.</i> (1991); Shikanai-Yasuda <i>et al.</i> (2006)
Santa Catarina	24	2005	Valente, Valente e Pinto (2006); Steindel <i>et al.</i> (2008)
Acre	3	1968-2005	Valente, Valente e Pinto (2006)
Amapá	61		Silveira (2006)
Amazonas	9		Valente, Valente e Pinto (2006)
Pará	217		Valente, Valente e Pinto (2006)
Norte (generalizado)	182	2006-2007	Pereira <i>et al.</i> (2009)
Mato Grosso	4	2000-2013	Brasil (2014)
Roraima	1		
Rondônia	2		
Tocantins	23		
Pará	1.648	2006-2018	Sistema de informação de agravo de notificação (2016)
Amazonas	95	2008-2018	
Rio Grande do Norte	9	2008-2018	

Fonte: Adaptado de Toso, Vial e Galanti (2011).

Atualmente, o cenário epidemiológico da doença de Chagas não apresenta redução de casos (Quadro 2). Conforme dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2016), a doença continua de forma alarmante no Brasil, e a transmissão oral é apontada como a principal provável forma de infecção, responsável por até 73% dos casos notificados no período de 2007 a 2018.

Na Região Amazônica, os primeiros casos de infecção oral foram reportados por Shaw, Lainson e Fraiha (1969). Seus estudos relataram um surto envolvendo três pessoas de uma mesma família em Belém, capital do Pará. Investigações sugeriram que o episódio foi provocado por infecção oral uma vez que não foram encontrados triatomíneos infectados no domicílio. Além disso, apenas um membro da família faleceu em área endêmica (Belo Horizonte – Minas Gerais), mas já havia 20 anos que não retornava à capital mineira.

No estado do Amazonas, houve relatos de surtos de DCh aguda no ano de 2004, no município de Tefé (8 casos), e em 2008, em Coari (25 casos), todos com suspeita de transmissão oral pelo consumo do suco de açaí, assim como em Santa

Isabel do Rio Negro, onde 14 casos ocorreram no ano de 2010 (MEDEIROS; GUERRA; LACERDA, 2008; BARBOSA-FERREIRA, 2010; LIMA, 2013).

#### 1.4 Prevalência da doença de Chagas

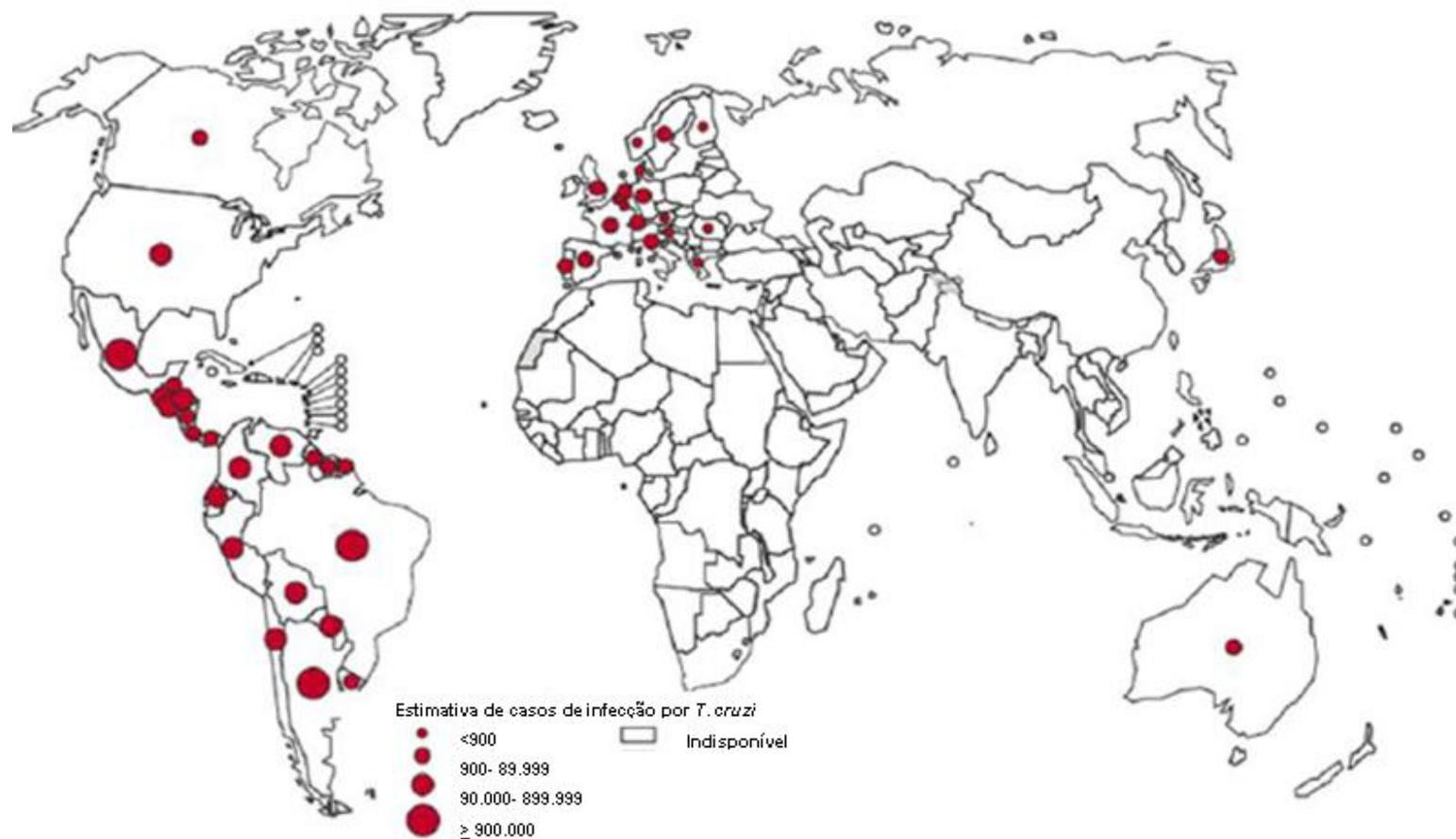
A DCh não tem cura espontânea e representa uma importante doença negligenciada e endêmica na América Latina. Estima-se que os maiores números de casos estão distribuídos entre Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186). Casos em regiões fora da América Latina (Figura 2) também são relatados, como na Europa e Pacífico Oriental, sugestivamente, atribuído ao fluxo migratório de indivíduos oriundos de áreas endêmicas a partir da década de 1990 (COURA; VIÑAS, 2010; DIAS *et al.*, 2016; EDWARDS; STIMPERT; MONTGOMERY, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Há estimativa de que cerca de 3.000 indivíduos estejam infectados no Japão, 1.500 na Austrália, além de 300.000 nos Estados Unidos e 5.500 no Canadá (SCHMUNIS; YADON, 2010; EDWARDS; STIMPERT; MONTGOMERY, 2017).

A prevalência da DCh em áreas não endêmicas pode ser demonstrada em estudos, como o de Basile *et al.* (2011), que reportou 4.290 casos de infecção por *T. cruzi* distribuídos em nove países europeus (Bélgica, França, Alemanha, Itália, Holanda, Portugal, Espanha, Reino Unido e Suíça). Os casos foram definidos conforme resultados sorológicos, empregando ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os participantes eram imigrantes ou crianças adotadas, ambos oriundos de países endêmicos, residentes nesses países no de 2009. A Espanha, que possui cerca de 45.300.000 de habitantes, apresentou o maior número de infectados (3.821). O segundo país com maior número de casos foi Suíça, com 180 casos entre seus 8.594.500 habitantes. Itália e França apresentaram, respectivamente, 114 (entre os 61.300.000 habitantes) e 111 (entre seus 62.600.000 habitantes) (BASILE *et al.*, 2011).

Ainda conforme Basile *et al.* (2011), no Reino Unido, onde habitam cerca de 69.950.000 pessoas, foram diagnosticados 28 casos; enquanto na Bélgica, com 10 milhões de habitantes, foram diagnosticados 19 casos. Os países com menos casos diagnosticados foram Portugal (8 casos/10 milhões de habitantes), Holanda (7 casos/17 milhões) e Alemanha (2 casos/ 81.370 milhões de habitantes). Os mesmos autores consideram que, no ano de 2008, cerca de 38 milhões de imigrantes viviam

na Europa e que, aproximadamente, 4.180.000 (11%) eram oriundos da América Latina.

Figura 2 – Distribuição de casos de infecção por *T. cruzi* segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde – 2006 – 2009.



Os círculos vermelhos representam localidades onde há estimativa de infecções humanas. O diâmetro dos círculos é correspondente ao número de casos. Onde não há marcação, não existe estimativa ou não há dados disponíveis. Fonte: World Health Organization, 2010 e adaptado de Santos, 2017.

#### 1.4.1 Doença de Chagas no Brasil

Camargo *et al.* (1984) realizaram um inquérito sorológico no Brasil, no período de 1975 a 1980, estimando a prevalência da doença. Seus achados apontaram prevalência (por 100 habitantes) de 4,22 no Brasil. A estimativa estadual ocorreu da seguinte forma (Quadro 2):

**Quadro 2 – Estimativa de prevalência da doença de Chagas no Brasil no período de 1975 a 1980**

<b>Estado</b>	<b>Estimativa (casos/100 habitantes)</b>	<b>Estado</b>	<b>Estimativa (casos/100 habitantes)</b>
Rio Grande do Sul	8,84	Acre	2,39
Minas Gerais	8,83	Amazonas	1,88
Goiás	7,4	Rio Grande do Norte	1,78
Sergipe	5,97	Rio de Janeiro	1,75
Bahia	5,44	Santa Catarina	1,39
Piauí	4,04	Ceará	0,84
Paraná	4,00	Pará	0,56
Paraíba	3,48	Rondônia	0,41
Mato Grosso	2,82	Espírito Santo	0,32
Pernambuco	2,79	Roraima	0,31
Alagoas	2,48	Maranhão	0,12
Mato Grosso do Sul	2,46	Amapá	0,00

O Estado de São Paulo e o Distrito Federal não foram incluídos no inquérito porque, de acordo com os autores, já apresentavam dados satisfatórios.

Fonte: Adaptado de Camargo *et al.* (1984).

De acordo com dados epidemiológicos disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o Brasil confirmou 2.570 casos notificados de DCh aguda no período de 2007 a 2018 (Tabela 1). O maior número - 2.579 (95%) concentrou-se na Região Norte, seguido da Região Nordeste - 97 (4%) (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVO DE NOTIFICAÇÃO, 2016). O SINAN Net é uma ferramenta ou um banco com a finalidade de tornar possível coletar, transmitir e disseminar dados gerados rotineiramente pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica (SVE) das três esferas de Governo (Município, Estado e União). Esse sistema possibilita o processo de investigação, dando subsídios à análise das

informações de vigilância epidemiológica das doenças de notificação compulsória (BRASIL, 2014).

**Tabela 1 – Casos confirmados de doença de Chagas aguda no Brasil por Região de notificação. Período: 2006-2018**

Região	Casos notificados (confirmados)
Norte	2.570
Nordeste	97
Sudeste	8
Centro-Oeste	30
Sul	4
Total	2.709

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2019). Dados sujeitos a revisão, atualizados no dia 04 de setembro de 2019.

Esses dados apontam a necessidade de fortalecimento nas redes de prevenção e controle da infecção pelo *T. cruzi*, quer seja por via vetorial, que requer controle e combate ao triatomíneo, quer seja por via oral, que exige monitoramento e adoção de práticas adequadas ao manuseio e ao preparo de alimentos, como carne de caça, sucos de produtos de palmeiras e caldo de cana, apontados como principais responsáveis por surtos ocorridos (PINTO *et al.*, 2008).

Vargas *et al.* (2018) investigaram um surto de DCh no Rio Grande do Norte, no município de Marcelino Vieira, decorrente do consumo de caldo de cana. Foram confirmados 18 casos agudos, ocorrendo três óbitos. Todos apresentaram sinais e sintomas no mês de outubro de 2015. Os sinais e sintomas mais relatados foram: febre, fraqueza, mialgia, prostração, inapetência, edema de membros inferiores, exantema, epigastralgia, edema de face, prurido e cefaléia. De acordo com os pesquisadores, a incidência da doença nesse surto foi de 86,1 por 10 mil habitantes. Além desses sinais e sintomas, foram relatadas hipertensão e cardiopatia.

#### 1.4.2 Doença de Chagas na Amazônia Brasileira

Conforme descrevem Rojas *et al.* (2005), o *T. cruzi* tem sido detectado circulando entre reservatórios de animais silvestres, triatomíneos e humanos em países da bacia amazônica (Brasil, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana e Bolívia). Essa ampla circulação do parasito somada à exploração humana do meio silvestre e à aproximação dos triatomíneos corroboram para que exista um cenário de infecção humana e de desenvolvimento da DCh.

Na Amazônia Brasileira, a DCh pode ser comprovada pela prevalência sorológica na população autóctone (CAMARGO *et al.*, 1984; COURA; NARANJO; WILLCOX, 1995; COURA *et al.*, 1999; COURA *et al.*, 2002; FÉ *et al.*, 2009; BRUM-SOARES *et al.*, 2010) e pela ocorrência de casos isolados ou em forma de surto, em fase aguda, por transmissão oral em alguns municípios, principalmente no estado do Pará (COURA *et al.*, 2002; NÓBREGA *et al.*, 2009; VALENTE *et al.*, 2009).

Os primeiros episódios da DCh na Amazônia Brasileira foram descritos por Shaw, Lainson e Fraiha (1969), que relataram quatro casos agudos no município de Belém, estado do Pará (PA). Aproximadamente 30 anos mais tarde, Pinto *et al.* (2001) estudaram 13 pacientes do mesmo núcleo familiar, no município de Abaetetuba (PA), portadores da DCh em fase aguda. Os critérios de diagnóstico consistiram na evidência de anticorpos IgM anti- *T. cruzi* e na presença de parasitos circulantes por xenodiagnóstico. Na amostragem, oito pessoas apresentaram extra-sístoles supraventriculares e/ou ventriculares enquanto quatro apresentaram bloqueios de ramo direito e bloqueios atrioventriculares.

Barbosa-Ferreira *et al.* (2010) descreveram o acometimento cardíaco em cinco pacientes em fase aguda da DCh autóctones da Amazônia (Pará e Amazonas). A via provável de infecção foi oral. Todos os pacientes apresentaram algum tipo de alteração cardíaca. Por meio de exame eletrocardiográfico (ECG), foram diagnosticados: bloqueio divisional antero-superior, bloqueio de ramo direito, extra-sístoles ventriculares e fibrilação atrial. Além disso, os mesmos pacientes foram submetidos a exame ecocardiográfico. Aquele que apresentou ECG normal foi diagnosticado com derrame pericárdico. Os pacientes com fibrilação atrial não apresentaram alteração por meio do ecocardiograma. As demais alterações consistiram em derrame pericárdico moderado, disfunção de ventrículo esquerdo e fração de ejeção igual a 50%.

No município de Barcelos (AM), foram reportados índices de soropositividade, que podem chegar a 13,2% (COURA; NARANJO; WILLCOX, 1995; COURA *et al.*, 1999), com relato de óbitos (ALBAJAR *et al.*, 2003). A soropositividade pode ser considerada uma doença ocupacional devido à alta taxa de positividade em trabalhadores extrativistas da fibra da piaçava (BRUM-SOARES *et al.*, 2010).

Piaçava é o nome popular da *Leopoldinia piassaba*, uma espécie de palmeira, cujas fibras encontradas nas folhas são utilizadas na produção de vassouras, escovas, cordas e objetos decorativos. Essa espécie é nativa da Amazônia e representa um dos principais produtos econômicos do município de Barcelos, cidade

que foi a primeira aldeia dos índios Manaós e a primeira capital do estado do Amazonas. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010), considerando a extração vegetal, apontam a piaçava como a principal produção do município de Barcelos, totalizando 8.406 toneladas no período de 2010 a 2016 (REIS, 1999; AQUINO; D'ALMEIDA; MONTEIRO, 2000; PRANG, 2001; PERES, 2003; MENEZES, 2014; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

No ano de 1977, seis extrativistas da fibra da piaçava do município de Barcelos apresentaram DCh (FERRARONI; MELO; CAMARGO, 1977). Posteriormente, Albajar *et al.* (2003) relataram dois casos de óbito de indivíduos com idade de 45 anos, portadores da infecção chagásica em fase crônica no estado do Amazonas. Ambos autóctones do Rio Negro e ex-extrativistas da piaçava. O primeiro indivíduo, sexo masculino, realizou atividades de extrativismo da piaçava dos 15 aos 37 anos de idade. O segundo caso se refere a uma mulher que trabalhou dos 10 aos 37 anos de idade na mesma atividade.

Posteriormente, Brum-Soares *et al.* (2010) estudaram uma amostragem composta por 152 participantes, também no município de Barcelos (AM). Por meio de testes sorológicos e moleculares, diagnosticaram infecção por *T. cruzi* em 38 indivíduos. Quanto às formas clínicas, 37% apresentaram a forma cardíaca da DCh enquanto nenhum caso da forma digestiva foi observado.

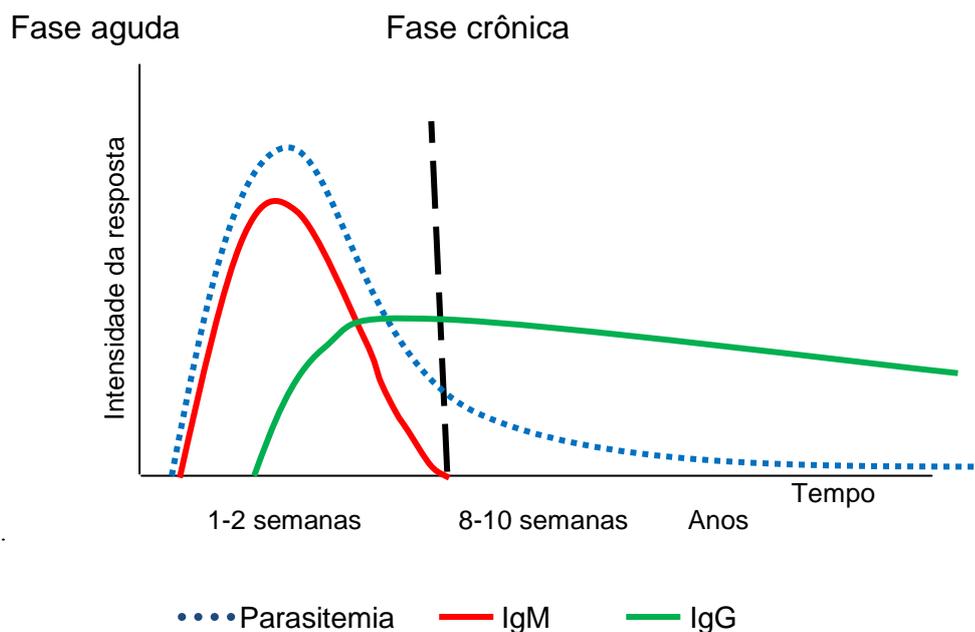
#### 1.4.3 Diagnóstico da doença de Chagas

De acordo com Dias *et al.* (2016), o Segundo Consenso Brasileiro de Doença de Chagas recomenda que indivíduos suspeitos de infecção por *T. cruzi* sejam submetidos aos exames sorológico, parasitológico e/ou molecular, conforme suspeita clínica, via e fase da infecção (aguda ou crônica). O diagnóstico da doença depende da fase em que a infecção se encontra. Em geral, são empregadas técnicas de detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em soro, testes moleculares e parasitológicos, além de exames de imagem, ausculta cardíaca e eletrocardiograma (DIAS *et al.*, 2016).

É importante que a suspeita seja prontamente esclarecida, pois o retardo no diagnóstico pode comprometer o tratamento e favorecer a evolução para quadros mais graves da doença (RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012). A detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* é importante na caracterização da fase da infecção,

considerando que, na fase aguda, é encontrada alta concentração de anticorpos de classe IgM (imunoglobulina M) enquanto a fase crônica é caracterizada pela detecção de IgG (imunoglobulina G). De igual modo, a parasitemia no sangue é maior na fase aguda (Figura 3) (COURA; BARRETT; NARANJO, 1994; DIAS; COURA, 1997; ALBAJAR, 2003; BRUM-SOARES, 2009; JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011; RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012).

**Figura 3 – Representação das curvas de parasitemia, imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) nas fases aguda e crônica da infecção por *T. cruzi***



Na fase aguda, a parasitemia é alta, e grande quantidade de *T. cruzi* pode ser encontrada no sangue do hospedeiro. Ainda na fase aguda, anticorpo da classe IgM apresenta-se em altas concentrações. Já na fase crônica, não são encontrados IgM, assim como ocorre uma baixa na carga parasitária encontrada no sangue.

Fonte: Adaptado de Rassi Junior, Rassi e Rezende (2012).

Anticorpos IgM são imunoglobulinas receptoras de antígenos em células B virgens, estimuladas pelo primeiro contato com o antígeno. O anticorpo IgM é o primeiro isotipo a ser produzido na fase aguda em decorrência da resposta adaptativa. Entre suas funções estão: ativar o sistema complemento (cascata de proteínas) na via clássica, desencadear o complexo de ataque à membrana (complexo antígeno-anticorpo), promovendo a lise celular, além de atuar como receptor de antígenos de linfócitos B virgens (MURPHY *et al.*, 2010).

Nos casos em que não se identifica o parasito na pesquisa direta, a verificação da presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico é considerada positiva na fase aguda, particularmente, quando associada ao contexto epidemiológico e às manifestações clínicas (LUQUETTI; SCHMUNIS, 2010). Quando a infecção é detectada na fase aguda, recomenda-se o tratamento

com administração de benznidazol, considerado tratamento de primeira linha na maioria dos países, ou nifurtimox. Este segundo, por sua vez, não está disponível no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

#### 1.4.4 Testes realizados em casos suspeitos de infecção aguda

##### 1.4.4.1 Teste sorológico

Guerreiro e Machado (1913) empregaram o método de reação de fixação de complemento, tomando como antígeno extratos parasitários obtidos de baço de cães jovens infectados experimentalmente e detectando anticorpos anti-*T. cruzi* em cães doentes em diferentes formas da doença. Contudo, essa técnica é considerada complexa, confiável apenas quando realizada por laboratório de pesquisa. Entretanto, não é recomendável no âmbito dos laboratórios de rotina devido à baixa sensibilidade (60%) e à baixa especificidade, o que possibilita apresentação de resultados falso-positivos (PRATA *et al.*, 1976).

O princípio do teste sorológico é a ligação antígeno e anticorpo (Ag-Ac) baseando-se em métodos indiretos para detecção de IgM. O teste pode ser realizado quando os exames parasitológicos forem negativos e a suspeita clínica persistir. Tais métodos têm utilidade complementar e devem sempre ser realizados em casos suspeitos ou confirmados de doença de Chagas aguda (DECARLI, 2001; BRASIL, 2014).

Considera-se o exame sorológico mais adequado na fase aguda tardia quando as repetições dos exames de pesquisa direta tiverem resultados negativos. Ressalta-se que a soroconversão para infecção por *T. cruzi* (positividade) é definida pela presença de uma primeira amostra de soro não reagente para anticorpos anti-*T. cruzi*, associada a uma segunda amostra reagente, que deve ser coletada em um intervalo de duas a quatro semanas, com base em um ensaio que inclua ambas as amostras simultaneamente (BRASIL, 2014).

O aumento de pelo menos dois títulos entre duas amostras reagentes com intervalos de duas a quatro semanas, em um contexto clínico e epidemiológico favorável para doença de Chagas aguda, pode ser considerado sugestivo também de doença de Chagas aguda. São considerados positivos os testes sorológicos com titulação de IgG a partir de 1:80 na técnica de IFI e ELISA, com densidade óptica a

partir de 0,23 (OSTERMAYER; CASTRO, 1997; LUQUETTI, 1999; LUQUETTI; SCHMUNIS, 2010).

#### 1.4.4.2 *Teste parasitológico direto*

O exame parasitológico direto é o mais indicado na fase aguda da infecção e define-se pela presença de *T. cruzi* no sangue, identificada por meio do exame direto do sangue periférico com o uso de microscopia. Durante a fase aguda, o parasito pode ser encontrado em abundância no sangue periférico do indivíduo infectado (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2009). O Ministério da Saúde (BRASIL, 2013) recomenda a realização simultânea de diferentes modalidades de exames parasitológicos, a saber:

- pesquisa a fresco de tripanosomatídeos: trata-se de uma técnica considerada rápida, simples, eficaz e econômica. Dispensa-se o processo de fixação e coloração. Os parasitos podem ser visualizados por sua rápida movimentação entre as hemácias;
- lâmina corada de gota espessa ou esfregaço: possui menor sensibilidade e é realizado prioritariamente na região da Amazônia Legal, integrada ao diagnóstico da Malária. É importante na caracterização morfológica do parasito;
- métodos de concentração: são mais sensíveis, porém, mais trabalhosos. Permitem a investigação direta de parasitos no sangue por meio de centrifugação. Os métodos comumente utilizados são:
  - strout: consiste na concentração de parasitos no sedimento, e sua finalidade é aumentar a sensibilidade para evidenciar o *T. cruzi* em amostras de sangue;
  - micro-hematócrito: refere-se à técnica de examinar o sangue após centrifugação em microcubo capilar;
  - creme leucocitário (*buffy coat*): utilizado na rotina de detecção de *T. cruzi* no sangue. Consiste na observação do creme leucocitário (entre as camadas de plasma, sobrenadante, e hemácia, que se sedimenta) após centrifugação.

Outros métodos de concentração encontrados são o *Quantitative Buffy Coat* (QBC) e de concentração em gradiente de Ficoll-Hypaque (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011):

- QBC: Consiste na concentração de parasitos por meio de centrifugação do sangue, em tubos de micro-hematócrito, utilizando-se coloração do DNA do parasito. Essa coloração se dá por meio do fluorocromo acidotrópico Laranja de Acridina. Considera-se um teste de alto custo, pois envolve microscopia fluorescente e tubos previamente preparados com anticoagulante e corantes especiais;
- Ficoll-Hypaque: É um teste baseado na centrifugação de sangue heparinizado em gradiente de Ficoll-Hypaque, no qual os parasitos poderão concentrar-se na camada de células mononucleares, entre o plasma e o Ficoll-Hypaque.

Em circunstâncias nas quais o indivíduo esteja imunocomprometido e apresente sinais e sintomas de reagudização da infecção por *T. cruzi*, a pesquisa por parasitologia direta deve ser estendida ao líquido cefalorraquidiano como teste complementar (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

#### 1.4.4.3 *Teste molecular*

De acordo com Schijman *et al.* (2011), o diagnóstico molecular apresenta resultados promissores quando existe suspeita clínica e epidemiológica de fase aguda da infecção por *T. cruzi* associada a exames parasitológicos diretos negativos. O teste consiste na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Através da técnica de PCR, é possível, por meio de síntese enzimática, obter cópias de sequências específicas de DNA do *T. cruzi* extraído do sangue total, soro ou líquido, por meio de ciclos repetitivos de desnaturação, hibridização e extensão (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

#### 1.4.4.4 *Western Blot*

Trata-se de um procedimento de alto custo, sendo utilizado em teste confirmatório em casos de divergências entre testes convencionais. Consiste na separação de um extrato de antígenos do parasito por meio de eletroforese e sua

transferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é então cortada em tiras, posta em contato com o soro a ser testado, incubada e revelada. Em casos de resultado positivo, pode ser visualizada banda específica (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

#### 1.4.5 Testes realizados em casos suspeitos de infecção crônica

De acordo com Dias *et al.* (2016), devido à parasitemia subpatente na fase crônica da infecção, os métodos parasitológicos de enriquecimento/multiplicação, hemocultura e xenodiagnóstico apresentam comprovadamente baixa sensibilidade, o que implica a ausência de valor diagnóstico quando o resultado for negativo. Quando apresentam resultados positivos, possuem utilidade principalmente no controle do tratamento específico ou, nos casos não usuais, quando a sorologia apresenta resultados inconclusivos.

Isso significa que os métodos convencionais indiretos para o isolamento e a identificação de *T. cruzi* apresentam baixa sensibilidade, que pode ser aumentada por meio da sua repetição. A PCR nessa fase tem indicação quando os testes sorológicos apresentarem resultado indeterminado ou para o controle de cura após o tratamento antiparasitário. Assim, deve ser realizada por laboratórios de competência reconhecida, com execução por especialistas na área (BRASIL, 2007).

##### 1.4.5.1 Testes sorológicos

De acordo com Ostermayer e Castro (1997), o teste sorológico em suspeitas de infecção crônica por *T. cruzi* é indicado em determinadas circunstâncias, como:

- necessidade de se estabelecer ou afastar a etiologia chagásica em paciente portador de cardiopatia idiopática;
- casos de megaesôfago ou de megacólon, que frequentemente são de etiologia chagásica;
- bancos de sangue, evitando a transmissão transfusional;
- no exame de gestantes para controlar a transmissão congênita;
- em inquéritos soropidemiológicos;
- acompanhamento de chagásicos tratados.

O exame sorológico é considerado essencial para o diagnóstico da infecção na fase crônica e deve ser realizado utilizando-se um teste com elevada sensibilidade em conjunto com outro de alta especificidade (BRASIL, 2014). Nesse contexto, é considerado infectado quando existe a presença de anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi*, detectados por meio de dois testes sorológicos com princípios, métodos e/ou preparações antigênicas distintas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). De acordo com Silveira, Unezawa e Luquetti (2001), convencionalmente são adotadas três técnicas:

- hemaglutinação indireta (HAI): essa técnica consiste na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígeno anti-*T. cruzi* em soro contendo anticorpos;
- imunofluorescência indireta (IFI): essa reação consiste na interação do *T. cruzi* com seus anticorpos específicos presentes no soro. São considerados reagentes os testes IFI com titulação a partir de 1:40;
- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA): trata-se de um teste imunoenzimático baseado na interação antígeno-anticorpo evidenciada pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, e revelada por um cromógeno. É considerada positiva a amostra que apresenta densidade óptica a partir de 0,23.

#### 1.4.5.2 *Exame parasitológico indireto*

De acordo com Junqueira, Gonçalves e Moreira (2011), os métodos parasitológicos indiretos costumam ser empregados na fase crônica da infecção, sendo recomendados quatro métodos: xenodiagnóstico, hemocultura, xenocultura e inoculação em animais de laboratório.

Devido à parasitemia pouco evidente na fase crônica, os métodos parasitológicos convencionais (xenodiagnóstico e hemocultura) são de baixa sensibilidade, o que implica em pouco valor diagnóstico. Por isso, um exame negativo não afasta a possibilidade da infecção, mas um exame positivo tem valor diagnóstico absoluto (CHIARI; GALVÃO, 1997; BRASIL, 2014). Contudo, caso haja necessidade de se lançar mão dessas técnicas, é recomendado pelo Ministério da Saúde a realização de xenodiagnóstico indireto. Esse apresenta sensibilidade semelhante ao clássico, porém é mais confortável ao paciente, evitando eventuais

reações alérgicas devido à picada do triatomíneo, por permitir a repetição com maior facilidade (BRASIL, 2014).

#### 1.4.5.3 *Teste Xenodiagnóstico para detecção do T. cruzi*

Conforme Dias (1940), corroborado por Chiari e Galvão (1997), o xenodiagnóstico consiste em verificar se o triatomíneo puro (sem infecção por *T. cruzi*) será infectado após alimentar-se do sangue do indivíduo supostamente infectado. Existem duas classes de xenodiagnóstico:

- xenodiagnóstico direto: no qual os triatomíneos irão se alimentar do sangue diretamente do indivíduo investigado. Para isso, os triatomíneos são acondicionados em “caixas” devidamente identificadas e essas são postas sobre a pele do indivíduo suspeito de infecção para que o inseto se alimente.
- xenodiagnóstico indireto: nesse caso, os triatomíneos ingerem o sangue previamente coletado do suposto infectado. Isso requer que o sangue seja coletado com anticoagulante e armazenado em “mamadeira” ou frasco, que será revestido por membrana (geralmente um pedaço de preservativo sem lubrificante), de modo que seja permitido que o inseto faça a sucção do sangue.

Em ambos os procedimentos, os triatomíneos alimentados serão reservados em temperatura ambiente, recebendo alimentação complementar e, posteriormente, será feita a pesquisa de *T. cruzi* nas fezes, no tubo digestivo, na hemolinfa e na glândula salivar desses insetos. Caso sejam encontrados parasitos, será confirmada a positividade do caso suspeito (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

#### 1.4.5.4 *Técnica de Hemocultura*

Baseia-se no cultivo de amostra clínica semeada em meios de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Essa técnica é empregada quando se busca isolar o parasito para estudos bioquímicos, biológicos e moleculares ou acompanhar cura de paciente tratado. A leitura é feita a cada 30 dias após o cultivo, até o 120º dia, quando o material passará por centrifugação e o sedimento será analisado (LUZ *et al.*, 1994; JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

#### 1.4.5.5 *Xenocultura para detecção de T. cruzi*

A xenocultura baseia-se na sementeira do tubo digestivo ou fezes do triatomíneo em meio LIT, possibilitando o isolamento de cepas de *T. cruzi* e o controle da qualidade dos xenodiagnósticos realizados (JUNQUEIRA; GONÇALVES; MOREIRA, 2011).

#### 1.4.5.6 *Reação em cadeia da polimerase - PCR*

A técnica de PCR para o diagnóstico molecular da infecção por *T. cruzi* consiste no emprego de oligonucleotídeos sintéticos, amplificando sequências específicas do parasito, podendo ser o kDNA (DNA do cinetoplasto) ou sequências satélites (sequências repetidas de nucleotídeos do *T. cruzi*) (BRITTO; MOREIRA, 2017).

A PCR pode ser empregada como ferramenta complementar para confirmação do diagnóstico quando os testes sorológicos fornecerem resultados inconclusivos ou discordantes. Contudo, um teste de PCR negativo não descarta a possibilidade de infecção uma vez que a parasitemia na fase crônica é baixa e intermitente. Entretanto, um teste positivo apresenta um valor diagnóstico absoluto (BRITTO; MOREIRA, 2017).

### 1.5 Fases da doença de Chagas

#### 1.5.1 Fase aguda

Essa fase geralmente é assintomática, contudo, em alguns casos, podem ocorrer manifestações, como febre, mal-estar, cefaléia, mialgia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, edemas de face ou de membros, adenomegalia, hemorragias, icterícia, taquicardia ou sinais de insuficiência cardíaca, já detectadas nas primeiras semanas após a infecção. Além disso, manifestam-se dispnéia, fadiga e outros sintomas semelhantes a miocardites de forma geral (DIAS *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2018).

Conforme as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos (PASTORE *et al.*, 2009) e Parada *et al.*

(1997), os exames eletrocardiográficos podem apresentar-se alterados, revelando taquicardia sinusal, diminuição da voltagem do complexo QRS (correspondente à despolarização ventricular), bloqueio atrioventricular (BAV) de primeiro grau, alteração primária da repolarização ventricular e presença de extrassístoles.

De acordo com Pinto *et al.* (2008), na Amazônia Brasileira, as manifestações clínicas da DCh aguda apresentam-se com maior intensidade e gravidade, o que vem sendo atribuído à suspeita de infecção oral, haja vista a maior concentração de parasitos introduzida. A pesquisadora realizou um inquérito sobre os casos agudos ocorridos entre os anos 1988 e 2005, autóctones do Pará e do Amapá, o que permitiu a análise de 233 casos, com alta prevalência de febre (99%), chegando a 39,8°C e perdurando por até 35 dias (PINTO *et al.*, 2008).

### 1.5.2 Fase crônica

Na fase crônica da DCh, a parasitemia tende a diminuir. Essa fase da doença é caracterizada pelo predomínio de anticorpo de classe IgG (imunoglobulina G) no soro do paciente (COURA, 2007). O indivíduo passa por uma forma intermediária assintomática e sem sinais de comprometimento cardíaco, podendo se estender por décadas ou evoluir para a forma digestiva ou cardíaca, com evolução para miocardiopatia dilatada, distúrbios de condução, tromboembolismo, insuficiência cardíaca, entre outras complicações. Pode também ocorrer morte súbita por arritmia (PRATA, 2001; FARIA *et al.*, 2013).

A forma cardíaca também é denominada Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) e afeta cerca de 30% dos portadores da DCh (ESPINOSA *et al.*, 1991), podendo apresentar caráter inflamatório e fibrosante. Além disso, pode ser acompanhada de arritmias ventriculares complexas associadas a distúrbios da formação e condução do estímulo elétrico atrioventricular e intraventricular, fenômenos tromboembólicos, disfunção ventricular direita e aneurismas ventriculares (XAVIER; SOUZA; MORENO, 2005).

De acordo com Marin-Neto *et al.* (2007), a CCC tem início com um quadro inflamatório, destruindo as fibras do miocárdio. Em decorrência dessa destruição, é formado um tecido fibroso que compromete as contrações ventriculares, que se torna hipertrofiado, caracterizando a miocardite. A evolução do quadro leva à perda progressiva da capacidade de ejeção e pode ser agravada por quadros de arritmias,

tromboembolismo pulmonar e insuficiência das válvulas cardíacas (MARIN-NETO, 2007; THIERS; BARBOSA, 2013).

Para o diagnóstico da CCC, devem-se considerar as evidências epidemiológicas, eletrocardiográficas, radiológicas e os testes sorológicos. Essas evidências baseiam-se na procedência de áreas endêmicas, acometimento digestivo, histórico familiar e na vizinhança. Entre as alterações cardíacas, podem ser encontrados: bloqueio de condução do ramo direito (BCRD), hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE), bloqueio de ramo esquerdo (BRE), bloqueios atrioventriculares (BAV) e extrassístole ventricular (ESV) (DIAS, 1985; ALMEIDA, 2004).

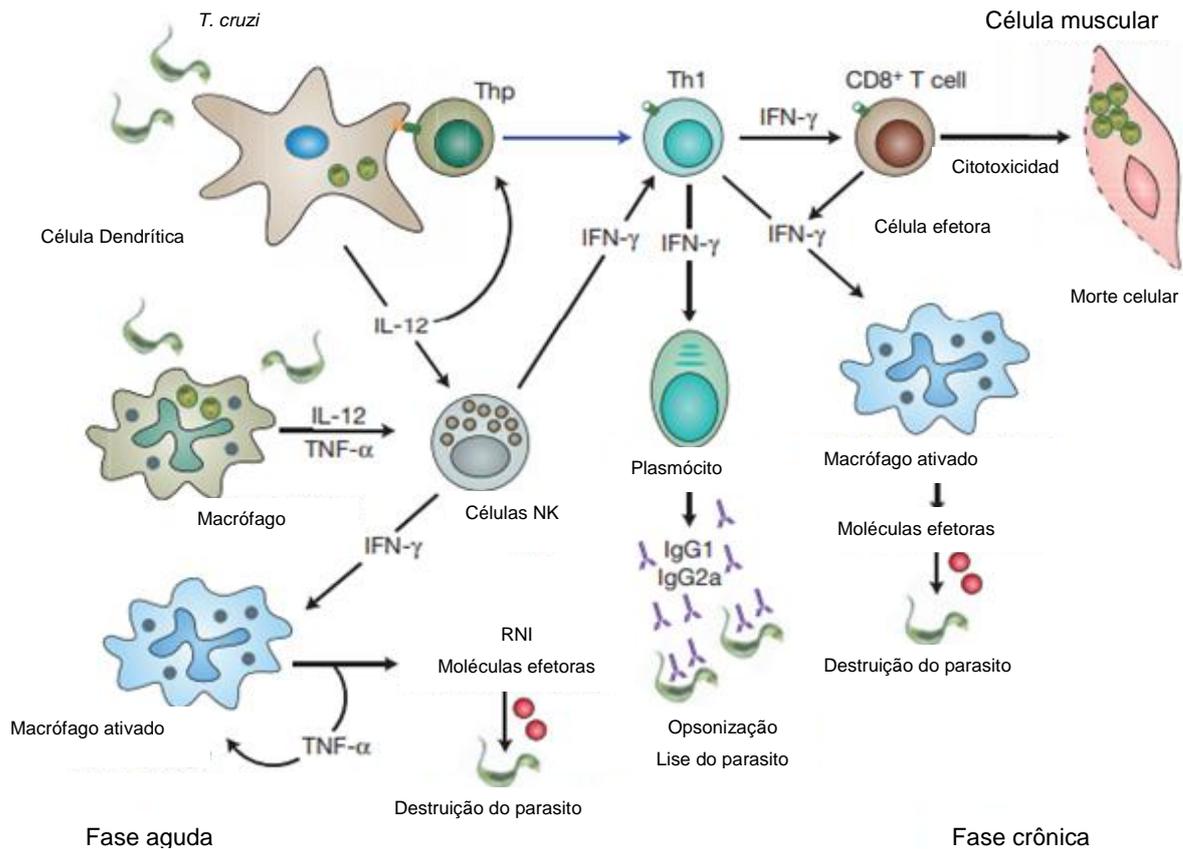
Estudos nos quais foram observados os comprometimentos cardíacos em pacientes portadores da DCh no município de Barcelos, Amazonas, mostraram que a forma cardíaca acometeu 22 a 45% dos pacientes (ALBAJAR, 2003; BRUM-SOARES, 2009).

Por sua vez, o quadro digestivo da DCh envolve o acometimento do esôfago e do cólon, desenvolvendo as síndromes de megaesôfago e megacólon, respectivamente, não sendo frequente na região do Rio Negro, Amazonas. Essas alterações podem ser observadas através de exames de imagem a partir da suspeita clínica (ALBAJAR, 2003; BRUM-SOARES, 2009).

## **1.6 Resposta imunológica na infecção por *T. cruzi***

O controle da infecção por *T. cruzi* demanda a ativação de diversos mecanismos imunes, efetores da resposta imune inata e também adaptativa, a fim de conter a replicação do parasito e a propagação da infecção para tecidos do hospedeiro (BRENER; GAZZINELLI, 1997; GOLGHER; GAZINELLI, 2004; JUNQUEIRA *et al.*, 2010) (Figura 4). Embora a multiplicação do *T. cruzi* seja reduzida, o parasito não é completamente eliminado, o que prolonga a resposta imune, podendo causar lesões teciduais decorrentes de atividades celulares (LANA; TAFURI, 2005).

**Figura 4 – Imunidade inata e adquirida durante infecção por *Trypanosoma cruzi***



A imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*: células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e DC) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras (reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio), que controlam a replicação parasitária. Células do sistema imune inato, como dendríticas, fazem uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T auxiliar 1 (T helper 1 – Th1) CD4+, assim como células T CD8+ e B. IFN- $\gamma$  produzido por células Th1 CD4+ ou células T CD8+ ativam mecanismos efetores em macrófagos, que destroem formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas, enquanto a atividade citotóxica realizada pelas células T CD8+ destroem células com amastigotas internalizadas.

Fonte: Adaptado de Junqueira *et al.* (2010).

O *T. cruzi* apresenta moléculas que interagem com receptores de reconhecimento padrão, como os semelhantes à Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptor*). Nessa interação, é desencadeada a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL), como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, além de Óxido Nítrico (NO, no inglês *Nitric Oxide*). Dessa forma, são ativadas células apresentadoras de antígenos, e fagócitos são recrutados para o tecido infectado (BAFICA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2004; ALIBERTI *et al.*, 1996; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012; PELLEGRINI *et al.*, 2011). A interação de componentes moleculares do *T. cruzi* com os receptores na célula hospedeira também ativa células *natural killer* (NK), produzindo IFN- $\gamma$ , e macrófagos, estimulando a expressão de IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e

NO (BASSO, 2013). De igual modo, células dendríticas também exercem importante papel na resposta à infecção por *T. cruzi*, na apresentação de antígenos e expressão de citocinas, como IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10 (KENNETH *et al.*, 2008).

Antunes e Cardoni (2000) apontam que IL-12 induz a síntese de IFN- $\gamma$ , que ativa fagócitos, aumentando a produção de NO, destruindo o *T. cruzi*. Por outro lado, a produção aumentada de NO inibe a síntese de IL-12, favorecendo a proliferação de células T reguladoras, inibindo a expressão de moléculas de adesão e migração celular. Gazzinelli *et al.* (1992) e Hunter *et al.* (1997) relatam que a produção exacerbada de IFN- $\gamma$  e de IL-12 aumenta o processo inflamatório e dano tecidual, sendo IL-10 e TGF- $\beta$  importantes no controle da produção dessas citocinas. Portanto, as citocinas podem interagir estimulando a produção de outras citocinas ou suprimindo-as.

Nesse contexto, as citocinas atuam de forma efetiva no desenvolvimento da doença de Chagas. Há evidências de que indivíduos portadores de cardiomiopatia chagásica apresentam mais IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IL-9 e IL-12 quando comparados aos pacientes com a forma indeterminada da doença. Outro fator observado em alguns estudos é que pacientes assintomáticos apresentam níveis de IL-13, IL-5, IL-4 e IL-10 circulantes mais elevados do que aqueles que desenvolveram a forma cardíaca (GOMES *et al.*, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011). O quadro a seguir (Quadro 3) apresenta as citocinas selecionadas para esse estudo, apontando sua fonte celular e algumas de suas funções.

**Quadro 3 – Representação resumida da fonte celular e funções das citocinas selecionadas para esse estudo**

(continua)

Citocina	Fonte celular	Função	Comportamento (expressão) na doença de Chagas	Referência
IFN-g	T <sub>H</sub> 1, CTL, NK.	Inibe a proliferação de T <sub>H</sub> 2; ativa células NK e macrófagos; regula e limita danos teciduais.	Aumenta na forma indeterminada e na cardiomiopatia chagásica crônica severa.	Garraud <i>et al.</i> (2003); Murphy <i>et al.</i> (2010).
TNF-a	T <sub>H</sub> 1, algumas CTL, macrófagos, NK.	Ativa e induz a produção de NO; regula a produção de citocinas; ativa e aumenta a permeabilidade do endotélio vascular.	Aumenta na forma indeterminada e na cardiomiopatia chagásica crônica severa.	Pérez, Bottasso e Savino (2009); Murphy <i>et al.</i> (2010).

**Quadro 3 – Representação resumida da fonte celular e funções das citocinas selecionadas para esse estudo**

(conclusão)

Citocina	Fonte celular	Função	Comportamento (expressão) na doença de Chagas	Referência
IL-6	Células T, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais.	Estimula o crescimento de linfócitos B.	Aumenta na cardiomiopatia chagásica crônica severa.	Abbas, Lichtman e Pillai (2015).
IL-10	Monócitos, T <sub>H2</sub> , algumas T <sub>H1</sub> , T <sub>REG</sub> .	Troca de classe para IgG1 e IgG3; inibe T <sub>H1</sub> e secreção de citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ ; favorece a resposta T <sub>H2</sub> , caracterizada por IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13; co-estimula a proliferação de mastócitos.	Aumenta na cardiomiopatia chagásica crônica.	Couper, Blount e Riley (2008); Garraud <i>et al.</i> (2003); Parameswaran e Patial (2010); Murphy <i>et al.</i> (2010).
*IL-8	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos, condócitos.	Estimula a migração de células imunológicas, como neutrófilos, e aumento da expressão de moléculas de adesão; inibe a produção de IgE estimulada por IL-4.	Diminui na cardiomiopatia chagásica grave.	Zwahlen, Walz e Rot (1993); Barros (2018).

CTL=*cytotoxic lymphocyte* (linfócito citotóxico), células NK= *natural killer*, NO= *nitric oxide* (óxido nítrico). \*Quimiocina.

Fonte: Adaptado de Albuquerque (2013).

O controle da infecção por *T. cruzi* depende de uma complexa interação dos mecanismos da resposta imune. As citocinas desempenham funções importantes na ativação e regulação da resposta imunológica, polarizando essa resposta contra o parasito (MATHEW *et al.*, 2009). Contudo, além da interação mútua entre as citocinas, capaz de induzir ou inibir sua expressão, foi visto que as funções das citocinas também são afetadas pela constituição dos genes codificadores para essas citocinas (BEUTLER; GRAEU, 1993; BREAM *et al.*, 2002; CHOTIVANICH *et al.*, 2002; CARPENTER *et al.*, 2007; DRISS *et al.*, 2011).

Diversos estudos buscam compreender a influência que os polimorfismos dos genes de citocinas possam ter nos níveis de expressão dessas citocinas e, conseqüentemente, na variabilidade da resposta imune. Estudos de associação clínica utilizando polimorfismos em genes de citocinas visam identificar marcadores específicos e desfecho clínico da doença através da comparação direta dos

genótipos de citocinas encontrados em pacientes com as características clínicas da doença, como a susceptibilidade, duração e gravidade (BEUTLER; GRAEU, 1993; BREAM *et al.*, 2002; CHOTIVANICH *et al.*, 2002; CARPENTER *et al.*, 2007; DRISS *et al.*, 2011).

### 1.7 Variabilidade genética como fator de risco para doença de Chagas

A partir de descobertas como da anemia falciforme, da fibrose cística e da hemofilia, o aconselhamento genético vem norteando a tomada de decisões de prognóstico. A resposta imune, determinada pelo genótipo, pode favorecer ou não o adoecimento do indivíduo ou o risco de desenvolver determinado agravo. Os estudos de polimorfismos de uma população exposta a diferentes agravos possibilitam o entendimento da correlação do perfil genético com a susceptibilidade a uma ou mais doenças dessa população. Fatores genéticos têm um papel importante para explicar essa variação na susceptibilidade às doenças. Por isso, julga-se de grande importância o estudo genético da população a fim de se compreender a interação entre a patogenia e o genótipo do indivíduo (HILL, 1998; HILL, 2006; BURGNER; JAMIESON; BLACKWELL, 2006).

Uma das possibilidades para o padrão individual de susceptibilidade relacionada a fatores genéticos são os polimorfismos em genes de citocinas. Variações nesses genes podem interferir na produção de citocinas e até mesmo favorecer o estabelecimento da infecção, além de contribuir com quadros mais graves da doença (WILSON *et al.*, 1997; SMITH; HUMPHRIES, 2009).

Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) sugerem que o alelo TNF- $\alpha$ -308A favoreça a progressão da fase crônica da DCh, como a evolução para Cardiopatia Chagásica, enquanto o alelo G confere proteção contra essa evolução. Por outro lado, Drigo *et al.* (2007) e Pissetti *et al.* (2011) não observaram relação de susceptibilidade ou progressão em indivíduos que apresentaram esse genótipo.

Em outros estudos, Beraun *et al.* (1998) e Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) mostram que o TNF- $\alpha$  -238G/A não apresenta nenhuma relação com a susceptibilidade ou evolução para a forma cardíaca. Pissetti *et al.* (2011) sugerem a existência de uma associação entre o alelo TNF- $\alpha$  -238A e a susceptibilidade à DCh, pela maior produção da citocina TNF- $\alpha$ , acarretando o escape do parasito e evolução da doença. López-Maderuelo *et al.* (2003) e Chong *et al.* (2006) indicam

que o polimorfismo +874A/T (rs2430561) no gene IFN- $\gamma$  pode atuar na susceptibilidade a doenças infecciosas. De igual modo, Torres *et al.* (2010) relacionaram o polimorfismo +874A/T à susceptibilidade à DCh na população colombiana, destacando a necessidade de futuros estudos que esclareçam a relação com a progressão da infecção.

Zafra *et al.* (2007) descreveram o incremento do alelo IL-12 $\beta$  +1188C 3'UTR em pacientes chagásicos com cardiopatia, que aumentaria os níveis de IL-12, resultando em inflamação exacerbada. Costa *et al.* (2009) analisaram o polimorfismo -1082A/G no gene IL-10 em pacientes brasileiros com quadro de cardiopatia chagásica e observaram a baixa expressão do alelo A com o comprometimento cardíaco, pois baixos níveis da IL-10 estavam ligados a maior dano cardíaco. Calzada *et al.* (2009) relataram, em peruanos e colombianos, que o alelo TGF- $\beta$ +10C estava associado à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Quadro 4).

**Quadro 4 – Apresentação de alguns genes polimórficos que possam atuar sobre a infecção por *T. cruzi* e sobre a progressão para quadros de CCC (cardiopatia chagásica crônica)**

Gene	Alelo	Possível efeito	Referência
TNF- $\alpha$ (308A/G)	A/A	Favorece complicações da fase crônica, como a CCC	Rodriguez-Péres <i>et al.</i> (2005)
	G/G	Protege contra complicações da fase crônica	
	A/G	Sem correlação	Drigo <i>et al.</i> 2007); Pisseti <i>et al.</i> (2011)
TNF- $\alpha$ (-238G/A)	G/A	Sem correlação	Beraun <i>et al.</i> (1998); Rodriguez-Pérez <i>et al.</i> (2005)
	A/A	Favorece o estabelecimento da infecção	Pisseti <i>et al.</i> (2011)
IFN- $\gamma$ (+874A/T)	A/A	Favorece o estabelecimento da infecção	López-Maderuelo <i>et al.</i> (2003); Torres <i>et al.</i> (2010)
IL-12 (+1188A/C 3'UTR)	AA	Favorece a CCC	Zafra <i>et al.</i> (2007)
IL-10 (-1082A/G)	AA	Favorece a CCC	Costa <i>et al.</i> (2009)
TGF- $\beta$ (+10T/C)	CC	Favorece o estabelecimento da infecção	Calzada <i>et al.</i> (2009)

Alelos AA- indicam homozigose para nucleotídeos A; alelos GG- indicam homozigose para nucleotídeos G; Alelos AG e GA- indicam heterozigose; Alelos CC- indicam homozigose para o nucleotídeo C.

Fonte: Elaboração do autor, mediante revisão bibliográfica.

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando estudos que buscaram compreender as variações das concentrações de citocinas frente à evolução clínica da doença de Chagas, questionamo-nos se indivíduos do município de Barcelos infectados por *T. cruzi* apresentam o mesmo perfil de citocinas que os participantes de outros estudos.

Dessa forma, esse estudo justifica-se pela:

- prevalência da doença de Chagas entre os extrativistas no Rio Negro;
- presença de triatomíneos nas palmeiras da região, aumentando a possibilidade de infecção humana vetorial;
- variação nos níveis de citocinas frente às formas clínicas da doença de Chagas.

### **3 HIPÓTESES**

#### **3.1 Hipótese nula**

Nossa hipótese nula é que os níveis de citocinas independem da infecção estabelecida por *T. cruzi*.

#### **3.2 Hipótese alternativa**

A hipótese alternativa é que indivíduos infectados por *T. cruzi* apresentam níveis de citocinas diferentes em relação aos indivíduos não infectados.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Verificar o nível de concentração das citocinas plasmáticas e a titulação de IgG *T. cruzi* na população extrativista da fibra da piaçava na Região do Médio Rio Negro, Amazônia brasileira.

### 4.2 Objetivos específicos

- Pesquisar anticorpos de classe IgG anti-*T. cruzi*;
- Avaliar o perfil clínico e eletrocardiográfico;
- Verificar as concentrações plasmáticas das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e da quimiocina IL-8 entre indivíduos infectados e não infectados por *T. cruzi*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo, seccional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz/CEP-IOC (ANEXO A), no qual buscamos associar o estabelecimento da infecção por *T. cruzi* em uma população exposta à infecção vetorial durante sua permanência em área de extrativismo de produtos da palmeira piaçava.

Posteriormente, desdobrou-se em um estudo analítico observacional tipo coorte a fim de ratificar se o tempo de exposição à infecção e o nível de citocinas estão relacionados à sorologia positiva para *T. cruzi*.

Os dados foram elencados de forma multivariada:

- quantitativas: discretas e contínuas;
- qualitativas: nominal e ordinal;
- descritivas.

Os resultados estão apresentados em tabelas e gráficos. Foram apresentadas as medidas de resumo:

- posição: média, mediana, mínimo e máximo;
- variabilidade: desvio padrão;
- associação: razão de risco, correlação.

### 5.2 Amostragem estudada

Inicialmente, foi realizada uma consulta ao banco de dados do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz, de onde foi selecionada uma amostragem de indivíduos de áreas de extrativismo do município de Barcelos com sorologia positiva para *T. cruzi*. A partir dessa seleção, foi realizada a busca desses indivíduos no município.

Além dos indivíduos com sorologia positiva, foram incluídos outros indivíduos também expostos à infecção pelo *T. cruzi* com sorologia desconhecida.

Foram incluídos 513 participantes nesse estudo. Considerando trabalhos que relatam prevalência de soropositividade para *T. cruzi* de 6,5% entre a população de Barcelos (DUNCAN; DANILOW; MALHEIRO, 2015), sugeriu-se a possibilidade

estatística de serem encontrados 33 indivíduos com IgG positiva para *T. cruzi*. Dessa forma, os indivíduos soronegativos tiveram os níveis de citocinas plasmáticas comparados com aqueles com os IgG positivo.

Uma vez que a Região Amazônica é endêmica para diversos agravos, além da exposição à infecção pelo *T. cruzi*, foram incluídos indivíduos com histórico de Leishmaniose tegumentar, Malária e outras infecções parasitológicas ou virais para que se compare seu padrão de resposta com dos demais participantes.

A população foi convidada, através da programação da Rádio Rio Negro (FM 87,9) e por busca ativa, a comparecer à Unidade Mista de Barcelos, onde receberam informações pertinentes ao estudo, como esclarecimentos sobre os riscos, benefícios, direitos, objetivos, procedimentos, voluntariedade, liberdade, sigilo e anonimato. O serviço de rádio é o principal meio de comunicação em Barcelos entre a população da área urbana e as comunidades ribeirinhas.

A busca ativa também contou com o apoio e participação dos Agentes Comunitários de Saúde das cinco Unidades Básicas de Saúde (UBS): São Francisco, São Sebastião, Aparecida, Marará e Santo Antônio; e também com a Secretaria Estadual de Educação, Fundação Nacional do Índio (FUNAI), Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) Alto Rio Negro, DSEI Yanomami e Fundação de Vigilância em Saúde (FVS).

A triagem foi realizada no Hospital Geral de Barcelos, e o transporte para os participantes residentes em comunidades e bairros distantes do hospital foi realizado pela FUNAI, pelo Setor de Endemias da FVS e pelo 3º Batalhão de Infantaria de Selva do Exército (3ºBIS).

Após receber as devidas informações e havendo voluntariedade, o participante assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXOS B e C) e respondeu ao questionário semiestruturado (ANEXO D), ou seja, uma combinação de perguntas abertas e fechadas, oferecendo ao participante a possibilidade de ponderar sobre o tema proposto, sem que haja influência do pesquisador.

### 5.2.1 Critério de inclusão

Foram incluídos no estudo os indivíduos que expressaram voluntariedade por meio de compreensão e assinatura do TCLE. O critério de inclusão foi o indivíduo

ter frequentado ou frequentar área de extrativismo (moradores e/ou extrativistas com sorologia positiva ou desconhecida para *T. cruzi*).

Considerando a presença de triatomíneos infectados nas palmeiras, abundantes nas áreas de extrativismos, tomamos os indivíduos trabalhadores ou moradores de áreas de extrativismo de produtos da palmeira como grupo exposto. Em contrapartida, os indivíduos que nunca frequentaram áreas de extrativismo foram tomados como grupo comparativo.

### 5.2.2 Critério de exclusão

Não foi aplicado critério de exclusão nesse estudo.

## 5.3 Aplicação de questionário

O questionário aplicado apresentou 47 questões. Foi lido por colaboradores do estudo e respondido conforme informações prestadas pelo participante. Dessa forma, foi possível obter informações referentes à inclusão e ao perfil do participante, aspectos epidemiológicos e clínicos.

Cada questionário recebeu um código identificado, que consiste nas letras BAR, seguido do número sequencial de três dígitos e o ano de coleta. Exemplo: BAR001/2017, no qual BAR corresponde a Barcelos, 001 o primeiro participante e 2017 o ano da coleta. Obs.: o número sequencial separa-se do ano de coleta por uma barra conforme exemplificado.

Essa mesma identificação foi seguida nos tubos de coleta e na ficha médica.

## 5.4 Exame eletrocardiográfico

O exame eletrocardiográfico foi realizado nas dependências do Hospital Geral de Barcelos, utilizando o eletrocardiógrafo Micromed WinCardio e, através do sistema de Telemedicina, foram encaminhados ao Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM-Manaus). Os traçados eletrocardiográficos foram analisados e laudados por médicos cardiologistas. Indivíduos que apresentaram alterações cardíacas importantes, como bloqueio de ramo (direito ou esquerdo) e fibrilação

atrial, foram encaminhados para acompanhamento no HUFM conforme orientação do médico cardiologista, colaborador desse estudo.

## 5.5 Exame clínico

Todos os participantes foram encaminhados a exame clínico, realizados por médicos do DSEI Alto Rio Negro, das Unidades Básicas de Saúde (UBS) dos bairros Aparecida, São Francisco e São Sebastião e 3ºBIS. Para isso, cada participante recebeu uma ficha médica padrão (ANEXO E), identificada como os formulários de questionário, constando campos para anotações da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (pulso), ausculta cardíaca e pulmonar, realização ou não de teste para HIV e resultado, além das observações feitas pelo médico e queixas e sintomas relatados pelos participantes.

## 5.6 Coleta e processamento da amostra sanguínea

A coleta sanguínea foi realizada no Hospital Geral de Barcelos, local de serviço público de saúde e emergência do município.

Foram coletados cerca de 9ml de sangue de cada participante em dois tubos *vacutainer* para coleta à vácuo: um tubo de 4ml contendo anticoagulante ácido-etileno-diamino-tetracético (EDTA) e um tubo de 5ml contendo ativador de coágulo. Ambos descartáveis e constituídos de material siliconizado. O material coletado passou pelas seguintes etapas:

- os tubos coletores contendo sangue foram centrifugados a 4000rpm (rotações por minuto) por 10 minutos;
- do tubo contendo fator anticoagulante foi transferido 1ml do sobrenadante (plasma) para um tubo de criopreservação e armazenado em freezer, com temperatura de -20°C. Esse material foi utilizado para os testes de expressão de citocinas;
- do tubo contendo ativador de coágulo foi transferido o sobrenadante (soro) para tubo de criopreservação e armazenado a -20°C a fim de se realizar os testes sorológicos para *T. cruzi*.

A realização de todas as atividades no município de Barcelos contou formalmente com o apoio e a colaboração das entidades públicas de saúde do município sob as devidas anuências (ANEXOS F a L).

#### 5.6.1 Transporte do material para o Laboratório de Doenças Parasitárias no Rio de Janeiro

No final das atividades no município de Barcelos (cerca de 40 dias), o material foi enviado para o IOC/Fiocruz-RJ por via aérea em caixas de transporte adequadas, contendo gelo seco carbônico, para evitar descongelamento, garantindo a biossegurança de manuseio, transporte, ambiente e do próprio material, e reduzir os riscos. Essas precauções atendem à Portaria Normativa nº 585, de 7 de março de 2013, do Ministério da Defesa, que “considera a biossegurança um conjunto de medidas que buscam anular, mitigar, controlar ou evitar riscos que possam afetar o bem-estar humano, animal, vegetal e ambiental de maneira não intencional” (AIRES *et al.*, 2015).

#### 5.6.2 Armazenamento do material nas dependências do laboratório

O soro permaneceu em freezer sob temperatura de -30°C.

O plasma para ensaios de expressão de citocinas foi armazenado em freezer sob temperatura de -80°C.

### 5.7 Pesquisa sorológica (IGG) *anti-trypanosoma cruzi*

A pesquisa de IgG foi realizada pelo Laboratório de Doenças Parasitária utilizando-se duas técnicas: Imunofluorescência Indireta (IFI) e o teste imunoenzimático ELISA.

#### 5.7.1 Técnica de Imunofluorescência Indireta

Essa técnica busca a reação de soro ou plasma humano com o antígeno fixado em lâminas de microscopia para fluorescência e é visualizada em microscópio

de fluorescência. Nesse estudo, foi empregado o kit IFI-Chagas-Bio-Manguinhos (Fiocruz-Brasil), buscando pesquisar anticorpos IgG em soro humano.

O referido kit integra:

- suspensão de antígeno – 6 ml (mililitros);
- controle positivo - 0,3 ml;
- controle negativo - 0,3 ml;
- anti-Ig humana conjugada com fluoresceína - 0,3 ml;
- glicerina tamponada pH 9,0  $\pm$  0,5 – 10 ml;
- azul de Evans 0,1% - 1 ml;
- lâminas para IFI – 50 un.;
- lamínulas – 50 un.;
- manual de instruções.

Nesse estudo, o teste consistiu na reação de soro humano com o parasito (*T. cruzi*) fixado em lâminas de microscopia para fluorescência. Para a visualização da reação, foi adicionado anti-imunoglobulina humana (Ig), conjugada com isotiocianato de fluoresceína.

As amostras, os controles e os reagentes foram homogeneizados em temperatura ambiente antes do uso em teste para titulação do conjugado.

Para titulação do conjugado, foram utilizadas duas lâminas, contendo 10 poços cada. Em cada poço, foi aplicado 10 $\mu$ L da suspensão antigênica (homogeneizada). Após a aplicação da suspensão antigênica, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por 30 minutos a fim de que secassem.

Os controles positivo e negativo foram diluídos em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphat Buffered Saline*) pH 7,2 (pH- potencial Hidrogênico). O controle negativo foi diluído em 1:40, fazendo-se necessário utilizar 5 $\mu$ L de soro humano, adicionando-se 200 $\mu$ L de PBS, sendo homogeneizado suavemente, evitando a formação de bolhas.

O controle positivo foi diluído seriadamente em tubos da seguinte forma:

- diluição A: 1:40 (5 $\mu$ L de soro humano + 200 $\mu$ L de PBS);
- diluição B: 1:80 (100 $\mu$ L diluição A + 100 $\mu$ L de PBS);
- diluição C: 1:160 (100 $\mu$ L da diluição B + 100 $\mu$ L de PBS);
- diluição D: 1:320 (100 $\mu$ L da diluição C + 100 $\mu$ L de PBS).

O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado antes de cada diluição. As lâminas, já secas, foram retiradas da estufa e observados os poços de controle positivo e negativo. Os poços de controle negativo receberam 10 $\mu$ L da diluição 1:40

(controle negativo). Os poços de controle positivo receberam 10µL das diluições de controle positivo. Cada poço recebeu o conteúdo de diluição correspondente, atentando-se para que a ponta da ponteira não encostasse na superfície da lâmina, o que provocaria retirada do antígeno.

Após a distribuição das diluições em cada poço, as lâminas foram incubadas em estufa da marca Fanem, modelo Orion 502, a 37°C, por 30 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS, com duração de 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foram lavadas em água destilada e secas em estufa por 10 minutos a 37°C.

Foram aplicados 10µL dos controles positivo e negativo diluídos em PBS aos poços correspondentes na lâmina.

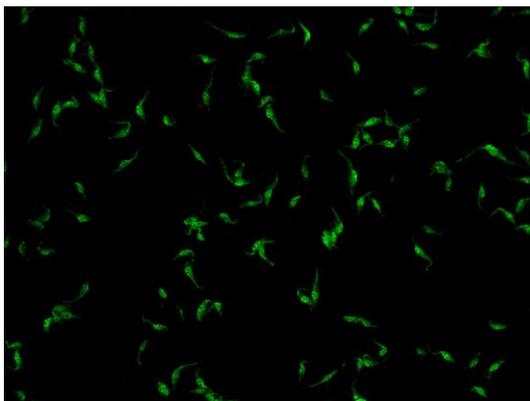
As amostras de soro provenientes dos participantes do estudo foram diluídas nas proporções 1:40, 1:60, 1:80 e 1:160 na solução PBS. Cada diluição teve 10µL aplicados em distintos poços da lâmina, sendo incubada por 30 minutos a 37°C em estufa. Decorridos 30 minutos, as lâminas foram lavadas em cuba por três vezes em PBS por cinco minutos cada lavagem, que foi finalizada em água destilada.

Para secagem, as lâminas foram levadas à estufa por 10 minutos a 37°C.

O conjugado anti-imunoglobulina (Ig) humana-fluoresceína previamente diluído em PBS-AE foi aplicado em 15µL em todos os poços das lâminas, sendo estas incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas, em seguida, por três vezes em cubas com PBS, finalizando a lavagem em água destilada. A secagem ocorreu em estufa a 37°C por 10 minutos. Por fim, foram adicionadas quatro gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, sendo cobertas por lamínulas e abrigadas da luz até o momento da leitura, realizada em microscópio de imunofluorescência.

Quando a amostra é positiva, ou seja, apresenta anticorpo anti-*T. cruzi*, o Ig+conjugado se liga ao parasito fixado na lâmina, emitindo fluorescência, indicando a positividade da reação. Foram consideradas positivas as amostras que apresentam fluorescência a partir da diluição 1:40 (Figura 5).

**Figura 5 – Exemplo de uma amostra com IgG positivo apresentada por técnica de Imunofluorescência indireta**



Fonte: Vircell Microbiologistis.

As amostras negativas, que não apresentam anticorpo anti-*T. cruzi*, não estabelecem reação com o parasito fixado em lâmina e não emitem fluorescência.

#### 5.7.2 Ensaio Imunoenzimático

O método qualitativo imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), estabelecido por Voller *et al.* (1975), baseia-se na interação antígeno-anticorpo, que é evidenciada pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, e é revelada por um cromógeno.

O método ELISA apresenta alta sensibilidade, requerendo a utilização de pouca quantidade de soro ou plasma. Além disso, proporciona a viabilidade de processamento de várias amostras em uma placa (THORNTON *et al.*, 2002).

Nesse estudo, foi utilizado o kit Chagatest ELISA recombinante v.3.0- Wiener lab. (2000- Rosário-Argentina: 831259500/01), sendo aplicado o procedimento especificado pelo fabricante, com reação em comprimento de onda primária de 450nm e secundária de 620nm, empregando 10ul de soro.

A técnica para detecção de anticorpo anti-*T. cruzi* empregada pelo Chagatest 3.0- Wiener fundamenta-se na diluição de amostras diluídas em suporte contendo os antígenos recombinantes imobilizados (1, 2, 13, 36 e SAPA – do inglês *Shed Acute Phase Antigen*), provenientes de proteínas específicas das formas tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*, obtidos por técnica de DNA recombinante, correspondentes a zonas altamente conservadas em diferentes cepas, caracterizando o método de 3º geração.

O kit contém os seguintes itens:

- policubetas de tiras removíveis, sensibilizadas com antígenos recombinantes imobilizados de *T. cruzi*;
- conjugado de anti-imunoglobulinas humanas e peroxidase;
- revelador peróxido de hidrogênio 60mmol/l em tampão citrato 50mmol/l pH 3,2;
- revelador tetrametilbencidina (TMB) 0,01mol/l em ácido clorídrico 0,1 N;
- stopper ácido sulfúrico 2 N;
- tampão de lavagem concentrado cloreto de sódio 1,4mol/l em tampão fosfato 100mmol/l e tensoativo não iônico 0,1g/l;
- diluente de amostra: albumina bovina em solução fisiológica tamponada com fosfato pH 7,2;
- controle positivo de soro contendo anticorpo inativado anti-*T. cruzi*;
- controle negativo de soro não reagente.

Seguindo orientações do fabricante, foi diluída uma parte do tampão de lavagem concentrado em quatro partes de água destilada (1+4). Para interpretação de resultados, quando a amostra é positiva, ou seja, contém anticorpos específicos, é formado um complexo com os antígenos, que permanecerá unido ao suporte. A fração não ligada é eliminada por lavagem após serem acrescentados anticorpos anti-imunoglobulina humana conjugados com peroxidase. Caso a reação ocorra na primeira etapa do processo, o conjugado se ligará.

Após uma nova lavagem, foi acrescentado o substrato enzimático, que reage com a peroxidase presente no conjugado, resultando em uma coloração azul. Quando a reação é interrompida com ácido sulfúrico, a coloração mudará de azul para amarelo. A coloração é lida em leitor de ELISA.

Dessa forma, para a realização do teste, os seguintes passos foram tomados:

- os reagentes e as amostras analisadas foram levados à temperatura ambiente;
- foram aplicados 200µL do diluente de amostras em cada poço da cubeta;
- foram empregados, sobre o diluente, dois controles positivos (CP) e três controles negativos (CN), no volume de 10µL cada, nas respectivas posições na cubeta;
- de igual modo, foram aplicados 10µL das amostras a serem analisadas, cada uma em sua posição na cubeta;
- as policubetas foram cobertas e incubadas por 30 minutos a 37°C;

- passados 30 minutos, as cubetas foram lavadas por cinco vezes com tampão de lavagem;
- o líquido residual, no final da lavagem, foi removido por inversão das cubetas sobre papel toalha;
- seguidamente, foram aplicados 50µL de conjugado em cada poço;
- as placas foram cobertas e levadas à estufa, permanecendo por 30 minutos a 37°C para secagem;
- passados 30 minutos, as cubetas foram lavadas por cinco vezes com tampão de lavagem;
- o líquido residual, no final da lavagem, foi removido por inversão das cubetas sobre papel toalha;
- em seguida, em cada poço, foram aplicados 50µL de cada revelador;
- as policubetas foram expostas à temperatura ambiente por 30 minutos;
- por fim, cada poço recebeu 50µL de “Stopper”.

As policubetas foram levadas ao equipamento leitor de ELISA, da marca Mindray, modelo MR-96A. O equipamento apresenta sistema de medição óptica bicromática, com método de detecção por absorvância, em filtro de 405nm a 630nm.

Os resultados foram interpretados conforme a absorvância da amostra com o valor do Cut-off, que é igual a média das leituras do Controle Negativo (CNx), dividido por 0,300 D.O. (30% da densidade óptica).

Seguindo esses critérios, foram consideradas não reagentes as amostras com absorvância menor que o limite inferior da zona de indeterminação (300). Foram consideradas reativas as amostras com absorvância a partir de 0,300 D.O. (densidade óptica) (Figura 6).

**Figura 6 – Visualização de reações de amostras em placa de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG**



Os poços em amarelos significam amostras positivas. Os poços brancos contêm amostras negativas.

Fonte: Cortesia – Dra. Patrícia Zauza. Laboratório de Doenças Parasitárias. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

## 5.8 Ensaio da concentração de citocinas plasmáticas

Os ensaios de citocinas foram realizados pelo Laboratório de Imunofarmacologia-IOC por meio da Plataforma Tecnológica do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde PDTIS-Luminex, Fiocruz-Rio de Janeiro.

Para esse ensaio, foi empregado kit comercial MilliPlex® MAP Kit, que acompanha placa de 96 poços, anticorpos de detecção (*bead*), padrões, tampão de ensaio, tampão de lavagem, diluente de amostra, diluente padrão, diluente de detecção de anticorpo, estreptavidina-PE, uma placa de fundo plano e fita de vedação. Para esse estudo, tomamos como referência cinco citocinas específicas: IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Os Imunoensaios MilliPlex® MAP Kit são construídos em grânulos magnéticos para a quantificação de citocinas múltiplas, quimiocinas e fatores de crescimento. Esses ensaios são oferecidos como painéis pré-misturados, personalizadas ou conjuntos de *singleplex*.

O kit emprega anticorpos monoclonais conjugados específicos para cada uma dessas citocinas, sensibilizados em placa de ELISA, possibilitando a quantificação de níveis de citocina plasmática expressa em pg/ml (picogramas por mililitro de plasma). A leitura do resultado foi feita no comprimento de onda de 405nm em espectrofotômetro da marca Spectra Max, Molecular Devices®.

A tecnologia de imunoensaio Luminex permite a quantificação simultânea de até 100 proteínas no soro, plasma, sobrenadante de cultura de tecidos ou lisado celular. Os analitos possíveis incluem citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, receptores solúveis, hormônios, moléculas de sinalização/fosforiladas.

Semelhante ao ELISA, esse ensaio foi projetado de acordo com um formato de imunoensaio em sanduíche de captura. As esferas acopladas ao anticorpo de captura foram incubadas com padrões de antígeno ou amostras por um tempo específico. A placa é então lavada para remover materiais não ligados, seguida de incubação com anticorpos de detecção biotinilados. Após a lavagem, os anticorpos biotinilados não ligados são incubados com um repórter de conjugado estreptavidina-ficoertrina (SA-PE) e, por fim, o leitor de matriz mede a fluorescência do SA-PE ligado.

Seguindo as recomendações do fabricante, o ensaio se deu da seguinte forma:

- foram distribuídos 22µL de *bead* diluídas em cada poço da placa (96 poços);
- a placa foi lavada duas vezes com 100µL de *Buffer* de lavagem;
- os plasmas humanos, assim como o padrão e o branco, foram vortexados e adicionados 25µL em seus respectivos poços;
- ao abrigo de luz, as placas foram cobertas com fita de vedação e papel alumínio e incubadas em agitador por 1 hora;
- a fita de vedação e o papel alumínio foram removidos, e a placa levada ao leitor Spectra Max, Molecular Devices® Bio-Plex, em leitura no comprimento de onda de 405nm.

### 5.9 Armazenamento dos dados

Os documentos (TCLE, questionário e ficha médica) foram digitalizados e armazenados em computador. As versões impressas encontram-se organizadas por ordem de identificação em arquivo físico.

Os dados obtidos, através do questionário sócio-epidemiológico, da ficha clínica, bem como resultados de eletrocardiograma, teste sorológico e ensaio de citocinas, foram transcritos e armazenados em banco de dados Microsoft® Excel® 2016 com cópia convertida para o banco elaborado no *Software* IBM® SPSS Statistics® 22.

### 5.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* IBM® SPSS Statistics® V22.0. Análises de comparações entre grupos de variáveis de distribuição normal foram feitas através do teste de *t-student* (2 grupos) ou por Análise de Variâncias (ANOVA) (mais de 2 grupos), enquanto as variáveis que apresentaram distribuição não normal foram analisadas pelos testes *Mann-Whitney*, para comparação de dois grupos, e *Kruskal-Wallis*, para comparação de três ou mais grupos independentes. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que o valor de p foi menor ou igual a 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise descritiva do universo amostral

O estudo contou com a participação de 513 indivíduos, dos quais 299 (58%) são masculinos e 214 (42%) femininos. A média de idade no grupo masculino foi de 41 anos, com desvio padrão de 17,33 anos. Entre o grupo feminino, a média de idade foi de 44 anos, e o desvio padrão de 17,08 anos (Tabela 2).

**Tabela 2 – Descrição da amostragem estudada na Região do Médio Rio Negro-AM quanto ao gênero (masculino e feminino) e média de idade**

Gênero	N	%	Média de idade	± Desvio padrão
Masculino	299	58,0	41,68	17,33
Feminino	214	42,0	44,10	17,08
<b>Total</b>	<b>513</b>	<b>100</b>	<b>43,53</b>	<b>17,23</b>

N-número de indivíduos. %- percentual.

Fonte: Elaboração própria.

A classificação dos participantes apresentada por faixa etária (Tabela 3) mostra que 207 (40%) participantes encontram-se na faixa etária compreendida entre 31 e 50 anos, englobando 123 (41%) da amostragem masculina e 84 (39%) da amostragem feminina.

**Tabela 3 – Descrição da amostragem definida por faixa-etária e gênero, destacando a faixa com maior percentual na população estudada na Região do Médio Rio Negro-AM**

Faixa Etária	Gênero				Total
	Masculino	%	Feminino	%	
0-10	4	1,0	1	0,5	5
11-20	22	7,0	21	10,0	43
21-30	45	15,0	37	17,0	82
<b>31-40</b>	<b>61</b>	<b>20,0</b>	<b>37</b>	<b>17,0</b>	<b>98</b>
<b>41-50</b>	<b>62</b>	<b>21,0</b>	<b>47</b>	<b>22,0</b>	<b>109</b>
51-60	48	16,0	37	17,0	85
61-70	33	11,0	20	10,0	53
>70	22	7,0	13	6,0	35
Não informado	2	1,0	1	0,5	3
<b>Total</b>	<b>299</b>	<b>100</b>	<b>214</b>	<b>100</b>	<b>513</b>

As linhas em destaque relacionam a faixa etária onde se concentrou a maioria dos participantes. Estes números foram somados, resultando 123 participantes na faixa de 31 a 50 anos (61+62), correspondendo a 40% da amostragem.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação à cor, 486 participantes (94,5%) se declararam pardos, dos quais 282 são masculinos e 204 femininos. O grupo de autodeclarados brancos somou 3,5% enquanto o grupo de autodeclarados negros somou 2% (Tabela 4).

**Tabela 4 – Cor autodeclarada pelos participantes, mensurada por gêneros masculino e feminino na Região do Médio Rio Negro-AM**

Cor	Gênero				Total	%
	Masculino	%	Feminino	%		
Negra	5	2,0	4	2,0	9	2,0
Branca	12	4,0	6	3,0	18	3,5
Parda	282	94,0	204	95,0	486	94,5
<b>Total</b>	299	100	214	100	513	100

Fonte: Elaboração própria.

Haja vista que a população da Região Amazônica é constituída fortemente por indivíduos indígenas, os participantes foram questionados quanto ao grupo (etnia) a que pertencem. A maioria dos participantes (58,9%) se declarou Baré enquanto 109 (21,2%) desconhecem sua etnia (Tabela 5)

**Tabela 5 – Classificação dos participantes por etnia na Região do Médio Rio Negro-AM**

Grupo indígena	Etnia do Pai	
	Participantes	%
Baniwa	32	6,2
Baré	302	58,9
Cariano	1	0,2
Lanawa	1	0,2
Macunadebe	1	0,2
Oripacu	2	0,4
Tariana	1	0,2
Tatinaua	2	0,4
Dessana	1	0,2
Ticuna	1	0,2
Tucana	12	2,5
Uakixana	1	0,2
Yanomami	46	9,0
Sem informação	110	21,2
<b>Total</b>	513	100

Etnias (grupos) indígenas aos quais pertence a amostragem desse estudo, mostrando a maior prevalência Baré

Fonte: Elaboração própria.

O grupo de expostos contou com 271 (60,5%) participantes masculinos e 177 (39,5%) femininos, totalizando 448 integrantes (Tabela 6). O grupo de não expostos contou com 65 (13%) da amostragem total, sendo 28 (43%) participantes masculinos e 37 (57%) femininos.

**Tabela 6 – Classificação por gênero entre expostos e não expostos à infecção por *T. cruzi* em área de extrativismo de produtos de palmeira na Região do Médio Rio Negro-AM**

Gênero	Exposto				Total
	Sim	%	Não	%	
Masculino	271	60,5	28	43,0	299
Feminino	177	39,5	37	57,0	214
<b>Total</b>	<b>448</b>	<b>100</b>	<b>65</b>	<b>100</b>	<b>513</b>

Fonte: Elaboração própria.

O tempo médio de exposição, considerando o exercício da extração de fibras e produtos da palmeira e/ou moradia em território de extrativismo, foi de 19,17 anos. Tanto na população masculina quanto na feminina, a maior concentração esteve na faixa de exposição de até 10 anos, sendo 83 homens e 56 mulheres, representando 31% e 32% respectivamente. Um homem e duas mulheres não souberam responder por quanto tempo viveram ou vivem na condição de expostos (Tabela 7).

**Tabela 7 – Distribuição de tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM, classificada por faixa com intervalo de 10 anos até a faixa de 41 a 50**

Faixa de tempo de exposição (anos)	Gênero				Total
	Masculino	%	Feminino	%	
Até 10	83	31,0	56	32,0	139
11-20	53	19,0	47	27,0	100
21-30	48	18,0	28	16,0	76
31-40	44	16	20	11,0	64
41-50	22	8	17	9,0	39
>50	20	7,5	7	4,0	27
Sem informação	1	0,5	2	1,0	3
<b>Total</b>	<b>270</b>	<b>100</b>	<b>175</b>	<b>100</b>	<b>448</b>

Participantes com período de exposição a partir de 51 anos foram agrupados na faixa maior de 50 (>50).

Fonte: Elaboração própria.

Os participantes receberam uma placa contendo espécimes de triatomíneos. Ao observá-la, 434 (85%) participantes responderam já terem visto o inseto em algum momento, do quais 414 (95%) viram o triatomíneo em área de piaçaval e 20 (5%) viram-no em locais fora da área de extrativismo. Quando questionados se o triatomíneo os picou, 260 (51%) participantes relataram ver o triatomíneo lhes picando, ou notaram sangue em suas mãos ou pele e o triatomíneo morto sobre o

seu corpo ou caído ao chão próximo à rede onde dormiam. Entre aqueles que asseguraram terem sido picados por triatomíneos, 252 (97%) pertencem ao grupo exposto, numa prevalência de 0,67 e razão de risco 12,14. O nível de significância estatística foi menor que 0,05 (Tabela 8). Os demais 84 participantes não souberam responder.

**Tabela 8 – Análise de relação entre o fator exposição e o risco de ser picado por triatomíneos na Região do Médio Rio Negro-AM**

Exposto	Já picado		Total	pr	Pr x C	ΣPr x C	OR	valor de p
	Sim (%)	Não (%)						
Sim	252 (97)	122 (72)	374	0,67	169,8			
Não	8 (3)	47 (28)	55	0,15	1,16	170,96	12,14	0,000
Total	260 (100)	169 (100)	429	0,61	157,58			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ration*) = razão de risco. A prevalência de casos de picadas por triatomíneos no grupo exposto foi de 0,67, e a razão de risco (OR) de 12,14. Valor de  $p \leq 0,05$ .

Fonte: Elaboração própria.

A média de picadas foi proporcionalmente maior conforme o tempo de exposição até a faixa de 31 a 40 anos, com queda de 1,5% e 7% entre as faixas seguintes (Tabela 9).

**Tabela 9 – Média de picadas por triatomíneos dentro das faixas de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM**

Faixa/Tempo de Exposição (anos)	Média de picadas
01-10	6,5
11-20	8,5
21-30	11,7
31-40	13,0
41-50	12,8
>50	11,9

Fonte: Elaboração própria.

Grande parte da população incluída nesse estudo reside em comunidades ribeirinhas distantes da sede do município, o que requer, muitas vezes, viagens de barco que ultrapassam duas horas para o percurso. Entre as comunidades de residência podemos citar Tapera, Nova Jerusalém, Nova Vida, Tabaco, Akukuaia, Aku Aku, Canafé, Floresta, Santa Luzia, São Francisco, Bandeira Branca e Piloto, sendo esta última a mais próxima da sede, demandando cerca de quarenta minutos em um percurso utilizando barco motor. Durante visita a essas comunidades,

podemos observar a presença de escola ofertando ensino para os primeiros anos do ensino fundamental (educação infantil) e de posto básico de saúde. Cada comunidade possui um líder comunitário, que cuida, dentre outros assuntos, da orientação quanto aos cuidados da saúde. Essas comunidades também recebem, periodicamente, visita da equipe de saúde do Distrito Sanitário Especial Indígena, que conta com médicos, assistente social, enfermeiro(a), técnico e auxiliar de enfermagem, dentista e auxiliar de consultório dentário.

## 6.2 Sorologia (IGG) *anti-trypanosoma cruzi* pela técnica de imunofluorescência indireta

Foi feita pesquisa de anticorpo IgG anti-*T. cruzi*, por meio de IFI, com todas as 513 amostras coletadas, das quais 73 (14%) foram reagentes e 440 (86%) não reagentes. Entre os reagentes, 71 (97%) pertencem ao grupo exposto, em uma prevalência de 0,16 e razão de risco de 5,93. A significância estatística foi de 0,006 (Tabela 10).

**Tabela 10 – Análise de relação entre o fator exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a sorologia IgG pela técnica de imunofluorescência indireta**

Exposto	IgG		Total	Pr	Pr x C	$\Sigma$ Pr x C	OR	Valor de p
	Positivo	Negativo						
Sim	71	377	448	0,16	11,25	11,31	5,93	0,006
Não	2	63	65	0,03	0,06			
Total	73	440	513	0,14	10,39			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados,  $\Sigma$  Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ration*) = razão de risco. A prevalência de sorologia IgG positiva pela técnica de IFI entre os expostos foi de 0,16, enquanto entre os não expostos foi de 0,03. Valor de p<0,05.

Fonte: Elaboração própria.

Entre os participantes que apresentaram sorologia IgG positiva pela técnica de IFI, 54 lembram terem sido picados por triatomíneos, enquanto 9 não recordam o episódio. O fato de ter sido picado por triatomíneos aumenta em 11,71 vezes a chance de o indivíduo apresentar um teste IFI reagente (Tabela 11).

**Tabela 11 – Análise de prevalência de sorologia IgG pela técnica de imunofluorescência indireta entre indivíduos “picados” por triatomíneos na Região do Médio Rio Negro-AM**

Picado	IgG		Total	pr	pr x C	Σ Pr x C	Valor de p
	Positivo	Negativo					
Sim	54	206	260	0,21	11,22	11,71	0,0005
Não	9	154	163	0,06	0,50		
Total	63	360	423	0,15	9,38		

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ration*) = razão de risco. A prevalência de sorologia IgG positiva pela técnica de IFI entre os indivíduos que foram “picados” por triatomíneos foi de 0,21, enquanto entre os não “picados” foi de 0,06. Valor de p=0,0005.

Fonte: Elaboração própria.

Quando observamos o tempo de exposição, as maiores prevalências de sorologia IgG positiva pela técnica IFI concentram-se nas amostragens de indivíduos que estiveram no grupo exposto por 21 a 30 anos (0,17) e de 41 a 50 anos (0,25) (Tabela 12).

**Tabela 12 – Correlação entre o tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a prevalência de amostras com IgG positiva pela técnica de imunofluorescência indireta**

Faixa Exposicao (anos)	IFI		Total	Pr	Pr x C	Σ Pr x C	X <sup>2</sup>	Valor de p
	Reagente	Não reagente						
0	2	63	65	0,03	0,06	11,88	11,65	0,07
0,01-10	20	119	139	0,14	2,88			
11-20	14	86	100	0,14	1,96			
21-30	13	63	76	0,17	2,22			
31-40	9	55	64	0,14	1,26			
41-50	10	29	39	0,25	2,56			
>50	5	22	27	0,18	0,92			
Total	73	437	510	0,14	10,45			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, X<sup>2</sup>= qui-quadrado. Valor de p=0,07.

Fonte: Elaboração própria.

A prevalência de ensaio sorologia IgG positiva por IFI aumenta proporcionalmente com a faixa etária do indivíduo (Tabela 13), na qual observamos aumento aproximadamente 20% de prevalência a cada período de 10 anos.

**Tabela 13 – Análise de relação entre a faixa etária e a prevalência de amostras reagentes à técnica de IFI na Região do Médio Rio Negro-AM**

Faixa Etária	IgG		Total	Pr	Pr x C	Σ Pr x C	X <sup>2</sup>	Valor de p
	Positivo	Negativo						
0,01-30	8	122	130	0,06	0,49			
31-40	10	88	98	0,10	1,02			
41-50	16	93	109	0,15	2,35	12,22	16,94	0,005
51-60	18	67	85	0,22	3,81			
>60	20	68	88	0,23	4,54			
Total	72	438	510	0,14	10,16			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, X<sup>2</sup>= qui-quadrado. Valor de p=0,005.

Fonte: Elaboração própria.

### 6.3 Sorologia (IGG) *anti-trypanosoma cruzi* pelo ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ensaio ELISA apresentou-se reativo para 45 (9%) amostras, das quais 44 (98%) pertencem ao grupo de expostos, que apresentou razão de risco de 7,5. O nível de significância estatística foi de 0,021 (Tabela 14). Não foi avaliada a possibilidade de infecção oral.

Os participantes que já foram “picados” por triatomíneos apresentaram chances 3,5 maiores de obterem sorologia IgG positiva pelo método ELISA. A prevalência nesse grupo foi de 0,08 enquanto entre os não expostos foi de 0,09, com valor de p=0,001 (Tabela 15).

**Tabela 14 – Análise de relação entre o fator exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a reação ao ELISA para *T. cruzi***

Exposto	ELISA		Total	Pr	Pr x C	Σ Pr x C	OR	Valor de p
	Reagente	Não reagente						
Sim	44	399	443	0,10	4,37	4,38	7,5	0,021
Não	1	68	69	0,01	0,01			
Total	45	467	512	0,09	3,96			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ration*) = razão de risco. A prevalência de sorologia IgG positiva pelo método ELISA entre os indivíduos expostos foi de 0,10, enquanto entre os não expostos foi de 0,01. A razão de chance de indivíduos expostos apresentarem IgG positiva por método ELISA foi de 7,5. Valor de p=0,021.

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 15 – Análise da influência da picada por triatomíneo na Região do Médio Rio Negro-AM sobre o resultado de ELISA**

Picado	ELISA		Total	pr	Pr x C	Σ Pr x C	OR	Valor de p
	Reagente	Não reagente						
Sim	35	377	412	0,08	2,97	3,50	0,97	0,001
Não	6	63	69	0,09	0,52			
Total	41	440	481	0,09	3,49			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados,  $\Sigma$  Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ration*) = razão de risco. A prevalência de sorologia IgG positiva pelo método ELISA entre os indivíduos já “picados” por triatomíneos foi de 0,08, enquanto entre os não “picados” foi de 0,09. A razão de chance de indivíduos expostos apresentarem IgG positiva por método ELISA foi de 0,97. Valor de p=0,001.

Fonte: Elaboração própria.

O tempo de exposição mostrou ser um fator influente para a prevalência de sorologia IgG positiva, cujas maiores concentrações envolvem indivíduos com mais de 10 anos de exposição (Tabela 16). A titulação de IgG aumentou consideravelmente na faixa de 41 a 50 anos de exposição (383,92) (Tabela 7 e Figura 7).

**Tabela 16 – Análise de relação entre o tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e a sorologia IgG anti- *T. cruzi***

Faixa Exposicao (anos)	IgG		Total	Pr	Pr x C	Σ Pr x C	X <sup>2</sup>	Valor de p
	Positivo	Negativo						
0	1	64	65	0,01	0,01	5,22	11,65	0,02
0,01-10	7	132	139	0,05	0,35			
11-20	11	89	100	0,11	1,21			
21-30	7	69	76	0,09	0,64			
31-40	7	57	64	0,10	0,76			
41-50	8	31	39	0,20	1,64			
>50	4	23	27	0,15	0,59			
Total	45	465	510	0,09	3,97			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados,  $\Sigma$  Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, X<sup>2</sup>= qui-quadrado. Valor de p=0,016.

Fonte: Elaboração própria.

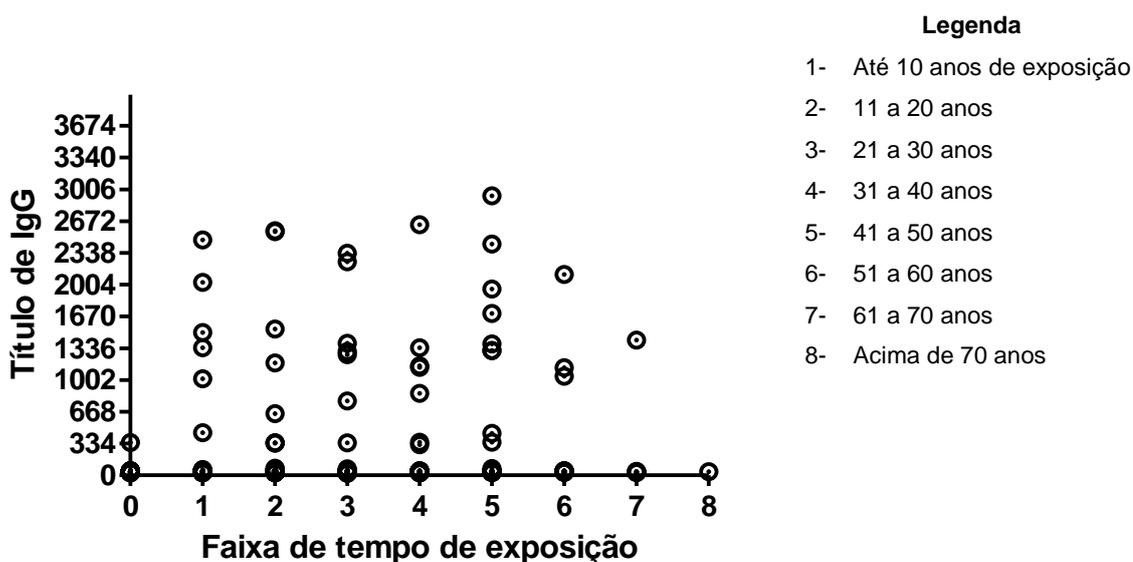
**Tabela 17 – Titulação de IgG por ELISA: média comparada à faixa de tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM**

Título de IgG por ELISA			
Faixa de Tempo de Exposição (anos)	Média	N	Desvio padrão
0	42,68	65	38,48
0,1-10	100,24	139	322,16
11-20	130,14	100	403,84
21-30	162,03	76	440,73
31-40	156,05	64	415,25
41-50	383,92	39	747,56
51-60	237,71	20	532,30
>60	266,33	6	565,20
Total	144,28	510	415,80

0- não exposto, 0,1- um mês.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 7: Titulação de IgG anti *T. cruzi* por ELISA conforme o tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM**



Foram considerados positivos os títulos com densidade óptica a partir de 334. IgG- imunoglobulina G.

Fonte: Elaboração própria.

A incidência de sorologia IgG positiva pela técnica ELISA aumentou conforme a faixa etária, assim como seus níveis aumentaram conforme o aumento da idade (Tabela 18 e Figura 8).

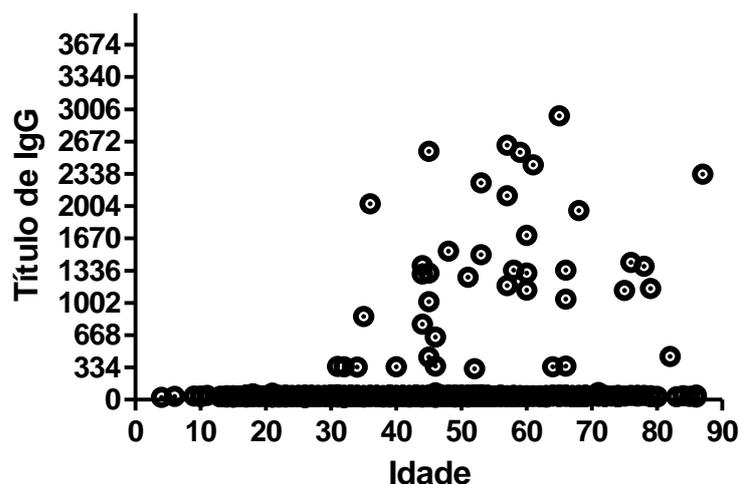
**Tabela 18 – Análise de relação entre a faixa etária e a reação ao ELISA para *T. cruzi* na população da Região do Médio Rio Negro-AM**

Faixa Etária	IgG		Total	Pr	Pr x C	$\Sigma$ Pr x C	$\chi^2$	Valor de p
	Positivo	Negativo						
0,01-30	1	130	131	0,01	0,01			
31-40	8	90	98	0,08	0,65			
41-50	11	98	109	0,10	1,11	5,38	17,71	0,005
51-60	12	73	85	0,14	1,69			
>60	13	75	88	0,15	1,92			
Total	45	466	511	0,09	3,96			

IgG= imunoglobulina G, pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados,  $\Sigma$  Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos,  $\chi^2$ = qui-quadrado. Valor de p= 0,005.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 8 – Titulação de IgG comparada à idade do indivíduo (Região do Médio Rio Negro-AM)**



IgG= imunoglobulina G. Idade escalada em anos.

Fonte: Elaboração própria.

Quando comparado o resultado da sorologia IgG sob o método ELISA em relação às co-infecções, foi encontrada significância estatística ( $p < 0,05$ ) conforme a combinação de infecções (Chagas, Malária, Dengue, Leishmaniose Tegumentar Americana) (Tabela 19).

**Tabela 19 – Análise de resultado do teste ELISA comparado ao número de agravos apresentados pelo participante na Região do Médio Rio Negro-AM**

Nro_Infec*	IgG		Total	pr	Pr x C	Σ Pr x C	X <sup>2</sup>	Valor de p
	Positivo	Negativo						
0	0	43	43	0,000	0,000			
1	1	285	286	0,003	0,003			
2	22	122	144	0,153	3,361	16,894	161,02	0,0000
3	18	16	34	0,529	9,529			
4	4	0	4	1,000	4,000			
Total	45	466	511	0,088	3,963			

\* Nro\_Infec = Chagas + Malária + Leishmania + Dengue

Fonte: Elaboração própria.

#### 6.4 Análise dos eletrocardiogramas

Nesse estudo, 357 (69%) participantes passaram por exame eletrocardiográfico (ECG), dos quais 115 (32%) apresentaram alteração e 242 (68%) apresentaram ECG normal. Entre os participantes com ECG alterado, 75 (65%) são do gênero masculino, com prevalência de 0,36. Entre participantes femininos, 40 (35%) apresentaram ECG alterado, prevalência de 0,27 (Tabela 20).

**Tabela 20 – Análise de relação entre o gênero e alterações eletrocardiográficas dos moradores na Região do Médio Rio Negro-AM**

Gênero	ECG		Total	pr	Pr x C	Σ Pr x C	OR	valor de p
	Alterado	Normal						
Masculino	75	136	211	0,36	26,66			
Feminino	40	106	146	0,27	10,96	37,62	1,46	0,11
Total	115	242	357	0,32	37,04			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ration*) = razão de risco. A prevalência de alterações cardíacas demonstradas por ECG foi de 0,36 entre os e homens e de 0,27 entre as mulheres. Valor de p>0,05.

Fonte: Elaboração própria.

Considerando a Terceira Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre análise e emissão de laudos eletrocardiográficos (PASTORE *et al.*, 2009), as alterações eletrocardiográficas dos participantes foram categorizadas em arritmias cardíacas (34 participantes), repolarização ventricular (52 participantes), sobrecarga

das câmaras cardíacas (1 participante) e distúrbios de condução intraventriculares (28 participantes) (Quadro 5).

**Quadro 5 – Categorização das alterações eletrocardiográficas apresentadas pelos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Alteração de ECG	Gênero		Total	% entre os participantes com alteração eletrocardiográfica (n=115)
	Masculino	Feminino		
Arritmias cardíacas	24	10	34	30
Alteração na repolarização ventricular	31	21	52	45
Sobrecarga das câmaras cardíacas	1	0	1	1
Distúrbios de condução intraventriculares	18	10	28	24
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>41</b>	<b>115</b>	<b>100</b>

Categorização das alterações eletrocardiográficas mostrando que a prevalência de alteração na repolarização ventricular seguida de arritmia cardíaca. ECG-eletrocardiograma.

Fonte: Elaboração própria.

Entre as arritmias cardíacas, a maioria dos participantes apresentou bradicardia sinusal (18), sendo 13 masculinos e 5 femininos. Em seguida, 5 participantes apresentaram taquicardia sinusal (4 masculinos e 1 feminino) enquanto taquicardia supraventricular foi apresentada por apenas 1 participante (Tabela 21).

**Tabela 21 – Arritmias cardíacas entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Arritmia cardíaca	Sexo		Total	% entre os participantes com ECG alterado (n=115)
	Masculino	Feminino		
Taquicardia supraventricular	0	1	1	1,0
Taquicardia sinusal	4	1	5	4,0
Bradicardia sinusal	13	5	18	16,0
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>21,0</b>

Apresentação das alterações do ritmo cardíaco, onde podemos observar que a maioria foi caracterizada como bradicardia sinusal. %= percentual representado. ECG= eletrocardiograma. n= total de indivíduos.

Fonte: Elaboração própria.

As alterações supraventriculares foram apresentadas somente por participantes masculinos, dos quais 2 apresentaram ritmo atrial ectópico e 1 apresentou fibrilação atrial (Tabela 22).

**Tabela 22 – Alterações do ritmo supraventricular entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Análise das alterações de ritmo supraventricular	Sexo		Total	% entre os participantes com ECG alterado (n=115)
	Masculino	Feminino		
Ritmo atrial ectópico	2	0	2	2,0
Fibrilação atrial	1	0	1	1,0
Total	3	0	3	3,0

Apresentação das alterações do ritmo supraventricular, observando que foram apresentadas somente por participantes masculinos. %= percentual representado. ECG= eletrocardiograma. n= total de indivíduos.

Fonte: Elaboração própria.

As arritmias ventriculares foram predominantemente extrassistólicas, com distribuição relativamente similar entre os participantes masculinos (4) e femininos (3) (Tabela 23).

**Tabela 23 – Arritmias ventriculares apresentadas pelos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Análise das arritmias ventriculares	Sexo		Total	% entre os participantes com ECG alterado (n=115)
	Masculino	Feminino		
Extrassístoles ventriculares	4	3	7	6,0
Total	4	3	7	6,0

Apresentação das arritmias ventriculares, predominantemente extrassistolial. %= percentual representado. ECG= eletrocardiograma. n= total de indivíduos.

Fonte: Elaboração própria.

Alteração da repolarização ventricular foi apresentada pela maior parte dos participantes (52), envolvendo 31 participantes masculinos e 21 femininos (Tabela 24).

**Tabela 24 – Alteração da repolarização ventricular entre moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Análise da repolarização ventricular	Sexo		Total	% entre os participantes com ECG alterado (n=115)
	Masculino	Feminino		
Alteração da repolarização ventricular	31	21	52	45,0
Total	31	21	52	45,0

Apresentação da alteração de repolarização ventricular, caracterizando a alteração mais frequente nos participantes. %= percentual representado. ECG= eletrocardiograma. n= total de indivíduos.

Fonte: Elaboração própria.

Alterações intraventriculares foram apresentadas por 27 participantes, dos quais 24 apresentaram bloqueio de ramo direito, sendo 16 masculinos e 8 femininos, enquanto bloqueio de ramo esquerdo foi apresentado por 3 participantes (1 masculino e 2 femininos). Bloqueio divisional anterossuperior foi apresentado por 14 participantes (11 masculinos e 3 femininos) (Tabela 25).

**Tabela 25 – Bloqueios intraventriculares apresentadas pelos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Análise de bloqueios intraventriculares	Sexo		Total	% entre os participantes com ECG alterado (n=115)
	Masculino	Feminino		
Bloqueio de ramo esquerdo	1	2	3	3,0
Bloqueio de ramo direito	16	8	24	21,0
Bloqueio divisional anterossuperior	11	3	14	12,0
Total	28	13	41	35,0

Apresentação dos bloqueios intraventriculares, onde podemos observar que a maioria foi caracterizada como bloqueio de ramo direito. %= percentual representado. ECG= eletrocardiograma. n= total de indivíduos.

Fonte: Elaboração própria.

Por fim, 1 participante masculino apresentou sobrecarga das câmaras cardíacas com sobrecarga ventricular esquerda (Tabela 26).

**Tabela 26 – Análise de sobrecarga das câmaras cardíacas apresentadas pelos participantes na Região do Médio Rio Negro-AM**

Sobrecarga das câmaras cardíacas	Sexo		Total	% entre os participantes com ECG alterado (n=115)
	Masculino	Feminino		
Sobrecarga ventricular esquerda	1	0	1	1,0
Total	1	0	1	1,0

Apresentação da sobrecarga das câmaras cardíacas, observando que a maioria consistiu no bloqueio divisional anterossuperior. %= percentual representado. ECG= eletrocardiograma. n= total de indivíduos.

Fonte: Elaboração própria.

A média de idade dos participantes com alteração cardíaca foi de 48,95 anos, com erro padrão de 1,70 e significância estatística de 0,011.

A maior prevalência de alterações cardíacas (0,35) foi encontrada no grupo exposto, no qual 108 participantes apresentaram algum tipo de alteração, sendo a significância estatística de 0,011 (Tabela 27).

**Tabela 27 – Análise de relação entre o fator exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e alterações no ECG**

Exposto	ECG		Total	Pr	Pr x C	$\Sigma$ Pr x C	OR	valor de p
	Alterado	Normal						
Sim	108	204	312	0,35	37,38	38,47	2,87	0,011
Não	7	38	45	0,16	1,09			
Total	115	242	357	0,32	37,34			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados,  $\Sigma$  Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ratio*) = razão de risco. A prevalência de alterações cardíacas demonstradas por ECG foi de 0,35 entre os expostos e de 0,16 entre os não expostos. Valor de p=0,011.

Fonte: Elaboração própria.

Entre os participantes com sorologia IgG positiva, apenas 34 (75,5%) realizaram ECG, entre os quais 44% apresentaram alteração cardíaca, embora não tenha sido encontrada significância estatística (Tabela 28).

**Tabela 28 – Comparação dos resultados do eletrocardiograma com a sorologia IgG anti- *T. cruzi* entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

IgG	ECG		Total	Pr	Pr x C	Σ Pr x C	OR	valor de $p$
	Alterado (%)	Normal (%)						
Positivo	15 (44)	19 (56)	34	0,44	6,62	37,06	1,78	0,112
Negativo	99 (31)	223 (69)	322	0,31	30,44			
Total	114	242	356	0,32	36,51			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados, Σ Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ratio*) = razão de risco. A prevalência de alterações cardíacas demonstradas por ECG foi 0,44 entre os indivíduos com IgG positivo e 0,34 entre os negativos. Valor de  $p=0,112$ .

Fonte: Elaboração própria.

Entre os participantes com sorologia IgG positiva, a alteração mais frequente foi da repolarização ventricular (8), contudo, não houve significância estatística. Essa alteração eletrocardiográfica também foi predominante entre os participantes com IgG negativo (Tabela 29).

**Tabela 29 – Alterações eletrocardiográficas apresentadas entre os participantes com sorologias IgG positiva e negativa para *T. cruzi*, moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Abreviatura	Alteração	IgG Positivo (n=45)	%	IgG Negativo (n=468)	%	Total (n=513)	Valor p
ARV	Alteração de repolarização ventricular	8	18,0	44	9,5	52	0,142
BDAS	Bloqueio divisional antero superior	3	7,0	11	2,0	14	0,135
BradSin	Bradicardia sinusal	3	7,0	15	3,0	18	0,314
BRD	Bloqueio de ramo direito	1	2,0	18	4,0	19	0,497
BRE	Bloqueio de ramo esquerdo	1	2,0	2	0,5	3	0,169
ESV	Extrassístole ventricular	0	0,0	3	1,0	3	0,180
FibAtr	Fibrilacao atrial	1	2,0	0	0,0	1	0,002
RAEct	Ritmo atrial ectópico	0	0,0	2	0,5	2	0,642
ScVE	Sobrecarga ventricular esquerda	0	0,0	1	0,2	1	0,742
Taq_Sin	Taquicardia sinusal	0	0,0	5	1,0	5	0,460
TaqSV	Taquicardia supraventricular	0	0,0	1	0,2	1	0,743
	Total	17	38,0	102	22,0	119	

Alterações eletrocardiográficas apresentados pelos participantes, mostrando que a maioria dos soropositivos para *T. cruzi* apresenta alteração na repolarização ventricular. IgG= imunoglobulina G. n= total de indivíduos. %= percentual representado em cada grupo.

Fonte: Elaboração própria.

## 6.5 Descrição dos resultados do exame clínico

A aferição da pressão arterial sistólica e diastólica (PAS e PAD) mostrou que a média na população estudada foi de 113 por 73 mmHg (milímetros de mercúrio). A distribuição apresentou-se quase homogênea entre homens (114 por 73 mmHg) e mulheres (113 por 72 mmHg). Também não foi vista discrepância entre expostos e

não expostos. Por outro lado, indivíduos com sorologia IgG positiva para *T. cruzi* apresentaram pressão arterial mais alta (120 por 77 mmHg) que os indivíduos soronegativos (113 por 72 mmHg) (Tabela 30).

**Tabela 30 – Média da pressão arterial (sistólica e diastólica) dos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM comparada entre gênero, exposição e sorologia IgG anti-*T. cruzi***

		Média (mmHg)			
		PAS	Desvio padrão	PAD	Desvio padrão
Sexo	Masculino	114	14,92	73	9,07
	Feminino	113	11,32	72	9,12
Exposto	Sim	114	13,59	73	9,12
	Não	111	12,85	71	8,9
IgG	Positivo	120	10,68	77	7,98
	Negativo	113	13,61	72	9,09

PAS- pressão arterial sistólica, PAD- pressão arterial diastólica, mmHg- miligrama de mercúrio.

Fonte: Elaboração própria.

Considerando a conceituação de hipertensão arterial, conforme a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (MALACHIAS *et al.*, 2016), na qual são considerados hipertensos indivíduos que apresentam níveis pressóricos de PAS  $\geq$  140 mmHg e/ou PAD  $\geq$  90 mmHg, categorizamos, então, os indivíduos sugestivamente em hipertensos e não hipertensos. Dessa forma, 31 participantes foram considerados hipertensos, cuja média foi 140 por 84 mmHg na amostragem geral. 97% dos participantes estão no grupo exposto à infecção vetorial por *T. cruzi*, maioria masculina (78%), e 28% apresentaram sorologia IgG positiva (Tabela 31).

**Tabela 31 – Caracterização dos indivíduos considerados hipertensos (PAS  $\geq$  140 mmHg e/ou PAD  $\geq$  90 mmHg) na Região do Médio Rio Negro-AM**

		Hipertenso				Total	Pr	Pr x C	$\Sigma$ Pr x C	OR	Valor de p
		Sim	%	Não	%						
Sexo	Masculino	24	77,0	230	56,0	254	0,09	2,27	2,53	2,71	0,019
	Feminino	7	22,5	182	44,0	189	0,04	0,26			
Exposto	Sim	30	97,0	366	89,0	396	0,08	2,27	2,29	3,77	0,167
	Não	1	3,0	46	11,0	47	0,02	0,02			
IgG	Positivo	9	29,0	33	8,0	42	0,21	1,93	3,14	4,70	0,000
	Negativo	22	71,0	379	92,0	401	0,05	1,21			

pr= prevalência, Pr x C= prevalência multiplicada pelo número de casos observados,  $\Sigma$  Pr x C = somatório da prevalência multiplicado pelo número de casos, OR (do inglês *Odds Ratio*) = razão de risco. A prevalência de hipertensão foi de 0,09 entre o sexo masculino, que apresentou risco 2,71 vezes maior que a população feminina. Entre os expostos, a prevalência foi de 0,08 e a razão de risco igual a 3,77. Por sua vez, indivíduos com IgG positivo para *T. cruzi* apresentaram risco relativo de 4,40 maior de desenvolverem hipertensão que os soronegativos. A prevalência de hipertensão entre os soropositivos foi de 0,21. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

Fonte: Elaboração própria.

## 6.6 Quantificação de citocinas plasmáticas

Observando as tabelas a seguir, podemos perceber que a concentração média (em pg/ml) de citocinas plasmáticas foi maior no grupo exposto, com exceção de IFN- $\gamma$  (Tabela 32, Figura 9 A, B, C, D, E).

**Tabela 32 – Média de concentração de citocinas (pg/ml) nos grupos exposto e não exposto à infecção vetorial por *T. cruzi* na Região do Médio Rio Negro-AM**

Citocina	Exposto	N	Média (pg/ml)	Desvio Padrão	Valor de p
IFN- $\gamma$	Não	29	36,09	65,36	0,484
	Sim	211	63,78	211,09	
IL-10	Não	29	63,40	173,56	0,848
	Sim	211	51,24	335,38	
IL-6	Não	29	17,70	189,13	0,610
	Sim	211	23,27	582,02	
IL-8	Não	29	54,38	62,34	0,439
	Sim	211	65,53	73,81	
TNF- $\alpha$	Não	29	48,38	42,10	0,755
	Sim	211	65,11	287,04	

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/ml- picograma por mililitro.

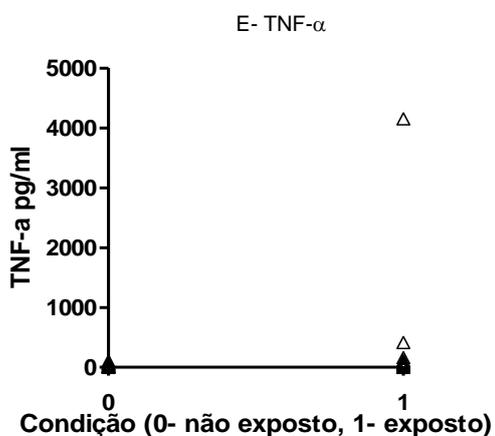
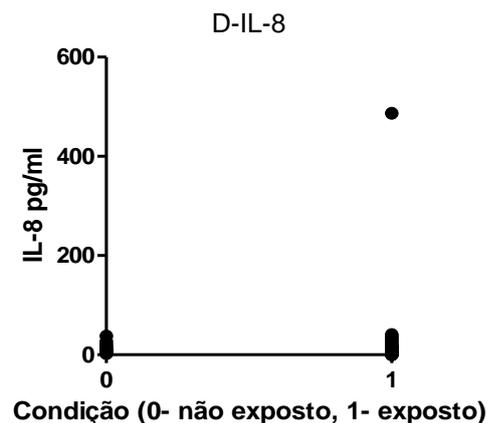
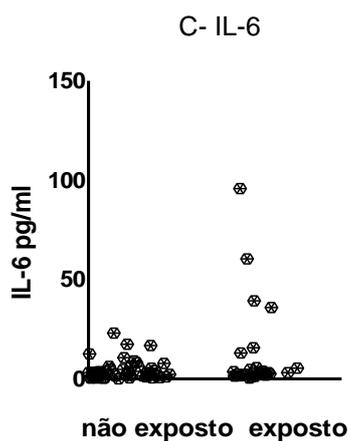
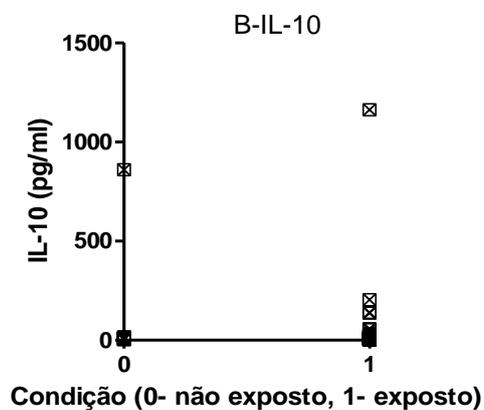
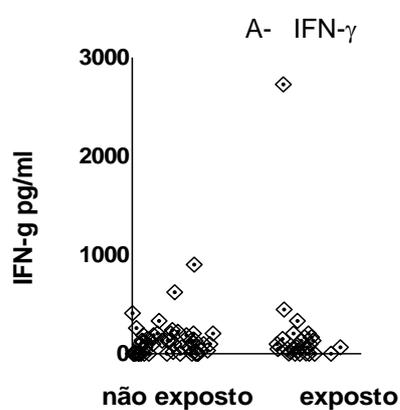
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 9 – Concentração de citocinas comparada entre indivíduos expostos e não expostos à infecção vetorial por *T. cruzi* em áreas de piaçaval na Região do Médio Rio Negro-AM**

**Legenda**

0- Não exposto

1- Exposto



IFN-g= interferon gama, IL= interleucina, TNFa= Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), pg/ml= picogramas por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

As concentrações de IL-10 apresentaram correlação com o tempo de exposição ( $p=0,021$ ). Os indivíduos expostos por até 10 anos apresentaram média de 53,15 pg/ml. As concentrações dessa citocina diminuíram nas faixas de 11 a 20 anos (resultando a média de 23,75 pg/ml) e de 21 a 30 anos (média de 16,37 pg/ml). Houve ligeiro aumento nas faixas de 31 a 40 anos (média de 18,82 pg/ml) e de 41 a 60 anos (média de 19,83 pg/ml). Essas concentrações retomaram queda quando a exposição foi maior que 50 anos (média de 13,09 pg/ml).

As concentrações de IFN- $\gamma$  foram maiores nos indivíduos expostos por um período de 21 a 30 anos (média de 67,27 pg/ml), enquanto as menores concentrações foram apresentadas nas exposições por menos de 11 anos (média de 9,27 pg/ml) e por mais de 50 anos (média de 8,8 pg/ml).

Os níveis de IL-6 mostraram aumento discreto quanto maior foi o tempo de exposição até os 30 anos. A partir dos 31 anos de exposição, foram observadas menores concentrações. IL-8 teve a maior concentração (média de 76,94 pg/ml) entre indivíduos expostos na faixa de 21 a 30 anos. A quimiocina IL-8 apresentou maior concentração entre os indivíduos com mais de 50 anos de exposição (média de 56,09 pg/ml). Por sua vez, TNF- $\alpha$  foi a citocina com maior média (121,68 pg/ml) nos indivíduos com até 10 anos de exposição (Tabela 33, Figura 10 A, B, C, D e E).

Quando comparadas as concentrações de citocinas em relação ao sexo, foi visto que o grupo masculino apresenta maiores concentrações para todas as citocinas, nas quais as médias foram: IFN- $\gamma$ - 63,76, IL-10- 64,85, IL-6- 27,50, IL-8- 66,46, TNF- $\alpha$ - 73,37. Houve significância estatística para IL-6 (*valor de  $p=0,035$* ) (Tabela 34 e Figura 11).

**Tabela 33 – Análise de significância estatística do tempo de exposição na Região do Médio Rio Negro-AM e da concentração média de citocinas**

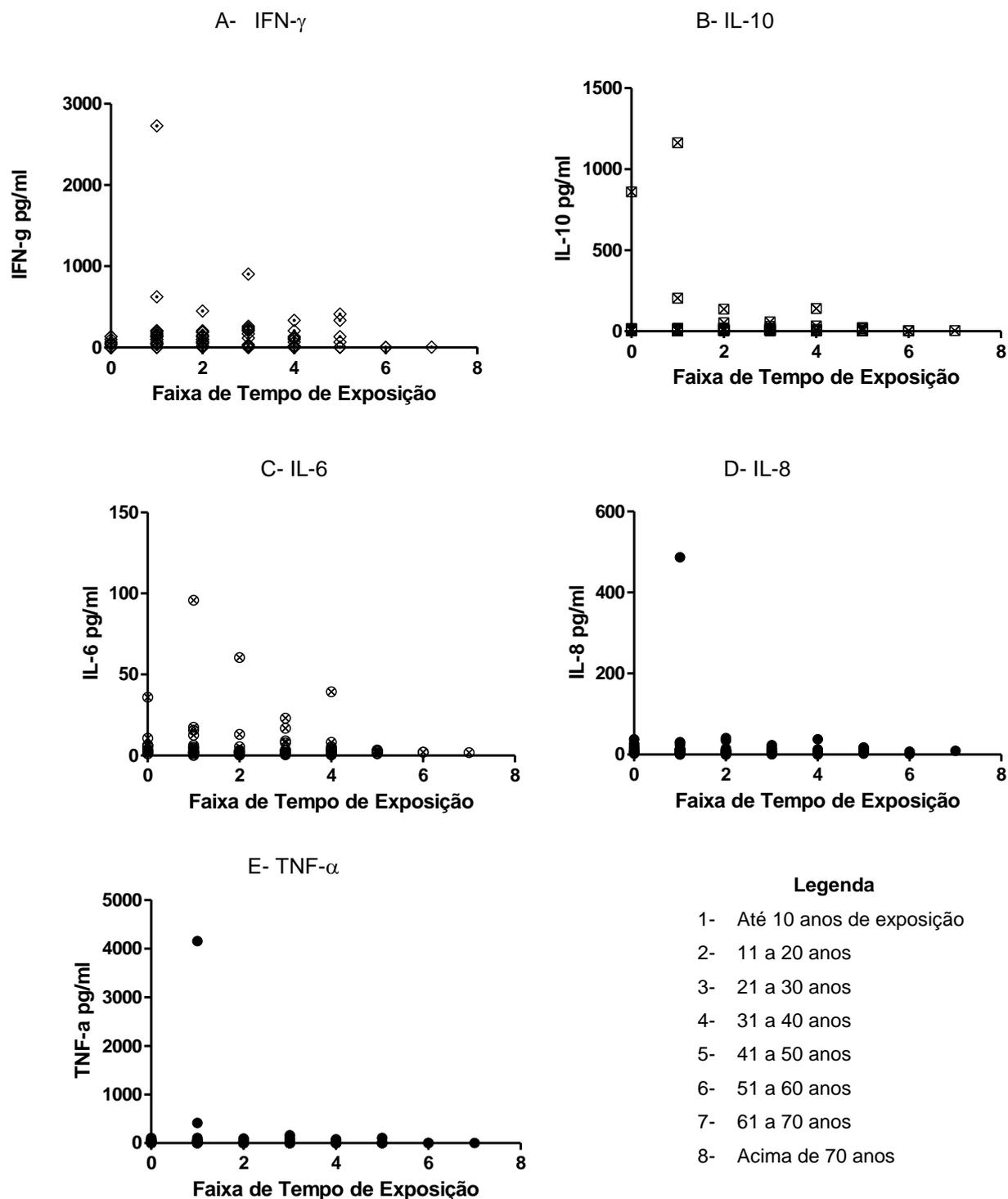
Tempo de exposição	N	IFN- $\gamma$			IL-10			IL-6		
		Média	Desvio Padrão	Valor de p	Média	Desvio Padrão	Valor de p	Média	Desvio Padrão	Valor de p
0,1-10	139	9,27	364,54	0,467	53,15	160,09	0,021	20,46	23,42	0,535
11-20	100	48,14	76,8		23,75	34,51		21,89	46,83	
21-30	76	67,27	157,82		16,37	10,53		21,15	33,43	
31-40	64	40,57	70,96		18,82	23,71		19,24	17,91	
41-50	39	61,85	118,08		19,83	18,79		13,72	10,95	
>50	27	8,8	8,07		13,09	85,82		12,66	11,76	

Tempo de exposição	N	IL-8			TNF- $\alpha$		
		Média	Desvio Padrão	Valor de p	Média	Desvio Padrão	Valor de p
0,1-10	139	62,01	76,09	0,930	121,68	542,06	0,270
11-20	100	68,95	65,99		45,1	31,13	
21-30	76	76,94	108,82		41,77	37,29	
31-40	64	50,65	38,16		39,92	28,17	
41-50	39	65,67	50,9		40,25	31,89	
>50	27	56,09	54,34		21,89	21,98	

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/ml- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Concentrações de citocinas conforme faixa de tempo de exposição vetorial por *T. cruzi* na Região Médio do Rio Negro-AM



Concentrações de citocinas medidas em pg/ml (picogramas por mililitro) de plasma. A- IFN- $\gamma$ = interferon gama, B- IL-10= interleucina 10, C- IL-6= Interleucina 6, D- IL-8= Interleucina 8, E- TNF- $\alpha$ = Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), pg/ml= picogramas por mililitro

Fonte: Elaboração própria.

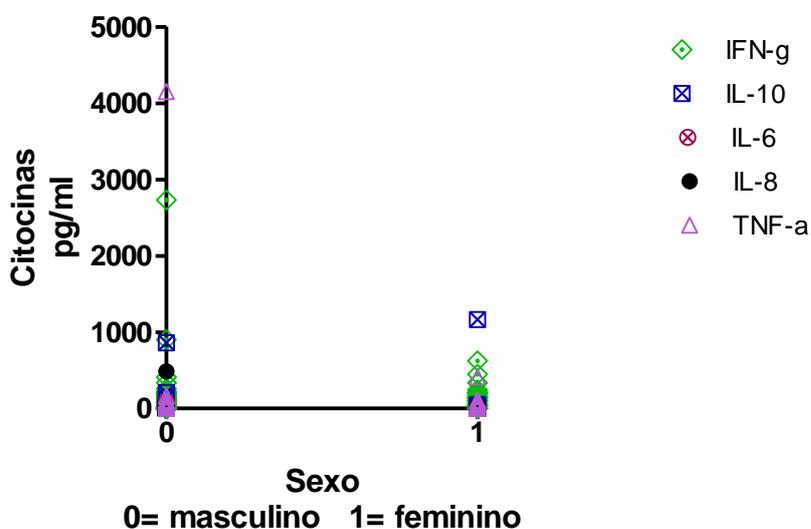
**Tabela 34 – Comparação de médias (pg/ml) de citocinas plasmáticas entre os grupos masculino e feminino moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

Citocina	Gênero	N	Média	Desvio Padrão	Valor de p
IFN- $\gamma$	Masculino	146	63,76	242,80	0,748
	Feminino	94	55,27	100,77	
IL-10	Masculino	146	64,85	397,79	0,465
	Feminino	94	33,85	125,63	
IL-6	Masculino	146	27,50	69,32	0,035
	Feminino	94	14,99	13,32	
IL-8	Masculino	146	66,46	82,82	0,546
	Feminino	94	60,65	52,83	
TNF- $\alpha$	Masculino	146	73,37	343,44	0,465
	Feminino	94	47,13	48,37	

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/ml- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 11 – Concentrações de citocinas plasmáticas comparada entre indivíduos masculinos e femininos moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**



IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), pg/ml- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

IL-8 foi a única que apresentou maiores concentrações entre os indivíduos com IgG positiva (95,93 pg/ml). As demais citocinas apresentaram maiores concentrações entre os indivíduos com IgG negativa (Tabela 35 e Figuras 12 A, B, C, D, E).

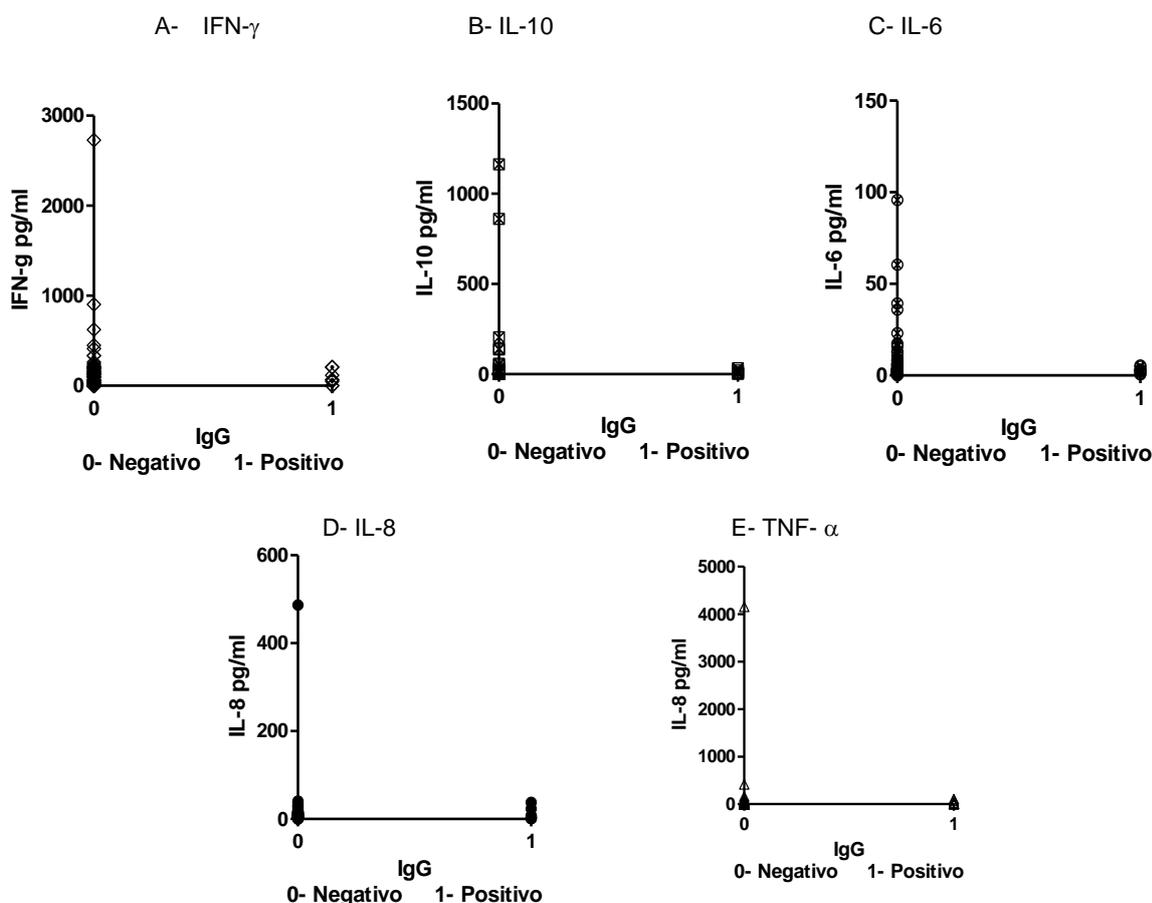
**Tabela 35 – Comparação das médias na dosagem de citocinas da população do Médio Rio Negro-AM mediante sorologia IgG**

Citocina	IgG	N	Média	Desvio Padrão	Valor de p
IFN- $\gamma$	Negativo	198	67,37	217,94	0,021
	Positivo	42	27,74	45,61	
IL-10	Negativo	198	59,44	351,84	0,480
	Positivo	42	20,95	26,93	
IL-6	Negativo	198	23,24	60,09	0,695
	Positivo	42	19,57	15,86	
IL-8	Negativo	198	57,45	60,24	0,032
	Positivo	42	95,93	109,32	
TNF- $\alpha$	Negativo	198	65,14	296,40	0,590
	Positivo	42	53,43	33,97	

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/ml- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 12 – Dosagem de citocinas comparada à sorologia IgG anti- *T. cruzi* entre a população do Médio Rio Negro-AM**



A- IFN- $\gamma$ = interferon gama, B- IL-10= interleucina 10, C- IL-6= Interleucina 6, D- IL-8= Interleucina 8, E- TNF- $\alpha$ = Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), pg/ml= picogramas por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

Em geral, maiores níveis de citocinas também foram apresentados por indivíduos que já foram “picados” por triatomíneos, com exceção de IL-10, cuja maior média (102,62 pg/ml) foi vista entre aqueles que nunca foram “picados” (Tabela 36).

**Tabela 36 – Comparação das concentrações de citocinas entre indivíduos “picados” e não “picados” por triatomíneos na Região do Médio Rio Negro-AM**

Citocina	Picado	N	Média	Desvio Padrão	Valor de p
IFN- $\gamma$	Sim	131	54,42	116,33	0,588
	Não	74	46,23	76,90	
IL10	Sim	131	27,94	101,92	0,137
	Não	74	102,62	556,72	
IL6	Sim	131	17,22	20,15	0,221
	Não	74	26,76	84,98	
IL8	Sim	131	55,94	46,05	0,315
	Nao	74	63,78	64,58	
TNF- $\alpha$	Sim	131	44,00	49,98	0,529
	Nao	74	48,59	59,68	

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/mL- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

IFN- $\gamma$  foi a única citocina com maiores concentrações entre indivíduos sem alteração eletrocardiográfica (média de 61,19 pg/ml). As demais citocinas apresentaram maiores concentrações entre aqueles com alteração. Nessa análise, por ora, não classificamos a alteração apresentada. Entre os alterados, as maiores médias foram nas citocinas TNF- $\alpha$  (110,78 pg/ml) e IL-10 (105,37 pg/ml). O valor de p para essa última foi 0,019, mostrando significância estatística dos níveis dessa citocina em relação ao eletrocardiograma alterado (Tabela 37).

**Tabela 37 – Concentração de citocinas entre os grupos com ECG normal e alterado na população do Médio Rio Negro-AM**

Citocina	ECG	N	Média	Desvio Padrão	Valor de p
IFN- $\gamma$	Alterado	67	8,76	338,02	0,562
	Normal	122	61,19	116,69	
IL-10	Alterado	67	105,37	583,17	0,158
	Normal	122	28,40	107,21	
IL-6	Alterado	67	34,48	90,50	0,019
	Normal	122	14,36	19,38	
IL-8	Alterado	67	68,14	85,30	0,122
	Normal	122	51,23	62,73	
TNF- $\alpha$	Alterado	67	110,78	504,29	0,121
	Normal	122	39,19	47,68	

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/mL- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

Foi visto que as concentrações de IFN- $\gamma$  aumentaram significativamente entre aqueles que tiveram Malária, nas quais a média foi 68,08 pg/ml (valor de p= 0,055), enquanto os participantes que não tiveram Malária apresentaram média de 32,80 pg/ml. A variação das demais citocinas foi menor entre esses dois grupos (Tabela 38).

**Tabela 38 – Análise estatística da concentração de citocinas entre os participantes com e sem histórico de Malária, moradores da Região do Médio Rio Negro-AM**

	Malária				Valor de p
	Sim (n=188)		Não (n=52)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
IFN- $\gamma$	68,08	222,4	32,80	61,46	0,055
IL10	54,16	350,9	47,44	167,96	0,846
IL6	22,5	60,4	22,76	27,70	0,972
IL8	62,56	75,8	70,05	59,15	0,450
TNF- $\alpha$	65,70	303,1	53,66	58,62	0,610

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/mL- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

Os participantes que tiveram Leishmaniose Tegumentar Americana apresentaram mais IL-10 (média de 118,02 pg/ml) quando comparados com aqueles que não tiveram a doença (a média dessa citocina foi de 26,89 pg/ml). De igual

modo, as concentrações médias de IL-6 (35,90 pg/ml) e IL-8 (78,14 pg/ml,  $p=0,053$ ) foram maiores em indivíduos que tiveram Leishmaniose quando comparados com aqueles que não tiveram a doença (Tabela 39).

**Tabela 39 – Concentração de citocinas entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM, com e sem histórico de Leishmaniose Tegumentar Americana**

	Leishmaniose Tegumentar Americana				Valor de $p$
	Sim (n=68)		Não (n=172)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
IFN- $\gamma$	47,04	97,00	65,73	227,48	0,373
IL-10	118,02	580,00	26,89	94,40	0,202
IL-6	35,90	96,16	17,34	22,41	0,120
<b>IL-8</b>	78,14	68,19	58,66	73,59	<b>0,053</b>
TNF- $\alpha$	56,85	59,92	65,56	316,37	0,730

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/ml- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

Foram observadas maiores concentrações de IL-10 (média de 132,94 pg/ml), IL-6 (média de 36,50 pg/ml) e de IL-8 (média de 79,81 pg/ml) entre os participantes que tiveram Dengue. Entre aqueles que não tiveram a doença, as maiores concentrações foram para IFN- $\gamma$  (média de 66,53 pg/ml) e TNF- $\alpha$  (média de 64,63 pg/ml) (Tabela 40).

**Tabela 40 – Concentração de citocinas entre os moradores da Região do Médio Rio Negro-AM que relataram dengue e aqueles que negaram a doença.**

	Dengue				Valor de $p$
	Sim (n=54)		Não (184)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
IFN- $\gamma$	41,62	79,38	66,53	223,37	0,207
IL-10	132,94	657,03	29,56	78,87	0,254
IL-6	36,50	100,93	18,62	30,37	0,204
IL-8	79,81	109,83	59,63	57,24	0,199
TNF- $\alpha$	58,11	77,52	64,63	305,14	0,793

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*), N- número de indivíduos, pg/ml- picograma por mililitro.

Fonte: Elaboração própria.

O quadro 6 sintetiza os resultados obtidos, comparados às concentrações de citocinas. Nele estão expostas a situação da citocina, se aumenta ou diminui as concentrações, mediante as condições do participante referentes à exposição, à sorologia IgG positiva, ao histórico de Malária, Leishmaniose Tegumentar Americana e Dengue, e à alteração eletrocardiográfica.

**Quadro 6 – Síntese dos resultados observados referentes à concentração de citocina plasmática da população do Médio Rio Negro-AM**

Condição	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
Indivíduos expostos	Aumenta 77%	Diminui 19%	Aumenta 31,5%	Aumenta 20,5%	Aumenta 34,5%
IgG positivo	Diminui 59%	Diminui 65%	Diminui 16%	Aumenta 67%	Diminui 18%
Malária	Aumenta 11%	Aumenta 14%	Diminui 1%	Diminui 11%	Aumenta 22%
Leishmaniose Tegumentar Americana	Diminui 28%	Aumenta 339%	Aumenta 107%	Aumenta 33%	Diminui 13%
Dengue	Diminui 37%	Aumenta 350%	Aumenta 96%	Aumenta 34%	Diminui 10%
ECG alterado	Diminui 86%	Aumenta 271%	Aumenta 140%	Aumenta 33%	Aumenta 183%

\*em relação aos indivíduos que não apresentam estas condições

IFN- $\gamma$ - Interferon gama, IL- Interleucina, TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*).

Fonte: Elaboração própria.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Análise descritiva do universo amostral

A análise descritiva desse estudo mostra que não houve grandes mudanças no perfil populacional ou socioepidemiológico da Região do Rio Negro desde os primeiros trabalhos realizados por nossa equipe. O extrativismo de fibra da piaçava continua sendo uma importante atividade laboral no município de Barcelos, e indivíduos que exercem essa atividade apresentam grandes chances de sofrerem infecção vetorial por *T. cruzi*, corroborando os estudos que inspiraram e nortearam a presente dissertação, dos quais podemos citar Coura, Barrett e Naranjo (1994), Albajar (2003), Junqueira (2005) e Brum-Soares (2009). O cenário epidemiológico continua o mesmo, como podemos perceber nesse estudo, realizado mais de duas décadas após a introdução da investigação por nossa equipe no município de Barcelos.

Estudos realizados por Brum-Soares *et al.* (2010), Duncan, Danillow e Malheiro (2015) e Coura, Junqueira e Ferreira (2018) indicam tendência à considerável prevalência de soropositividade entre indivíduos expostos em áreas de piaçabais. Isso se deve à presença de triatomíneos hematófagos presentes no meio silvestre, bem como animais que venham a servir de reservatório do *T. cruzi*, servindo de alimento para o homem. Outro fator importante também se dá pela ingestão de frutas e sucos contaminados por fezes de triatomíneos, requerendo cuidados no seu manuseio (COURA, 2015).

Apesar da importância da atividade extrativista, existe a carência de regulamentação da profissão, bem como de um sistema de cadastro, a fim de mensurar o quantitativo de indivíduos que a exercem no município de Barcelos. Essa demanda pôde ser observada durante nossas expedições e consulta a documentos, como o livro de Menezes (2014), que aponta 551 piaçabeiros no município de Barcelos. Contudo, a Cooperativa dos Piaçabeiros do município apresentou o cadastro de 53 trabalhadores, reforçando a necessidade de levantamento do quadro profissional e atualização de cadastro.

O predomínio discreto de participantes masculinos também corrobora com estudo realizado por Brum-Soares (2009), no qual esse grupo representou 56% da amostragem. Essa distribuição é característica da cultura humana, na qual o homem é tomado como o provedor do sustento da família, e a mulher a cuidadora do lar.

A distribuição não homogênea da idade dos participantes também foi encontrada nos estudos anteriores, como o de Albajar (2003), quando o maior grupo apresentou idade até 22 anos. Na amostragem levantada por Brum-Soares (2009), a idade predominou entre 37 e 56 anos, enquanto, no estudo de Duncan, Danilow e Malheiros (2015), a faixa predominante foi de 20 a 59 anos.

Em relação às etnias, de acordo com a Federação das Organizações Indígenas do Rio Negro (FOIRN), os grupos indígenas do Rio Negro são classificados como Povos da Floresta e Povos do Rio. Os Povos de Floresta são formados pelas etnias Hupde, Yuhup, Nadëb e Dow. Os denominados Povos do Rio, por sua vez, são formados pelas etnias Arapaço, Barasana, Bará, Desana, Cubeo, Karapanã, Makuna, Miriti-Tapuia, Siriano, Tariano, Taiwano, Tatuyo, Tukano, Tuyuka, Wanano, Baniwa, Coripaco, Baré, Werekena e Tariana. Os Barés formam o maior grupo indígena da Região do Rio Negro, o que justifica o predomínio dessa etnia na nossa amostragem. É importante destacar que a população declarada indígena nesse estudo, embora possa ser descendente de duas etnias distintas, não descende de pais naturais de outros estados, ou seja, podemos caracterizá-los como amazonenses nativos, sem parentesco próximo (pai e mãe) em outro estado ou país.

Uma curiosidade está relacionada aos indígenas de etnia Yanomami, uma vez que os 46 participantes são descendentes de pai e mãe da mesma etnia, evidenciando o isolamento de uma linhagem genética e étnica, já que não sofreram miscigenação, diferente dos representantes de outras etnias, os quais, algumas vezes, relataram ser descendentes de duas etnias distintas, mas consideraram-se pertencer à etnia do pai.

Referente à apresentação das placas contendo amostras de triatomíneos, essa é uma prática adotada em todos os estudos referentes à DCh na Região do Rio Negro realizados pelo nosso grupo. Essa é uma forma de confirmar se o participante realmente teve contato com esse vetor e se já foi picado por ele, além de identificar possível domiciliação e focos em piaçabais. Ao menos, dois participantes negaram ter visto um barbeiro ou ter sido picado e, quando lhes foi apresentada a placa, relataram ter visto um espécime e terem sido picados. Inclusive, capturaram desses insetos em suas casas e nos entregaram, sendo confirmado se tratar de um hematófago. Dessa forma, corroborando com observações de Coura, Naranjo e Willcox (1995), observamos correlação entre a exposição e o reconhecimento do triatomíneo. Albajar (2003) sugeria declínio na exposição vetorial. Contudo, não

observamos o mesmo, considerando que 97% dos indivíduos expostos ao vetor em área de extrativismo sofreram picadas do triatomíneo e muitos não conseguiram mensurar quantas vezes foram “picados”.

O triatomíneo, conforme o histórico de picadas, compartilha *habitat* com os assentamentos dos piaçabeiros, que, embora reconheçam o inseto, carecem de maior conscientização e acesso a medidas protetivas, como o uso de mosquiteiros e repelentes. A presença de triatomíneos em piaçabais é uma realidade, e é preocupante a tendência à urbanização e à domiciliação desses insetos, o que talvez seja influenciada pelo transporte desses em meio à piaçava ou outros produtos, como açaí. Além da presença de triatomíneos no ambiente silvestre, também circulam anofelinos, o que contribui com o aparecimento de Malária, endêmica no Rio Negro (SUÁREZ-MUTIS; COURA, 2007; COUTINHO *et al.*, 2018), além de flebótomos, transmissores da LTA. Dessa forma, justifica-se a presença de participantes com relatos desses agravos.

A prevalência de Malária observada nesse estudo é exatamente a descrita por Albajar (2003). Por outro lado, essa prevalência é subestimada, pois, durante o desenvolvimento desse estudo, muitos moradores de Barcelos procuraram as unidades de saúde com sintomas da doença, sendo confirmado por testes de lâmina. Contudo, devido ao incômodo dos sintomas, muitos não puderam participar, pois não se sentiam dispostos a responder ao questionário e submeterem-se aos demais procedimentos, como coleta sanguínea e realização de ECG.

A amostragem acometida por LTA também está subestimada, pois os participantes relataram sobre parentes e colegas que apresentaram a doença, mas não participaram desse estudo. Logo, é notória a endemicidade de Malária e LTA na região, demonstrando a necessidade de revisão nas medidas de controle dessas doenças, haja vista que são agravos históricos e com tendência a aumento. Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2016) apontam a notificação de 19.518 casos da doença no estado do Amazonas, no período de 2007 a 2017, dos quais 201 procediam do município de Barcelos.

## 7.2 Análise dos eletrocardiogramas

Chama atenção a prevalência de eletrocardiogramas alterados, mostando a necessidade de investigação dos fatores que possam estar induzindo a esse achado. A princípio, não foi observada associação de ECG alterado com a

exposição vetorial ou exercício de atividades em áreas de piaçaval. Contudo, posterior a esse estudo, foi prestada a informação, por meio de diálogos informais, de que seria comum o consumo de gasolina entre os piaçabeiros e a inalação de produtos alucinógenos por um grupo específico de participantes desse estudo. Porém, nos careceu incluir essa abordagem nesse estudo, a fim de estabelecer correlação entre o uso dessas substâncias e as alterações eletrocardiográficas. Não foram encontrados estudos de correlação entre a ingestão de gasolina e comprometimento das funções cardíacas, talvez por desconhecimento dessa prática. Todavia, McCall (1987) aponta alterações eletrocardiográficas comuns no alcoolismo, como a fibrilação atrial, extra-sístoles ventriculares, distúrbios da condução atrioventricular, bloqueio de ramo, hipertrofia do ventrículo esquerdo e anormalidades da repolarização. De acordo com De Lucia *et al.* (2006), o uso de alucinógenos demonstra correlação com alterações do SNC e cardíacas, como taquicardia e hipertensão. Isso sugere uma extensão do estudo, abordando essa prática, devido às alterações eletrocardiográficas apontadas semelhantes às apresentadas pelos participantes soronegativos para *T. cruzi* nesse estudo.

A realização de exame ECG exigiu disponibilidade de tempo do técnico operador do aparelho e adequação à demanda de pacientes que não pertencem a esse estudo. Dessa forma, somada à necessidade de deslocamento dos participantes em dia posterior ao preenchimento de questionário e coleta sanguínea, o procedimento não pôde ser aderido por todos aqueles que atenderam ao perfil de inclusão. Essas dificuldades justificam a adesão de 69% dos participantes.

De igual modo, não foi possível que todos os participantes com sorologia IgG positiva para *T. cruzi* atendessem ao exame. Contudo, devido à participação de um expressivo contingente de participantes (69%) submetidos ao ECG e com resultado sorológico, foi permitido que comparássemos ambos os resultados. As alterações do ECG nesse estudo também foram referenciadas por Brum-Soares *et al.* (2010) em uma amostragem populacional da Microrregião do Rio Negro- Amazonas. De igual modo, essas alterações não sugerem relação com a faixa etária.

Simões *et al.* (2018) apontam a disfunção ventricular esquerda global decorrente da cardiopatia dilatada como uma evolução da cardiomiopatia chagásica. De acordo com a Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica, a fase crônica da cardiomiopatia chagásica pode ser classificada em cinco estágios: A, B1, B2, C e D (ANDRADE *et al.*, 2011).

O estágio A engloba os pacientes sob risco de desenvolver insuficiência cardíaca e que apresentam sorologia positiva, mas sem cardiopatia estrutural ou sintomas de insuficiência cardíaca e alterações digestivas, caracterizando a forma indeterminada. O estágio B1 inclui os pacientes com cardiopatia estrutural, com evidências de alterações eletrocardiográficas, contudo, a função ventricular global é normal. No estágio B2, estão aqueles que apresentam cardiopatia com disfunção ventricular global, mas sem sinais e sintomas prévios ou atuais de ICC. Enquanto no estágio C os pacientes apresentam disfunção ventricular e sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca, os pacientes em estágio D apresentam sintomas refratários de insuficiência cardíaca em repouso (ANDRADE *et al.*, 2011).

Laranja, Dias e Nobrega (1948) descreveram algumas alterações de ECG e traçaram o perfil com a miocardiopatia chagásica crônica. Desse modo, consideraram que a miocardite chagásica é uma doença de indivíduos moços entre 20 e 40 anos de idade. Corroborando essa afirmativa e achados de Albajar (2003) e de Brum-Soaes (2009), esse estudo também encontrou grande prevalência de alterações eletrocardiográficas em participantes na faixa etária de 31 a 40 anos.

Assim como Brum-Soares (2009) encontrou 45% de indivíduos sororreagentes, nosso estudo encontrou percentual próximo a esse (47%). Por outro lado, embora a pesquisadora tenha observado alteração em 22% dos não reagentes, em nosso estudo, esse percentual subiu para 31%. Essa alta taxa de indivíduos com alteração eletrocardiográfica desperta a necessidade de investigação sobre fatores que possam influenciar esse resultado, como caracterização genética, atividades laborais, prática ou ausência de atividade física, hábitos de alimentação entre outros.

### **7.3 Sorologia (IGG) *anti-trypanosoma cruzi***

A divergência de resultados entre as técnicas de IFI e ELISA também foram apontadas por Albajar (2003) e Brum-Soares (2009), sugerindo resultados falso-positivos por IFI em decorrência da presença de anticorpos para outros agravos, como Malária e LTA. Essa evidência requer uma maior investigação, inclusive revendo os valores de títulos de IFI para a região amazônica (COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018).

Conforme esperado, a titulação analisada por técnica ELISA, entre os indivíduos expostos e com histórico de picadas por triatomíneos, foi mais elevada do

que entre os não expostos ou sem histórico de picadas, corroborando com outros estudos (COURA; BARRETT; NARANJO, 1994; ALBAJAR, 2003). Nenhum participante soropositivo relatou transfusão sanguínea, descartando, assim, infecção por esse método. De igual modo, não foram relatados casos de infecção oral, o que não é descartado nessa amostragem.

Considerando a soroprevalência entre indivíduos expostos em áreas de piaçabais, recomenda-se maior atenção às medidas de vigilância e controle nessas áreas. A prevalência de soropositividade entre indivíduos expostos à infecção por *T. cruzi* em área de extrativismo corrobora com inquéritos sorológicos que apontam os piaçabeiros como grupo de risco para infecção pelo parasito (COURA; BARRETT; NARANJO, 1994; ALBAJAR, 2003; BRUM-SOARES, 2009; COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018).

#### **7.4** Descrição dos resultados do exame clínico

As observações médicas durante o exame clínico, em conjunto com os exames eletrocardiográficos, sugerem a forma indeterminada da doença de Chagas na fase crônica, no município de Barcelos, o que não significa que não haverá progressão para quadros cardíacos, gastrintestinais e/ou outras complicações.

Pinto *et al.* (2008) sugerem que a morbidade na fase crônica da doença de Chagas, no município de Barcelos, seja baixa (2,8-5%) devido aos baixos níveis de parasitemia ou às características das cepas circulantes. De fato, posteriormente à conclusão desse estudo, foram reportados dois óbitos: O primeiro, paciente de sexo masculino, 89 anos de idade, ex-extrativista da piaçava, deu entrada no Hospital Geral de Barcelos apresentando quadro grave de cardiomegalia, vindo a óbito cerca de sete dias após internação hospitalar. No ano seguinte (2018), outro paciente portador da doença de Chagas crônica, sexo masculino, 36 anos de idade, ingressou no mesmo hospital com quadro de dispnéia, astenia e cansaço. Exames radiológicos mostraram cardiomegalia e infiltrado pulmonar. O ECG apontou bloqueio de ramo direito, e o paciente foi transferido para o HUFM-AM, indo a óbito em aproximadamente três meses após apresentação do quadro relatado.

Uma vez que a manifestação de sintomas e a evolução cardíaca da doença de Chagas foram detectadas no município de Barcelos em curto espaço de tempo antecedente ao óbito, a Secretaria Municipal de Saúde e os DSEIs do município foram orientados a acompanhar os participantes soropositivos, com uma rotina

periódica de avaliação médica e eletrocardiográfica. Também houve orientação para a realização de exames de imagem (radiografia) quando o médico julgar pertinente.

## 7.5 Quantificação de citocinas plasmáticas

Quanto aos níveis de citocinas, estudos, como os de Döffinger *et al.* (1999), Ottenhoff *et al.* (2000) e Holland (2000), mostraram menores concentrações de IFN- $\gamma$  frente a infecções por micobactérias, *Salmonella*, *Listeria*, vírus, protozoários e helmintos, o que também foi observado nessa amostragem quando consideramos que os indivíduos sorologicamente confirmados infectados por *T. cruzi* tiveram menores concentrações da citocina em seu plasma, comparado aos indivíduos com sorologia negativa, assim como observou Duncan, Danilow e Malheiros (2015). O mesmo resultado foi encontrado entre os indivíduos acometidos por LTA e Dengue, embora não tenha havido significância estatística. Por outro lado, a média dessa citocina foi maior no grupo que não teve Malária. Esses dados vão de encontro aos achados de Pisseti *et al.* (2009), que observou níveis maiores de IFN- $\gamma$  plasmáticas entre indivíduos soropositivos para *T. cruzi*. Barral e Barral-Netto (2009) sugerem que haja competição antigênica com predomínio dos antígenos que levam a uma resposta de citocinas antagônicas ao IFN- $\gamma$ , como a IL-10, quando se trata de Leishmaniose cutânea difusa, cuja investigação não contempla o nosso estudo. Contudo, não descartamos essa competição quando consideramos que a concentração tenha sido maior entre os indivíduos que foram acometidos por Malária, agravo altamente endêmico na Microrregião do Rio Negro, onde esse estudo se desenvolveu.

De acordo com Sousa (2012), indivíduos com forma indeterminada da doença de Chagas produzem significativamente mais IL-10 e menos TNF- $\alpha$  do que pacientes com miocardiopatia chagásica. Nesse estudo, foram obtidos resultados contraditórios a essa afirmativa, pois os indivíduos que apresentaram algum tipo de alteração eletrocardiográfica tiveram maiores concentrações de IL-10 e TNF- $\alpha$ . Embora essas duas citocinas apresentaram tendência a aumentarem suas concentrações plasmáticas em situações de alteração eletrocardiográfica, a média de TNF- $\alpha$  foi ainda ligeiramente superior à de IL-10. Esses dados corroboram com Silva *et al.* (2008) que encontraram, no grupo com eletrocardiograma alterado, maiores concentrações de IFN- $\gamma$ .

Foi observada possível ação antagônica dos níveis de IL-10 sobre IFN- $\gamma$ , como sugerem Barral e Barral-Netto (2009). Quando comparamos esses níveis entre os participantes com relatos de Dengue, Malária e LTA, foi observada IL-10 mais alta que a de IFN- $\gamma$ . Por outro lado, assim como IFN- $\gamma$ , a média de IL-10 também foi menor entre os indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* do mesmo modo apresentado por Duncan, Danilow e Malheiros (2015). Corroboramos ainda com Barral e Barral-Netto (2009) quando observamos que os níveis de IL-10 foram inversamente proporcionais aos de IFN- $\gamma$  nas demais análises.

Quanto ao acometimento por Malária, as concentrações de IL-10 foram maiores nos indivíduos que tiveram a doença por até 10 vezes. Por outro lado, indivíduos que apresentaram a doença por 11 a 20 vezes obtiveram concentração média da citocina equivalente aos indivíduos que nunca tiveram Malária. Riley *et al.* (2006) relatam que a indução de IL-10 e TGF- $\beta$  é essencial para a prevenção de complicações de formas graves da Malária. Quanto a esse aspecto, esse estudo não contemplou a investigação de quadros graves e morbidades causadas pela Malária a fim de confirmarmos a observação do autor em nossa amostragem.

As concentrações de IL-6 observadas nesse estudo corroboram os achados de Tsutamoto *et al.* (1998) e Jenny *et al.* (2002), que apontam a associação dos níveis de IL-6 com as condições de saúde decorrentes da idade, apresentando maiores níveis da citocina. Entre as condições, encontram-se complicações cardiovasculares. De igual modo, concentrações elevadas dessa citocina também foram encontradas entre os indivíduos com eletrocardiograma alterado.

Diferentemente do que observou Pissetti *et al.* (2009), nossos resultados mostraram níveis de TNF- $\alpha$  superiores aos de IL-10 e IFN- $\gamma$  entre os soropositivos. Quando analisadas as concentrações de TNF- $\alpha$  juntas aos agravos, maiores concentrações foram apresentadas entre aqueles que relataram Malária. Diante disso, podemos mencionar estudos de Machado *et al.* (2004), que instiga uma investigação mais incisiva, uma vez que sugere a correlação dessa citocina com quadros de Malária graves.

Quanto a IL-8, pouco se sabe sobre sua atuação na doença de Chagas. Contudo, Pereira *et al.* (2014) observaram níveis mais elevados em pacientes portadores de dislipidemias que apresentavam doenças cardiovasculares, sugerindo sua associação ao risco de desenvolvimento de doença cardiovascular. Por outro lado, Barros (2018) encontrou níveis mais baixos de IL-8 em pacientes com a CCC grave quando comparados às formas indeterminada e cardíaca leve. O papel da IL-8

não tem sido amplamente demonstrado na doença de Chagas, contudo, o nosso estudo mostrou tendência ao aumento nos níveis dessa quimiocina nos indivíduos soropositivos para *T. cruzi* e com alteração eletrocardiográfica. Esses achados evidenciam a necessidade de investigações sobre sua importância na imunopatogênese das formas clínicas da doença.

## 8 CONCLUSÕES PARCIAIS

Diante dos dados apurados, atendendo aos objetivos da pesquisa, podemos concluir que:

- a pesquisa de anticorpos de classe IgG anti-*T. cruzi* confirmou que o risco de infecção pelo parasito em áreas de extrativismo de produtos da palmeira piaçava perpetua no município de Barcelos, corroborando estudos realizados por nossa equipe na região do Médio Rio Negro.
- a diferença dos níveis de citocinas sugere tendência a menores concentrações de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os indivíduos com sorologia IgG positiva, enquanto IL-8 aumenta significativamente. Contudo, novos estudos são necessários para que esse achado seja validado, bem como maiores investigações sobre a atuação de IL-8 merecem atenção;
- indivíduos com eletrocardiograma alterado, independente da condição de doença de Chagas, apresentam maiores concentrações de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ ;
- resultados do exame clínico de participantes infectados por *T. cruzi* sugerem a forma indeterminada da DCh entre os extrativistas da região do Médio Rio Negro;
- para que seja elucidado o papel dessas citocinas na doença de Chagas, sobretudo na Região do Rio Negro, sugere-se um estudo de acompanhamento da progressão da doença juntamente com o monitoramento dos níveis das citocinas.

## 9 CONCLUSÃO

Diante do exposto, atendendo ao objetivo geral, esse estudo sugere a tendência na diminuição das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  e aumento de IL-8 nos indivíduos com IgG positivo para *T. cruzi*. Porém, é necessária maior investigação na população do Rio Negro a fim de confirmar as evidências apontadas nesse estudo uma vez que os padrões de concentração de citocinas nesse grupo foram divergentes dos achados relatados por outros pesquisadores, que tiveram como amostragem populações de outras regiões. Dessa forma, esse estudo é pioneiro na pesquisa de concentrações de citocinas na população do Rio Negro-Amazônas e tende a abrir uma ampla linha de investigação dos padrões biológicos individuais frente ao cenário da doença de Chagas na região.

## **10 PERSPECTIVAS**

A proposta inicial desse projeto previa o estudo de polimorfismo de genes de citocinas conforme projeto original contemplado em edital da FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) - E\_03/2015 - Apoio a Projetos Temáticos no Estado do Rio de Janeiro–2015. Contudo, não houve repasse do recurso financeiro pela agência, fazendo com que adequações fossem necessárias.

Dessa forma, mantém-se a proposta de dar continuidade a esse estudo, incluindo a pesquisa de polimorfismo em genes de citocinas, consistindo em averiguar se o genótipo atua no estabelecimento da infecção e na expressão das citocinas.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AIRES, C. A. M. *et al.* Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**. [S. l.], v. 6, n. 2, p. 73-81, 2015. Disponível em: <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232015000200010&lng=pt&tlng=pt](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000200010&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 08 out. 2016.

ALBAJAR, P. V. **Emergência da infecção chagásica humana em áreas do Rio Negro, Estado do Amazonas**. 2003. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

ALBAJAR, P. V. *et al.* Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 36, n. 3, p. 401-407, 2003.

ALBUQUERQUE, J. B. **Infecção oral/intragástrica pelo *Trypanosoma cruzi* em modelo murino**: aspectos da infecção e da resposta imune do hospedeiro. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2013.

ALIBERTI, J. C. S. *et al.* Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**. [S. l.], v. 64, n. 6, p. 1961-1967, 1996.

ALMEIDA, D. R. Insuficiência cardíaca na doença de Chagas. **Rev. Soc. Cardiol. do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, ano XIII, n. 03, p. 1-8, 2004.

ANDRADE, J. P. *et al.* I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. **Arq. Bras. Cardiol.** [S.l.], v. 96, n. 6 p. 434–442, 2011.

ANTUNES, M. I.; CARDONI, R. IL-12 and IFN-g production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, [S.l.], v. 71, n. 2 p. 103–109, 2000.

AQUINO, R. C. M. P.; D'ALMEIDA, J. R. M.; MONTEIRO, S. N. Desenvolvimento de compósitos de matriz polimérica e piaçava. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 14., 2000, São Pedro - SP. **Anais**. São Pedro – SP, 2000. p. 19601- 19611.

BAFICA, A. *et al.* Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol**. [S. l.], v. 177, n. 6, p. 3515-3519, 2006.

BARBOSA-FERREIRA, J. M. *et al.* Acometimento cardíaco em casos de doença de Chagas aguda da Amazônia. Relato de caso. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 94, n. 6, p. 147-149, 2010.

- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Aspectos imunológicos da Leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gaz. Med. Bahia**. [S. l.], v. 79, n. supl. 3, 35-39, 2009.
- BARROS, M. S. **Avaliação das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em soro de pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Instituto Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.
- BASILE, L. *et al.* Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveill**. [S.l.], v. 16, n. 37, p. 1-10, 2011.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J. Exp Med**. [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-315X/full/v3/i1/%5Cn.htm>>. Acesso em: 09 dez. 2019.
- BERAUN, Y. *et al.* Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. **Tissue Antigens**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 81-83, 1998.
- BEUTLER, B.; GRAEU, G. E. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. **Crit. Care. Med.**, [S. l.], v. 21, n. 10 Suppl, p. 423-435, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. Doença de Chagas aguda: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento: guia de consulta rápida para profissionais de saúde. **Rev. Patol.Trop**. [S. l.], v. 36, n. 3, p. 1-32, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. **Rev. Patol. Trop.**, Brasília, n.42, v. 4, p. 475-478, 2013.
- BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BREAM, J. H. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription. **Genes Immun**. [S.l.], v. 3, n. 3, p. 165-169, 2002.
- BRENER Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, [S. l.], v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.
- BRITTO, C.; MOREIRA, O. **Diagnóstico molecular da doença de Chagas**. In: PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS. Diagnóstico Molecular. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico>>. Acesso em: 20 jan. 2018.
- BRUM-SOARES, L. M. **Estudo da transmissão e morbidade da infecção chagásica crônica em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas (1997-2008)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

BRUM-SOARES, L. M. *et al.* Morbidade da doença de Chagas em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberava, v. 43, n. 2, p. 170-177, 2010.

BURGNER, D.; JAMIESON, S. E.; BLACKWELL, J. M. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? **Lancet Infect. Dis.** [S. l.], v. 6, n. 10, p. 653-663, 2006.

CALZADA, J. E. *et al.* Transforming growth factor beta 1 (TGFb1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. **Cytokine.** [S. l.], v. 45, n. 3, p. 149-153, 2009.

CAMARGO, M. E. *et al.* Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 192-204, 1984.

CARPENTER, D. *et al.* Immunogenetic control of antibody responsiveness in a malaria endemic area. **Hum Immunol.** [S. l.], v. 68, n. 3, p. 165-169, 2007.

CASTRO, L. H. E. **Construção de um Modelo de Previsão de Atividade para o Planejamento e Síntese de Triazóis Promissores para Inibição da CYP51 do *Trypanosoma cruzi*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. p. 85-97. Disponível em: < <http://books.scielo.org/id/nf9bn> >. Acesso em: 15 maio 2018.

CHONG, W. P. *et al.* The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. **BMC Infect. Disease.** [S. l.], v. 6, n. 82, p. 1-4, 2006.

CHOTIVANICH, K. *et al.* Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P. falciparum* malaria. **Blood.** [S. l.], v. 100, n. 4, p. 1172-1176, 2002.

COSTA, G. C. *et al.* Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J. Infect. Disease.** [S. l.], v. 199, n. 3, p. 451-454, 2009.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J. Immunol.** [S. l.], v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

- COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 30-33, 2003.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. supl. 1, p. 113-122, 2007. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762007000900018&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000900018&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 26 fev. 2018.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions: a comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.
- COURA, J. R.; BARRETT, T. V.; NARANJO, M. A. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 27, n. 4, p. 251-253, 1994.
- COURA, J. R. *et al.* Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 379-384, 1999.
- COURA, J. R. *et al.* Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 171-176, 2002.
- COURA, J. R., JUNQUEIRA, A. C. V.; FERREIRA, J. M. B. B. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. **Mem. Inst. Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n.1, p.17-23, 2018.
- COURA, J. R.; NARANJO, M. A.; WILLCOX, H. P. F. Chagas' disease in the brazilian Amazon: II: a serological survey. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 103-107, 1995.
- COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, [S.l.], v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.
- COURA, J. R.; VIÑAS P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, [S. l.], v. 465, n. 7301, p. 6-7, 2010.
- COURA, J. R.; VIÑAS P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p.856-862, 2014.
- COUTINHO, P. E. G. *et al.* An analysis of the influence of climatic and hydrological factors affecting new Malária cases in riverine áreas along the Rio Negro and surrounding Puraquequara Lake, Amazonas, Brazil. **Environ. Monit. Assess.** [S. l], v. 190, n. 5, p. 311-325, 2018.
- DECARLI, G. A. **Parasitologia Clínica**: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico de parasitoses humanas. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

- DELUCIA, R. *et al.* Tabagismo, canabíoides e inalantes alucinógenos. In: DELUCIA, R. (org.). **Farmacologia integrada**. 5 ed. São Paulo: Clube dos autores, 2006, p. 319-320.
- DEVERA, R. *et al.* Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 35, n. 4, p. 323-330, 2002.
- DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 335-342, 1940.
- DIAS, J. C. P. História Natural. In: CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. (org.). **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985, p. 99-113.
- DIAS, J. C. P. ; COURA, J. R. Epidemiologia. In: DIAS, J. C. P. ; COURA, J. R. (Org.). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas**. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, p. 33-65.
- DIAS, J. C. P. *et al.* Pesquisas prioritárias sobre doença de Chagas na Amazônia: agenda de curto-médio prazo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 497-498, 2001.
- DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Brasília, v. 25, n. especial, p. 7-86, 2016. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v25nesp/2237-9622-ess-25-esp-00007.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2018.
- DÖFFINGER, R. *et al.* Inheritable defects in IL-12 and IFN $\gamma$ - mediated immunity and the TH1/TH2 paradigm in man. **Allergy**. [S. l.], v. 54, n. 5, p. 409-412, 1999.
- DRIGO, S. A. *et al.* Lack of association of tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. **Immunol. Lett.** [S. l.], v. 108, n. 1, p. 109-111, 2007.
- DRISS, A. *et al.* Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. **Malar J.** [S. l.], v. 10, n. 271, p. 1-10, 2011.
- DUNCAN, W. P.; DANILOW, J. L.; MALHEIRO, A. Piassaba palm extractivism as an associated fator with Chagas disease: seroprevalence and immunological profile in native inhabitants of the Central Amazonia, Brazil. **Rev. Pan-Amaz Saude**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 35-42, 2015.
- EDWARDS, M. S.; STIMPERT, K.; MONTGOMERY, S. P. Addressing the Challenges of Chagas Disease: An Emerging Health Concern in the United States. **Infect. Dis. Clin. Pract.**, [S.l.], v. 25, n. 3, p. 118-125, 2017.
- ESPINOSA, R. *et al.* Prognostic indicators in chronic chagasic cardiopathy. **Int. J. Cardiol.** [S.l.], v. 30, n. 2, p. 195-202, 1991.
- FARIA, D. R. A. B. *et al.* Doença de Chagas congênita com manifestações pleomórficas: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Clín. Med.** São Paulo, v. 11, n. 1, p.

80-84, 2013. Disponível em <<http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2013/v11n1/a3394.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

FÉ, N. F. *et al.* Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 642-646, 2009.

FERRARONI, J. J.; MELO, J. A. N.; CAMARGO, M. E. Moléstia de Chagas na Amazônia. Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones, sorologicamente positivos. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 7, n. 3, p. 438-440, 1977.

FERREIRA, M. S. *et al.* Doença de Chagas e imunossupressão. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ, 1997, p. 365-381. Disponível em: < <http://books.scielo.org/id/nf9bn> >. Acesso em: 25 jun. 2018.

FERREIRA, R.T.B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vig. Sanit. Debate**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014.

FILIGHEDDU, M.T.; GÓRGOLAS, M; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmission oral. **Med. Clin. (Barc)**; [S.l.], v. 148, n. 3, p. 125-131, 2017. 148 (3). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meDChli.2016.10.038>>. Acesso em: 05 jul 2018.

GARRAUD, O. *et al.* Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. **Trends Parasitol.** [S. l.], v. 19, n. 7, p. 300-3004, 2003.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* The microbicidal activity of interferon-g treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.** [S. l.], v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1992.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.

GOMES, J. A. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun.** [S. l.], v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

GONÇALVES, R. G. *et al.* Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. **Journal of Tropical Medicine**, [S.l.], v. 2012, p. 1-15, 2012.

GUERREIRO, C.; MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento de diagnóstico. **Brasil Med.** [S. l.], n. 27, p. 225-226, 1913.

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

HILL, A. V. The immunogenetics of human infectious diseases. **Annual Rev. Immunol.** [S. I.], v. 16, p. 593-617, 1998.

HILL, A. V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annual Rev. Genet.** [S. I.], v. 40, p. 469-486, 2006.

HOLLAND, S. M. Treatment of infections in the patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. **Microbes Infect.** [S. I.], v. 2, n. 13, p. 1579-1590, 2000.

HUNTER, C. A. *et al.* IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** [S. I.], v. 158, n. 7, p. 3311-3316, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo 2010**. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?lang=&codmun=130040&search=amazonas|barcelos|infograficos:-historico>>. Acesso: 20 jun. 2017.

JENNY, S. T. *et al.* In the elderly, interleukin-6 plasma levels and -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** [S.I.], v. 22, n. 12, p. 2066-2071, 2002.

JUNQUEIRA, A. C. V. **Trypanosoma cruzi, Chagas 1909 em Áreas do Médio e Alto Rio Negro, Amazonas, Brasil**. 2005. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto de Ciências Biomédicas/Departamento de Parasitologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

JUNQUEIRA, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, [S.I.], v. 12, n.29, p. 1-23, 2010.

JUNQUEIRA, A. C. V.; GONÇALVES, T. C. M.; MOREIRA, C. J. C. **Manual de capacitação na detecção de Trypanosoma cruzi para microscopistas de Malária e Laboratoristas da rede pública**. 2 ed. Rio de Janeiro: SCV/ICICT, 2011.

KENNETH, M. *et al.* Janeway's immunobiology. New York: Garland Sc., 2008.  
LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (org.). **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 85-108.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.

LIMA, R. C. S. *et al.* Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 46, n. 4, p. 510-514, 2013.

LÓPEZ-MADERUELO, D. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir. Crit. Care Med.** [S. I.], v. 167, n. 7, p. 970-975, 2003.

LUQUETTI, A. O. Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** [S. l.], v. 94, n.1, p. 283-284, 1999.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUNIS, G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (org.). **American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research.** Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 743-792.

LUZ, Z. M. P. *et al.* Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [S.l.], v. 27, n. 3, p. 143-148, 1994.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **An Bras Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962004000600002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962004000600002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 21 fev. 2018.

MADY, C. *et al.* Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas cardiomyopathy. **Circulation**, [S.l.], v. 90, n. 6, p. 3098-3102, 1994.

MALACHIAS, M. V. B. *et al.* 7º Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Soc Bras. Cardiol.** Rio de Janeiro, v. 107, n.3, p. 1 -103, 2016.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**. [S.l.], v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MATHEW, S. J. *et al.* Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. **J Cell Sci.** [S. l.], v. 122, pt. 12, p. 1939-1946, 2009.

MCCALL, D. Alcohol and the cardiovascular system. **Current Problem in Cardiology**. [S.l.], v. 12, n. 6, p. 355-414, 1987.

MEDEIROS, M. B.; GUERRA, J. A. O.; LACERDA, M. V. G. Meningoencefalite em paciente com doença de Chagas aguda na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, n. 4, p. 520-521, 2008.

MENEZES, E. S. **Os “piaçabeiros” no médio rio negro: identidade étnica e conflitos territoriais.** 15 ed. Brasília: Paralelo, 2014.

MURPHY, K. *et al.* **Imunobiologia de Janeway.** 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, [S.l.], v. 15, n.4, p. 653-655, 2009.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. **J. Immunol.** [S. l.], v. 173, n. 9, p. 5688-5696, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.9.5688>&5Cnhttp://www.jimmunol.org/content/173/9/5688&5Cnhttp://www.jimmunol.org/>. Acesso em: 10 dez. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos.** Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Doença de Chagas nas Américas: uma revisão da atual situação da saúde pública e sua visão para o futuro. Conclusões e recomendações.** Washington, DC: OPAS, 2018.

OSTERMAYER, A. L.; CASTRO, A. M. Diagnóstico sorológico da doença de chagas. In: DIAS, J. C. P; COURA, J. R. (org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. p. 99 – 113. Disponível em: < <http://books.scielo.org/id/nf9bn> >. Acesso em: 20 jun. 2018.

OTTENHOFF, T. H. *et al.* Human deficiencies in type 1 cytokine receptors reveal the essential role of type 1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Microbes Infect.** [S. l.], v. 2, n. 13, p. 1559-1566, 2000.

PARADA, H. *et al.* Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas disease: clinical, parasitological, and histopathological study. **Int. J. Cardiol.** [S. l.], v. 60, n. 1, p. 49-54, 1997.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** [S. l.], v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.

PASTORE, C. A. *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos (2009). **Arq. Bras. Cardiol.** [S. l.], v. 93, n. 3 supl. 2, p. 1-19, 2009.

PELLEGRINI, A. *et al.* The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. **Fut. Microbiol.** [S. l.], v. 6, n. 12, p. 1521-1533, 2011.

PEREIRA, K. S. *et al.* Chagas disease a foodborne illness. **J. Food. Prot.** [S. l.], v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PEREIRA, M. M. *et al.* Serum levels of cytokines and chemokines associated with cardiovascular disease in Brazilian patients treated with statins for dyslipidemia. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 66–70, 2014.

PERES, S. C. **Cultura, política e identidade na Amazônia: O associativismo indígena no Baixo Rio Negro.** 2003. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas. Campinas, SP. 2003.

PÉREZ, A. R.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. **Neuroimmunomodulation.** [S. l.], v. 16, n. 2, p. 96-105, 2009.

- PINTO, A. Y. N. **Estudo de casos agudos de doença de chagas tratados e sua evolução para formas crônicas no Pará e Amapá, Amazônia brasileira**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- PINTO, A. Y. N. *et al.* Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 413-419, 2001.
- PINTO, A. Y. N. *et al.* Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.
- PISSETTI, C. W. *et al.* Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [S. l.] v. 42, n. 4, p. 425-430, 2009.
- PISSETTI, C. W. *et al.* Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development Trypanosoma cruzi Infection. **PLoS Negl. Trop. Disease**. [S. l.], v. 5, n. 3, p. 1-9, 2011.
- PRANG, G. **A caboclo society in the Middle Rio Negro basin: ecology, economy and history of an ornamental fishery in the state of Amazonas, Brazil**. 2001. Tese (Doutorado) - Wayne State University, Detroit, Michigan, 2001.
- PRATA, A. *et al.* Discrepâncias relativas entre resultados de reações de Guerreiro-Machado executadas em três diferentes laboratórios. **Rev. Patol. Trop.**, Uberaba, v. 10, n. 2, p. 103-105, 1976.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet. Infect. Dis.** [S. l.], v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.
- RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). **Infect Dis Clin North Am.** [S. l.], v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.
- REIS, A. C. F. **Manaós e outras Villas**. 2 ed. Manaus: EDUA, 1999.
- REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RILEY, E. M. *et al.* Regulating immunity to malaria. **Parasite immunology**, [S. l.], v. 28, n. 1-2, p. 35-49, 2006.
- RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J. Parasitol. Res.**, [S. l.], v. 2012, n. 507874, p. 1-12, 2012.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. **Immunol. Lett.** [S. l.], v. 98, n. 1, p. 97-102, 2005.

ROJAS, A. *et al.* Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia: implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. **Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 1, p. 82-89, 2005.

ROMAÑA, C.; MEYER, H. Estudo do ciclo evolutivo do "Schizotrypanum Cruzi" em cultura de tecidos de embrião de galinha. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 19-37, 1942.

ROSSI, J. C. H. N. **Fatores associados com a ocorrência de triatomíneos em unidades domiciliares de localidades rurais no município de Posse, Goiás, Brasil, 2013.** 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

RUEDA, K. *et al.* Oral transmission of Trypanosoma cruzi: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. **Biomédica**, Bogotá, Colômbia, v. 34, n. 4, p. 631-641, 2014.

SANTOS, V. R. C. **Estudo sobre doença de Chagas aguda no Estado do Pará, Amazônia.** 2017. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

SANTOS, V. R. C. *et al.* Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 5, p. 1-6, 2018.

SCHIJMAN, A. G. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **Plos Neglect Trop Disease**. [S. l.], v. 5, n. 1, 2011.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**. [S.l.], v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.

SHAW, J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 2, n. 2, p.153-157, 1969.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Transmissão da doença de Chagas aguda por via oral: surto epidêmico em Catolé do Rocha, Paraíba, 1986. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA).** Rio de Janeiro, 2006, p. 35-38.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Possible oral-transmission of acute Chagas-Disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991.

SILVA, C. P. *et al.* Por que os portadores de cardiomiopatia chagásica têm pior evolução que os não-chagásicos? **Arq. Bras. Cardiol.** [S.l.], v. 91, n. 6, p. 389-394, 2008.

SILVA, M. B. A. *et al.* Vigilância entomológica dos vetores da doença de Chagas no agreste pernambucano. **Rev. Saúde Desenv.**, [S.l.], v. 11, n. 7, p. 229-244, 2017.

SILVA, N. N. *et al.* Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 10, n. 5, p. 265-276, 1968.

SILVEIRA, A. C. Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la Enfermedad de Chagas. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)**. Rio de Janeiro, 2006, p. 16-19.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 52-63, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822011000800009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000800009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 23 jun. 2018.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**. [S.l.], v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.

SIMÕES, M. V. *et al.* Cardiomiopatia da Doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. [S.l.], v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. **Dados Epidemiológicos Sinan**. 2016. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. **Dados Epidemiológicos Sinan**. 2019. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>>. Acesso em: 18 set. 2019.

SMITH, A. J. P.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine Growth Factor Rev**. [S. l.], v. 20, n. 1, p. 43-59, 2009.

SOUSA, G. R. **Citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na doença de Chagas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

STEINDEL, M. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, **Brazil**. **Diagn. Microbiol. Infect Dis**. [S.l.], v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

SUÁREZ-MUTIS, M. C.; COURA, J. R. Mudanças no padrão epidemiológico da Malária em área rural do médio Rio Negro, Amazônia brasileira: análise retrospectiva. **Cad. Saude Publ**. Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 795-804, 2007.

TALICE, R. V. *et al.* Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas de la zona endémica del Uruguay. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)**, [S.l.], v. 33, n. 6, p. 595-620, 1952.

THORNTON, C. R. *et al.* Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested compost. **Microbiology**. [S.l.], v. 148, n. 5, p. 1263-1279, 2002.

TORRES, C. M. Sobre a anatomía patológica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p.391-409, 1941.

TORRES, O. A. *et al.* Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. **Infect Genet. Evol.** [S. l.], v. 10, n. 5, p. 682-685, 2010.

TOSO, M. A.; VIAL, F. U.; GALANTI, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. **Rev. Med.**, Santiago, Chile, v. 139, n. 2, p. 258-266, 2011. Disponível em: <<http://scielo.conicyt.cl/scielo.php>>. Acesso em: 02 set 2019.

TSUTAMOTO, T. *et al.* Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.** [S. l.], v. 31, n. 2, p. 391-398, 1998.

VALENTE, S. A. *et al.* Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.** [S. l.], v. 103, n. 3, p. 291-297, 2009.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; PINTO, A. Y. N. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazonia Brasileira. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)**. Rio de Janeiro, 2006, p. 21-26.

VARGAS, A. *et al.* Investigaçãõ de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cad. Saúde Publ.**, [S.l.], v. 34, n. 1, 2018.

VIRCELL MICROBIOLOGISTIS. **Diagnostic Solutions for Human Infectious Diseases**. Disponível em: <https://en.vircell.com/support/image-gallery/IFA/>. Acesso em: 23 jun.2018.

VOLLER, A. *et al.* Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. **Lancet**. [S.l.], v. 1, n. 7904, p. 426-428, 1975.

WILSON, A. G. *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. [S. l.], v. 94, n. 7, p. 3195-3199, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Control of Chagas disease**. Geneva: World Health Organization. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**: first WHO report on neglected tropical diseases, 2010. Disponível em:

<[https://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/9789241564090/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241564090/en/)>. Acesso em: 17 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Treatment of Chagas Disease**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/disease/treatment/en/>. Acesso em: 18 jun. 2018

XAVIER, S. S.; SOUZA, A. S.; MORENO, A. H. Aplicação da nova classificação da insuficiência cardíaca (ACC/AHA) na cardiopatia chagásica crônica: análise crítica das curvas de sobrevida. **Rev. SOCERJ**. [S. l.], v. 18, n. 3, p. 227-232, 2005.

ZAFRA, G. *et al.* Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. **Microbes Infect.** [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1049-1052, 2007.

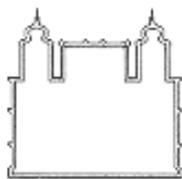
ZWAHLEN, R.; WALZ, A.; ROT, A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. **International Review of Experimental Pathology**. [S. l.], v.34, part B, p. 27-42, 1993.

## 12 ANEXOS

### ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
<p><b>Título da Pesquisa:</b> Polimorfismos de base única e expressão de citocinas na doença de Chagas. <b>Pesquisador Responsável:</b> Angela Cristina Veríssimo Junqueira <b>Área Temática:</b> <b>Versão:</b> 1 <b>CAAE:</b> 79922017.8.0000.5248 <b>Submetido em:</b> 06/11/2017 <b>Instituição Proponente:</b> FUNDACAO OSWALDO CRUZ <b>Situação da Versão do Projeto:</b> Aprovado <b>Localização atual da Versão do Projeto:</b> Pesquisador Responsável <b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio</p>	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1024107	

## **ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz –  
Laboratório de Doenças Parasitárias  
Tel. (021) 25621278. Telefax: (021)2280-3740**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

#### **GENÉTICA DA MALÁRIA, DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MÉDIO RIO NEGRO**

Estamos convidando-o a participar de um estudo sobre a genética da Malária, doença de Chagas e Leishmaniose tegumentar americana no médio rio Negro. A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) está realizando uma pesquisa em Barcelos para avaliar se há pessoas resistentes a ou que são mais susceptíveis à estas doenças e como isso pode impactar no controle das mesmas nesse município. O estudo é coordenado pelo Professor José Rodrigues Coura do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, no Rio de Janeiro. Esperamos poder incluir aproximadamente 800 pessoas neste estudo.

A sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você aceitar participar ou permitir que seu filho (menor de 18 anos) faça parte desta pesquisa, vamos lhe fazer algumas perguntas, um exame clínico e depois vamos coletar uma pequena amostra de sangue para estudar os organismos que causam a Malária, doença de Chagas e Leishmaniose tegumentar americana. Você ou seu filho podem decidir participar ou não do estudo e podem sair dele em qualquer momento sem que haja nenhum problema para você ou seu filho em relação aos serviços médicos prestados pelo sistema de saúde de Barcelos. Se tiver uma das doenças e não quiser participar do estudo, de qualquer forma será medicado seguindo o tratamento oficial do Ministério da Saúde. Você não receberá nenhum pagamento por participar desta pesquisa e os procedimentos realizados não terão nenhum custo para você. Barcelos é uma cidade muito pequena e não há meios de transporte massivo. Por esse motivo não há necessidade de nenhum tipo de ressarcimento econômico para que os participantes de pesquisa se desloquem até o hospital. De outro lado, a maior parte de pesquisa será baseada na busca ativa nos próprios domicílios dos participantes.

Você ou seu filho podem sentir uma pequena dor no momento de coletar o exame de sangue e as vezes pode ficar um pouco roxo no local da coleta. Os pesquisadores cuidarão para que não existam problemas maiores nestes casos. Se for encontrada alguma doença durante a entrevista, os pesquisadores o encaminharão até o hospital onde será feito o diagnóstico e dados os medicamentos específicos. Às vezes os medicamentos específicos podem causar alguns problemas como mal-estar no estômago, vômito, diarreia, coceira ou manchas na pele; esses problemas, quando acontecem, são geralmente leves e passam sem

precisar tomar mais medicamentos. Se o problema continuar ou piorar é preciso que retorne imediatamente ao posto de saúde ou hospital onde será examinado e receberá as orientações necessárias. Esperamos que você ou seu filho não tenham nenhum tipo de mal-estar como consequência da sua participação no estudo; se tiver alguma consequência negativa, será dada toda a assistência necessária no serviço de saúde até que fique bem. Não está previsto nenhum tipo de indenização por participar da pesquisa.

Os benefícios que você ou seu filho podem ter desta pesquisa tem a ver com receber tratamento sob supervisão de um pesquisador e se você ou seu filho continuarem doentes com Malária, doença de Chagas, Leishmaniose tegumentar americana ou se outra doença aparecer, saberemos rapidamente e isto poderá ser importante para a sua saúde. Também vamos saber se a população de Barcelos tem alguma susceptibilidade aumentada para ter ou para resistir a uma dessas doenças.

Qualquer informação sobre você ou seu filho será mantida em segredo absoluto por parte dos pesquisadores; nem seu nome ou o de seu filho serão usados em relatórios publicados; em vez disso serão usados códigos para ninguém conhecer as pessoas que fizeram parte da pesquisa. Todos os seus dados ou os dados do seu filho e o material coletado serão utilizados para esta pesquisa e uma parte do material será armazenado, para se for necessário, utilizarmos em estudos futuros.

Este termo de consentimento está redigido em duas vias de igual teor; uma delas ficará com você ou seu representante legal e a outra será guardada pelos pesquisadores. Se decidir participar do estudo, você ou seu representante legal e o pesquisador deverão dar um visto em todas as páginas deste documento e assinarem a última página.

Qualquer dúvida que você tenha em qualquer etapa do estudo pode ligar a cobrar e entrar em contato com o Dra. Martha Cecília Suarez-Mutis - tel. (21) 2562-1278, a Dra. Simone da Silva Santos- tel. (21) 2562-1396, a Dra. Ângela Junqueira –Tel. (21) 2562-1492 ou o professor José Rodrigues Coura Tel. (21) 25621229.

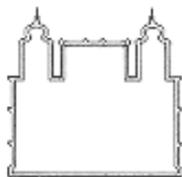
Qualquer informação que você ou seu filho deseje saber, pode ser perguntada aos pesquisadores do estudo, tanto durante a pesquisa quanto em momentos futuros. Se você tiver também alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4.036 sala 705 (Expansão) Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360Tel.: (21) 3882-9011 de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.**

### **Consentimento**

Acredito ter sido bem informado sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidos para mim. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação não vai me gerar despesas e que



## **ANEXO C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz –  
Laboratório de Doenças Parasitárias  
Tel. (021) 25621278. Telefax: (021)2280-3740**

### **TERMO DE ASSENTIMENTO**

#### **GENÉTICA DA MALÁRIA, DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MÉDIO RIO NEGRO**

Estamos convidando-o a participar de um estudo sobre a genética da Malária, doença de Chagas e Leishmaniose tegumentar americana no médio rio Negro. A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) está realizando uma pesquisa em Barcelos para avaliar se há pessoas mais resistentes ou que pegam mais estas doenças e como isso pode impactar no controle das mesmas nesse município. O estudo é coordenado pelo Professor José Rodrigues Coura do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, no Rio de Janeiro. Esperamos poder incluir aproximadamente 800 pessoas neste estudo.

Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar da pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem.

Se você concordar em participar deste estudo, vamos lhe fazer algumas perguntas, um exame clínico e depois vamos coletar uma pequena amostra de sangue para estudar os organismos que causam a Malária, doença de Chagas e Leishmaniose Tegumentar Americana.

Você pode sentir uma pequena dor no momento de coletar o exame de sangue e as vezes pode ficar um pouco roxo no local da coleta. Os pesquisadores cuidarão para que não existam problemas maiores nestes casos. Se for encontrada alguma doença durante a entrevista, os pesquisadores o encaminharão até o hospital onde será feito o diagnóstico e dados os medicamentos específicos para que fique bom. Às vezes os medicamentos específicos podem causar alguns problemas como mal-estar no estômago, vômito, diarreia, coceira ou manchas na pele; esses problemas, quando acontecem, são geralmente leves e passam sem precisar tomar mais medicamentos. Todos os dias haverá uma pessoa no serviço de saúde disposto a ajudar você a curar o mal-estar, se precisar.

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e não vamos dar nenhuma informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa. As

informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, somente os pesquisadores poderão ter acesso a elas. Qualquer informação sobre você terá um número ao invés de seu nome. Só os investigadores saberão qual é o seu número e manteremos em segredo.

Todos os seus dados e o material coletado serão utilizados para esta pesquisa e uma parte do material será armazenado, para se for necessário, utilizarmos em estudos futuros.

Você não tem que estar nesta pesquisa. Ninguém estará furioso ou desapontado com você se você disser não, a escolha é sua. Você pode dizer "sim" agora e mudar de ideia depois e tudo continuará bem.

Você pode perguntar qualquer dúvida agora ou em qualquer etapa do estudo entrando em contato com a Dra. Martha Cecília Suarez-Mutis - tel. (21) 2562-1278, a Dra. Simone da Silva Santos- tel. (21) 2562-1396, a Dra. Angela Junqueira –Tel. (21) 2562-1492 ou o professor José Rodrigues Coura Tel. (21) 2562-1229. Eles vivem no Rio de Janeiro e trabalham na Fiocruz. Você pode ligar a cobrar se quiser saber mais coisas sobre o projeto. Este termo de assentimento é feito em duas cópias iguais, uma delas ficará com seus pais ou seu representante legal e a outra será guardada pelos pesquisadores. Se decidir participar do estudo, você ou seu representante legal e o pesquisador deverão dar um visto em todas as páginas deste documento e assinarem a última página.

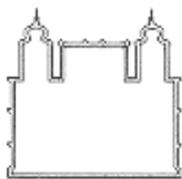
#### Certificado do Assentimento

Eu entendi que a pesquisa é para saber se há pessoas que têm mais chance de pegar ou serem mais resistentes a pegar as doenças relacionadas. Eu entendi que receberei o tratamento com acompanhamento dos pesquisadores e que eu darei uma amostra de sangue através da coleta na veia do braço.

_____	_____
Nome da criança/adolescente	Assinatura
_____	_____
Nome do responsável	Assinatura
_____	_____
Nome do pesquisador	Assinatura

Data: \_\_\_\_\_

## ANEXO D - QUESTIONÁRIO



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz –  
Laboratório de Doenças Parasitárias



### POLIMORFISMOS EM GENES HUMANOS DE CITOCINAS E SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇAS ENDÊMICAS NO BRASIL: MALÁRIA, DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE

O questionário deverá ser preenchido pelo colaborador do projeto

[Instruções ao preencher: O campo Número de Registro deverá ser composto pelas iniciais do bairro/localidade onde o participante mora (duas letras), seguido do número da família (com três dígitos), mais o número do paciente (dois dígitos) e o ano de 2016. Exemplo: ss023.04/16 (bairro de São Sebastião, família 023, paciente 04, /16 = ano de 2016).

1- Nome: \_\_\_\_\_

2- Número de Registro: \_\_\_\_\_ 3- Data: \_\_\_\_\_

4- Etnia do pai: \_\_\_\_\_ 5- Etnia da mãe: \_\_\_\_\_

6- Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino 7- Idade: \_\_\_\_ 8- Data de nascimento \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

9- Cor declarada: ( ) Negra ( ) Branca ( ) Parda ( ) Outra: \_\_\_\_\_

10- Estado e Município de nascimento: \_\_\_\_\_

11- Nome da localidade ou comunidade de nascimento (bairro, igarapé, comunidade, etc): \_\_\_\_\_ ( ) Urbano ( ) Rural

12- Estado e Município de residência atual: \_\_\_\_\_

13- Endereço/nome da localidade ou comunidade de residência atual (bairro, igarapé, comunidade, etc): \_\_\_\_\_ ( ) Urbano ( ) Rural

14- Há quanto tempo mora na localidade ou comunidade atual ? (bairro, igarapé, comunidade, etc) \_\_\_\_\_

15- Residências anteriores: \_\_\_\_\_

16- Viagens para fora do Amazonas (local - data e período que ficou) \_\_\_\_\_

17- Trabalha como extrativista atualmente? ( ) Sim ( ) Não 17.1- Há quanto tempo? \_\_\_\_

17.2- Se é extrativista atualmente, qual extrativismo realiza? \_\_\_\_\_

17.3- Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

17.4- Se é extrativista atualmente, qual o local do extrativismo? ( ) Urbano ( ) Rural

17.5- Quantos dias na semana trabalha com extrativismo? \_\_\_\_\_

17.6- Que outras atividades de extrativismo realizou anteriormente? \_\_\_\_\_

18- Já foi extrativista? ( ) Sim ( ) Não

18.1- Qual extrativismo realizava? \_\_\_\_\_ 18.2 Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

19- Se não é extrativista:

19.1- Ocupação atual: \_\_\_\_\_ 19.2- Lugar de trabalho \_\_\_\_\_ ( ) urbano ( ) rural

20- Mora em área de extrativismo: ( ) Sim ( ) Não 21- Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

22- Já foi diagnosticado com doença de Chagas? ( ) Sim ( ) Não

23- Se sim, o diagnóstico foi feito por quem e quando? \_\_\_\_\_

24- Algum de seus pais foi diagnosticado com a doença de Chagas? ( ) Sim ( ) Não

25- Se sim, quem? ( ) Pai ( ) Mãe ( ) Os dois

26- Se sim, o diagnóstico foi feito por quem e quando? \_\_\_\_\_

27- Já foi operado (onde, quando e por que?) \_\_\_\_\_

28- Recebeu transfusão de sangue (onde, quando e por que?) \_\_\_\_\_

29- Alguma vez teve Malária? ( ) Sim ( ) Não 30- Número de vezes que teve Malária \_\_\_\_\_

31- Quando foi a última Malária? Ano \_\_\_\_\_ Mês \_\_\_\_\_ Lugar \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

32- Está com Malária no momento atual? ( ) Sim ( ) Não Espécie: \_\_\_\_\_

Tratamento \_\_\_\_\_ Data de início do tratamento \_\_\_\_\_

33- Tem algum dos seguintes sintomas?

	Sim	Não
Febre		
Dor de cabeça		
Tremor (Calafrio)		
Moleza		
Diarreia		
Suor		
Vômito		
Enjôo		
Outro (Qual):		

34- Já teve Leishmaniose? ( ) Sim ( ) Não 35- Se sim, o diagnóstico foi feito por quem e quando?

36- Já teve? ( ) Dengue ( ) Chikungunya ( ) Febre Amarela ( ) Zika ( ) Tuberculose

- 37- Se sim, o diagnóstico foi feito por quem e quando? \_\_\_\_\_
- 38- Tem ou já teve alguma outra doença infecciosa? ( ) Sim ( ) Não
- 39- Se sim, qual (is) e quando teve a doença? \_\_\_\_\_
- 40- Atualmente faz tratamento para alguma doença? Sim ( ) Não ( )
- 41- Qual medicamento usa atualmente \_\_\_\_\_
- 42- Há quanto tempo faz uso deste medicamento? \_\_\_\_\_
- 43- Sabe reconhecer um barbeiro (piolho da piaçaba) [mostrar placa]? ( ) Sim ( ) Não
- 44- Reconhece a espécie? ( ) Panstrongylus ( ) Rhodnius ( ) Triatoma ( ) Nenhuma
- 45- Onde já viu? ( ) Piaçabal ( ) Residência atual ( ) Residências anteriores ( ) Dentro de casa ( ) Fora da casa ( ) Outro \_\_\_\_\_
- 46- Foi picado por barbeiro? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
- 47- Se sim: Quando \_\_\_\_\_ Quantas vezes? \_\_\_\_\_ Onde (local geográfico) \_\_\_\_\_
- 48- Observações: \_\_\_\_\_
- Entrevistador: \_\_\_\_\_
- Data: \_\_\_\_\_

## ANEXO E - FICHA MÉDICA

POLIMORFISMOS EM GENES HUMANOS DE CITOCINAS E SUSCEPTIBILIDADE  
A DOENÇAS ENDÊMICAS NO BRASIL: MALÁRIA, DOENÇA DE CHAGAS E  
LEISHMANIOSE

### FICHA MÉDICA

**O questionário deverá ser preenchido pelo médico colaborador do projeto**

[Obs.: O participante poderá ser atendido para o exame físico sem a apresentação do ECG e ECO. Pedimos preencher a data do exame físico. O campo **identificador** será preenchido pelo pesquisador]

Identificador: [ \_\_\_\_\_ ]      Data: \_\_\_\_\_

- Nome: \_\_\_\_\_
- Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino Idade: \_\_\_\_\_ Data de Nasc: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
- Estado e Município de nascimento: \_\_\_\_\_

Exame físico:

- Pulso: \_\_\_\_\_ PA: \_\_\_\_\_ Ausculta cardíaca e pulmonar: \_\_\_\_\_

ECG: \_\_\_\_\_ Eco: \_\_\_\_\_

Informação Complementar:

- Já fez algum teste para HIV? ( ) Sim ( ) Não
- Se fez algum teste para HIV, o resultado foi ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Inconclusivo
- Observações: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

- Atendido por: \_\_\_\_\_

Assinatura e carimbo do médico

## ANEXO F - DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BARCELOS



ESTADO DO AMAZONAS  
PREFEITURA MUNICIPAL DE BARCELOS  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE



### DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

A Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos está ciente das atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, que consiste em trabalhos no Município de Barcelos, particularmente sobre Doença de Chagas, Malária e Parasitoses Intestinais, com o apoio efetivo da direção do Hospital Geral de Barcelos e do Setor de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos-Am. Os trabalhos realizados envolvem levantamento clínico-epidemiológico, diagnóstico laboratorial, dinâmica de transmissão vetorial e educação em saúde, não somente na sede do município, mas também em comunidades do interior. Além destes estudos, vem ministrando cursos de capacitação dos profissionais de endemias e da atenção básica, nos quatro municípios da Microrregião do Rio Negro-Am.

Dada a importância das atividades desenvolvidas, a Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos apoia e colabora nas atividades desenvolvidas.

Barcelos-Am, 30 de Junho de 2017.

Atenciosamente,

  
**LAENE CONCEIÇÃO GADELHA**  
Secretária Municipal de Saúde de Barcelos/AM

Laene C. Gadelha  
SMS  
CPF 192.646.592-20  
CI 0558673-9

## ANEXO G – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA UNIDADE MISTA DE BARCELOS

Local e data:

Aceitamos participar como colaboradores do projeto “Polimorfismos em genes humanos de citocinas e susceptibilidade a doenças endêmicas no Brasil: malária, doença de Chagas e leishmaniose”, coordenado pelo Prof. Dr. José Rodrigues Coura (Laboratório de Doenças Parasitárias- IOC/Fiocruz), que terá, entre outros produtos finais, a dissertação de mestrado do aluno Evandro da Rocha Dias, intitulada “Polimorfismos de base única de genes humanos e sua possível correlação com a expressão de citocinas e resposta humoral frente a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*” orientado pelos pesquisadores Dr. Pedro HernanCabello Acero (Laboratório de Genética Humana-IOC/Fiocruz) e Dra Angela Cristina Verissimo Junqueira (Laboratório de Doença Parasitárias-IOC/Fiocruz).

Att.,



Angela S. Dulley de Almeida  
ENFERMEIRA  
COSEN-AM 274281

Diretor(a) da Unidade Mista de Barcelos

## ANEXO H – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA FUNAI- BARCELOS-AM

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO- FUNAI

Barcelos, 29 de junho de 2017.

### Declaração de Anuência

A Fundação Nacional do Índio (FUNAI) está ciente das atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo-Fiocruz- que consiste em trabalhos no município de Barcelos, particularmente sobre Doença de Chagas, Malária e Parasitoses Intestinais, com o apoio efetivo da direção do Hospital Geral de Barcelos e do Setor de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos-AM. Os trabalhos realizados envolvem levantamento clínico-epidemiológico, diagnóstico laboratorial, dinâmica de transmissão vetorial e educação em saúde, não somente na sede do município, mas também em comunidades do interior. Além destes estudos, vem ministrando cursos de capacitação dos profissionais de endemias e da atenção básica, nos quatro municípios da Microrregião do Rio Negro-AM.

Durante as atividades desenvolvidas, é oferecido aos indígenas amparados pela unidade de Barcelos-AM, exames sorológicos, eletrocardiograma, atendimento médico e aconselhamento para acompanhamento médico daqueles que apresentam sorologia positiva e/ou cardiopatia detectada por meio de eletrocardiograma.

Dada a importância das atividades desenvolvidas, a FUNAI apoia e colabora nas atividades desenvolvidas.



Assinatura e carimbo  
João Silveira Dias  
Enfermeiro Indigenista  
FUNAI - Barcelos-AM

## ANEXO I – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO DSEI-ARN

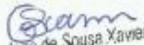


Barcelos, 29 de Junho de 2017.

### Declaração de Anuência

O Distrito Sanitário Indígena (DSEI) Alto Rio Negro está ciente das atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo-Fiocruz- que consiste trabalhos no município de Barcelos, particularmente sobre Doença de Chagas, Malária e Parasitoses Intestinais, com o apoio efetivo da direção do Hospital Geral de Barcelos e do Setor de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos-AM. Os trabalhos realizados envolvem levantamento clínico-epidemiológico, diagnóstico laboratorial, dinâmica de transmissão vetorial e educação em saúde, não somente na sede do município, mas também em comunidades do interior. Além destes estudos, vem ministrando cursos de capacitação dos profissionais de endemias e da atenção básica, nos quatro municípios da Microrregião do Rio Negro-AM.

Dada a importância das atividades desenvolvidas, o DSEI apoia e colabora nas atividades desenvolvidas.

  
Gilson de Sousa Xavier  
Enfermeira  
COREN-AM 412196

---

Assinatura e carimbo

## ANEXO J – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO DSEI-YANOMAMI



Barcelos, 29 de junho de 2017.

### Declaração de Anuência

O Distrito Sanitário Indígena (DSEI) Yanomami está ciente das atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo-Fiocruz- que consiste trabalhos no município de Barcelos, particularmente sobre Doença de Chagas, Malária e Parasitoses Intestinais, com o apoio efetivo da direção do Hospital Geral de Barcelos e do Setor de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos-AM. Os trabalhos realizados envolvem levantamento clínico-epidemiológico, diagnóstico laboratorial, dinâmica de transmissão vetorial e educação em saúde, não somente na sede do município, mas também em comunidades do interior. Além destes estudos, vem ministrando cursos de capacitação dos profissionais de endemias e da atenção básica, nos quatro municípios da Microrregião do Rio Negro-AM.

Dada a importância das atividades desenvolvidas, o DSEI apoia e colabora nas atividades desenvolvidas.

Robson Santos de Carvalho  
COREN-15036

Assinatura e carimbo

## ANEXO K – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DA FVS-AMAZONAS

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE-FVS- BARCELOS-AM

Barcelos, 29 de junho de 2017.

### Declaração de Anuência

A Fundação de Vigilância em Saúde- FVS- está ciente das atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo-Fiocruz- que consiste em trabalhos no município de Barcelos, particularmente sobre Doença de Chagas, Malária e Parasitoses Intestinais, com o apoio efetivo da direção do Hospital Geral de Barcelos e do Setor de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos-AM. Os trabalhos realizados envolvem levantamento clínico-epidemiológico, diagnóstico laboratorial, dinâmica de transmissão vetorial e educação em saúde, não somente na sede do município, mas também em comunidades do interior. Além destes estudos, vem ministrando cursos de capacitação dos profissionais de endemias e da atenção básica, nos quatro municípios da Microrregião do Rio Negro-AM.

Dada a importância das atividades desenvolvidas, a Fundação de Vigilância em Saúde apoia e colabora nas atividades desenvolvidas.

  
\_\_\_\_\_  
José de Oliveira Menezes  
Gerente de Endemias  
FVS - Barcelos - AM  
\_\_\_\_\_  
~~Decreto nº 054/2017-GP~~

Assinatura e carimbo

## ANEXO L – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO 3ºBIS

Local e data:

Aceitamos participar como colaboradores do projeto “Polimorfismos em genes humanos de citocinas e susceptibilidade a doenças endêmicas no Brasil: malária, doença de Chagas e leishmaniose”, coordenado pelo Prof. Dr. José Rodrigues Coura (Laboratório de Doenças Parasitárias-IOC/Fiocruz), que terá, entre outros produtos finais, a dissertação de mestrado do aluno Evandro da Rocha Dias, intitulada “Polimorfismos de base única de genes humanos e sua possível correlação com a expressão de citocinas e resposta humoral frente a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*” orientado pelos pesquisadores Dr. Pedro Hernan Cabello Acero (Laboratório de Genética Humana-IOC/Fiocruz) e Dra Angela Cristina Verissimo Junqueira (Laboratório de Doença Parasitárias-IOC/Fiocruz).

Att.,

  
Comandante do 3ºBIS