



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ALANNA CARLA DA COSTA BELMINO**

**CAUSALIDADE E GRAVIDADE DAS REAÇÕES ADVERSAS AO BENZNIDAZOL:  
INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO FÁRMACO, DO INTERFERON  $\gamma$  E DO  
POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON**

**FORTALEZA**

**2022**

ALANNA CARLA DA COSTA BELMINO

CAUSALIDADE E GRAVIDADE DAS REAÇÕES ADVERSAS AO BENZNIDAZOL:  
INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO FÁRMACO, DO INTERFERON  $\gamma$  E DO  
POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia clínica.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira.

.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B389c Belmino, Alanna Carla da Costa.  
Causalidade e gravidade das reações adversas ao benzimidazol: Influência dos níveis séricos do fármaco, do interferon gamma e do polimorfismo genético do fator regulador de interferon / Alanna Carla da Costa Belmino. – 2022.  
139 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Maria de Fátima Oliveira.
1. Benzimidazol. 2. Efeitos colaterais e Reações adversas relacionados a medicamentos. 3. Exames e Diagnósticos laboratoriais. 4. Interferon gamma. 5. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Título.
- CDD 615
-

ALANNA CARLA DA COSTA BELMINO

CAUSALIDADE E GRAVIDADE DAS REAÇÕES ADVERSAS AO BENZNIDAZOL:  
INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO FÁRMACO, DO INTERFERON  $\gamma$  E DO  
POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia clínica.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra Renata de Sousa Alves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Andréa Bessa Teixeira  
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

---

Dra. Alana Gomes de Souza  
Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG/EBSERH)

A Jesus Cristo, minha inspiração de vida.

Aos meus pais, Marilac e José Maria.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me permitiu viver esse sonho, por não ter me deixado desistir quando eu achei que não conseguia mais. Ao Senhor toda honra e toda glória, a minha vida, os meus conhecimentos, a minha vida pessoal e profissional. Agradeço a Deus pela oportunidade de estudar, de aprender e de ensinar. Peço que um dia eu seja merecedora de tantas vitórias.

Á minha mãe **Marilac da Costa**, por seu apoio em todos os momentos, por seu amor incondicional, por suas orações e por sempre vibrar com as minhas conquistas.

Ao meu pai **José Maria**, que não está mais entre nós, mas sei que de onde estiver me protege, me guarda, me ajuda a correr atrás dos meus sonhos.

Á minha irmã **Alinne Costa**, por cuidar de mim, por me dar forças, por ser meu porto seguro.

Ao meu esposo, meu amigo, companheiro e meu amor **Arley Belmino**, por sua paciência durante todo o percurso da minha vida acadêmica, por me ajudar a estudar e a crescer.

Aos meus sogros **Noelia** e **Antônio Joaci**, pelo apoio e carinho recebidos.

Á minha professora orientadora **Maria de Fátima**, por me inspirar, por ter me aceitado nessa caminhada, pela confiança, pelo seu carinho e pelos seus ensinamentos acadêmicos e de vida. Marcou a minha história e terá sempre um lugar no meu coração.

Á minha amiga **Arduina** por me dar forças, por rezar por mim e por nunca me deixar esquecer nem por um segundo que Deus Sempre está no controle de tudo.

Aos **pacientes do Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC)**, pela confiança no meu trabalho, pelos ensinamentos de vida e de fé. Eles me ajudaram a construir a profissional que sou hoje.

Aos meus amigos e colegas do LPDC, **Mylena, Dudu, Igor, Aucélio Júnior, Julieth, Natasha, Raquel, Emanuella, Letícia, Karen** por toda ajuda e parceria na construção desse trabalho, fundamental para que eu pudesse construir essa tese.

Ao professor **Tiago**, sua equipe de laboratório e seus alunos brilhantes como a **Bruna** por me darem todo o suporte nos experimentos, por terem sido a luz no final do túnel. Sou muito grata por toda ajuda.

Ao meu amigo, **Damião Júnior** pela parceria acadêmica, pelas ideias, por me mostrar a direção, por me ensinar.

Aos meus colegas **Tarcisio e Pedro** por toda a colaboração nas ideias, auxílio nos experimentos e por todo o apoio.

Ao **Centro de Farmacovigilância do Ceará** por todo o suporte na classificação das reações adversas.

Aos professores da banca **Tiago Sampaio, Andrea Bessa, Renata Alves, Alana Gomes, Maria de Fátima** pela disponibilidade, por todas as correções, contribuições e ensinamentos.

A todos do **Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**, em especial a ex-coordenadora **profa. Kalyne Leal**, o atual coordenador **prof. Ramon Menezes**, a secretária **Juliana e Maxwilliam** por todo o auxílio recebido durante esse tempo de mestrado e doutorado.

“Porque se uniu a mim, eu o livrarei e o  
protegerei, pois conhece o meu nome.”  
(Salmos 91:14,15).

## RESUMO

Para o tratamento da doença de Chagas (DC) existem dois fármacos, o Nifurtimox e o Benznidazol (BNZ). O mecanismo de ação do BNZ consiste na formação de radicais livres que podem lesar as células do hospedeiro, tendo como consequência o surgimento de reações adversas (RAM), que precisam ser estudadas com mais detalhes para segurança do paciente. O Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), por sua vez, é uma citocina fundamental na resposta imunológica ao *Trypanosoma cruzi*, podendo influenciar nas formas sintomáticas da DC e no perfil de resposta à terapia farmacológica. Este trabalho teve como objetivos estudar a causalidade e gravidade das RAM ao BNZ, bem como a influência dos níveis séricos do fármaco, do IFN- $\gamma$  e do polimorfismo genético do fator regulador de interferon (IRF). Trata-se de um estudo de coorte prospectivo de pacientes com DC que realizaram o tratamento com BNZ no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC). A avaliação das RAM foi realizada em média de 30 e 60 dias após o início do tratamento e incluiu análises clínicas e laboratoriais. As RAM foram classificadas quanto à causalidade e quanto à gravidade. O BNZ foi quantificado no soro por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Concentrações de IFN- $\gamma$  foram determinadas no soro por ensaio imunoenzimático e a frequência de polimorfismos nos genes dos fatores reguladores de interferon (IRF), IRF1 e IRF8, foram realizadas através da Reação em Cadeia da Polimerase. Observou-se alta prevalência de RAM, a maioria classificada como possíveis e prováveis, de gravidade leve a moderada. Foi possível verificar que as RAM não estavam relacionadas com as concentrações séricas de BNZ, mas mostrou associação em relação aos níveis séricos de IFN- $\gamma$ . Ademais, os níveis séricos de IFN- $\gamma$  estavam mais elevados nos pacientes com a forma digestiva e naqueles com a forma cardíaca, durante e após tratamento com BNZ. As RAM associadas à interrupção e intervenções foram as que afetaram o sistema dermatológico, sistema nervoso central e periférico e órgãos do sentido como a ageusia. Também foram observadas leves alterações hematológicas e bioquímicas como neutrofilia e linfopenia. O método adaptado para quantificação de BNZ mostrou-se adequado para a quantificação do BNZ em soro humano. Quanto ao polimorfismo, o genótipo selvagem de IRF8 apresentou níveis mais baixos de IFN- $\gamma$ , sugerindo que a forma indeterminada da doença está mais relacionada a indivíduos sem polimorfismos (gene selvagem) para IRF8. Apesar da presença de várias RAM, o BNZ mostra-se seguro desde que o tratamento seja acompanhado por médicos e farmacêuticos, demonstrando a importância do serviço prestado pelo LPDC no acompanhamento dos pacientes promovendo uma farmacoterapia segura. Mecanismos que favorecem a predisposição a uma determinada forma clínica da DC ou no aparecimento das RAM ao BNZ ainda são desconhecidos, mas os resultados encontrados com este trabalho aventam a possibilidade de que o conhecimento dos polimorfismos auxiliará na compreensão da patologia, melhorando o direcionamento terapêutico no futuro, necessitando de estudos clínicos que avaliem as frequências de polimorfismos genéticos e as concentrações de citocinas nos diferentes estágios da DC.

**Palavras-chave:** Reações adversas relacionadas a medicamentos; Exames e Diagnósticos laboratoriais; Interferon gama, Polimorfismo de nucleotídeo único; *Trypanosoma cruzi*; Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

## ABSTRACT

For the treatment of Chagas disease (CD) there are two drugs, Nifurtimox and Benznidazole (BNZ). The mechanism of action of BNZ consists in the formation of free radicals that can damage host cells, resulting in adverse drug reactions (ADR), which need to be studied in more detail for patient safety. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), in its turn, is a fundamental cytokine in the immune response to *Trypanosoma cruzi*, which may influence the symptomatic forms of CD and the response profile to drug therapy. This work aimed to study the causality and severity of ADRs to BNZ, as well as the influence of serum levels of the drug, IFN- $\gamma$  and the genetic polymorphism of the interferon regulatory factor (IRF). This is a prospective cohort study of patients with CD who underwent treatment with BNZ at the Chagas Disease Research Laboratory (LPDC). The evaluation of ADRs was performed at a mean of 30 and 60 days after the start of treatment and included clinical and laboratory analyses. ADRs were classified according to causality and severity. BNZ was quantified in serum by High Performance Liquid Chromatography. IFN- $\gamma$  concentrations were determined in serum by enzyme immunoassay and the frequency of polymorphisms in the genes of interferon regulatory factors (IRF), IRF1 and IRF8, were performed using the Polymerase Chain Reaction. A high prevalence of ADRs was observed, most classified as possible and probable, of mild to moderate severity. It was possible to verify that the ADRs were not related to the serum concentrations of BNZ, but showed an association in relation to the serum levels of IFN- $\gamma$ . Furthermore, serum IFN- $\gamma$  levels were higher in patients with the digestive form and in those with the cardiac form, during and after treatment with BNZ. ADRs associated with interruption and interventions were those that affected the dermatological system, central and peripheral nervous system and sense organs such as ageusia. Mild hematological and biochemical alterations such as neutrophilia and lymphopenia were also observed. The adapted method for quantification of BNZ proved to be suitable for the quantification of BNZ in human serum. As for the polymorphism, the wild-type IRF8 genotype showed lower levels of IFN- $\gamma$ , suggesting that the indeterminate form of the disease is more related to individuals without polymorphisms (wild gene) for IRF8. Despite the presence of several ADRs, BNZ is safe as long as the treatment is supervised by physicians and pharmacists. It is noted the importance of the service provided by the LPDC in the follow-up of patients promoting safe pharmacotherapy. Mechanisms that favor the predisposition to a specific clinical form of CD or the appearance of ADRs to BNZ are still unknown, but the results found with this work suggest the possibility that the knowledge of polymorphisms will help in the understanding of the pathology, improving the therapeutic direction in the future, requiring clinical studies to evaluate the frequencies of genetic polymorphisms and the concentrations of cytokines in the different stages of CD.

**Keywords:** Adverse drug reactions; Laboratory tests and diagnostics; Interferon gamma, Single Nucleotide Polymorphism; *Trypanosoma cruzi*; High Pressure Liquid Chromatography.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 DOENÇA DE CHAGAS – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
1.2 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	17
1.2.1 <i>Benznidazol: mecanismo de ação e reações adversas</i> .....	19
1.3 PAPEL DO IFN- $\gamma$ NA FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS E NAS REAÇÕES ADVERSAS AO BENZNIDAZOL .....	21
1.4 FATORES REGULADORES DE INTERFERON (IRF).....	24
1.5 SERVIÇO DE ATENÇÃO FARMACÊUTICA AOS PORTADORES DE DOENÇA DE CHAGAS .....	26
1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	30
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1 GERAL .....	31
2.2 ESPECÍFICOS.....	31
<b>ARTIGO I – CAUSALIDADE E GRAVIDADE DAS REAÇÕES ADVERSAS E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS AO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA .....</b>	<b>32</b>
RESUMO.....	32
ABSTRACT .....	33
1 INTRODUÇÃO .....	34
2 METODOLOGIA .....	35
2.1 PACIENTES E PROCEDIMENTOS .....	36
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS REAÇÕES ADVERSAS .....	36
2.3 ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL .....	37
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
2.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1 CARACTERÍSTICAS SÓCIO DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	39
3.2 FREQUÊNCIA DAS REAÇÕES ADVERSAS AO BENZNIDAZOL DE ACORDO COM OS SISTEMAS OU ÓRGÃOS .....	44
3.3 CAUSALIDADE E GRAVIDADE DAS REAÇÕES ADVERSAS .....	49
3.4 ALTERAÇÕES LABORATORIAIS DEVIDO AO USO DO BENZNIDAZOL .....	52
4 CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS .....	57
<b>ARTIGO 2 – ADAPTAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE BENZNIDAZOL NO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA .....</b>	<b>63</b>
RESUMO.....	63
ABSTRACT .....	64
1 INTRODUÇÃO .....	65
2 METODOLOGIA .....	67
2.1 PACIENTES E PROCEDIMENTOS .....	68
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS REAÇÕES ADVERSAS .....	68
2.3 DETERMINAÇÃO DE BNZ NO SORO .....	68
2.3.1 <i>Material e equipamento</i> .....	68
2.3.2 <i>Obtenção das amostras</i> .....	69
2.3.3 <i>Metodologia empregada</i> .....	69
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
2.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	71
3 RESULTADOS.....	71
3.1 QUANTIFICAÇÃO DE BNZ NO SORO.....	71
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS RAM AO BENZNIDAZOL .....	75

3.3 CONCENTRAÇÃO DE BNZ E A PRESENÇA DE RAM.....	76
4 DISCUSSÃO .....	78
5 CONCLUSÃO .....	81
REFERÊNCIAS .....	81
<b>ARTIGO 3 - IFN-<math>\gamma</math> E POLIMORFISMO DE FATORES REGULADORES DE INTERFERON COMO INFLUÊNCIA NAS FORMAS DA DOENÇA DE CHAGAS, NO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL E NO DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES ADVERSAS .....</b>	<b>86</b>
RESUMO.....	86
ABSTRACT .....	87
1 INTRODUÇÃO .....	88
2 METODOLOGIA .....	90
2.1 DELINEAMENTO, POPULAÇÃO DO ESTUDO, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	90
2.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	90
2.3 MENSURAÇÃO DA CITOCINA INTERFERON (IFN- $\gamma$ ) NO SORO.....	91
2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES FATOR REGULADOR DE INTERFERON (IRF).....	91
2.4.1 <i>Processamento da amostra</i> .....	91
2.4.2 <i>Extração do DNA</i> .....	91
2.4.3 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real</i> .....	92
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	93
2.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	94
3 RESULTADOS.....	94
3.1 INFLUÊNCIA DO BENZNIDAZOL NOS NÍVEIS DE IFN- $\gamma$ .....	94
3.2 NÍVEIS DE IFN- $\gamma$ NA PRESENÇA DE REAÇÕES ADVERSAS.....	96
3.3 FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES IRF1 E IRF8 NOS PACIENTES COM DC CRÔNICA.....	98
4 DISCUSSÃO .....	100
5 CONCLUSÃO .....	107
<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>125</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas – considerações gerais

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909, pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Essa doença é causada pelo protozoário sanguíneo flagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida de forma natural por um inseto hematófago da família *Reduviidae*. O inseto vetor infectado ao se alimentar de sangue de uma pessoa, elimina seus excrementos infectados com *T. cruzi*, que podem ser arrastados pela vítima para o local da picada causando assim a infecção. Outras formas de transmissão são transfusão de sangue, transplante de órgãos, congênita, acidentes de laboratório e oral, esta última via é prevalente na região norte do Brasil devido á ingestão de açaí in natura com fezes ou urina de triatomíneos infectado com *T. cruzi* (BRASIL, 2014; WHO, 2022).

A doença ainda hoje representa um grave problema de saúde pública na América Latina (WHO, 2022). Dentre as doenças endêmicas, esta enfermidade ocupa lugar de destaque, seja pelo grau de morbidade e letalidade, seja pelo custo econômico e social que representa. Deixou de ser exclusiva da América Latina porque nas últimas décadas se espalhou para outros continentes, como Estados Unidos, Canadá, e muitos países da Europa e alguns países ocidentais do Pacífico (WHO, 2022).

Na América Latina, o número de infectados chegou próximo de 20 milhões no início da década de 1980, com 100 mil novos casos por ano (WHO, 2002; 2010), e uma incidência anual de 41.200 casos por via vetorial (OPAS, 2006). A redução no surgimento de novos casos se deu principalmente pelo controle das duas principais modalidades de transmissão: a vetorial e a transfusional (WHO, 2010). No mundo, estima-se que existam de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e cerca de 75 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (WHO, 2022).

Martins-Melo *et al.*, (2014) publicaram o primeiro estudo com revisão sistemática e metanálise para estimar a prevalência da doença de Chagas no Brasil. Incluindo publicações de 1980 a 2012, a prevalência agrupada estimada da doença de Chagas foi de 4,2%, variando de 4,4% na década de 1980 a 2,4% após 2000. Neste estudo, as maiores prevalências foram verificadas em: mulheres (4,2%), maiores de 60 anos (17,7%), residentes nas regiões Nordeste (5,0%) e Sudeste (5,0%) e em áreas mistas, urbana/rural (6,4%), estimando-se que 4,6 milhões de pessoas estariam infectadas por *T. cruzi* no Brasil.

Entre 1999 e 2007, ocorreram 53.930 óbitos no Brasil relacionados à doença de Chagas, sendo causa básica ou causa associada. Como causa básica foram identificadas: complicações diretas do envolvimento cardíaco, como os transtornos de condução/arritmias (41,4%) e a insuficiência cardíaca (37,7%). E como causa associada das doenças cerebrovasculares (13,2%), doenças isquêmicas do coração (13,2%) e as doenças hipertensivas (9,3%). Sendo considerada a mais grave doença crônica transmissível (MARTINS-MELO *et al.*, 2012), no período de 2000 a 2013, com 68.206 mortes registradas no Brasil, uma média de 4.872 por ano, segundo o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) (MARTINS-MELO *et al.*, 2016). E atualmente, em todo o mundo estima-se que ocorram cerca de 10.000 mortes a cada ano (WHO, 2022).

Em 2020, no período de março a agosto, foram registrados no país 1.746 óbitos tendo a DC como causa básica. Em alguns casos, a COVID-19 foi citada como comorbidade que pode ter agravado ou contribuído direta ou indiretamente na causa do óbito (BRASIL, 2021).

Considerando projeções de estimativas de prevalência de infecção por *T. cruzi*, existiram em 2020 no Brasil: 819.351 a 1.927.885 pessoas com a forma indeterminada; entre 409.676 a 963.943 pessoas com a forma cardíaca; e entre 136.559 a 321.314 pessoas com a forma digestiva da DC. Levando em consideração a pandemia do novo coronavírus, sabemos que indivíduos com alterações cardíacas (forma cardíaca) representam uma importância epidemiológica em termos de agravamento dos casos e prognósticos desfavoráveis em decorrência da infecção por SARS-CoV-2 (BRASIL, 2021).

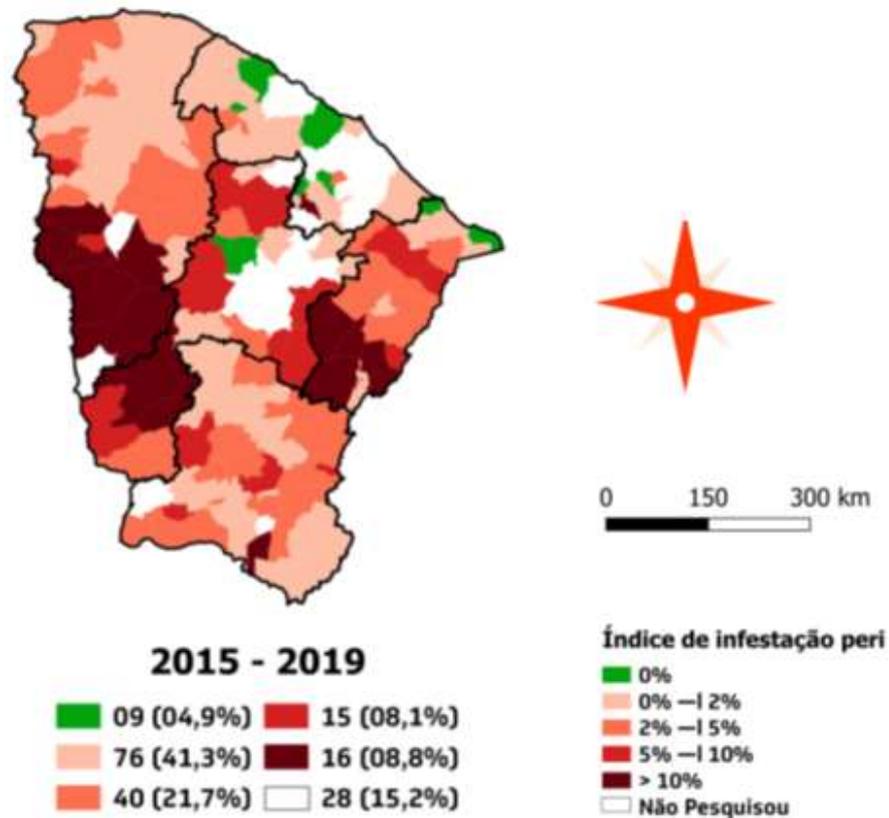
A Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) alertou em 2021 que 70% das pessoas que vivem com a doença, nas Américas, não sabem que estão infectadas, devido à ausência de sintomas clínicos. Estima-se que mais de 10 mil pessoas morrem a cada ano em consequência de complicações clínicas da doença de Chagas (OPAS, 2021).

A OPAS chama a atenção para o fato de que o tratamento da população com doença de Chagas é de apenas 1% a cada ano. Sabemos que para controlar a doença e melhorar a qualidade de vida dessas pessoas é essencial alcançar a cobertura universal de saúde, incluindo gerenciamento clínico e aconselhamento para todas as pessoas diagnosticadas (OPAS, 2021).

A região nordeste, principalmente o estado do Ceará, ainda representa grande preocupação em termos de risco de transmissão da DC, essa preocupação se deve principalmente a três fatores: a região ainda permanece socialmente muito carente e possui os mais altos índices de moradias pobres que são propícias à colonização pelo triatomíneo

(FIGURA 1); é o epicentro de dispersão de duas espécies de difícil controle pelos meios rotineiros da Fundação Nacional de Saúde (FNS), o *Triatoma brasiliensis* e o *Triatoma pseudomaculata*; e nos últimos anos, a pandemia da COVID-19, pode ter ocasionado impacto nas ações de assistência e vigilância em saúde, considerando a sobrecarga dos serviços e a necessidade das medidas de distanciamento para redução da transmissão por SARS-CoV-2 (DIAS, 1998; FREITAS; *et al.*, 2007; BRASIL, 2021; GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021).

Figura 1: Índice de infestação peridomiciliar de triatomíneos por município. Ceará, 2015 a 2019.



Fonte: PCDC versão 2.14. CEVEP/COVEP/SEVIR/SESA. GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021.

Estudo realizado no município de Limoeiro do Norte observou uma prevalência de 4,2% (FREITAS *et al.*, 2017) e Fidalgo *et al.*, (2021), no município de Quixeré, encontrou uma prevalência de 3,7% de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.

Diante da progressiva redução das atividades de vigilância entomológica, devido aos reduzidos índices de transmissão vetorial, o Ceará se preocupa com a possibilidade de

transmissão ativa da doença de Chagas em consequência da redução dessa atividade e falta de prioridade pelo Estado. As regiões de maior importância epidemiológica e alto risco da transmissão da DC pela via vetorial neste estado são: os sertões dos Inhamuns (Crateús e Tauá), Baixo Jaguaribe (Jaguaruana, Limoeiro do Norte, Russas) e Centro-Sul (Icó) (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021).

A DC possui duas fases clínicas, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda geralmente é inaparente, as manifestações clínicas, quando presentes, são febre, edema, hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia e em casos mais graves a insuficiência cardíaca. A fase crônica apresenta, principalmente, quatro formas clínicas distintas: indeterminada, digestiva, cardíaca e mista (BRASIL, 2014).

A forma indeterminada caracteriza-se por um longo período assintomático, que pode durar toda a vida do indivíduo, com ausência de manifestações clínicas; a forma digestiva manifesta-se pelo acometimento do esôfago ou do intestino grosso, levando ao aparecimento do megaesôfago ou do megacólon, respectivamente (BRASIL, 2014).

No megaesôfago, com a destruição dos plexos, a atividade motora dos esfíncteres superior e inferior que controlam a passagem do bolo alimentar fica desordenada e o indivíduo apresenta disfagia, azia, regurgitação, dor retroesternal e hipertrofia de glândulas salivares; em casos avançados pode apresentar desnutrição (CARVALHO *et al.*, 2015).

A forma cardíaca é a mais preocupante, pois as doenças cardiovasculares foram frequentemente associadas aos óbitos relacionados à doença de Chagas (MARTINS-MELO *et al.*, 2016). A presença de alterações eletrocardiográficas constitui elemento fundamental na caracterização de comprometimento cardíaco significativo na doença de Chagas (BRASIL, 2014). Os pacientes podem apresentar disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, anormalidades do movimento da parede, bradicardia e taquicardia, insuficiência cardíaca e morte cardíaca súbita (CARDOSO *et al.*, 2016).

Algumas teorias explicam que a destruição neuronal na fase aguda ocorre, devido há uma grande concentração do protozoário ocasionando a morte neuronal. Na fase crônica, por sua vez, o que poderia provocar a destruição neuronal seria uma resposta autoimune do próprio hospedeiro, pois já se sabe que a concentração do parasito é muito pequena (CORBETT *et al.*, 2001, RIBEIRO, CREMA, RODRIGUES, 2008).

Existe ainda a forma mista, caracterizada por uma forma cardiodigestiva, com ocorrência simultânea de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas (megaesôfago e/ou megacólon) da doença de Chagas (BRASIL, 2014).

Os mecanismos responsáveis pelos diferentes quadros clínicos nas formas da DC

envolvem diversos fatores tanto relacionados ao parasito quanto ao hospedeiro (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005) e requerem tratamento, principalmente na fase sintomática da doença.

## 1.2 Tratamento da doença de Chagas

Com relação ao tratamento, os medicamentos existentes para o tratamento da DC são o Benznidazol (BNZ) e o Nifurtimox, esse último foi retirado do mercado brasileiro em 1980 devido à alta toxicidade no aparelho digestivo, assim o fármaco de escolha para o tratamento da DC é o BNZ. A dose utilizada na fase crônica é 5mg/kg/dia e o tratamento dura em média dois meses, porém quando a dose é muito alta, ou seja, ultrapassa a dose máxima diária de 300 mg, estende-se o tratamento até três meses para garantir a segurança do paciente (LUQUETTI E SCHMUÑIS, 2010; BRASIL, 2014).

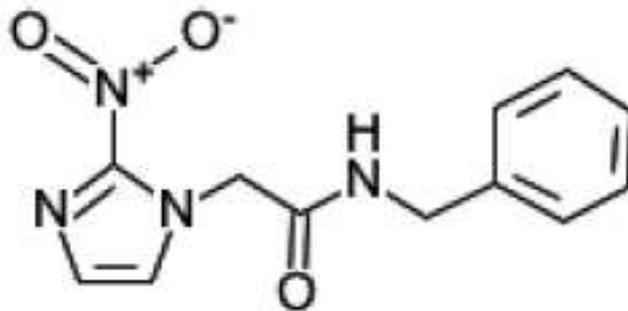
O Nifurtimox (3-metil-4-{(5-nitrofurfurilidene) amino} tiomorfolina-1-dioxido), produzido pelo laboratório Bayer, lançado em 1967 com o nome comercial Lampit®, em comprimidos de 120mg de princípio ativo, sendo a primeira droga utilizada no tratamento da fase aguda da DC, na dose de 5 a 10mg/kg/dia durante 30 a 60 dias (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os estudos com BNZ iniciaram entre 1971 e 1974, mostrando eficácia similar ou superior ao Nifurtimox, fármaco da classe dos nitroheterocíclicos (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida) (FIGURA 2), que possuem atividade antiprotozoária (CANÇADO, 2000). O BNZ foi sintetizado em 1972, por Wineholt e Liebman, produzido pelo laboratório Hoffman-La Roche com o nome de *Rochagan*® (FIGURA 2), e desde 2008 passou a ser produzido na forma de comprimidos de 100mg pelo laboratório do Estado de Pernambuco com o nome de benznidazol (LAFEPE) (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Mesmo possuindo atividade sobre outros microrganismos, como *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*, o BNZ tem uso clínico apenas para o *Trypanosoma cruzi*, sendo este o único fármaco específico para a DC no Brasil (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

O tratamento etiológico da DC tem como objetivo erradicar a infecção, prevenir o aparecimento de lesões nos órgãos ou retardar a evolução das lesões presentes para formas mais graves (PONTES *et al.*, 2010), além de interromper a cadeia de transmissão do parasito (MENEZES *et al.*, 2011). O tratamento na fase aguda deve ser realizado em todos os casos imediatamente após a confirmação parasitológica, independentemente da via de transmissão (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O tratamento também pode ser instituído na fase crônica recente, período de cinco a doze anos da infecção inicial, na fase crônica tardia, acima de doze anos da

infecção inicial na forma indeterminada e nas formas cardíacas e digestivas leves (BRASIL, 2014; WHO, 2016), entretanto, o fármaco tem eficácia limitada quando administrado a adultos na fase crônica da doença (taxas de cura variam de 15% a 35%) (VIOTTI *et al.* 2006; FABBRO *et al.* 2007).

Figura 2- Estrutura química do Benznidazol.



Fonte: OLIVEIRA *et al.*,2008.

Em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana ou aqueles que esperam por um transplante de órgãos é necessário realizar avaliação criteriosa para determinar o tratamento (BERN *et al.*, 2007). O uso do BNZ é contraindicado nos casos graves de cardiomiopatia chagásica, mulheres em idade fértil sem o uso de contraceptivos, gestantes, insuficiência hepática ou renal, doenças neurológicas e outras doenças que possam ser agravadas pelo uso do fármaco devido a sua alta toxicidade (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016).

O Segundo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas de 2015, recomenda o tratamento da doença tanto na fase aguda como na fase crônica, sendo a dosagem indicada de acordo com o peso do paciente; para adultos 5mg/kg/dia, por via oral durante 60 dias em duas ou três tomadas diárias e para crianças 5-10mg/kg/dia por via oral durante 60 dias em duas ou três tomadas diárias. Para pacientes com mais de 60kg, o período de tratamento é estendido até no máximo por três meses, para que dessa forma não se exceda a dose máxima diária permitida (300mg/dia) (BRASIL, 2005; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2016).

O BNZ, atualmente, é disponibilizado pelo Ministério da Saúde apenas para centros de referência de tratamento para a rede pública ou para projetos de pesquisa (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

### **1.2.1 Benznidazol: mecanismo de ação e reações adversas**

O mecanismo de ação do BNZ é a formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos a partir da redução do grupo nitro presente na estrutura da molécula do fármaco por ação da nitroredutase (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

Essa redução leva a formação de radicais livres intermediários e metabólitos nucleofílicos, através das enzimas de metabolização de citocromo P450, sendo as principais a NADPH- citocromo P450 redutase, xantina oxidoreductase e aldeído-oxidase (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

A NADPH- citocromo P450 redutase atua sobre o grupo nitro da molécula (R-NO<sub>2</sub>), levando a produção de um radical ânion nitro intermediário (R-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); esse radical nitrofurano possui elevado potencial redox, sofrendo uma reação do tipo ciclo redox utilizando o oxigênio molecular, que por sua vez é reduzido a ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pela transferência de um elétron do complexo da NADPH desidrogenase. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é produzido através da dismutação do ânion superóxido (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Ambos na presença de Fe<sup>+3</sup> formam o radical livre hidroxila (OH<sup>-</sup>) através da reação de Haber-Weiss. Os radicais livres produzidos, principalmente o radical hidroxila, ligam-se a lipídeos, proteínas e DNA levando a lesão das células do parasito (MAYA *et al.*, 2006).

Desde a síntese do BNZ em 1972, a farmacocinética deste fármaco ainda não foi totalmente elucidada. Estudos de 1979, 1980 e 1984 descreveram que na dose de 100 mg o BNZ é rapidamente absorvido a partir do trato gastro intestinal, com picos de concentração plasmática de 2,2 a 2,8 µg/mL entre 3 a 4 horas após a administração por via oral. É rapidamente e uniformemente distribuído no plasma com valor de volume de distribuição igual a 0,56 L/kg. A meia-vida de eliminação é de 12 horas e a taxa de ligação a proteínas plasmáticas é de cerca de 40%. A eliminação do fármaco por via renal na forma de metabólitos é de 60 a 67%, na excreção inalterada de 6% e na via fecal é de 22 a 28%. O tempo para atingir a concentração plasmática máxima (T máx) foi de 4,25 h (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979; RAAFLAUB, 1980, ROBERTS *et al.*, 1984).

Acredita-se que devido à formação de radicais livres resultantes do mecanismo de ação do BNZ, células do hospedeiro também podem ser lesadas, levando ao surgimento de reações adversas. Reações adversas sérias relatadas em adultos tratados com BNZ, incluindo neutropenia e leucopenia, ambos por depressão de medula óssea (COLOSIO *et al.*, 2007).

A Reação Adversa a Medicamentos (RAM), segundo a RDC N° 406 de 22 de julho de 2020, é qualquer resposta prejudicial ou indesejável, não intencional, a um

medicamento, que ocorre nas doses usualmente empregadas no ser humano para profilaxia, diagnóstico, terapia da doença ou para a modificação de funções fisiológicas. É diferente do efeito colateral que está relacionado com propriedades farmacológicas do medicamento (OMS, 2005; BRASIL, 2020). Para não causar confusão, é importante diferenciar RAM de efeito colateral e evento adverso.

O evento adverso é qualquer ocorrência médica indesejável ao paciente que pode surgir durante o tratamento com um medicamento, mas que não tem, necessariamente, relação causal com esse tratamento (BRASIL, 2020).

As RAM relacionadas ao BNZ podem aparecer entre o sétimo e o décimo dia de tratamento e levam muitas vezes a interrupção do mesmo. Fenômenos como dor nas articulações e polineuropatia periférica são raros. Nesses casos o paciente pode apresentar um aumento da sensibilidade à dor nas extremidades dos dedos ao cortar as unhas ou lavar as mãos com água fria (FIOCRUZ, 2012).

A terapia com BNZ pode causar desde incômodos gerais até específicos e mais graves, geralmente subdivididos em três tipos: hipersensibilidade, polineuropatia periférica e depressão da medula óssea (DIAS; COURA, 1997).

Devido à possibilidade de depressão da medula óssea, recomenda-se realizar o hemograma antes de iniciar o tratamento e nos 10º, 20º, 37º e 52º dias depois de iniciada a terapia (CANÇADO, 2002; SOSA *et al.*, 2004). Das alterações causadas pela depressão da medula óssea a neutropenia é a mais frequente, mas também pode ser observada agranulocitose, onde os primeiros sintomas observados são faringite e febre, e a púrpura trombocitopênica, em que são comuns o aparecimento de petéquias e hemorragias na mucosa da boca. A agranulocitose e a púrpura trombocitopênica são raras, porém a neutropenia pode se desenvolver rapidamente, sendo de extrema importância o alerta ao paciente caso haja sinais de infecção, como febre. Essas reações devem desaparecer quando a dose é reduzida ou o tratamento é interrompido (BERN *et al.*, 2007).

As reações cutâneas foram descritas na literatura como urticária, erupção exantemática (FIGURA 3) ou, de forma menos comum, como reação a drogas com eosinofilia e sintomas sistêmicos (síndrome DRESS), levando a suspensão definitiva de tratamento em 15% a 30% dos pacientes. Estas reações cutâneas normalmente aparecem nos primeiros 30 dias de tratamento, principalmente após o 10º dia de tratamento. Apesar do amplo uso de BNZ, informações sobre sua toxicidade e mecanismos ainda são escassas e grande parte dos estudos presentes abordam apenas aspectos clínicos (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; SALVADOR *et al.*, 2014).

Figura 3 – Exemplos que reações ocasionadas pelo uso do benznidazol em pacientes portadores da doença de Chagas atendidos pelo Laboratório de Pesquisa em doença de Chagas da UFC



Legenda: A - Erupção cutânea; B – Descamação das mãos; C – Manchas vermelhas na mão e perna.

Fonte: Próprio autor.

As reações associadas ao sistema dermatológico são as reações mais prevalentes em pacientes que fazem uso do BNZ (SALVADOR *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.* 2017; GOTIJO *et al.* 2020), como exemplo dessas reações estão as erupções cutâneas que são caracterizadas por lesões vermelho-escuras acompanhadas de sensação de queimação ou coceira (RIVE *et al.*, 2013) e reações mais graves já foram relatadas como síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) e Necrólise epidérmica tóxica (NET). Ao correlacionar os níveis de citocinas com reações adversas, alguns estudos relataram um aumento inicial nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-8 seguido de elevação de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL -10 (KAUPPINEN, 1991 ; CORREIA *et al.*, 2002 ; SHIOHARA *et al.*, 2015).

### **1.3 Papel do IFN- $\gamma$ na fisiopatologia da doença de Chagas e nas reações adversas ao benznidazol**

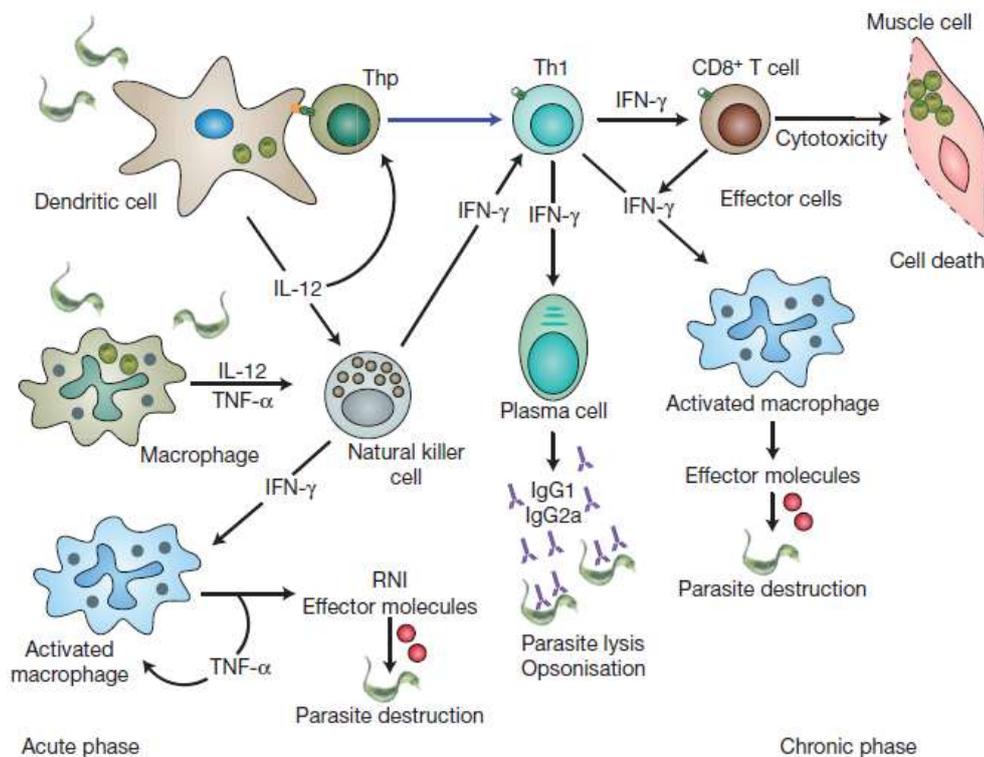
A resposta imunológica pode ser um dos fatores que estão relacionados com a patogênese da DC e tem sido associada com as diferenças entre as manifestações clínicas com diferentes graus de gravidade. Os mecanismos pelos quais indivíduos desenvolvem as diferentes formas da doença ainda não foram elucidados, mas a avaliação da concentração de citocinas anti e pró-inflamatórias pode ajudar a desvendar os mecanismos e vir a ser utilizadas

como marcadores imunológicos para os diferentes estágios da DC (WARD *et al.* 1999; D'AVILA *et al.* 2009).

O *T. cruzi*, ao cair na corrente sanguínea, desencadeia mecanismos imunológicos da imunidade inata e adaptativa (FIGURA 4). Inicialmente, macrófagos, células Natural Killer (NK) e células dendríticas (células do sistema imune inato) começam a produzir citocinas pró-inflamatórias como interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras (intermediários de nitrogênio reativos (RNIs) e GTPases induzíveis por IFN- $\gamma$ ) que controlam a replicação do parasito. Ao mesmo tempo, células dendríticas ao produzirem IL-12 que promove a diferenciação e expansão clonal de células T helper 1 (Th1) CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células B do plasma, ativando, portanto, a imunidade adquirida. A IL-12 desencadeia a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> com perfil Th1 que produz IFN- $\gamma$  que ativam mecanismos efetores em macrófagos para destruir as formas intracelulares (amastigotas) e extracelulares (tripomastigotas) fagocitados e as células TCD8<sup>+</sup>, através de sua atividade citotóxica, destroem células contendo amastigotas. Células B produzem anticorpos que atuam ativando o sistema complemento causando a lise das células infectadas ou funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose dessas células (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Logo, observa-se que indivíduos infectados com *T. cruzi* mantêm maior produção de citocinas inflamatórias do perfil Th1 como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em comparação com indivíduos saudáveis, como resultado do estímulo persistente da imunidade inata e específica (ALBA-ALVARADO *et al.* 2018).

Observa-se que dentre todas as citocinas, o IFN- $\gamma$  tem um papel crucial na resposta imunológica contra o *T. cruzi*, tem a função de controlar a infecção durante as fases aguda e crônica, porém, níveis excessivos dessa citocina podem causar dano tecidual. IL10 e IL12 são dois importantes antagonistas envolvidos na regulação da síntese de IFN- $\gamma$ . Não se sabe ao certo qual a influência do BNZ no perfil de citocinas, mas acredita-se que o fármaco pode ocasionar uma expressão média de citocinas inflamatórias, aumentando os níveis de IFN- $\gamma$ , dessa forma, esta citocina pode atuar em sinergismo com o fármaco durante o tratamento, potencializando sua ação tripanocida, mas também causando dano tecidual no hospedeiro (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2012).

Figura 4 - Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.



Na fase inicial da invasão do *T. cruzi*, macrófagos, células NK e células dendríticas produzem as citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e moléculas efetoras que são os intermediários de nitrogênio reativos (RNIs) e GTPases induzíveis por IFN que controlam a replicação do parasita. Ao mesmo tempo, as células dendríticas ativam a imunidade inata e a adquirida, produzindo IL-12 que ativa a diferenciação e expansão clonal das células T helper 1 (Th1) CD4+ e CD8+ e células B do plasma. O IFN- $\gamma$  produzido pelas células T CD4+ Th1 ou CD8+ ativa macrófagos para destruir tanto amastigotas quanto tripomastigotas fagocitados, enquanto a atividade citotóxica exibida por células T CD8+ destrói células contendo amastigotas intracelulares. Os anticorpos produzidos pelas células B lisam a forma tripomastigota extracelular ou facilitam a fagocitose de parasitas opsonizados com IgG. Abreviaturas: IFN: interferon; IL: interleucina; NK, natural killer; Thp: célula precursora de Th; TNF, fator de necrose tumoral.

Fonte: JUNQUEIRA *et al.*, 2010.

Alguns estudos mostraram que o BNZ está relacionado a um *down-regulation* na expressão média de citocinas, levantando a hipótese que o tratamento durante a fase crônica pode ter um impacto de suporte, modulando o perfil de citocinas inflamatórias de pacientes na forma indeterminada da doença, reduzindo as chances de uma evolução para a forma cardíaca (REVELLI *et al.*, 1999; PIAGGIO *et al.*, 2001; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2006; BUSTAMANTE *et al.*, 2008; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2012).

A imunopatogênese que leva ao aparecimento das reações adversas ao BNZ ainda

não foi bem esclarecida, mas acredita-se que sejam reações mediadas por células T (HOETZENECKER *et al.*, 2016). Existem três hipóteses que podem explicar a ativação de células T por medicamentos, são elas a teoria do modelo hapteno/pró-hapteno, no qual, proteínas endógenas se ligam covalentemente ao fármaco ou seus metabólitos formando neoantígenos que serão reconhecidos pelo sistema imune; a teoria do modelo de repertório peptídico alterado em que o fármaco liga-se em uma posição no sulco de ligação do peptídeo HLA provocando uma mudança no formato na fenda de ligação e altera a especificidade dos autopeptídeos capazes de se ligar à molécula HLA; e o conceito p-i, no qual, o fármaco consegue se ligar diretamente no receptor de células T ou no HLA sem passar por processamento, estimulando rapidamente essas células (WHITE *et al.*, 2015; PICHLER E HAUSMANN, 2016).

O *down-regulation* no perfil de citocinas inflamatórias, além de parecer evitar a progressão da doença para as formas sintomáticas, pode minimamente favorecer a replicação parasitária de focos inflamatórios residuais, considerando a menor eficácia do benznidazol em promover erradicação parasitária na fase crônica da doença de Chagas (CANÇADO, 2002; CAMANDAROBA *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2004), então, apesar dos elevados níveis de IFN- $\gamma$  estarem associados com cura, eles também estão relacionados com as formas clínicas mais graves da doença e com o aparecimento de reações adversas ao BNZ (REVELLI *et al.*, 1999; PIAGGIO *et al.*, 2001; EHRT *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2006; BUSTAMANTE, BIXBY, TARLETON, 2008; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2012; LEVICK AND GOLDSPIK, 2014; SALVADOR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

#### **1.4 Fatores Reguladores de Interferon (IRF)**

O IFN- $\gamma$  regula a expressão de mais de 1.000 genes através da ativação da Janus tirosina quinase (JAK) e fosforilação da via do transdutor e ativador da transcrição 1 (STAT-1), juntamente com outros mecanismos. Dentre os genes regulados por IFN- $\gamma$ , estão os Fatores Reguladores de Interferon (IRF - *Interferon Regulatory Factor*), que consiste em nove membros: IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 e IRF9 e formam uma família de fatores de transcrição que tem uma extensa homologia em sua sequência de consenso de reconhecimento do DNA. Eles conseguem se ligar a uma sequência homóloga do gene do interferon- $\beta$  e vários genes regulados pelo interferon. Os IRFs regulam respostas imunes, principalmente contra antígenos virais, resultando na amplificação do ataque antiviral e

ativação da defesa adaptativa (MAMANE *et al.*, 1999; TANIGUCHI *et al.*, 2001; TAKAOKA *et al.*, 2008; NEHYBAJ *et al.*, 2009).

A principal função da família IRF é a regulação de respostas imunes, resultando na amplificação do ataque antiviral e ativação da defesa adaptativa (NEHYBAJ *et al.*, 2009) e o IFN- $\gamma$  é um indutor importante dos genes IRFs.

Entre a família IRF, as proteínas IRF1 e IRF8 estão relacionadas na resistência à infecção intracelular, como é o caso da DC (TAKI *et al.*, 1997). O IRF1 e o IRF8 são reguladores transcricionais que desempenham papéis críticos na ativação de macrófagos por sinais pró-inflamatórios como o IFN- $\gamma$ . O IRF1 está envolvido na regulação de genes durante a inflamação, resposta imune, hematopoese e proliferação celular e IRF8 tem como função promover a diferenciação de células mieloides progenitoras para as linhagens de fagócitos mononucleares (monócitos, macrófagos e células dendríticas), agindo como um antagonista da via de granulócitos polimorfonucleares (ABDOLLAHI *et al.*, 1991; TAMURA *et al.*, 2000; TESTA *et al.*, 2004; KUROTAKI *et al.*, 2014; SALEM *et al.*, 2014).

O papel do IRF1 de regular a expressão de genes como *Toll-like Receptor 9* é essencial para o reconhecimento de microorganismos e apresentação de antígenos (GUO *et al.*, 2005), além disso, em macrófagos, desencadeia a expressão de óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*), principal mediador de citotoxicidade contra patógenos (KROGER *et al.*, 2002) e os níveis de IRF1 parecem ser críticos para o desenvolvimento de células T no timo e para o crescimento de células B (YAMADA *et al.*, 1991; KROGER *et al.*, 2002). Logo, observa-se que IRF1 está envolvido em muitos pontos da resposta imune e, como consequência, pode afetar a suscetibilidade a diversas doenças infecciosas.

Acredita-se que IRF1 desempenhe um papel na resposta a doenças parasitárias, pois se localiza na região do genoma humano 5q31, que contém um conjunto de genes imunológicos que codificam citocinas e fatores de crescimento. Na infecção pelo *Plasmodium falciparum* observou-se o envolvimento dessa região gênica no controle da carga parasitária e na infecção pelo *Schistosoma mansoni* verificou-se uma relação com a intensidade da infecção (MARQUET *et al.*, 1996; RIHET *et al.*, 1998).

A perda da função de IRF8, por sua vez, pode ser ocasionada por um polimorfismo em nucleotídeo único que pode levar à expressão defeituosa de genes importantes na apresentação de antígenos e na ativação de células T, mas também na resposta a estímulos como receptores de citocinas, receptores de padrão molecular associado a patógenos, fatores do complemento, entre outros (LANGLAIS, BARREIRO, GROS, 2016).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) são uma forma muito comum de variação genética em sequências de DNA e tem uma frequência na população de pelo menos 1%. Neste tipo de variação genética, uma única base nucleotídica é substituída ao longo de uma sequência de DNA. Podem ocorrer tanto em regiões codificadoras e não codificadoras (PASTERNAK, 2005). Não é conhecido ainda como SNP em genes IRFs podem influenciar na resposta contra o *T. cruzi*.

Entre os pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, a progressão da doença está associada com perfis imunológicos distintos. É provável que variações genéticas como polimorfismos em genes de citocinas estejam associadas ao desenvolvimento das diferentes formas da doença de Chagas em humanos (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

Diante do exposto, é necessário o acompanhamento destes pacientes para identificação de polimorfismos em genes de citocinas e verificar quais os papéis desses polimorfismos no desenvolvimento de formas sintomáticas da DC.

### **1.5 Serviço de Atenção farmacêutica aos portadores de doença de Chagas**

Em abril de 2005, foi criado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará, o primeiro projeto de atenção farmacêutica aos pacientes portadores da doença de Chagas, pioneiro no Estado do Ceará (FIGURAS 5 e 6). Este, concebido inicialmente como um projeto, hoje é um serviço de referência no estado do Ceará (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021), sob a coordenação da professora Dra. Maria de Fátima Oliveira que visa promover uma maior segurança na terapia com benznidazol ao paciente portador da doença de Chagas, promover uma atenção mais humanizada a estes pacientes, além de estudar fatores populacionais relacionados à doença (COSTA *et al.*, 2018).

O serviço é realizado pela docente e alunos de graduação e pós-graduação que compõem o Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC). Dessa forma, o serviço atua não somente no tratamento e acompanhamento dos pacientes portadores da doença de Chagas, mas também como ambiente de ensino, pesquisa e extensão inserindo os estudantes no ambiente da pesquisa o mais cedo possível e ensinando a valorizar os seres humanos com um atendimento mais humanizado. O Serviço conta atualmente com mais de 500 pacientes cadastrados e tratados com benznidazol.

Ademais, o serviço realiza suas atividades em parceria com o ambulatório de cardiologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) com o acompanhamento

médico, prescrição e avaliação clínica dos pacientes, além da suspensão do tratamento, quando necessária; o Laboratório de Análises Clínicas do Complexo Hospitalar e o LACT para a realização de exames laboratoriais; o Centro de Estudos em Atenção Farmacêutica (CEATENF) com classificação das reações adversas e a Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA-CE), responsável pelo fornecimento do benznidazol produzido pelo Laboratório farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) na forma de comprimido de 100mg.

Figura 5: Paciente recebendo atendimento farmacêutico no Laboratório de Pesquisa em doença de Chagas da UFC



\*Foto autorizada pelos pacientes.

Fonte: LPDC, 2018.

O serviço faz o seguimento farmacoterapêutico de forma a contemplar todo o tratamento dos pacientes e acompanhamento contínuo após o tratamento, uma vez por ano.

O primeiro atendimento é caracterizado pela apresentação do serviço prestado pelo LPDC ao paciente. Nesse primeiro momento o paciente é informado sobre a DC e seus vários aspectos, incluindo o tratamento e suas possíveis consequências. Após a explicação, se o paciente concordar em participar do serviço, é assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Dessa forma, são preenchidos a Ficha de Seguimento farmacoterapêutico, que contém informações socioeconômicas dos pacientes, assim como os medicamentos por eles utilizados e comorbidades. Posteriormente é dispensado o medicamento para metade do tratamento e entregue a Ficha de Monitoramento de Efeitos Indesejáveis ao BNZ com a devida orientação de como preenchê-la. O paciente também é orientado a trazer de volta a ficha preenchida ou não, para avaliação das reações adversas. Por fim, o paciente é encaminhado à sala de coleta de sangue onde será coletado o sangue para a realização dos exames hematológicos, bioquímicos e sorológicos.

Figura 6: Coleta de sangue para a realização de exames hematológicos, bioquímicos e sorológicos, ao lado verificação de Pressão Arterial e em seguida Verificação de Peso, altura e medida de Circunferência abdominal.



\*Foto autorizada pelos pacientes.

Fonte: LPDC, 2018.

O segundo atendimento é realizado 30 dias após o primeiro, quando o paciente receberá a segunda e última etapa do tratamento. Nesse atendimento o paciente deverá devolver a Ficha de Monitoramento de Efeitos Indesejáveis ao BNZ e receber outra ficha para o monitoramento da segunda etapa do tratamento e aplicação do Questionário Sobre Adesão. Posteriormente, será realizada nova coleta de sangue para a realização dos exames hematológicos, bioquímicos e sorológicos para a avaliação de alterações que podem vir acompanhadas do uso do BNZ.

O terceiro atendimento é realizado 60 dias após o início da terapia, momento em que o tratamento é concluído. Nesta consulta o paciente devolve a Ficha de Monitoramento de Efeitos Indesejáveis ao BNZ entregue no 2º atendimento, e aplicado novamente o Questionário Sobre Adesão e Reações Indesejáveis. O procedimento de coleta de sangue é repetido para a avaliação de alterações que podem vir acompanhadas do uso do BNZ.

O quarto atendimento ocorre 6 meses após o término do tratamento e realiza-se a coleta de sangue para realização dos exames necessários.

A partir do quarto atendimento, o principal objetivo das consultas é a orientação em relação à melhoria de hábitos de vida, controle dos exames de sangue e correto uso de medicamentos, caso os pacientes façam uso de algum.

As consultas farmacêuticas, a partir disto, são realizadas uma vez ao ano com a aplicação da ficha de qualidade de vida do paciente (SF-36) e coletas de sangue para exames necessários.

O trabalho do LPDC é fundamental importância no acompanhamento de portadores da doença de Chagas, visto que nele os pacientes recebem todo seguimento necessário para promoção da saúde e qualidade de vida no que diz respeito à DC, não só em

relação à dispensação do benznidazol, mas na saúde do paciente como um todo, além de priorizar um bom acolhimento, permitindo que o paciente possa se expressar com liberdade, ser ouvido com atenção e de forma que se sinta mais seguro e acolhido diante da realidade da doença. O trabalho do LPDC não é restrito ao uso do BNZ e reações adversas durante o tratamento, mas também acompanhar o paciente por toda sua vida e trabalhar na promoção de sua saúde, e preencher a lacuna que muitas vezes são identificadas nos serviços públicos de saúde.

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados em forma de artigos que visam responder aos objetivos propostos no trabalho e serão publicados em revistas indexadas a fim de dar visibilidade ao assunto e contribuir para a melhoria do tratamento e qualidade de vida dos pacientes.

## 1.6 Relevância e justificativa

O presente estudo buscou estudar a influência (ou interferência) do benznidazol em vários aspectos da saúde do paciente, como o surgimento de reações adversas, relacionadas à concentração plasmática do fármaco ou fatores do próprio paciente; bem como alterações nos níveis de citocina pró-inflamatória e a presença de polimorfismo genético no gene Fator Regulador de Interferon (IRF).

Para tanto, foram abordados aspectos no âmbito da farmacovigilância, na busca por respostas sobre a segurança da farmacoterapia com BNZ, visto que, trata-se de um medicamento com baixa adesão, altas taxas de incidência de RAM que variam de 50% (SOSA-ESTANI, VIOTTI, SEGURA, 2004; VIOTTI *et al.*, 2009) a 98% (PINAZO *et al.*, 2013) e uma considerável taxa de suspensão do tratamento em torno de 20% (PONTES *et al.*, 2010; PINAZO *et al.*, 2010) em pacientes com DC crônica.

O presente estudo tinha a finalidade de conhecer a incidência e características das RAM, realizar intervenções com acompanhamento farmacêutico e médico para melhorar a adesão ao tratamento e auxiliar no manejo adequado das RAM ocasionadas pelo BNZ.

Além disso, analisar a aplicação da dosagem de IFN- $\gamma$  e a frequência de polimorfismo em genes IRFs como predição de risco para o desenvolvimento de RAM ou para o desenvolvimento de formas sintomáticas da DC.

Características populacionais podem ser determinantes de diferentes perfis de reações, e por isso, o conhecimento deste perfil aperfeiçoará a atenção prestada ao paciente com doença de Chagas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a causalidade e gravidade das reações adversas ao Benznidazol e a influência dos níveis séricos do fármaco, do IFN-  $\gamma$  e do polimorfismo genético do fator regulador de interferon (IRF).

### 2.2 Específicos

- Classificar as reações adversas quanto á causalidade e gravidade e alterações laboratoriais decorrentes do tratamento com BNZ.
- Relacionar a concentração de benznidazol no soro de pacientes com as reações adversas ocasionadas pelo mesmo.
- Determinar a relação entre os níveis de IFN-  $\gamma$  com as reações adversas, a forma da doença, níveis séricos de BNZ e a presença de comorbidades.
- Identificar a influência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene Fator Regulador de Interferon (IRF) na resposta mediada por IFN-  $\gamma$  e no perfil de resposta ao tratamento com BNZ.

## ARTIGO I – CAUSALIDADE E GRAVIDADE DAS REAÇÕES ADVERSAS E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS AO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

### CAUSALITY AND SEVERITY OF ADVERSE REACTIONS AND LABORATORY CHANGES TO BENZNIDAZOLE TREATMENT IN PATIENTS WITH CHRONIC CHAGAS DISEASE

#### RESUMO

**Introdução:** A doença de Chagas (DC) representa um grave problema de saúde pública na América Latina. O Benznidazol (BNZ) é utilizado para o tratamento DC, apesar do seu amplo uso, poucas informações estão disponíveis sobre sua toxicidade e mecanismos das reações adversas (RAM). RAM é qualquer resposta prejudicial ou indesejável, não intencional, a um medicamento, que ocorre nas doses usualmente empregadas no ser humano. **Objetivos:** Identificar e classificar as RAM clínicas e laboratoriais ocasionadas pelo uso do BNZ com relação à sua causalidade e gravidade. **Metodologia:** Estudo de coorte prospectivo de pacientes em tratamento com BNZ realizado no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2021. O acompanhamento do tratamento incluiu consultas farmacêuticas e análises laboratoriais antes, 30 dias e 60 dias após o início do tratamento. As RAM foram classificadas quanto à causalidade e gravidade. **Resultados:** Participaram do estudo 40 pacientes com DC crônica, destes 21 (52,5%) do sexo masculino, com média de idade de 54,6 anos, naturais e procedentes de cidades do interior do estado e escolaridade analfabetos/fundamental incompleto. Alta prevalência de RAM com um total de 161 em 30 (90%) pacientes. Destas, 104 (64,6%) foram classificadas como possíveis e 57 (35,4%) como prováveis. A maioria das reações foi classificada em moderadas e leves. Dos 40 pacientes, 9 (22,5%) suspenderam o tratamento. As RAM associadas à interrupção e intervenções foram as que afetaram o sistema dermatológico, sistema nervoso central e periférico ou que culminaram em ageusia. Após 30 dias de tratamento, alterações hematológicas e bioquímicas leves foram observadas como neutrofilia e linfopenia. **Conclusão:** Apesar do elevado percentual de RAM, muitos pacientes foram capazes de completar o tratamento, o que se atribui ao êxito da estratégia de acompanhamento com intervenções de tratamento sintomático juntamente ao aconselhamento, levando a compreensão da sintomatologia e manutenção do tratamento.

**Palavras-chave:** Benznidazol. Efeitos colaterais e Reações adversas relacionados a medicamentos. Exames e Diagnósticos laboratoriais.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chagas disease (CD) still represents a serious public health problem in Latin America. Benznidazole (BNZ) is used for the treatment of CD, despite its wide use, little information is available about its toxicity and mechanisms of adverse drug reactions (ADRs). ADR is any unintended, harmful or undesirable response to a drug that occurs at doses commonly used in humans. **Objectives:** To identify and classify clinical and laboratory adverse drug reactions (ADRs) caused by the use of BNZ in terms of causality and severity. **Methodology:** Prospective cohort study of patients receiving BNZ from January 2018 to December 2021. Treatment follow-up included pharmaceutical consultations and biological analyzes (hemogram, liver and kidney function tests) before, during and after treatment. ADRs were classified according to causality and severity, validated by the Pharmacovigilance Center of Ceará according to the methodology of the World Health Organization. **Results:** Participated in the study 40 patients with chronic CD. A high prevalence of ADR was observed with a total of 161. Among these, 104 (64.6%) were classified as possible and 57 (35.4%) as probable. Most reactions were classified as moderate and mild. Of the 40 patients, 9 (22.5%) discontinued treatment. ADRs associated with interruption and interventions were those that affected the dermatological system, central and peripheral nervous system and sense organs such as ageusia. Mild hematological and biochemical changes such as neutrophilia and lymphopenia were observed after 30 days of treatment. **Conclusion:** Many patients were able to complete the treatment even with ADR, a benefit obtained due to the follow-up strategy with symptomatic treatment interventions together with counseling, aiming at patient safety.

**Keywords:** Benznidazole. Drug-related side effects and adverse reactions. Laboratory tests and diagnostics.

## 1 INTRODUÇÃO

Para o tratamento etiológico da doença de Chagas (DC), existem dois medicamentos, o Nifurtimox e o Benznidazol (BNZ), sendo este último o único fármaco disponível no Brasil (LUQUETTI E SCHMUÑIS, 2010; BRASIL, 2014).

O tratamento na fase aguda deve ser realizado em todos os casos imediatamente após a confirmação parasitológica, independentemente da via de transmissão (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O tratamento na fase crônica, apesar da baixa eficácia, também deve ser instituído nos casos recentes (período de cinco a doze anos da infecção inicial), na fase crônica tardia, (acima de doze anos da infecção inicial), na forma indeterminada e nas formas cardíacas e digestivas leves com objetivo erradicar a infecção, prevenir o aparecimento de lesões nos órgãos ou retardar a evolução das lesões presentes para formas mais graves (PONTES *et al.*, 2010), além de interromper a cadeia de transmissão do parasito (MENEZES *et al.*, 2011; BRASIL, 2014; WHO, 2016).

Tratamento com BNZ deve ser oferecido a todos os adultos entre 19 e 50 anos na fase crônica da doença, apesar da eficácia limitada com taxa de cura variando de 15% a 35% (VIOTTI *et al.* 2006; FABBRO *et al.* 2007). O BNZ é contraindicado nos casos graves de cardiomiopatia chagásica, mulheres em idade fértil sem o uso de contraceptivos, gestantes, insuficiência hepática ou renal, doenças neurológicas e outras doenças que possam ser agravadas pelo uso do fármaco, devido a sua alta toxicidade (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016). Em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana ou aqueles que esperam por um transplante de órgãos é necessário realizar avaliação criteriosa para determinar o tratamento (BERN *et al.*, 2007).

O II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, realizado em 2015, recomenda o tratamento nas fases aguda e crônica, sendo a dosagem indicada de acordo com o peso do paciente; para adultos 5mg/kg/dia, por via oral durante 60 dias em duas ou três tomadas diárias e para crianças 5-10mg/kg/dia por via oral durante 60 dias em duas ou três tomadas diárias. Para pacientes com mais de 60kg, o período de tratamento é estendido até 3 meses, para não exceder a dose máxima diária permitida (300mg/dia) (BRASIL, 2005; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2016).

O BNZ é disponibilizado pelo Ministério da Saúde apenas para centros de referência de tratamento para a rede pública ou para projetos de pesquisa (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007). Em 2005, foi criado o centro de referência em assistência farmacêutica às pessoas com doença de Chagas, a partir de ações realizadas no Laboratório de

Pesquisa em Doença de Chagas da Universidade Federal do Ceará (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021), onde é realizado o monitoramento do tratamento dos pacientes acometidos com a doença no estado do Ceará.

Apesar do amplo uso do BNZ, informações escassas estão disponíveis sobre sua toxicidade e reações adversas, pois grande parte dos estudos abordam apenas os aspectos clínicos (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; SALVADOR *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do BNZ consiste na formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos a partir da redução do grupo nitro presente na estrutura da molécula do fármaco por ação da nitroreductase. Os radicais livres são produzidos através das enzimas de metabolização citocromo P450, sendo as principais a NADPH-citocromo P450 reductase, xantina oxidoreductase e aldeído-oxidase (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

Os radicais livres resultantes do mecanismo de ação do BNZ, podem lesionar as células do hospedeiro, levando ao surgimento de reações adversas a medicamentos (RAM). Efeitos adversos sérios são relatados em adultos tratados com BNZ, incluindo dermatopatia alérgica, manifestações gástricas, neuropatia periférica, neutropenia e leucopenia, ambos por depressão de medula óssea (COLOSIO *et al.*, 2007). Desta forma, o presente estudo buscou avaliar as características sociodemográficas, as reações adversas clínicas e laboratoriais ocasionadas pelo uso do BNZ e classificá-las com relação à sua causalidade e gravidade.

## **2 METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo de pacientes com DC crônica em tratamento com BNZ no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC) da Universidade Federal do Ceará no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2021.

Foram incluídos no estudo pacientes com idade igual ou superior a 18 anos que chegaram ao LPDC com diagnóstico confirmado para doença de Chagas (exames sorológicos reagentes por duas metodologias diferentes) e com prescrição de BNZ. Foram excluídos aqueles pacientes com tratamento prévio para a DC, gestantes, imunossupressão de qualquer tipo, comorbidades como doenças hepáticas ou renais e pacientes que não compareceram a pelo menos uma consulta farmacêutica durante o tratamento.

## 2.1 Pacientes e procedimentos

Os pacientes, ao chegarem ao LPDC, foram convidados a participar da pesquisa e, quando de acordo, assinaram um termo de consentimento.

O esquema terapêutico com o benznidazol foi realizado de acordo com o preconizado pelo II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS *et al*, 2016). O acompanhamento do tratamento e avaliação das reações adversas foram realizados na metade e no final do tratamento, em média de 30 e 60 dias após o início do tratamento.

O acompanhamento do tratamento incluiu avaliação clínica (sinais e sintomas) e análises biológicas (Hemograma, Testes de função hepática e renal) antes do tratamento, 30 dias e 60 dias, em média, após o início do tratamento. O BNZ foi fornecido ao LPDC pela Secretaria de Saúde do estado do Ceará.

Como parte do protocolo de acompanhamento farmacêutico, cada paciente era interrogado sobre o aparecimento de reações adversas a partir do segundo atendimento (em média 30 dias após o início do tratamento) e documentado em formulários específicos para reações adversas a medicamentos. Estes formulários foram elaborados pelos farmacêuticos do serviço para notificar os resultados dos exames laboratoriais e a presença de sinais e sintomas clínicos.

Durante todo o tratamento, além do acompanhamento farmacêutico do LPDC, os pacientes receberam acompanhamento médico pelo ambulatório de Cardiologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. Ao ser identificada uma RAM, profissionais do LPDC encaminhavam o paciente ao médico prescritor para as devidas intervenções. Reações adversas específicas foram tratadas clinicamente de acordo com sua gravidade; os eventos leves e moderados foram tratados inicialmente com medicamentos de acordo com os sintomas específicos (analgésicos para cefaleia, inibidores da bomba de prótons para dispepsia, anti-histamínicos e corticoides para alergias). Em alguns casos, o esquema de tratamento foi continuado em paralelo com os medicamentos para os sintomas das reações adversas, e em outros casos a terapia com BNZ foi suspensa temporariamente ou definitivamente. A suspensão temporária do BNZ foi implementada por 10 dias durante o manejo das reações.

## 2.2 Classificação das reações adversas

As reações adversas foram classificadas quanto à causalidade (definida, provável, possível, condicional e não relacionada) e quanto à gravidade (leve, moderada, grave e fatal) e

validadas pelo Centro de Farmacovigilância do Ceará (CEFACE) de acordo com metodologia da Organização Mundial de Saúde (WHO), utilizada pelo centro (QUADRO 1) (FONTELES *et al.*, 2009). Todas as reações foram classificadas apenas em relação ao BNZ.

Quadro 1 – Classificação das reações adversas quanto à causalidade e quanto á gravidade de acordo com metodologia da Organização Mundial de Saúde (WHO)

<b>CAUSALIDADE</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>
Definida	Um evento clínico relacionado a infusão e/ou reexposição.
Provável	Um evento clínico que ocorre onde somente um medicamento pode ser envolvido.
Possível	Um evento clínico que ocorre onde dois ou mais medicamentos podem ser envolvidos, ou ainda se pode inferir relação com a doença.
Condicional	Um evento clínico em que os dados são parcialmente incompletos ou insuficientes.
Não relacionada	Um evento clínico em que não existe uma ligação direta entre a reação adversa e o medicamento, no caso o benznidazol. Assim, estas reações podem estar relacionadas a outros medicamentos, porém são não relacionadas para a causalidade com o benznidazol.
<b>GRAVIDADE</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>
Leve	Reação de pequena importância clínica e de curta duração, podendo requerer tratamento, não afetando substancialmente a vida do paciente.
Moderada	Reação que altera as atividades usuais do paciente, resultando em incapacidade transitória sem sequelas. Necessita de intervenção.
Grave	Reação que ameaça diretamente a vida do paciente, provoca hospitalização e pode causar sequelas permanentes.
Fatal	Reação que resulta em óbito.

Fonte: Organização Mundial de Saúde (WHO).

### 2.3 Acompanhamento laboratorial

Os exames bioquímicos foram realizados para avaliar a função renal (creatinina e ureia) e hepática (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST); além de exames hematológicos (hemograma), em todos os participantes antes, durante (30 dias) e após o tratamento (60 dias). Os exames foram realizados pelo Laboratórios de Análises Clínicas do Hospital Universitário Walter Cantídio e adotados os valores de referência do fornecedor de cada kit de análise para cada parâmetro analisado (QUADRO 2).

Quadro 2 - Valores de referência dos parâmetros hematológicos e bioquímicos pré-estabelecidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Walter Cantídio.

<b>Exame</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>Eritrograma</b>	
Hemácias (/mm <sup>3</sup> )	4,5 a 6,5 (Masculino) 4,0 a 5,5 (Feminino)
Hemoglobina (g/dL)	13,5 a 18 (Masculino) 12 a 16 (Feminino)
Hematócrito (%)	40,0 a 54,0 (Masculino) 36,0 a 45,0 (Feminino)
VCM (fL)	80 a 96
HCM (pg)	27 a 32
CHCM (g/dL)	32 a 36
<b>Leucograma</b>	
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	4.000 a 11.000
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> ) / (%)	1.600 a 7.500 / 40 a 80
Linfócitos (/mm <sup>3</sup> ) / (%)	800 a 4.500 / 20 a 40
Monócitos (/mm <sup>3</sup> ) / (%)	80 a 1.000 / 2 a 10
Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> ) / (%)	40 a 600 / 1 a 6
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	150.000 a 500.000
<b>Parâmetros de função hepática</b>	
AST (U/L)	< 38 (Masculino) <32(Feminino)
ALT (U/L)	< 41 (Masculino) <31(Feminino)
<b>Parâmetros de função renal</b>	
Ureia (mg/dL)	10 a 50
Creatinina (mg/dL)	0,7 a 1,3 (Masculino) 0,6 a 1,1 (Feminino)

Fonte: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Walter Cantídio.

## 2.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Office Excel 2016 e analisados utilizando o programa *Graphpad Prism* versão 6.0. A análise descritiva foi realizada por meio da média  $\pm$  desvio padrão. O teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado foram aplicados para determinar a associação entre as variáveis categóricas com a ocorrência de reações adversas. Para a comparação entre os três momentos da coleta de sangue utilizaram-se os testes ANOVA com pós-teste de Tukey, para avaliação dos resultados laboratoriais. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 2.5 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa que envolve Seres Humanos CEP/ Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), de acordo Resolução nº 466/12 do conselho Nacional de Saúde – CNS do Ministério da Saúde, sob parecer de número 3.284.027.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Características sócio demográficas da população estudada

De janeiro de 2018 a dezembro de 2021 foram atendidos 47 pacientes com doença de Chagas crônica, porém 7 pacientes foram excluídos do referido estudo devido aos critérios de exclusão. Logo, o presente estudo avaliou 40 pacientes, destes 21 (52,5%) eram do sexo masculino e 19 (47,5%) do sexo feminino com média de idade de 54,6 anos (TABELA 1).

Com base na idade média dos pacientes suspeita-se que esses indivíduos estão na fase crônica da doença (CARVALHO *et al.*, 2015). Porém, observamos alguns pacientes com menos de 40 anos de idade ( $n=5$ , 12,5%) o que pode indicar transmissão ativa da DC em alguns municípios, pois ainda há captura de elevado número de triatomíneos, inclusive infetados com *T. cruzi* (FIDALGO *et al.*, 2018).

Quanto à escolaridade, 22 (55%) pacientes eram analfabetos/fundamental incompleto (TABELA 1). Muitos estudos relatam esse mesmo perfil entre os indivíduos portadores da doença de Chagas (ALVES *et al.*, 2009; SOUSA JÚNIOR, *et al.* 2017; COSTA *et al.*, 2018; MIZOGUTI *et al.* 2018). Acredita-se que, em geral, os pacientes com DC têm poucas oportunidades sociais, salários baixos e pouca instrução, mostrando que a DC é uma das

doenças parasitárias que está relacionada com o aspecto socioeconômico da população (WHO, 2002; ALVES *et al.*, 2009). Corrobora com este achado, elevado percentual (80%) de pacientes que nasceram e cresceram em cidades interioranas, onde se tem em toda a América Latina, incluindo o Brasil, oportunidades sociais profundamente escassas, além de baixas condições de moradia, (DIAS; BORGES DIAS, 1979; DIAS, 1999; COSTA *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2020).

Tabela 1- Características sociodemográficas de 40 pacientes com doença de Chagas crônica que realizaram o tratamento com BNZ no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2021.

<b>Variáveis</b>	<b>Categorias</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	21	52,5
	Feminino	19	47,5
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>
<b>Idade</b>	34 – 49 Anos	13	32,5
	50 – 65 Anos	22	55,0
	Acima de 65 anos	5	12,5
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>
<b>Escolaridade</b>	Analfabeto	5	12,5
	Fundamental incompleto	17	42,5
	Fundamental completo	4	10,0
	Médio incompleto	1	2,5
	Médio completo	10	25,0
	Superior completo	3	7,5
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>
<b>Ocupação</b>	Aposentado	14	35,0
	Agricultor	3	7,5
	Dona de casa	3	7,5
	Desempregado	4	10,0
	Autônomo	3	7,5
	Outros	13	32,5
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>

	Cidades do interior do Estado Ceará	32	80,0
<b>Naturalidade</b>	Outros Estados brasileiros	8	20,0
	Fortaleza	0	0
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>
	Cidades do interior do Estado Ceará	29	72,5
<b>Procedência</b>	Fortaleza	8	20,0
	Região metropolitana de Fortaleza	3	7,5
	<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>

Muitos pacientes nasceram (n=32, 80,0%) e continuam morando em cidades do interior do Ceará (n=29, 72,5%), em maior destaque Quixeré, Limoeiro do Norte e Russas. Freitas *et al* (2015) e Freitas *et al* (2017) demonstraram em seus estudos que o município de Limoeiro do Norte é um dos locais com maior prevalência da DC no estado do Ceará com taxa de soroprevalência de 2,6% (4/154) e 4,2% (34/812), respectivamente, para anticorpo anti-*T.cruzi* por dois testes sorológicos.

Segundo Fidalgo *et al* (2018) essa região possui grande risco de transmissão vetorial para a DC, tendo em vista o alto índice de infestação por triatomíneos. Os autores também detectaram que Limoeiro do Norte apresentou o maior número de espécimes infectadas (n = 205), indicando uma taxa de infecção de 5,3%.

O Boletim epidemiológico publicado em janeiro de 2021 mostrou que os municípios da região do Sertão dos Inhamuns (Crateús e Tauá), Baixo Jaguaribe (Jaguaruana, Limoeiro do Norte e Russas) e Centro-Sul (Icó) concentraram o maior número de pessoas infectadas com *T. cruzi*. A prevalência de amostras reagentes para doença de Chagas na fase crônica da doença no estado do Ceará variou de 3,2% em 2015 a 2,4% em 2019. Entre esses anos, observou-se uma variação no número de amostras processadas. A partir de 2018, houve um aumento no número de amostras, como reflexo das atividades de vigilância epidemiológica desenvolvidas no estado com busca ativa de possíveis portadores da infecção pelo *T. cruzi* em habitantes cujas casas tiveram triatomíneos infectados (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021).

Alguns pacientes faziam uso de outros medicamentos antes de iniciar o tratamento com BNZ, os quais foram mantidos em concomitância com BNZ, incluindo para hipertensão arterial sistêmica (n=13), arritmia cardíacas (n=3), dislipidemia (n=6), diabetes (n=2), entre

outros.

Medicamentos para o sistema cardiovascular foram os mais comumente utilizados durante o tratamento com BNZ (n=45; 47,4%), seguido de medicamentos para o aparelho digestivo e metabolismo (n=17; 17,9%) (TABELA 2). Observamos uma média de 2,5 medicamentos por paciente.

Podemos observar que a DC está associada com comorbidades do sistema cardiovascular como hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca, distúrbios no ritmo cardíaco; comorbidades associadas ao aparelho digestivo e metabolismo como distúrbios do trato gastrointestinal, hiperglicemia/diabetes, hipercolesterolemia; entre outras. Essas comorbidades podem estar relacionadas ao processo de envelhecimento dos pacientes, visto que 14 (35%) tinham idade maior que 60 anos ou atribuídas à fisiopatologia da tripanossomíase (ALMEIDA *et al.*, 2007). É provável que hipertensão arterial se manifeste com o avançar da idade independentemente da evolução da DC, porém, mais estudos são necessários para esclarecer melhor essa associação.

Rojas *et al.* (2018) verificaram em seu estudo que indivíduos com DC, em comparação com participantes sem DC, têm prevalência quase três vezes maior de alterações no eletrocardiograma (ECG) como bloqueio completo do ramo direito e bloqueio fascicular anterior esquerdo, bloqueio atrioventricular de primeiro grau, fibrilação atrial combinada e a combinação de bloqueio completo do ramo direito e bloqueio fascicular anterior esquerdo.

A etiologia das alterações cardíacas em pacientes com DC ainda não está totalmente esclarecida, mas vários mecanismos foram propostos. As alterações cardíacas são caracterizadas pelo desenvolvimento de um infiltrado celular difuso, alterações da microcirculação que levam à fibrose. As evidências sugerem que a presença do parasito no coração desencadeia uma resposta imunitária específica e que pelo menos algumas das células que constituem o infiltrado são específicas do parasito. A persistência do *Trypanosoma cruzi* pode iniciar o dano às células endoteliais vasculares ou levar ao dano da microvasculatura por meio de seus efeitos no infiltrado inflamatório, bem como em vários lipídios bioativos, como o tromboxano A e a prostaglandina F<sub>2α</sub>, potentes vasoconstritores (BONNEY E ENGMAN, 2008). Além disso, a infecção por *T. cruzi* também prejudica a inervação parassimpática, predispondo à hiperativação simpática, que pode levar a mais danos cardíacos e arritmogênese (DÁVILA *et al.*, 2002; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Tabela 2- Classificação Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) dos medicamentos utilizados pelos 40 pacientes com doença de Chagas crônica em tratamento com BNZ no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2021.

<b>Classificação ATC</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Medicamentos utilizados</b>
<b>Fármacos hormonais sistêmicos, com exclusão de hormônios sexuais</b>	4	4,2	Hipotireoidismo	Levotiroxina sódica
<b>Anti-infecciosos de uso sistêmico</b>	7	7,4	- Infecções cutâneas pelo vírus <i>Herpes</i> ; - Infecções bacterianas; - Anti-retrovirais.	Aciclovir; Amoxicilina, Abacavir, lamivudina, atazanavir, ritonavir, dolutegravir
<b>Aparelho digestivo e metabolismo</b>	17	17,9	- Distúrbios do trato gastrointestinal;  - Hiperglicemia/ Diabetes;  - Hipercolesterolemia.	Dexlansoprazol, Omeprazol, Domperidona, Pantoprazol, Complexo homeopático Almeida Prado 46; Cloridrato de metformina, Gliclazida; Fosfato de sitagliptina monoidratado; Sinvastatina, Atorvastatina
<b>Sistema Cardiovascular</b>	45	47,4	- Hipertensão, - Angina do peito, - Insuficiência cardíaca, - Distúrbios no ritmo cardíaco	Losartana potássica, Captopril, Maleato de enalapril, Espironolactona, Furosemida, Valsartana, Clortalidona, Hidroclorotiazida, Olmesartana medoxomila, Besilato de anlodipino, Carvedilol, Nifedipino, Cloridrato de propranolol, Succinato de metoprolol, Hemifumarato de bisoprolol, Cloridrato de amiodarona
<b>Sistema Nervoso</b>	14	14,7	- Epilepsia, episódios de mania, distúrbio de humor bipolar e depressão, ansiedade, Distúrbios convulsivos, transtorno do pânico e transtorno de ansiedade generalizada; - Estados de dor, de inflamação e de febre.	Carbamazepina, Clonazepam, Diazepam, Amitriptilina, Alprazolam, Cloridrato de trazodona, Fenobarbital, Escitalopram;  - Dipirona; diclofenaco dietilamônio.

<b>Sangue e órgãos hematopoiéticos</b>	6	6,3	- Prevenção secundárias dos eventos aterotrombóticos; - Anemia por deficiência de ferro	Clopidogrel, Ácido acetilsalicílico;  Sulfato ferroso, Hidróxido de Ferro III.
<b>Órgãos dos sentidos</b>	1	1,1	Glaucoma	Maleato de timolol
<b>Sistema Músculo-Esquelético</b>	1	1,1	Reumatismo	Cafeína, carisoprodo, diclofenaco de sódio e paracetamol
<b>Total</b>	<b>95*</b>	<b>100</b>		

\*2,5 medicamentos por paciente.

### 3.2 Frequência das reações adversas ao benznidazol de acordo com os sistemas ou órgãos

No total, 40 pacientes foram tratados com BNZ, destes 4 (10%) suspenderam temporariamente o tratamento, mas conseguiram concluir utilizando medicamentos para o manejo das RAM como corticoides (prednisona) e anti-histamínicos (loratadina ou dicloridrato de hidroxizine) e 5 (12,5%) pacientes não completaram o tratamento com interrupção definitiva, totalizando 87,5% pacientes que completaram o tratamento prescrito.

Dos 40 pacientes tratados, 30 (90%) apresentaram pelo menos uma reação adversa. A dose total de BNZ foi de 300 mg/dia e a duração do tratamento dos pacientes que concluíram variou de 40 a 90 dias (média 67,7). A duração do tratamento dos pacientes que suspenderam em definitivo variou de 7 a 70 dias. Todas as RAMs desapareceram após a descontinuação do tratamento. E 10 (25%) pacientes não apresentaram RAM durante todo o tratamento.

As reações adversas mais frequentes foram as relacionadas aos sistemas dermatológico como prurido (n=17; 40,5%), descamação da pele (n=9; 21,4%) e manchas vermelhas/erupções cutâneas (n=8; 19%); além de alterações gastrointestinais como dor abdominal (n=11; 29,7%), náuseas/enjoo (n=7; 18,9%) e aumento do apetite (n=7; 18,9%). Outro sistema afetado pelo uso do BNZ foi o sistema central e periférico correspondendo a 11,2% (n=18) das reações adversas encontradas (QUADRO 3).

No presente estudo, o perfil de reações por intolerância ao BNZ foi semelhante ao relatado em outros estudos observacionais focados na segurança e tolerância do benznidazol no tratamento de pacientes com doença de Chagas. Gotijo *et al.* (2020), com 62 pacientes

mostrou uma prevalência de RAM de 66,1% (n=41) e as reações mais apresentadas foram reações dermatológicas como prurido e reações gastrointestinais como náusea e dor abdominal. Segundo Salvador *et al.* (2015), a reação cutânea associada ao benznidazol é uma reação adversa medicamentosa compatível com uma reação de hipersensibilidade não mediada por IgE (retardada). Segundo estes autores, a reação cutânea relacionada ao BNZ é uma reação mediada por células T com uma resposta Th2 produzindo IL-5, com aumento de IL-10. A IL-10 desempenha um papel de modulação da síntese de IL-12 e INF- $\gamma$ , evitando uma excessiva resposta imune que poderia causar inflamação extensiva e dano aos tecidos do hospedeiro, além de diminuir o desenvolvimento de respostas imunes mediadas por Th2.

Quadro 3 – Frequência das RAMs de 40 pacientes com doença de Chagas crônica relacionadas ao benznidazol durante todo o período de tratamento - LPDC/Fortaleza - janeiro/2018 a dezembro/2021 de acordo com sistemas e órgãos.

Sistema ou órgão	Frequência absoluta	%	Sintomas/Alteração	Frequência	
				n	%
<b>Dermatológico</b>	42	<b>26,1</b>	Manchas vermelhas/ erupções cutâneas	8	19,0
			Manchas roxas	2	4,8
			Prurido	17	40,5
			Pele seca	2	4,8
			Erupções bolhosas	2	4,8
			Hiperemia nas extremidades	1	2,4
			Ardência e queimação na pele	1	2,4
			Descamação da pele	9	21,4
<b>Gastrointestinal</b>	37	<b>23,0</b>	Azia	3	8,1
			Náuseas/enjoos	7	18,9
			Aumento do Apetite	7	18,9
			Dor abdominal	11	29,7
			Dor abdominal + diarreia	4	10,8
			Diarreia	2	5,4
			Vômitos	3	8,1
<b>Estado Geral</b>	23	<b>14,3</b>	Cefaleia	13	56,5
			Algia (dor) nos membros	6	26,1

			Febre	4	17,4
<b>Musculoesquelético</b>	16	<b>9,9</b>	Astenia	11	68,8
			Artralgia	5	31,3
<b>Nervoso central e periférico</b>	18	<b>11,2</b>	Parestesia	10	55,6
			Tontura/Vertigem	8	44,4
<b>Nervoso Autônomo</b>	10	<b>6,2</b>	Perda de apetite	10	100,0
<b>Cardiovascular</b>	8	<b>5,0</b>	Edema nas extremidades/facial	8	100,0
<b>Órgãos dos sentidos</b>	7	<b>4,3</b>	Ageusia	7	100,0
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>100</b>	Total	<b>161</b>	

Silva *et al.* (2017) encontraram uma incidência de RAM de 56,1%, inferior a encontrada em nosso estudo e as RAM que exigiram a interrupção permanente do tratamento com BNZ foram as dermatoses, 148 (7,1%); distúrbios gastrointestinais, 14 (0,7%); e distúrbios do sistema nervoso, 28 (1,3%). Gotijo *et al.* (2020), por sua vez, observaram em sua população de estudo uma prevalência de reações adversas ao BNZ de 66,1% (n=41), sendo as reações dermatológicas predominantes, manifestando-se em 18 (81,8%) dos 22 (53,6%) pacientes que descontinuaram o tratamento. Os pacientes também fizeram uso de corticoides e anti-histamínicos para a resolução das reações dermatológicas.

Diante desses resultados, parece que os corticoides seriam uma opção para o manejo dessa reação adversa; no entanto, poucos relatos de experiência estão disponíveis sobre a eficácia dos esteroides para prevenir ou conter reações cutâneas devido ao BNZ. Dos 9 (22,5%) pacientes que tiveram o tratamento suspenso, sete deles (77,8%) fizeram uso de corticoide (prednisona ou prednisolona) por 5 dias para a resolução da reação adversa cutânea (GÁRGOLAS *et al.*, 2013).

Das reações adversas ocasionadas pelo BNZ no sistema nervoso central e periférico destaca-se a parestesia representando 55,6% (n=10) dessas reações (QUADRO 3). Esse resultado chama a atenção, pois, trata-se de uma reação que pode ser irreversível. A parestesia é um sintoma caracterizado pela sensação de dormência ou formigamento em alguma parte do corpo. Pode acometer os membros como braços, pernas, mãos, como também em áreas menos comuns, como a boca. No caso do tratamento com BNZ, as partes mais

acometidas foram os membros superiores (mãos e braços) ou membros inferiores (pernas e pés). Esse tipo de reação deve ser identificado o quanto antes para iniciar o protocolo de suspensão do tratamento e iniciar o tratamento sintomático com medicamentos anticonvulsivantes (BERAN, 2015). No presente estudo, os casos de parestesia foram reversíveis seguindo as recomendações do II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2016).

A ageusia (perda do paladar) foi observada em 4,3% (n=7) dos pacientes (QUADRO 3), porém, apenas 3 pacientes relataram essa reação na primeira etapa do tratamento, em que foi possível realizar a intervenção da interrupção do tratamento com BNZ. O restante relatou a reação após conclusão do tratamento. Nos 6 pacientes a falta de paladar foi revertida após a interrupção definitiva ou término do tratamento. Segundo o II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2015), pacientes que apresentem ageusia durante o tratamento deve suspender imediatamente o BNZ (DIAS *et al.*, 2016).

A olfação e a gustação apresentam anatomia e fisiologia complexas, ainda não totalmente conhecidas. A importância do paladar reside no fato de que ele permite a um indivíduo selecionar substâncias específicas de acordo com as suas vontades e de acordo com as necessidades metabólicas. Os medicamentos costumam afetar mais a gustação que a olfação (PALHETA NETO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016).

O paladar pode ser afetado em casos de lesões do nervo facial proximal à saída da corda timpânica. Muitas ideias simples podem ser sugeridas a pacientes com alterações de gosto. A mastigação de goma ou de gelo pode atuar como uma ajuda temporária na hipogeusia. Os pacientes devem ser encorajados a mastigar seus alimentos muito bem, alterando os lados de sua boca ou então os seus alimentos (BURKERT *et al.*, 2005). A importância da olfação e a gustação são vitais e sua perda traz graves consequências na qualidade de vida, bem como pode representar risco à saúde do indivíduo (PALHETA NETO *et al.*, 2011).

Os achados encontrados no presente estudo mostram que o BNZ induz alta incidência de reações adversas (90%; n=30), o que muitas vezes representa uma barreira para o seu uso. O perfil de reação cutânea durante o tratamento foi semelhante ao relatado em outros estudos observacionais focados na segurança e tolerância do BNZ no tratamento da doença de Chagas como o estudo de Silva *et al.* (2017), no qual, as RAM que exigiram a interrupção permanente do tratamento com BNZ foram as dermatoses, 148 (7,1%); distúrbios gastrointestinais, 14 (0,7%); e distúrbios do sistema nervoso, 28 (1,3%), mas com uma incidência de RAM de 56,1%, incidência esta inferior a encontrada no presente estudo.

Gotijo *et al.* (2020) observaram em sua população de estudo uma prevalência de

reações adversas ao BNZ de 66,1% (n=41), sendo as reações dermatológicas predominante, manifestando-se em 18 (81,8%) dos 22 (53,6%) pacientes que descontinuaram o tratamento. Os pacientes também fizeram uso de corticoides e anti-histamínicos para a resolução das reações dermatológicas.

As principais reações responsáveis pela suspensão temporária do BNZ foram reações relacionadas ao sistema dermatológico (descamação da pele, prurido, erupções bolhosas); relacionadas ao sistema cardiovascular como edema de membros superiores e/ou inferiores. E as reações responsáveis pela interrupção definitiva do tratamento foram relacionadas ao sistema nervoso central e periférico como a parestesia e relacionada aos órgãos do sentido como a ageusia.

Quando observamos na literatura as reações adversas provocadas pelo Nifurtimox, o BNZ parece ser uma melhor alternativa ao tratamento, pois o Nifurtimox apresenta uma menor tolerância digestiva, refletida na anorexia com perda de peso e distúrbios psíquicos, logo, o BNZ tornou-se a primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas (BRASIL, 2005). No Brasil, o Nifurtimox somente é utilizado nos casos de intolerância ao BNZ (DIAS *et al.*, 2016).

Com relação essa distinção entre homens e mulheres no desenvolvimento de reações adversas ao BNZ, devemos considerar alguns fatores como diferenças entre os organismos femininos e masculinos que podem afetar todo o processo farmacocinético dos fármacos, tanto anatômico como fisiológicos. As mulheres possuem maior gordura corporal, o que pode afetar a distribuição e armazenamento de drogas lipofílicas, levando a um aumento do seu volume de distribuição e tempo de meia-vida. O contrário é válido para fármacos hidrofílicos. As mulheres ainda apresentam diferente capacidade de filtração glomerular, bem como esvaziamento gástrico, fatores que podem afetar a eliminação e a absorção de fármacos, respectivamente (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A variável sexo não foi significativa (0,0692), mas as mulheres mostraram uma tendência maior de desenvolver RAM durante o tratamento com BNZ em comparação com os homens (TABELA 3). Esse resultado não foi significativo ( $p < 0,05$ ), provavelmente, devido ao tamanho da amostra, é provável, que em uma amostra maior seria possível observar melhor essa diferença.

Estudo realizado por Molina *et al.* (2017) avaliou a farmacocinética do BNZ em adultos saudáveis e verificou que os homens apresentaram uma concentração plasmática máxima menor que as mulheres, além disso, apresentaram volume médio de distribuição em função da biodisponibilidade maior que o sexo feminino, justificaram esse resultado com base

nas variações do pH gástrico, taxa de esvaziamento gástrico, tempo de trânsito intestinal, expressão intestinal de proteínas de transporte e a composição corporal.

Tabela 3 - Relação entre a presença de reações adversas relacionadas ao tratamento com benznidazol, características basais (sexo e idade) de 40 pacientes com doença de Chagas e eventos (interrupção do tratamento) em janeiro/2018 a dezembro/2021.

VARIÁVEL	CATEGORIA	REAÇÃO ADVERSA		p-valor*	OR
		Sim	Não		
Sexo	Feminino	17	2	0,0692	-
	Masculino	13	8		
Idade	18-50 anos	10	3	1,0000	-
	>50 anos	20	7		
Interrupção do tratamento	Sim	9	0	0,0428	10,76
	Não	21	10		

\*Teste Exato de Fisher  
OR: Odds ratio

Além disso, o metabolismo hepático feminino também difere com relação ao masculino, como por exemplo, uma maior atividade da enzima CYP3A4, principal metabolizador de fármacos do nosso organismo (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Por tanto, apesar de não ter sido observada uma relação significativa, foi coerente encontrar uma maior frequência de reações adversas nas mulheres, mesmo não sendo conhecido o mecanismo exato dessa maior predisposição.

Observou-se que a presença de reações adversas está relacionada com a interrupção do tratamento ( $p=0,0428$ ), ou seja, os pacientes apenas interrompem o tratamento com BNZ devido a presença de RAM. Com relação a idade, verificou-se que não existe uma relação entre a idade do paciente e o aparecimento de RAM ( $p=1,0000$ ).

### 3.3 Causalidade e Gravidade das Reações Adversas

Ao total foram identificadas 161 reações adversas durante o tratamento com o BNZ. Essas reações foram classificadas quanto à causalidade em definida, provável, possível,

condicional e não relacionada, utilizando o algoritmo de Naranjo para pontuar as reações e, então classificá-las. Os resultados também foram classificados quanto à gravidade (leve, moderada, grave e fatal) de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

De acordo com o algoritmo de Naranjo, encontramos 104 (64,6%) RAM classificadas como possíveis de terem sido ocasionadas pelo BNZ e 57 (35,4%) como prováveis de terem sido ocasionadas pelo BNZ (TABELA 4). Não foram observadas RAM do tipo definida, condicional e não relacionada.

No estudo de Oliveira *et al.* (2017) foi observada uma maior quantidade de reações classificadas como definidas (26,7%; n=193), mas muitas reações foram classificadas em prováveis (25,1%; n=180) e possíveis (24,3%; n=174). O estudo de Gotijo *et al.* (2020) também encontrou uma alta prevalência de reações prováveis (80,9%; n=85).

No presente estudo 54% (n=87) das RAM foram classificadas em moderadas (TABELA 4), podendo resultar em incapacidade transitória sem sequelas e necessitando de intervenção (administração de medicamentos e suspensão do tratamento). Silva *et al.* (2017), classificaram as RAM encontradas em seu estudo como leves e moderadas 900 (43,4%) e 263 (12,7%) respectivamente, diferindo dos nossos resultados. Não foi observada nenhuma RAM grave ou fatal. Apesar do alto índice de RAM relacionadas ao tratamento com benznidazol, este dado é amenizado pela predominância de reações consideradas moderadas (54%; n=87) e leves (46%; n=74), dessa forma, podemos considerar que o BNZ é um medicamento seguro para o tratamento da DC, salvo os casos em que o BNZ não é indicado (MORILLO *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2016).

As RAM leves e moderadas foram tratadas primeiramente com medicamentos de acordo com os sintomas específicos (analgésicos para cefaleia, inibidores da bomba de prótons para dispepsia, anti-H2 para alergias) (TABELA 2).

Pacientes com RAM leve ou moderada foram encorajados a reiniciar o tratamento com benznidazol após 10 dias de suspensão do medicamento para o tratamento sintomático de RAM. Pacientes que tiveram o tratamento suspenso devido a reações dermatológicas (12,5%; n=5), foram submetidos ao tratamento sintomático com corticoide e anti-histamínicos e após 10 dias retomaram o tratamento com BNZ associado com anti-histamínico até o final do tratamento. Dessa forma, 60% (n=3) dos que suspenderam o medicamento devido reações dermatológicas conseguiram concluir o tratamento. Logo, a suspensão do BNZ por 10 dias e a retomada do tratamento associado com anti-histamínicos parece ser uma boa alternativa para a conclusão do tratamento da doença de Chagas na presença de reações adversas dermatológicas.

Tabela 4 – Classificação das 161 reações adversas ao benznidazol por causalidade e gravidade em 40 pacientes com doença de Chagas que realizaram o tratamento no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC) entre janeiro de 2018 e dezembro de 2021.

PERFIL DA REAÇÃO	FREQUÊNCIA	
	n	%
<b>Causalidade</b>		
Provável	57	35,4
Possível	104	64,6
Definida	0	0
Condicional	0	0
Não relacionada	0	0
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>100</b>
<b>Intensidade</b>		
Leve	74	46,0%
Moderada	87	54,0%
Grave	0	0
Fatal	0	0
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>100</b>

Estudo realizado por Oliveira *et al.* (2017) encontraram alta frequência de RAM durante a administração de BNZ (91,5%), porém, como vimos também em nossa pesquisa, a maioria das RAM foi considerada leve e apenas 23,2% dos casos necessitaram de interrupção definitiva do tratamento.

Os casos de RAM que exigiram a interrupção permanente do tratamento com BNZ foram classificados em leves como prurido e vômito; moderadas como manchas vermelhas/erupções cutâneas, descamação da pele, parestesia, ageusia e edema nas extremidades/facial.

Diante da alta frequência reações adversas, o sucesso da adesão ao BNZ deve-se a importância de um acompanhamento médico e farmacêutico durante todo o tratamento. O acompanhamento farmacêutico realizado pelo Laboratório de Pesquisa em doença de Chagas da UFC pode detectar ou prevenir reações adversas graves ao tratamento com BNZ (COSTA *et al.*, 2018) e isso pode justificar o fato de não terem sido observadas, nesse estudo, reações adversas graves ou fatais.

### 3.4 Alterações laboratoriais devido ao uso do Benznidazol

Cuidados devem ser tomados antes e durante o tratamento com BNZ na monitorização das reações adversas. Antes de se iniciar o tratamento, foram realizados exames clínicos e laboratoriais (hemograma, avaliação de enzimas hepáticas e testes de função renal). Esta conduta deve ser repetida no 30º e 60º dias do início do tratamento (BRASIL, 2005). Na tabela 5 observou-se os dados dos parâmetros laboratoriais representados por média  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados laboratoriais durante o seguimento mostraram casos de alterações hematológicas e alterações bioquímicas leves. Usando o teste ANOVA foi verificado que ocorreu neutrofilia ( $p < 0,05$ ), por aumento de segmentados ( $p < 0,05$ ) e linfopenia ( $p < 0,05$ ), após 30 dias de tratamento com o BNZ (TABELA 5). Estudo realizado por Pinazo *et al.*, (2013) também observaram linfopenia com um caso de linfopenia grave no início do tratamento. Em ambos os casos, os sintomas foram bem controlados e os valores laboratoriais voltaram ao normal quando o benznidazol foi retirado.

O tratamento com BNZ não é recomendado aos pacientes que possuem insuficiência hepática ou renal (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016), pois seu principal mecanismo metabólico é mediado pelo complexo enzimático do citocromo P450. O mecanismo de ação do BNZ, por processos enzimáticos mediados pelo citocromo P450 geram compostos que resultam em radicais livres de oxigênio e nitrogênio responsáveis pela toxicidade não só ao parasito, mas também, em menor grau, às células hospedeiras, causando reações adversas como a elevação das enzimas hepáticas (PAVAN *et al.*, 2018).

A biotransformação do fármaco ocorre no tecido hepático, com posterior eliminação pelos rins (MOLINA *et al.*, 2015). Em pacientes com função hepática e renal normais, recomenda-se a realização das taxas séricas de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) para acompanhamento da função hepática, e ureia e creatinina séricas para acompanhamento da função renal (DIAS *et al.*, 2016).

As enzimas estavam elevadas na seguinte ordem de frequência: AST 8 casos (20%), com valores variando de 39 U/L a 355 U/L; ALT 10 casos (25%), com valores variando de 31 U/L a 529 U/L. As enzimas AST e ALT estão localizadas no interior dos hepatócitos, próximas à membrana celular e estas enzimas podem ser liberadas das células, o que causa necrose dos hepatócitos (DAVANÇO *et al.*, 2015; CORONEL *et al.*, 2017).

Quando um aumento plasmático dessas enzimas atinge 10 ou mais vezes os valores de referência, pode ser entendido como reflexo de hepatite causada por drogas. No presente estudo, os valores atingiram um máximo de 9,34 para AST, 12,9 para ALT. Pavan *et al.* (2018) observaram em seu estudo valores de enzimas hepáticas que atingiram um máximo de 9,11 para ALT, 8,18 para AST, resultados muito semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Ainda não se conhece claramente os mecanismos envolvidos nas alterações hepáticas induzidas pelo BNZ, mas a elevação tardia das enzimas sugere que deve haver uma relação com o aumento do tempo de exposição ao fármaco. Verificou-se no presente estudo elevação das enzimas hepáticas no 30º dia em 53,8% (n=7) dos pacientes que apresentaram alteração nessas enzimas. Mas essa elevação não foi considerada estatisticamente significativa (p=0,7117 para AST e p= 0,8987 para ALT).

Estudos experimentais em animais realizado por Garcia *et al.*, (2005) verificaram sinais de hipertrofia hepática no grupo de animais em uso de BNZ, mas não detectaram aumento de colágeno, logo, chegaram à conclusão de que não há necrose produzida pelo BNZ, pois a substituição do parênquima hepático por tecido conjuntivo cicatricial não é necessária. Isso pode justificar o fato de as enzimas hepáticas voltarem para o quantitativo normal após o término ou suspensão do tratamento.

Um dos pacientes chamou a atenção pela maior elevação das enzimas hepáticas, ele também apresentou reação cutânea como coceira, manchas vermelhas; alterações no sistema nervoso central e periférico como a parestesia; alteração no leucograma caracterizada por eosinofilia confirmada em lâmina; RAM relacionada ao estado geral como algia nos membros e RAM relacionada aos órgãos do sentido como a ageusia, culminando com a suspensão definitiva do tratamento com BNZ. Todas essas alterações foram rapidamente regularizadas com a suspensão do fármaco e com tratamento em baixas doses de corticoide por um curto período de tempo, anti-histamínicos, analgésicos e anti-inflamatórios.

Pavan *et al.* (2018) também encontram em seu estudo um paciente com uma alta concentração de enzimas hepáticas, se destacando dos demais. Este paciente também apresentou sintomas digestivos, reação cutânea e alteração hematológica caracterizada por neutropenia. Após suspensão do BNZ e uso de corticoides as alterações desapareceram.

Tabela 5 – Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos 40 pacientes com DC tratados com BNZ antes do tratamento, 30 dias e 60 dias após o início do tratamento - LPDC/Fortaleza- janeiro/2018 a dezembro/2021.

	ANTES DO TTO	30 DIAS DE TTO	60 DIAS DE TTO	VALOR DE REFERÊNCIA	p-valor
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Homem/Mulher	
<b>HC (mi/mm<sup>3</sup>)</b>	4,89±0,62	4,83±0,59	4,78±0,61	4,5 a 6,5/ 4,0 a 5,5	0,7438
<b>HB (g/dL)</b>	14,19±1,55	13,91±1,48	14,03±2,08	13,5 a 18 / 12 a 16	0,7801
<b>LEU GLOBAL (/mm<sup>3</sup>)</b>	6323±1619	6388±2116	6335±1750	4.000 a 11.000	0,9867
<b>NEU (%)</b>	52,89±8,73	58,13±9,68	55,08±8,95	40 a 80	0,0425*
<b>BAST (%)</b>	0,1±0,44	0±0	0,24±1,01	0 a 5	0,2564
<b>SEG (%)</b>	52,79±8,79	58,13±9,68	55,64±9,15	40 a 75	0,0401*
<b>EO (%)</b>	3,06±1,77	3,58±2,52	3,66±3,07	1 - 6%	0,52
<b>BASO (%)</b>	0,75±0,43	0,87±9,53	0,63±0,32	0 a 1	0,1247
<b>LINF (%)</b>	35,28±7,73	28,73±7,53	31,53±9,25	20 a 40	0,0021*
<b>MONO (%)</b>	8,02±2,07	8,68±2,19	8,26±2,14	2 a 10	0,3894
<b>PLAQ (/mm<sup>3</sup>)</b>	246325±56055	242895±65459	238622±76111	150.000 a 500.000	0,8966
<b>UREIA (mg/dL)</b>	33,28±9,59	32,47±9,78	30,58±10,70	10 a 50	0,4926
<b>CREATININA (mg/dL)</b>	0,91±0,23	0,90±0,19	0,84±0,20	0,7 a 1,3 / 0,6 a 1,1	0,4262
<b>AST (U/L)</b>	24,38±6,52	25,82±9,08	35,81±56,22	<38 / <32	0,7117
<b>ALT (U/L)</b>	27,35±14,95	31,36±22,62	42,58±85,05	< 41 / <31	0,8987

Legenda: DP: Desvio padrão; TTO: Tratamento; HC: Hemácias; HB: Hemoglobina; LEU: Leucócitos; NEU: Neutrófilos; BAST: Bastões; SEG: Segmentados; EO: Eosinófilos; BASO: Basófilos; LINF: Linfócitos; MONO: Monócitos; PLAQ: Plaquetas; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase \*Teste ANOVA com pós-teste Tukey.

Neste estudo, apenas 4 (10%) pacientes apresentaram eosinofilia durante o período de tratamento com o BNZ. É uma alteração laboratorial comum de ocorrer diante de uma reação alérgica, mas não ocorreu em todos os pacientes que apresentaram RAM associadas ao sistema dermatológico ( $p=0,52$ ). A presença de eosinófilos na pele é comum em distúrbios dermatológicos associados a reações adversas a medicamentos e tem sido levantada a hipótese de que os eosinófilos podem contribuir para a defesa do patógeno e regular as respostas inflamatórias. As drogas, seja diretamente ou após o processamento pelas células dendríticas, ativam as células T que podem produzir citocinas, resultando em dano tecidual e resposta inflamatória (GRAAUW *et al.*, 2015; WHITE *et al.*, 2015).

Nas reações a medicamentos, os eosinófilos intervêm nas urticárias, angioedema, na síndrome de DRESS (*Drug Reaction (or Rash) with Eosinophilia and Systemic Symptoms*), caracterizada por reação sistêmica medicamentosa que pode ser muito grave. A imunomodulação das reações alérgicas com eosinofilia faz com que os corticoides e anti-histamínicos aumentem a apoptose dos eosinófilos (CARLOS, 2015), o que justifica a melhora e resolução das reações adversas apresentadas pelos pacientes do presente estudo ao utilizarem o esquema prednisona 20 mg por dia durante 5 dias e anti-histamínicos como Loratadina 10 mg por dia ou dicloridrato de hidroxizina 25 mg duas a três vezes ao dia por 10 dias ou em concomitância com o uso do BNZ.

Dos 9 (22,5%) pacientes que suspenderam o tratamento com BNZ devido a RAM, 4 (44,4%) conseguiram retomar e concluir o tratamento usando anti-histamínicos em concomitância. Rodríguez-Guardado *et al.* (2012) observaram que a combinação de doses crescentes de benznidazol e anti-histamínico oral (dexclorfeniramina) foi capaz de evitar distúrbios da pele e permitir um curso completo de 60 dias de tratamento com benznidazol em 19 pacientes.

A reação idiossincrática à droga parece ser o mecanismo mais provável responsável pelas reações adversas causadas pelo BNZ, uma vez que há mais de um órgão/sistema do organismo afetado, além disso, observa-se a recuperação rápida das reações adversas após a retirada da droga (DOOLEY *et al.*, 2002; NOVAES *et al.*, 2015). Não há estudos clínicos na literatura que consigam responder diretamente os mecanismos que envolvem as RAM induzidas por BNZ (PAVAN *et al.*, 2018), por isso mais estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos para traçar estratégias no tratamento e acompanhamento dos pacientes que necessitem utilizar esse medicamento, uma vez que não temos outras opções disponíveis no mercado farmacêutico.

Tivemos como limitações um número reduzido de pacientes, e isso pode ser explicado pela suspensão dos atendimentos farmacêuticos no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC) da UFC devido a pandemia da Covid-19. Os atendimentos foram suspensos por mais de um ano, o que reduziu o número de participantes da pesquisa.

Este estudo mostrou que muitos pacientes foram capazes de completar o tratamento com benznidazol sem nenhuma incidência de RAM grave, sucesso este atribuído a estratégia de acompanhamento próximo juntamente com aconselhamento e tratamento sintomático das RAM visando a segurança do paciente. Devemos utilizar os resultados do presente estudo como forma de melhorar a atenção prestada, visando a promoção de uma farmacoterapia mais segura para esses pacientes.

O serviço de atenção farmacêutica ao paciente com doença de Chagas do estado do Ceará é referência em acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes com doença de Chagas, apesar de todas as suas limitações, tem tentado fazer uma atenção mais humana e especializada a esses pacientes, através da atuação fundamental do farmacêutico durante o tratamento com benznidazol.

#### **4 CONCLUSÃO**

A população caracterizou-se por idade acima dos 40 anos, de baixa escolaridade, naturais e procedentes de cidades do interior do Estado Ceará, a maioria aposentados.

Alta prevalência de reações adversas foi encontrada na população estudada, sendo a grande maioria de gravidade moderada. As reações mais frequentes foram dermatológicas, gastrointestinais e do sistema nervoso. As RAM mais associadas à interrupção e intervenções foram descamação da pele, prurido, erupções bolhosas, a parestesia e ageusia.

Os exames laboratoriais observados indicam que o BNZ induz alterações na função do fígado com frequência, mas não são graves e facilmente controláveis, devem ser monitoradas principalmente no 30º dia e ao final do tratamento.

Este estudo mostrou que muitos pacientes concluíram o tratamento com BNZ sem RAM graves usando uma estratégia de acompanhamento ao paciente e tratamento sintomático.

O serviço de atenção farmacêutica ao paciente portador da doença de Chagas do estado do Ceará é um exemplo dessa estratégia de atendimento e acompanhamento, promovendo uma atenção especializada a esses pacientes.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E.A. *et al.* Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, n.3, p. 311-315, 2007.

ALVES, R.M.A.; THOMAZ, R.P.; ALMEIDA, E.A., *et al.* Chagas' disease and ageing: the coexistence of other chronic disease with Chagas' disease in elderly patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p. 622-628, 2009.

BERAN, R. Paraesthesia and peripheral Neuropathy. **Reprinted from afp.**, v. 44, n.3, p. 92-95, 2015.

BERN, C. *et al.* Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States a Systematic Review. **(Reprinted) JAMA, American Med. Association**, v. 298, n. 18, 2007.

BONNEY, K.M; ENGMAN, D.M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Curr Mol Med.**, v. 8, n. 6, p. 510-518, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Edição única. Brasília, 2014. 812p. Disponível em:  
[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf). Acesso em: 07 jan. 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, (Supl. III), Brasília, 2005.

BURKERT, S; HABERLAND, E.J; GUDZIOL, H. Olfactory and gustatory disorders: causes, diagnosis and treatment. **MMW Fortschr Med.**, v. 147, n. 11, p. 51-53, 2005.

CARLOS, A.G.P. Doenças alérgicas e eosinófilo. **Rev Port Imunoalergologia**, v.23, n.1, p. 7-9, 2015.

CARVALHO, N.B. *et al.* Manual de atendimento a pacientes com doença de Chagas: atenção básica 2014/2015. [S.l: s.n.], 2015.

COLOSIO, R. C. *et al.* Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde- Paraná, Brasil. **Cien Cuid Saúde**, Paraná, p. 355-363, 2007.

CORONEL, M.V, *et al.* Adverse systemic reaction to benznidazole. **Rev Soc Bras Med Trop.**,

v. 50, n. 1, p.145-147, 2017.

COSTA, A.C. *et al.* Satisfação dos pacientes com doença de Chagas atendidos por um serviço de atenção farmacêutica no estado do Ceará, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva [online]**, v. 23, n. 5, p. 1483-1494, 2018.

COSTA, W.P *et al.* Perfil sócio-cultural econômico em áreas de doença endêmica de Chagas na zona rural do município de Mossoró-RN. **Rev Verde Agroecol Desen Sust.**, v.2, p. 101-106, 2007.

DAVANÇO, M.G; DE CAMPOS, M.L; PECCININI, R.G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study Biomed. **Chromatogr.**, v. 29, p.1008–1015, 2015.

DÁVILA, D.F; ROSSELL, O; DE BELLABARBA, G.A. Pathogenesis of chronic chagas heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. **Int J Parasitol.**, v. 32, n. 1, p. 107-109, Jan. 2002.

DIAS, J. C. P *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2016. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 1, 2016.

DIAS, J.C.P.; BORGES DIAS, R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, 31:105-124. 1979.

DOOLEY, J.S. *et al.* Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System. **Wiley-Black Well**, v.12, p 20–25, 2002.

FABBRO, D.L. *et al.* Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, p.1–10, 2007.

FIDALGO, A.S.O.B.V. *et al.* Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online]; v. 51, n. 2, p. 174-182. 2018. Available from: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0408-2017>

FONTELES, M.F.F. *et al.* Reações adversas causadas por fármacos que atuam no sistema nervoso: análise de registros de um centro de farmacovigilância do Brasil. **Rev Psiq Clín.** v.

36, n.4, p.137-44, 2009.

FREITAS, E. C. *et al.* Prevalence of Chagas Disease in a rural area in the state of Ceara, Brazil.

**Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.**, v. 57, n. 5, p. 431-433, 2015.

FREITAS, E.C. *et al.* Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 1, p. 44-51, 2017.

GARCIA, S, *et al.* Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.

GÁRGOLAS M *et al.* The use of steroids to prevent cutaneous reactions to benznidazole in patients with Chagas disease. **Pathog Glob Health.**, v. 107, p.157–160, 2013.

GOTIJO, M. K.LC.L. *et al.* Characterization of adverse reactions to benznidazole in patients with Chagas disease in the Federal District, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], v. 53. 2020.

GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ. Secretaria de Saúde. **Boletim epidemiológico: Doença de Chagas.** Fortaleza. Grupo Técnico da doença de Chagas Célula de Vigilância Epidemiológica (CEVEP), Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica e Prevenção em Saúde (COVEP), 2021. 46 p.

GRAAUW, E, *et al.* Eosinophilia in Dermatologic Disorders. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 35, p. 545-560, 2015.

HASSLOCHER-MORENO, A.M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother.** v. 67, n. 5, p. 1261-67, 2012.

LUQUETTI, A.O; SCHMUÑIS, G.A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. **American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research.** Elsevier, Amsterdam, p. 743-92, 2010.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, Supl. 1, p.319–324, 2009.

MARIN-NETO, J.A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation.**, v. 115, n. 9, p. 1109-112023, 2007.

MENEZES, C. *et al.* Clinical aspects of Chagas Disease and implications for novel Therapies. **Drug Dev. Res.** v. 72, n. 6, p. 471-479, 2011.

MIZOGUTI, I.L, *et al.* Doença de Chagas: A culpa é do Açaí. Boletim informativo da Universidade de São Paulo, 2018; 1(1): 1-10.

MOLINA, I, *et al.* Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufactures. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 10, p. 6125-6131, 2015.

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother**, v.61, p. 01912-16, 2017. doi: 10.1128/AAC.01912-16.

MORILLO, C.A, *et al.* BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med.**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, Oct., 2015.

NOVAES, R.D. *et al.* Trypanosoma cruzi infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitol Res.**, v. 114, n. 8, p. 2873–81, 2015.

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 37, p. 209-228, 2008.

OLIVEIRA, M.J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLOS ONE**, v. 12, n.9, p. 1-13, 2017.

PALHETA NETO, *et al.* Anormalidades sensoriais: olfato e paladar. **Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, São Paulo - Brasil, v.15, n.3, p. 350-358, 2011.

PAVAN, T.B.S, *et al.* Hepatic changes by benznidazole in a specific treatment for Chagas disease. **PLoS ONE**, v.13, n. 7, p. 1-11, 2018.

PINAZO, M.J *et al.* Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to

Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 57, n. 1, p. 390-395 2013.

PONTES, V.M.O, *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benznidazol, no Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 182-187, 2010.

RODRÍGUEZ-GUARDADO, A. *et al.* Prevención de las reacciones adversas asociadas al benznidazol mediante el uso combinado de dosis escalonadas y dexclorfeniramina. In: **VIII Taller Sobre La Enfermedad De Chagas Importada: Avances En El Tratamiento Antiparasitario.** Edição 1. Centro De Investigación En Salud Internacional De Barcelona: Esmon, 2012

ROJAS, L.Z. *et al.* Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v.12, n.6, p. 1-20, 2018.

SALVADOR, F. *et al.* Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with Chagas disease. **Clin Infect Dis.** v. 61, n.11, p.1688-94, 2015. doi: 10.1093/cid/civ690.

SALVADOR, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. **Clin Microbiol Infect**, v.20, p.706–12, 2014.

SILVA, G.M.S. *et al.* Benznidazole treatment safety: the Me´decins Sans Frontie`res experience in a large cohort of Bolivian patients with Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 2596–2601, 2017.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo. **Moléstia de Chagas.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. 248 p.

SOUSA JÚNIOR, A.S. *et al.* Análise espaço-temporal da doença de Chagas e seus fatores de risco ambientais e demográficos no município de Barcarena, Pará, Brasil. **Rev. Bras. de Epidemiol.** [online], v. 20, n. 04, p. 742-755, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1980-5497201700040015>>. ISSN 1980-5497.

VIANA, C.E.M. *et al.* Pharmaceutical care in the state of Ceará, Brazil: socioeconomic and

demographic profile of patients with chagas disease attended in a referral center. **J Trop Pathol.**, v. 49, n.4, p. 243-253. oct.-dec. 2020.

VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*, v.144, p.724–34, 2006.

WHITE, K.D, *et al.* Evolving models of the immunopathogenesis of T cell–mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 136, p. 219–234, 2015.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Report. Geneva;2002.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

## ARTIGO 2 – ADAPTAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE BENZNIDAZOL NO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

### ANALYTICAL METHODOLOGY ADAPTATION FOR THE QUANTIFICATION OF BENZNIDAZOLE IN THE SERUM OF PATIENTS WITH CHRONIC CHAGAS DISEASE

#### RESUMO

**Introdução:** A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, tem como tratamento o benznidazol (BNZ), o qual é distribuído pelo SUS no Brasil, este apresenta alta incidência de reações adversas (RAM) que podem levar à suspensão do tratamento. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica utilizada na monitorização terapêutica de fármacos em soro ou plasma, sendo considerada uma técnica adequada para a quantificação de BNZ no plasma humano. A diferença entre soro e plasma é que o plasma apresenta fibrinogênio, importante proteína do processo de coagulação. O soro parece apresentar uma maior estabilidade frente ao plasma em diversas condições de estoque na análise de alguns parâmetros bioquímicos. **Objetivos:** Adaptação de uma metodologia analítica (CLAE com detector de Ultravioleta) para quantificação de BNZ no soro humano e como objetivo secundário relacionar a concentração de BNZ no soro com as RAM apresentadas durante o tratamento. **Metodologia:** Trata-se de um estudo do tipo coorte prospectivo de seguimento farmacoterapêutico de pacientes com DC crônica em tratamento com BNZ no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC) da Universidade Federal do Ceará. A concentração do BNZ no soro foi determinada por CLAE/UV. O acompanhamento do tratamento foi realizado com 30 e 60 dias após o início do tratamento. As RAM foram classificadas de acordo com a gravidade. **Resultados:** O método adaptado mostrou especificidade, seletividade, linearidade e precisão, portanto, adequado para a quantificação do BNZ em soro humano. Observou-se que 58,82% (n=10) dos pacientes com 30 dias de tratamento estavam com a concentração sérica de BNZ dentro da faixa tripanocida. As RAM foram leves e moderadas e não estavam relacionadas com as concentrações séricas de BNZ. **Conclusão:** Trata-se de um método rápido, confiável e bastante eficaz para a mensuração sérica de BNZ em pacientes. As concentrações séricas de BNZ não estavam relacionadas com as reações adversas.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas. Benznidazol. HPLC. Toxicidade de Fármacos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chagas disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is treated with benznidazole (BNZ), which is distributed by the Public Health System in Brazil, and has a high incidence of adverse drug reactions (ADR) that can lead to suspension of treatment. High performance liquid chromatography (HPLC) is a technique used in the therapeutic monitoring of drugs in serum or plasma, being considered an adequate technique for the quantification of BNZ in human plasma. The difference between serum and plasma is that plasma contains fibrinogen, an important protein in the clotting process. The serum seems to present greater stability against plasma in different storage conditions in the analysis of some biochemical parameters. **Objective:** Adaptation of an analytical methodology (HPLC with Ultraviolet detector) for quantification of BNZ in human serum and as a secondary objective to relate the concentration of BNZ in serum with the ADRs presented during treatment. **Methodology:** This is a prospective cohort study of pharmacotherapeutic follow-up of patients with chronic CD undergoing treatment with BNZ at the Chagas Disease Research Laboratory (LPDC) of the Federal University of Ceará. Serum BNZ concentration was determined by HPLC/UV. Treatment follow-up was performed at 30 and 60 days after the start of treatment. ADRs were classified according to severity. The concentration of BNZ in the serum was determined by High Performance Liquid Chromatography with an Ultraviolet detector (HPLC/UV), revalidating the methodology of Guerrero *et al.* (2011). **Results:** The adapted method showed specificity, selectivity, linearity and precision, therefore, suitable for the quantification of BNZ in human serum. It was observed that 58.82% (n=10) of the patients with 30 days of treatment had the serum concentration of BNZ within the trypanocidal range. ADRs were mild and moderate and were unrelated to serum BNZ concentrations. **Conclusion:** It is a fast, reliable and very effective method for measuring serum BNZ in patients. Serum concentrations of BNZ were not related to adverse reactions.

**Keywords:** Chagas disease. Benznidazole. HPLC. Drug Toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, representa um sério problema de saúde pública na América Latina (JANNIN, VILLA, 2007; WHO, 2016). O tratamento etiológico da DC no mundo se limita a dois medicamentos o Nifurtimox (Nf) e o Benznidazol (BNZ), ambos com efetividade limitada na fase crônica e alto risco de toxicidade em doses terapêuticas (SOEIRO *et al.* 2009, ALTCHER *et al.* 2014, KRATZ *et al.*, 2018).

O BNZ é o principal medicamento tripanocida no mundo usado no tratamento da DC aprovado em nove países das Américas, incluindo Estados Unidos e o México (MORILLO *et al.*, 2015; BERMUDEZ *et al.*, 2016; WIENS *et al.*, 2016). A eficácia do BNZ em pacientes com infecção por *T. cruzi* é extremamente variável e depende do estágio da doença.

No Brasil, o BNZ é o fármaco de escolha para o tratamento etiológico com taxas de cura parasitológicas variando de 60 a 85% na fase aguda da doença (SCHIJMAN *et al.*, 2003; BERN, 2011). No entanto, na fase crônica as taxas de cura não alcançam 40% (BERN, 2011; WIENS *et al.*, 2016). Embora não proporcione a cura, o tratamento deve ser oferecido a adultos com infecção crônica, devido as evidências de que o tratamento reduz a morbimortalidade, melhora o prognóstico do paciente, aumenta a sobrevida, além de gerar uma possível estabilidade na evolução da cardiomiopatia chagásica (SCHIJMAN *et al.*, 2003; WIENS *et al.*, 2016).

O BNZ apresenta alta incidência de efeitos indesejáveis, a maioria dos quais são tratáveis ou reversíveis, mas que, infelizmente, podem levar à interrupção permanente do tratamento em um número significativo de pacientes (VIOTTI *et al.*, 2009). As reações adversas a medicamentos (RAM) ocorrem em 30% a 87% dos pacientes tratados com BNZ e 12% a 29% dos pacientes não conseguem concluir o tratamento (PONTES *et al.*, 2010; VIOTTI *et al.*, 2009).

O BNZ foi sintetizado em 1972 pelo laboratório Hoffman-La Roche com o nome comercial de *Rochagan*<sup>®</sup> o qual foi produzido e comercializado por um longo período pela Roche. Em 2003, a Roche transferiu a licença e a tecnologia para o Brasil, sendo o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) o único produtor no mundo dos comprimidos de BNZ. No entanto, em 2010, devido a uma série de problemas logísticos, a produção e a distribuição do medicamento foi suspensa levando a uma escassez mundial e uma interrupção do tratamento dos indivíduos infectados e diagnosticados. A partir de 2012,

um novo fabricante, ELEA, uma empresa farmacêutica privada com sede na Argentina, anuncia o registro e também passa a produzir o BNZ (WIENS *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação do BNZ se baseia na formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos a partir da redução do grupo nitro presente na estrutura da molécula do fármaco por ação da nitroreductase (CASTRO, DEMECCA, BARTEL, 2006; SOSA ESTANI, SEGURA, 2006). Sua farmacocinética possui dados limitados na infecção crônica. Apesar disso, o tratamento é indicado, por melhorar o prognóstico e retardar o aparecimento de formas clínicas graves. A posologia é de 5mg/kg/dia, via oral, durante 60 dias, em duas ou três tomadas diárias para adultos (VIOTTI *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011). O BNZ apresenta boa biodisponibilidade oral, volume aparente de distribuição de 0,56 litro/kg e meia-vida de eliminação de 12 a 15 horas (VIOTTI *et al.*, 2009, GARCIA-BOURNISSEN *et al.*, 2012, MORILLO *et al.*, 2017).

As reações adversas provocadas pelo BNZ são relacionadas aos sistemas dermatológico, como a dermatite, e sistema gastrointestinal. Outras reações são anorexia, dor de cabeça, depressão da medula óssea e, em alguns casos, a neuropatia (danos nos nervos causando dormência, fraqueza e dor) (PINAZO *et al.*, 2010). Logo, observa-se a necessidade de um acompanhamento farmacêutico e médico durante o tratamento com BNZ.

Não se sabe ao certo quais os fatores que estariam relacionados ao desenvolvimento de reações adversas ao BNZ, mas estudo *in vitro* relatou que concentrações de 20 µg/mL parecem estar relacionadas a um maior risco de toxicidade, principalmente, com distúrbios relacionados com o sistema dermatológico (RAAFLAUB, ZIEGLER, 1979).

Por se tratar de uma doença tropical negligenciada, usando o mesmo tratamento há 50 anos, houve um interesse em mensurar a concentração sérica do BNZ através de um método simples, rápido e confiável e dessa forma, poder contribuir para melhorar o manejo da DC adaptando os esquemas de dose às necessidades individuais.

Poucos dados existem hoje sobre a farmacocinética do BNZ (RAAFLAUB, ZIEGLER, 1979; RAAFLAUB, 1980; ALTCHEH *et al.*, 2014; SOY *et al.*, 2015; MOLINA *et al.*, 2017). O que se tem estabelecido com relação a concentração ideal tripanossomida e a concentração tóxica são baseados em estudos *in vitro* (RAAFLAUB, 1980). A dosagem recomendada de benznidazol para o tratamento da infecção por *T. cruzi* é de 5 mg/kg/dia, mas o protocolo de tratamento com BNZ pode variar em alguns países, desde 5 mg/kg/dia divididos em duas ou em três tomadas diárias (PINAZO *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2016). Estudos estão sendo realizados propondo esquemas terapêuticos diferentes para reduzir a

incidência de reações adversas ao medicamento (MORILLO *et al.*, 2017; FRADE *et al.*, 2020; TORRICO *et al.*, 2021).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *high-performance liquid chromatography* (HPLC) é uma técnica utilizada na monitorização terapêutica de fármacos em soro ou plasma, é específica e adaptável a quase todas as moléculas, sendo considerada uma técnica adequada para a quantificação de BNZ no plasma humano. Apresenta alta sensibilidade e precisão que se baseia na separação de misturas, no qual as substâncias a serem separadas são distribuídas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. Cada composto foi eliminado da fase estacionária e identificado pelo detector em um tempo diferente, gerando um pico cromatográfico. A análise dos diferentes picos nos permite identificar e quantificar as substâncias presentes na amostra (JEHL, GALLION, MONTEIL, 1990; SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2004).

A proposta do presente estudo foi adaptar uma metodologia analítica (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta – CLAE/UV) para quantificação de BNZ no soro humano. E como objetivo secundário investigar se as RAM apresentadas em pacientes com DC tratados com BNZ poderiam estar relacionadas com as concentrações séricas de BNZ, a fim de buscar respostas para o surgimento dessas reações, e identificar concentrações adequadas para minimizar o aparecimento das mesmas.

## **2 METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo de pacientes em tratamento com benznidazol acompanhados no Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC) da Universidade Federal do Ceará no período de janeiro de 2018 a julho de 2019.

Foram incluídos no estudo pacientes com idade igual ou superior a 18 anos que chegaram ao LPDC com diagnóstico confirmado para doença de Chagas (exames sorológicos reagentes com duas metodologias diferentes) e com prescrição de BNZ. Foram excluídos aqueles pacientes com tratamento prévio para DC, gravidez, qualquer tipo de imunossupressão, comorbidades como doenças hepáticas ou renais e pacientes que não compareceram as três primeiras consulta farmacêuticas no período da pesquisa.

## 2.1 Pacientes e procedimentos

Compareceram ao LPDC 23 pacientes, dos quais 17 atenderam aos critérios de inclusão. As amostras foram coletadas em 3 momentos distintos: no tempo zero, ou seja, antes do início do tratamento com BNZ, com 30 dias do início do tratamento e com pelo menos 60 dias após o início do tratamento para mensuração da concentração de BNZ no soro.

O regime de tratamento com o BNZ foi realizado de acordo com que preconiza o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, a dose utilizada foi de 5 mg/kg/dia dividida em 3 doses, durante 60 dias. Quando a dose diária ultrapassava os 300 mg, estendia-se o tratamento até 3 meses. O acompanhamento do tratamento e avaliação das reações adversas foram realizados, por volta, de 30 e 60 dias após o início do tratamento.

No LPDC, os pacientes foram consultados sobre o aparecimento de reações a partir do segundo atendimento farmacêutico e documentado em formulários específicos para reações adversas a medicamentos. Estes formulários foram elaborados pelos farmacêuticos do serviço para notificar os resultados dos exames laboratoriais e a presença de sinais e sintomas clínicos.

Em cada atendimento foi coletada uma amostra de sangue dos pacientes em tubos com gel separador e após a obtenção do soro por centrifugação foi armazenado em freezer a -80 °C até posterior quantificação de BNZ.

## 2.2 Classificação das reações adversas

As reações adversas foram classificadas quanto a gravidade (leve, moderada, grave e fatal) e validadas pelo Centro de Farmacovigilância do Ceará (CEFAC) de acordo com metodologia da Organização Mundial de Saúde (WHO), utilizada pelo centro (FONTELES *et al.*, 2009). Todas as reações foram classificadas apenas em relação ao BNZ.

## 2.3 Determinação de BNZ no soro

### 2.3.1 Material e equipamento

Benznidazol foi fornecido pela Nortec Química, lote: 603218; acetonitrila grau UV/HPLC (J.T. Baker); água ultrapurificada para uso em CLAE. Os demais reagentes e solventes utilizados (Dimetilssulfóxido - DMSO, fabricante Dinâmica, Química

Contemporânea Ltda.) foram de grau analítico. Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto de bomba Dynamax® modelo SD-200, injetor manual com loop de 20µL, coluna cromatográfica Synergi 4µm Hydro-RP 80Å 250x4,6 mm, com detector PDA Varian ProStar e sistema Varian Workstation. Foi usada uma centrífuga de microtubos Costar® No. 10 – MVSS.

### **2.3.2 Obtenção das amostras**

O sangue foi coletado em tubo de 5mL, com gel de separação, por punção venosa com sistema a vácuo. O sangue foi centrifugado a 2.500 rotações por minutos durante 10 minutos e armazenado em freezer a -80°C até análises dos soros para mensuração da concentração de BNZ, que ocorreu de 1 a 2 anos após a coleta. Apenas os pacientes que tinham finalizado suas três coletas de sangue até julho de 2019 tiveram suas amostras de soro analisadas.

### **2.3.3 Metodologia empregada**

Guerrero *et al* (2011) utilizaram a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta – (CLAE/UV) para quantificar o BNZ no plasma de indivíduos em tratamento. Esta foi adaptada para amostras de soro humano que estavam armazenadas a -80°C por um período de 1 a 2 anos, para isso alguns parâmetros foram avaliados conforme a RDC 166, publicada no DOU nº. 141, de 25 de julho de 2017: linearidade, repetibilidade, especificidade e reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

A composição da fase móvel foi a mesma descrita e utilizada por Guerrero *et al* (2011), que consiste em acetonitrila e água ultrapurificada na proporção 40:60, respectivamente, filtrada através de membrana de 0,45 µm.

A velocidade de fluxo utilizada no aparelho foi de 0,9 mL/min. Para a detecção do BNZ, utilizou-se um comprimento de onda de 324 nm em modo de absorbância. A benzocaína foi usada como padrão interno das corridas que usaram soro humano, seja este, soro controle de pessoas sem DC e sem tratamento (soro branco) ou soro dos pacientes tratados.

O BNZ foi primeiramente diluído em dimetilssulfóxido (DMSO), a fim de obter a completa dissolução do fármaco para preparar as diluições subseqüentes na fase móvel.

Para a extração do BNZ, as amostras de soro foram submetidas ao processo de extração por precipitação de proteínas com ácido tricloroacético 0,3 M. Para isso, foi adicionado 25 µL de uma solução de BNZ (10 µg/mL) a 450 µL do soro humano branco e

acrescido de 25µL de solução benzocaína (252µg/mL) e 500µL de ácido tricloroacético 0,3 M para precipitação de proteínas. A mistura foi homogeneizada no vórtex por 15 segundos e em seguida centrifugada por 15 minutos a 10.000rpm. O sobrenadante foi utilizado tanto para lavagem da seringa de injeção quanto para a análise, sendo injetado repetidas vezes por um mesmo analista.

No sistema cromatográfico foi injetado 20µl da amostra filtrada, registrando-se os valores de área e o tempo de retenção dos picos, expressos em desvio padrão relativos. A benzocaína (padrão interno) foi injetada conjuntamente na amostra e o tempo de corrida foi de 15 minutos. Para avaliação da repetibilidade, 4 preparações independentes foram obtidas.

O parâmetro de linearidade foi avaliado através de uma curva de calibração, utilizando soluções diluídas em fase móvel. Utilizou-se 6 amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas do Padrão Interno (PI): 100µg/mL, 40µg/mL, 10µg/mL, 4µg/mL, 2,84µg/mL e 1,42µg/mL. As injeções foram realizadas em triplicata para cada valor de concentração. O procedimento foi realizado em dias diferentes, por analistas diferentes para avaliação da linearidade para o método. O tempo de corrida foi de 10 minutos para cada injeção aplicada no aparelho.

Para a análise da reprodutibilidade do método, foram realizadas curvas de calibração injetadas por diferentes analistas, nos dias seguintes a realização da curva do parâmetro de linearidade. As curvas foram obtidas com as concentrações de 4µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram escolhidas estas concentrações, em virtude de estarem próximos das concentrações da margem terapêutica (3 – 6 µg/mL) (GUERRERO *et al*, 2011).

Para avaliação da especificidade foi realizado ensaio de degradação forçada de BNZ 40µg/mL em meios ácido (HCl 1M), básico (NaOH 1M) e oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) a 60°C por uma hora. Após esse período, as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e neutralizadas com base, ácido e agente redutor, respectivamente e então injetada no cromatógrafo em triplicata.

A mensuração da concentração de BNZ no soro dos pacientes, ocorreu após a avaliação dos referidos parâmetros relatados acima.

## **2.4 Análise estatística**

Os dados foram tabulados no Microsoft Office Excel 2016 e analisados utilizando o

programa *Graphpad Prism* versão 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). As variáveis quantitativas foram determinadas como médias e desvios padrão, e as variáveis categóricas foram descritas por frequências e porcentagens. O teste T foi usado em comparações de variáveis contínuas com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para comparar variáveis com distribuição não normal. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## 2.5 Considerações éticas

O projeto foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa que envolvem Seres Humanos CEP/ Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), de acordo Resolução nº 466/12 do conselho Nacional de Saúde – CNS do Ministério da Saúde, considerando o respeito pela dignidade humana e pela especial proteção devida aos participantes das pesquisas científicas envolvendo seres humanos e aprovado sob número de parecer 3.284.027.

## 3 RESULTADOS

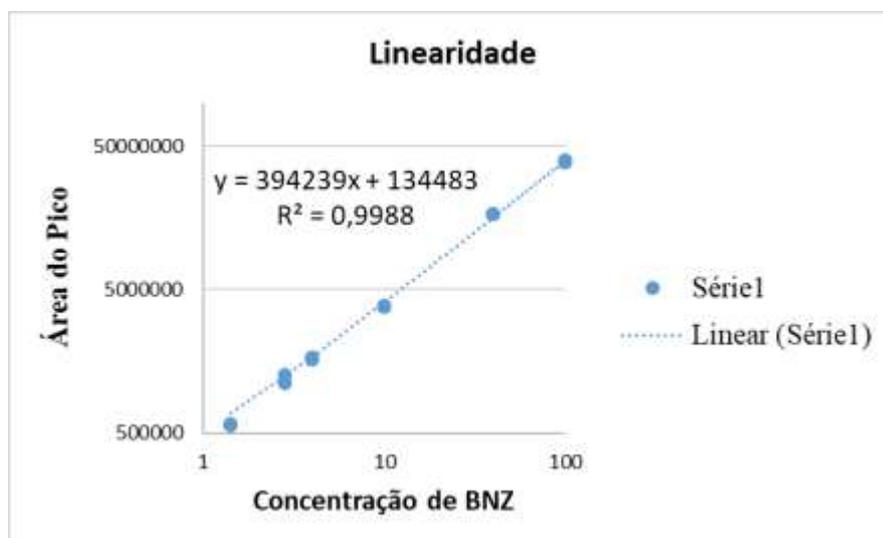
### 3.1 Quantificação de BNZ no soro

Para a quantificação do BNZ no soro foi adaptada a metodologia de Guerrero *et al* (2011), analisando os seguintes parâmetros como linearidade, repetibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

A curva de calibração foi linear com injeção das concentrações de 1,4µg/mL a 100µg/mL, em triplicata. Os valores de  $R^2$  foram: 0,9975; 0,9961 e 0,9991, mostrando que os valores estão próximos, indicando que os valores da reta se mantiveram alinhados, próximos de 1, valor próximo do ideal. (FIGURA 1).

O estudo da repetibilidade foi realizado com o uso de uma mistura de soro humano branco sem DC em quatro amostras e em triplicata. A tabela 1 mostrou pequenas variações obtidas nos valores de desvio padrão relativos entre as razões das áreas de BNZ/Benzocaína (1,42%; 2,16%; 1,22%; 1,96%).

Figura 1 - Linearidade da análise do BNZ nas concentrações de 1,4µg/mL a 100µg/mL, em triplicata e valores de concentração, média das áreas de pico e desvio padrão relativo.



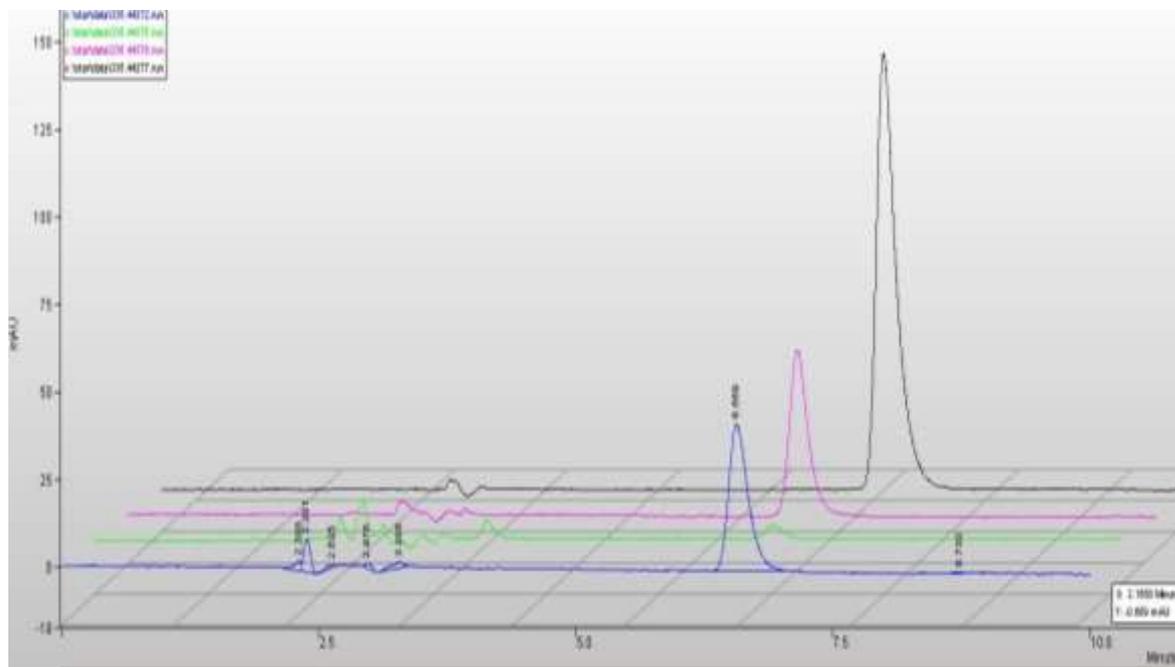
Concentração BNZ (µg/mL)	Média das áreas dos picos	Desvio Padrão Relativo (%)
100	39265015	2,41
40	16720510	0,47
10	3804504	0,80
4,48	1663825	1,99
2,84	1120540	1,80
1,42	572561,7	1,22

A especificidade do método foi avaliada com a indução da degradação do BNZ (40 µg/mL) em meios ácido (HCl), básico (NaOH) e oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para a verificação de alguma interferência no aparecimento do pico de BNZ, seja por sobreposição, ou por deslocamento do tempo de retenção do BNZ. O tempo de retenção do BNZ não foi afetado (FIGURA 2). As diferentes formas de degradação promoveram o aparecimento de diferentes picos antes do pico correspondente ao BNZ, que teve sua intensidade reduzida, demonstrando que foi consumido no processo de degradação. Fica demonstrada, assim, a especificidade do método adotado para análise.

Tabela 1 - Razão entre BNZ e Benzocaína após o procedimento de precipitação de proteínas.

Amostra	Área Pico BNZ	Área Pico Benzocaína	Razão BNZ/Benzocaína	Média da Razão BNZ/Benzocaína (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
1	3953556	13682669	28,895	29,342	1,42
	4046917	13613997	29,726		
	3930808	13368346	29,404		
2	3615737	12608727	28,676	29,365	2,16
	3791820	12668476	29,931		
	3688561	12509234	29,487		
3	3448280	12000697	28,734	29,017	1,22
	3546870	12057470	29,416		
	3409065	11795246	28,902		
4	3947392	13333126	29,606	29,887	1,96
	4034367	13679578	29,491		
	4096601	13403844	30,562		

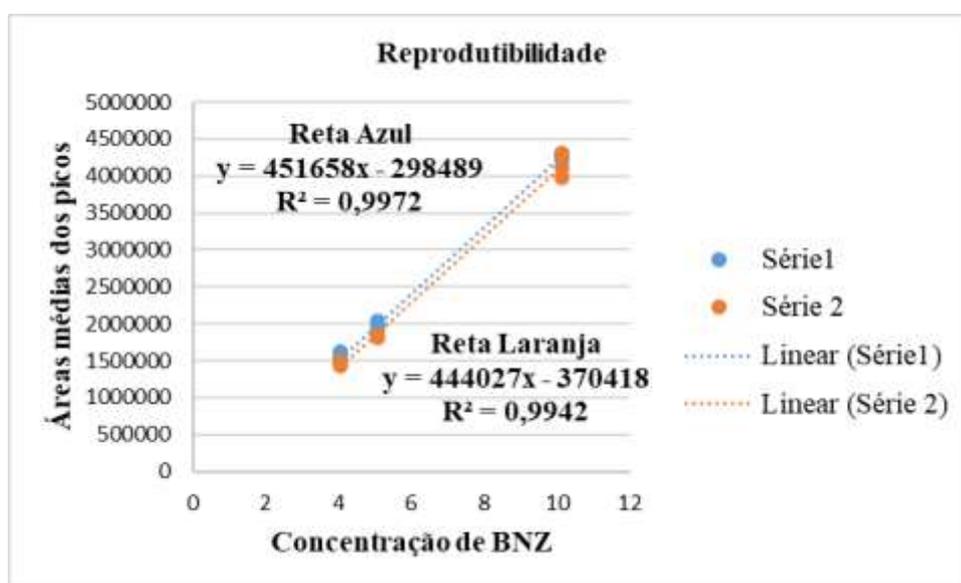
Figura 2 – Cromatograma do ensaio de degradação forçada do BNZ.



Legenda: Eixo X – tempo de retenção em minutos. Eixo Y – Absorbância. Traçado preto – Apenas BNZ; Traçado rosa – BNZ em meio oxidativo; Traçado verde – BNZ em meio alcalino; Traçado azul – BNZ em meio ácido.

A reprodutibilidade foi demonstrada através da injeção das mesmas soluções com concentrações conhecidas de BNZ realizadas por analistas diferentes. Pode-se observar pelo valor de desvio padrão relativo (3,5636 %; 5,0221%; 0,9112% e 2,45226%; 1,062573%; 4,109352%) das injeções realizadas por diferentes analistas que houve reprodutibilidade do método (FIGURA 3). Nas análises das retas, encontramos os valores de X (Concentrações de BNZ) em ambas as curvas, logo, podemos dizer que estavam muito próximas do paralelismo entre ambas, mostrando que estavam consoantes, mesmo sendo feitas por analistas diferentes.

Figura 3 - Gráfico demonstrando a reprodutibilidade do método.



Legenda:

#### Reta azul

Concentração do BNZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média das áreas dos picos	Desvio Padrão Relativo (%)
4,048	1561718	3,5636
5,06	1948627	5,0221
10,12	4278670	0,9112

#### Reta Laranja

Concentração BNZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média das áreas dos picos	Desvio Padrão Relativo (%)
4,048	1467326	2,45226

5,06	1827975	1,062573
10,12	4131204	4,109352

Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.2 Caracterização das RAM ao benznidazol

A idade média dos pacientes era 57 anos, variando de 39 a 76 anos; sendo 58,8% (n=10) do sexo feminino e 41,2% (n=7) do sexo masculino. Em relação naturalidade, 76,5% (n=13) eram de cidades do interior cearense, tendo em sua maioria fundamental incompleto (41,2%; n=7) ou eram analfabetos (23,5%; n=4). Alguns pacientes estavam em tratamento para outras patologias além da DC, como para hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia e arritmia cardíaca. Um total de 44 medicamentos foi utilizado durante o tratamento com BNZ e destes 40,9% (n=18) eram medicamentos pertencentes à classe de anti-hipertensivos.

Durante o tratamento com BNZ, foram identificadas 45 RAM, 76,4% (n=13) dos pacientes apresentaram pelo menos uma RAM durante o seguimento e apenas 23,5% (n=4) não apresentaram nenhuma RAM, e uma incidência média de 2,6 RAM/paciente (TABELA 2). A suspensão do tratamento aconteceu em 23,5% (n=4) dos pacientes, sendo 02 mulheres e 02 homens. As RAM foram classificadas somente quanto ao BNZ.

Tabela 2 – Frequência e gravidade das RAM de 17 pacientes com doença de Chagas crônica relacionadas ao benznidazol durante todo o período de tratamento - LPDC/Fortaleza - janeiro/2018 a julho/2019 de acordo com sistemas e órgãos.

<b>Sistema ou órgão</b>	<b>Sintomas/Alteração</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Classificação quanto a Gravidade</b>
<b>Dermatológico</b>	Manchas vermelhas/ erupções cutâneas	2	4,4	Moderada
	Prurido	4	8,8	Leve
	Ardência e queimação na pele	1	2,2	Moderada
	Descamação da pele	2	4,4	Moderada

<b>Gastrointestinal</b>	Azia	3	6,6	Leve
	Náuseas/enjoos	1	2,2	Leve
	Aumento do apetite	2	4,4	Leve
	Dor abdominal	4	8,8	Moderada
	Dor abdominal + diarreia	1	2,2	Moderada
	Diarreia	2	4,4	Moderada
	Vômitos	2	4,4	Leve
<b>Estado Geral</b>	Cefaleia	4	8,8	Leve
	Febre	3	6,6	Leve
<b>Musculoesquelético</b>	Astenia	3	6,6	Moderada
	Artralgia	1	2,2	Moderada
<b>Nervoso central e periférico</b>	Parestesia	3	6,6	Moderada
	Tontura/Vertigem	1	2,2	Leve
<b>Nervoso Autônomo</b>	Perda de apetite	3	6,6	Leve
<b>Cardiovascular</b>	Edema nas extremidades/facial	1	2,2	Moderada
<b>Órgãos dos sentidos</b>	Ageusia	2	4,4	Moderada
<b>Total</b>		<b>45</b>	<b>100</b>	

Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.3 Concentração de BNZ e a presença de RAM

As concentrações séricas de BNZ foram registradas nos dias 0, 30 e 60 de seguimento e avaliadas de acordo com variáveis clínicas e epidemiológicas.

Dos 17 pacientes analisados, 58,82% (n=10) dos pacientes com 30 dias de tratamento estavam com a concentração sérica de BNZ dentro da faixa tripanocida que seria de 3 a 6µg/mL (GUERRERO *et al.*, 2011), 41,21% (n=7) estavam com concentração subterapêutica ou não detectável e 1 paciente estava com concentração maior do que 6µg/mL,

enquanto que com 60 dias do início do tratamento, apenas 35,29% (n=6) mantiveram os níveis de BNZ ideais e os demais estavam em concentrações subterapêuticas ou não foram detectadas no soro (TABELA 3).

As amostras de soro coletas no tempo zero mostram o padrão inicial do paciente no cromatograma, se fosse observado algum pico, indicaria a utilização de outro fármaco, que estaria presente, mesmo após todo o processamento da amostra, e no mesmo comprimento de onda escolhido. No tempo zero, nenhum paciente apresentou pico no mesmo tempo de retenção correspondente ao pico do BNZ.

Tabela 3 – Concentração sérica de BNZ 30 dias (D30) e 60 dias (D60) após o início do tratamento com BNZ.

<b>Descrição</b>	<b>Variáveis</b>	<b>D<sub>30</sub> N(%)</b>	<b>D<sub>60</sub> N(%)</b>
<b>Concentração Sérica de BNZ</b>	Acima de 6µg/mL	0	1 (5,88)
	Entre 3 e 6µg/mL	10 (58,82)	6 (35,29)
	Abaixo de 3µg/mL	3 (17,68)	5 (29,41)
	Não detectado	4 (23,53)	5 (29,41)
	Total	17	17

Legenda: D<sub>30</sub>: 30 dias após o início do tratamento. D<sub>60</sub>: 60 dias após o início do tratamento

De todas as amostras analisadas, apenas uma estava em concentração superior à faixa tripanocida. A média (desvio padrão) das concentrações séricas de BNZ nos D<sub>30</sub> e D<sub>60</sub> foram 3,118(1,945) e 2,445 (2,161) µg/mL, respectivamente.

Não foi observada diferença significativa nas concentrações séricas de BNZ quando comparado a pacientes com e sem relato de reação adversa ou para aqueles que tinham condições concomitantes (TABELA 4).

Tabela 4 – Avaliação das concentrações séricas de BNZ com o sexo, comorbidades, reações adversas, sintomas/sinais gastrointestinais, dermatológicos e neurológicos e musculo esqueléticos.

<b>Variáveis</b>		<b>Média da concentração sérica de BNZ</b>	
		<b>D<sub>30</sub> (µg/mL)</b>	<b>D<sub>60</sub> (µg/mL)</b>
<b>Sexo</b>	Feminino	3,11	1,295
	Masculino	3,93	3,36

	p-valor	0,806	0,2946
<b>Comorbidades</b>	Sim	3,12	2,59
	Não	4,9	2,335
	p-valor	0,0682	0,6852
<b>Reação adversa</b>	Sim	3,54	2,59
	Não	3,925	2,63
	p-valor	0,3618	0,9538
<b>Sintomas/sinais gastrointestinal</b>	Sim	3,93	2,59
	Não	3,035	2,63
	p-valor	0,2384	0,9602
<b>Sintomas/sinais dermatológicos</b>	Sim	1,722	2,74
	Não	3,699	2,323
	p-valor	0,1677	0,7875
<b>Sintomas/sinais neurológicos e musculoesquelético</b>	Sim	3,24	2,028
	Não	3,051	2,673
	p-valor	0,8552	0,5737

Legenda: D<sub>30</sub>: 30 dias após o início do tratamento. D<sub>60</sub>: 60 dias após o início do tratamento.

#### 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho o método de Guerrero *et al.* (2011) foi adaptado para a quantificação do BNZ no soro. A adaptação consistiu na mudança da amostra de plasma sanguíneo a -40°C para soro humano armazenado a -80°C de forma que essa mudança não alterasse o cumprimento dos requisitos de quantificar, detectar o BNZ, ser preciso, linear e ter curto tempo de preparo.

No parâmetro linearidade, observou-se valores de R<sup>2</sup> próximos ao de Guerrero *et al.* (2011), mostrando que os valores estão próximos e o método demonstrou linearidade dos resultados. Na análise da repetibilidade, diante dos achados foi possível constatar uma repetibilidade na realização do procedimento, o que forneceu uma maior confiança para a quantificação de BNZ em soros de pacientes com doença de Chagas em tratamento.

Na análise da especificidade, observou-se que o método adotado na análise é específico e que o meio alcalino promove a maior degradação por hidrólise da amida.

São raros estudos que quantificaram BNZ em soro humano, apenas em plasma (RAAFLAUB, 1980; WORKMAN *et al.*, 1984; WALTON, WORKMAN, 1986; MORILLA *et al.*, 2003; GUERREIRO *et al.*, 2011; PINAZO *et al.*, 2013; ALTCHER *et al.*, 2014; SALVADOR *et al.*, 2015; MOLINA *et al.*, 2017). O soro humano é obtido após a centrifugação do sangue coletado em tubos sem anticoagulantes, ou seja, a diferença entre soro e plasma é que o plasma apresenta fibrinogênio e fatores da coagulação, importante para o processo de coagulação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL, 2010). Alguns estudos em animais mostraram que o soro apresentou uma maior estabilidade frente ao plasma em todas as condições de estoque estabelecidas na análise de alguns parâmetros bioquímicos como ureia, creatinina, colesterol, entre outros (FERNANDES, TEIXEIRA, SANTOS, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Baseado nesses estudos, optou-se pela coleta e análise do soro frente ao plasma, visto que o soro armazenado no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foi analisado 1 a 2 anos depois da coleta.

Estudos de monitorização terapêutica mostraram que a maior parte das análises laboratoriais permite a utilização de soro ou plasma obtido a partir de sangue venoso (GROSS, 2001; ROBERTS *et al.*, 2011; BUSH, 2012; OELLERICH *et al.*, 2012). Estudo realizado por Lange *et al.*, (2018) avaliaram a qualidade de amostras armazenadas no seu biorrepositório e que seriam utilizadas para pesquisas de biomarcadores no futuro, verificaram que as amostras de soro humano não perderam a sua qualidade após serem armazenadas por longos períodos. Os resultados do presente estudo mostram que o soro humano armazenado de 1 a 2 anos no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  pode ser utilizado com segurança para a quantificação do BNZ, ou seja, a mudança da amostra, tempo e temperatura de armazenamento não comprometeu a eficácia e qualidade do método analítico de Guerreiro *et al.*, (2011).

Na verificação das RAM provocadas pelo BNZ, à suspensão do tratamento aconteceram devido às reações relacionadas ao sistema dermatológico, como descamação da pele, manchas vermelhas e prurido; relacionadas também ao sistema nervoso central e periférico como a parestesia; e reações associadas aos órgãos dos sentidos como a ageusia. Ressalta-se que os pacientes foram tratados com dose de 5mg/kg/dia, de modo a não ultrapassar dose diária de 300mg. Em média, a duração do tratamento foi de 68 dias, variando de 60 a 90 dias. Em relação à interrupção do tratamento, a duração média antes da retirada do BNZ foi de 35,2 dias, sendo uma interrupção com 56 dias, uma com 40 dias, outra com 39 dias e apenas um com 6 dias de tratamento.

Apesar da alta frequência de RAM ocasionada pelo uso do BNZ e a falta do conhecimento dos mecanismos de ação pelos quais essas reações acontecem, o BNZ ainda é medicamento de escolha para o tratamento da DC (SIQUEIRA-BATISTA, 2007). A maioria das reações foi considerada leve e moderada, o que torna o tratamento seguro desde que acompanhado por profissionais farmacêuticos e médicos (COSTA *et al.*, 2018).

Assim como no estudo de Pinazo *et al.* (2013), verificamos que a dose de 5mg/kg/dia seguida em protocolos terapêuticos (DIAS *et al.*, 2016) é a dose adequada que permite níveis tripanocidas ideais em pacientes crônicos adultos, mas o tempo de tratamento ainda permanece divergente em alguns estudos (FRADE *et al.*, 2020), logo são necessários estudos clínicos randomizados que avaliem esquemas terapêuticos mais curtos, com boa tolerabilidade e boa eficácia para que o paciente tenha uma farmacoterapia segura e eficaz.

Alguns estudos relatam que a toxicidade do BNZ pode estar relacionada com concentrações plasmáticas de BNZ  $>20 \mu\text{g/mL}$  (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979; RAAFLAUB, 1980; MORILLA *et al.*, 2003). No presente estudo nenhum paciente apresentou esta concentração, a concentração mais alta encontrada foi de  $7\mu\text{g/mL}$  em um paciente, após 60 dias do início do tratamento. As RAMs apresentada por este paciente foram perda de paladar (ageusia), náuseas e dores abdominais.

Cançado (2002) relacionou sintomas/sinais neurológicos e músculo esquelético como parestesia e artralgia com altas concentrações de BNZ no final do tratamento devido ao acúmulo do fármaco, mas essa relação não foi encontrada no presente estudo, assim como também não foi observado por Pinazo *et al.* (2013) e Salvador *et al.* (2015).

Os resultados mostraram que as concentrações séricas de BNZ nas doses atualmente recomendadas (DIAS *et al.*, 2016) não estavam associadas a reações adversas, corroborando com os únicos estudos encontrados na literatura que abordavam essa questão Pinazo *et al.* (2013) e Salvador *et al.* (2015). Logo, são necessários estudos que esclareçam os mecanismos responsáveis pelas RAM. Além disso, deve-se avaliar o papel potencial dos metabólitos do BNZ tanto na toxicidade quanto na atividade antiparasitária (PINAZO *et al.*, 2013).

As limitações do presente estudo foram o número de pacientes, visto que alguns não retornaram nas datas marcadas para os atendimentos, impossibilitando as três coletas necessárias (antes do tratamento, 30 dias e 60 dias após o início do tratamento), além disso, a falta de financiamento para a ampliação do estudo.

## 5 CONCLUSÃO

O método analítico de Guerrero *et al.* (2011) modificado mostrou especificidade, seletividade, linearidade e precisão, portanto, adequado para a quantificação do BNZ em soro humano.

Esse método pode ser empregado para monitoramento do BNZ no soro do paciente, em serviços de saúde de países endêmicos, dando maior suporte, principalmente em indivíduos que necessitem de um acompanhamento mais próximo, como pacientes transplantados renais, os quais podem ter sua excreção diferente dos pacientes não transplantados.

A dose de BNZ de 5mg/kg/dia mostrou-se adequada, em todos os pacientes avaliados as concentrações séricas de BNZ estavam abaixo de 20 µg/mL. As concentrações séricas de BNZ não estavam relacionadas com as reações adversas.

## REFERÊNCIAS

- ALTCHEH, J. *et al.* Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.5, p. 1-9, 2014.
- BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop.**, v. 156, p. 1-16, 2016.  
doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26747009
- BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal Of Medicine**, v. 364, n. 26, p.2527-2534, 2011.  
<http://dx.doi.org/10.1056/nejmct1014204>.
- BRASIL. Constituição (2017). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Resolução RDC no - 166, de 24 de Julho de 2017**. 141. ed. BRASIL.
- BUSH, V. Effects of Pre-analytical Variables in Therapeutic Drug Monitoring. In: Therapeutic Drug Monitoring. **Elsevier Inc.**, p. 31–48, 2012.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop.**, v. 44p. 29-37, 2002.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 2006, p. 471–479, 2006.

COSTA, A.C. *et al.* Satisfação dos pacientes com doença de Chagas atendidos por um serviço de atenção farmacêutica no estado do Ceará, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva [online]**, v. 23, n. 5, p. 1483-1494, 2018.

DIAS, J. C. P *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2016. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 1, 2016.

FERNANDES, S.T; TEIXEIRA, M.N; SANTOS, E.S. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento nas dosagens bioquímicas de uréia e creatinina em soro ou plasma caninos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.6, p.648-651, 2001.

FONTELES, M.F.F. *et al.* Reações adversas causadas por fármacos que atuam no sistema nervoso: análise de registros de um centro de farmacovigilância do Brasil. **Rev Psiq Clín.** v. 36, n.4, p.137-44, 2009.

FRADE, V.P. *et al.* Ideal benznidazole dose regimen in chronic chagasic patients: a systematic review. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 62, n. 52, p. 1-13, 2020.

GARCIA-BOURNISSEN, F. *et al.* Pediatric clinical pharmacology studies in Chagas disease. **Pediatr Drugs**, v. 11, p, 33–37, 2012.

GROSS, A.S. Best practice in therapeutic drug monitoring. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 52, p. 5S–10S, 2001.

GUERRERO, L, *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 49, p. 77–82, 2011.

JANNIN, J; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, p. 95-97, 2007.

JEHL, F; GALLION, C; MONTEIL, H. High-performance liquid chromatography of antibiotics. **J Chromatogr.**, v. 531, p. 509–49, 1990.

KRATZ, J.M *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease, **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.  
DOI: 10.1080/17512433.2018.1509704

LANGE, L.A. *et al.* Avaliação da qualidade e da estabilidade de amostras de soro humano para análise e armazenamento em biorrepositório. **Rev. bras. anal. clin.**, v.50, n.1, p.50-56, 2018.

MENEZES, C. *et al.* Clinical aspects of Chagas Disease and implications for novel Therapies. **Drug Dev. Res.** v. 72, n. 6, p. 471-479, 2011.

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother**, v.61, p. 01912-16, 2017.  
doi: 10.1128/AAC.01912-16.

MORILLA, M.J, *et al.* Liposomal Benznidazole: A High-Performance Liquid Chromatographic Determination for Biodistribution Studies. **J. Cromatogr. Sci.**, v. 41, p. 405–409, 2003.

MORILLO, C. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic T. Cruzi carriers: the STOPCHAGAS Trial. **J Am Coll Cardiol.**, v. 69, p. 939-47, 2017.

MORILLO, C. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic T. Cruzi carriers: the STOPCHAGAS Trial. **J Am Coll Cardiol.**, v. 69, p. 939-47, 2017.

MORILLO, C.A, *et al.* BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med.**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, Oct., 2015.

OELLERICH, M. *et al.* Therapeutic Drug Monitoring - Clinical Guide. **Abbott Pharm.**, p. 349–72, 2012.

OLIVEIRA, F.S *et al.* Efeito do congelamento e do tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cordeiros na determinação de parâmetros bioquímicos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 717-722, 2011.

PINAZO, M.J *et al.* Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, p. 4896–4899, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00537-10>.

PINAZO, M.J *et al.* Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 57, n. 1, p. 390-395 2013.

PONTES, V.M.O, *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benznidazol, no Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 182-187, 2010.

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p. 1611-1614, 1979.

ROBERTS, J.A. *et al.* Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 73, n.1, p. 27–36, 2011.

SALVADOR, F. *et al.* Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with Chagas disease. **Clin Infect Dis.** v. 61, n.11, p.1688-94, Dec.,2015. doi: 10.1093/cid/civ690.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p.441-449, 2003.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo. **Moléstia de Chagas.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. 248 p.

SKOOG, D; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. Principios de Análisis Instrumental, 5th ed. Madrid (Spain): The McGraw- Hill Company; 2001. MEYER, V. **Practical high-performance liquid chromatography**, Switzerland: John Wiley & Sons, v. 4; 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL (Brasil). **COLETA DE SANGUE VENOSO.** 2. ed. Barueri: Manole Ltda, 2010. 130 p.

Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2022.

SOEIRO, M.N.C *et al.* Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p. 301 – 310, 2009.

SOSA-ESTANI S, SEGURA, E.L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Curr Opin Infect Dis.**, v.19, p. 583–587, 2006.  
doi: 10.1097/01.qco.0000247592.21295.a5.

SOY, D. *et al.* Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with chagas disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 6, p. 3342-3349, 2015.

TORRICO, F. *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1129-1140, 2021.

VIOTTI, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.7, p. 157-163, 2009.

WALTON, M.I, WORKMAN, P. Método cromatográfico líquido de alta performance de fase reversa para a determinação simultânea do 2- nitroimidazol benznidazol e seu metabólito amina em materiais biológicos. **J Chromatogr.**, v. 375, p. 190-6, 1986.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2016.  
Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

WIENS, M.O. *et al.* Systematic Review and Meta-analysis of the Pharmacokinetics of Benznidazole in the Treatment of Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, n. 12, p. 7035-7042, 2016. doi:10.1128/AAC.01567-16

WORKMAN, P. *et al.* Farmacocinética pré-clínica do benzonidazol. **Br J Câncer**, v. 50, p. 291-03, 1984.

**ARTIGO 3 - IFN- $\gamma$  E POLIMORFISMO DE FATORES REGULADORES DE INTERFERON COMO INFLUÊNCIA NAS FORMAS DA DOENÇA DE CHAGAS, NO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL E NO DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES ADVERSAS**

**IFN- $\gamma$  AND POLYMORPHISM OF INTERFERON REGULATORY FACTORS AS AN INFLUENCE IN THE FORMS OF CHAGAS DISEASE, IN BENZNIDAZOLE TREATMENT AND IN THE DEVELOPMENT OF ADVERSE REACTIONS**

**RESUMO**

**Introdução:** O Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina pró-inflamatória fundamental na resposta imunológica ao *Trypanosoma cruzi*, podendo influenciar nas formas sintomáticas da doença de Chagas (DC). Algumas evidências sugerem que o IFN- $\gamma$  pode potencializar o efeito tripanocida do benznidazol (BNZ). O IFN- $\gamma$  regula a expressão gênica dos Fatores Reguladores de Interferon (IRF), estes, regulam respostas imunes contra microorganismos. O IRF8 e o IRF1 são reguladores transcricionais que desempenham papéis críticos na ativação de macrófagos que são células fundamentais na imunidade contra o *T. cruzi*. Não se sabe a influência de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) nesses genes, mas acredita-se que possa levar a uma maior suscetibilidade a infecções virais, bacterianas e parasitárias. **Objetivo:** Investigar se IFN- $\gamma$  tem relação com as reações adversas (RAM) induzidas por BNZ e se os níveis IFN- $\gamma$ , SNP em IRF teria alguma relação com as formas da DC. **Metodologia:** Estudo de coorte prospectivo realizado no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2021. Concentrações de IFN- $\gamma$  foram determinadas no soro por ELISA e a frequência de polimorfismos nos genes dos IRF, IRF1 e IRF8, foram realizadas através da qPCR. **Resultados:** Níveis séricos de IFN- $\gamma$  estavam mais elevados nos pacientes com a forma digestiva e naqueles com a forma cardíaca durante e após tratamento com BNZ. Os níveis séricos de IFN- $\gamma$  estavam mais elevados dentre os pacientes que apresentaram RAM. Verificou-se que os pacientes com comorbidades e valores mais altos de IFN- $\gamma$  têm 1,25 vezes mais chances de desenvolver RAM. Não foi observada diferença entre as frequências das formas da DC quanto ao polimorfismo do gene IRF1. O genótipo selvagem de IRF8 apresentou níveis mais baixos de IFN- $\gamma$ . Os resultados sugerem que a forma indeterminada da doença está mais relacionada a indivíduos sem polimorfismos (gene selvagem) para IRF8. **Conclusão:** Mecanismos que favorecem a predisposição a uma determinada forma clínica da DC ou no aparecimento das reações adversas ao BNZ são desconhecidos. Os resultados abrem sugestões para estudos clínicos que avaliem frequências de polimorfismos genéticos e as concentrações de citocinas nos diferentes estágios da DC.

**Palavras-chave:** Interferon gama, Polimorfismo de nucleotídeo único, *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) is a fundamental pro-inflammatory cytokine in the immune response to *Trypanosoma cruzi*, which may influence the symptomatic forms of Chagas disease (CD). Some evidence suggests that IFN- $\gamma$  may potentiate the trypanocidal effect of benznidazole (BNZ). IFN- $\gamma$  regulates the gene expression of Interferon Regulating Factors (IRF), which regulate immune responses against microorganisms. IRF8 and IRF1 are transcriptional regulators that play critical roles in the activation of macrophages that are key cells in immunity against *T. cruzi*. The influence of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) on these genes is unknown, but it is believed that it may lead to increased susceptibility to viral, bacterial and parasitic infections. **Objective:** To investigate whether IFN- $\gamma$  is related to adverse drug reactions (ADR) induced by BNZ and whether IFN- $\gamma$ , SNP levels in IRF would be related to the forms of CD. **Methodology:** Prospective cohort study carried out from January 2018 to December 2021. IFN- $\gamma$  concentrations were determined in serum by ELISA and the frequency of polymorphisms in the genes of interferon regulatory factors (IRF), IRF1 and IRF8, were performed using the real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. **Results:** Serum levels of IFN- $\gamma$  were the highest in patients with the digestive form and in those with the cardiac form during and after treatment with BNZ. They were also the highest among patients who had ADR. Patients with comorbidities and the highest IFN- $\gamma$  values are 1.25 times more likely to develop ADR. No difference was observed between the frequencies of the forms of CD regarding the polymorphism of the IRF1 gene. The wild-type IRF8 genotype showed the lowest levels of IFN- $\gamma$ . The results suggest that the indeterminate form of the disease is more related to individuals without polymorphisms (wild gene) for IRF8. **Conclusion:** Mechanisms that favor the predisposition to a specific clinical form of CD or the appearance of adverse drug reactions to BNZ are unknown. The results open suggestions for clinical studies that evaluate the frequencies of genetic polymorphisms and the concentrations of cytokines in the different stages of CD.

**Keywords:** Interferon gamma, Single nucleotide polymorphism, *Trypanosoma cruzi*

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é ocasionada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, tendo sido descrita pela primeira vez em 1909. Após mais de 100 anos, esta enfermidade ocupa lugar de destaque dentre as doenças endêmicas, pelo grau de morbidade e letalidade bem como pelo custo econômico e social que representa (WHO, 2016). Estima-se que 6 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas nas Américas e mais de 10 mil pessoas morrem a cada ano em consequência de complicações clínicas da doença de Chagas (OPAS, 2021).

A DC é caracterizada por duas fases distintas: aguda e crônica. Geralmente, a fase aguda é assintomática, sendo que, apenas 2 a 10% dos indivíduos infectados apresentam sintomas (RASSI *et al.*, 2000). A forma crônica apresenta quatro formas distintas como a forma indeterminada, cardíaca, digestiva e mista (DIAS *et al.*, 2016).

Na forma indeterminada o indivíduo é assintomático, contudo apresenta exame sorológico positivo. A forma cardíaca é a mais grave, responsável por elevada morbimortalidade. Nessa forma, o paciente pode manifestar arritmias ventriculares complexas em associação com distúrbios da formação e condução do estímulo elétrico atrioventricular e intraventricular, elevada incidência de morte súbita e de fenômenos tromboembólicos, além de disfunção ventricular direita e aneurismas ventriculares. O esôfago e intestino grosso são acometidos na forma digestiva da doença, levando ao aparecimento de megaesôfago e megacólon, causando disfagia e constipação (DIAS *et al.*, 2016).

A resposta imune do hospedeiro consegue controlar o parasitismo pelo *Trypanosoma cruzi*, mas não consegue debelar a infecção. O hospedeiro desenvolve e mantém uma longa resposta celular e humoral contra o patógeno (SATHLER-AVELAR, 2008). Esse controle ocorre, principalmente, pela ação das células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos). Essas células possuem um papel fundamental no controle da infecção, pois quando ativadas por linfócitos T CD4+, exercem ação microbicida produzindo interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (COHN, 1978; NOGUEIRA *et al.*, 1982; MATOS *et al.*, 2022). A citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  tem um papel fundamental na resposta imunológica contra ao *T. cruzi*, porém, também desempenha um papel patogênico central na miocardite e insuficiência cardíaca em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (EHRT *et al.*, 2001; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; LEVICK AND GOLDSPINK, 2014).

Para o tratamento da DC, os medicamentos existentes são o Nifurtimox e o Benznidazol (BNZ) (PONTES *et al.*, 2010). O mecanismo pelo qual o BNZ atua na resposta

imune do indivíduo infectado pela DC ainda não está esclarecido, porém, estudo realizado por Bahia-Oliveira *et al.*, (1998) demonstrou que o BNZ ocasionou uma maior produção de IFN- $\gamma$  pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em pacientes tratados na fase aguda e curados (exames parasitológicos e sorológicos), porém, nos pacientes cronicamente infectados isso não foi observado. Logo, algumas evidências sugerem que os elevados níveis de IFN- $\gamma$  atuam de forma sinérgica com o quimioterápico durante o tratamento, ou seja, IFN- $\gamma$  pode potencializar o efeito tripanocida do BNZ (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998).

O IFN- $\gamma$  regula a expressão gênica dos Fatores Reguladores de Interferon (IRF). A família dos IRF consiste em nove membros que conseguem se ligar a uma sequência homóloga do gene do interferon- $\beta$  e vários genes regulados pelo interferon- $\gamma$ , regulando respostas imunes, principalmente contra antígenos virais, resultando na ativação da defesa adaptativa (MAMANE *et al.*, 1999; TANIGUCHI *et al.*, 2001; TAKAOKA *et al.*, 2008; NEHYBA *et al.*, 2009).

O IRF8 e o IRF1 são reguladores transcricionais que desempenham papéis críticos na ativação de macrófagos por sinais pró-inflamatórios como o IFN- $\gamma$ . O IRF8 tem como função promover a diferenciação de células mieloides progenitoras para as linhagens de fagócitos mononucleares como monócitos, macrófagos e células dendríticas, agindo como um antagonista da via de granulócitos polimorfonucleares. Já o IRF1 tem importante papel durante o processo de diferenciação de células mieloides.

A perda das funções dos genes IRF1 ou IRF8 ocasionada, por exemplo, por um Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) poderia causar uma desregulação de fatores de transcrição que são determinantes para o desenvolvimento de células mieloides e bloqueio da diferenciação granulocítica, além de deixar o indivíduo susceptível a infecções (ABDOLLAHI *et al.*, 1991; TAMURA *et al.*, 2000; TESTA *et al.*, 2004; KUROTAKI *et al.*, 2014; SALEM *et al.*, 2014).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são o tipo mais comum de variação genética que podem afetar ou não a sequência de uma proteína. Neste tipo de variação genética, uma única base nucleotídica é substituída ao longo de uma sequência de DNA (PASTERNAK, 2005). Não é conhecido ainda como SNP em genes IRFs podem influenciar na resposta contra o *T. cruzi*.

O gene IRF1 está localizado no cromossomo 5q31.1, na posição 132483434. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que foi avaliado (rs 839) surge devido a substituição de adenina (A) por uma guanina (G). Assim, nomea-se o gene selvagem de AA, o heterozigoto AG e GA e o gene polimorfo de GG. Já o gene IRF8 está localizado no

cromossomo 16q24.1, na posição 85921636. O SNP avaliado (rs10514611) surge devido à substituição de citosina (C) por uma timina (T). Assim, nomea-se o gene selvagem de CC, o heterozigoto CT e TC e o gene polimorfo de TT (LEE *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2012).

Alterações nos níveis de citocinas podem ocorrer durante o tratamento com BNZ e polimorfismos em genes de citocinas podem estar associados ao desenvolvimento das formas da doença de Chagas em humanos (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Apesar dos elevados níveis de IFN- $\gamma$  estarem associados a cura na fase aguda da DC, eles também estão relacionados com as formas clínicas mais graves da doença (GOMES *et al.*, 2003).

O presente estudo buscou avaliar a relação entre os níveis de IFN-  $\gamma$  com as reações adversas ao BNZ, com a forma da doença e a presença de comorbidades, além disso, buscou-se identificar a influência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) dos genes IRF1 e IRF8 na resposta mediada por IFN-  $\gamma$  e nas formas clínicas da DC.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Delineamento, população do estudo, critérios de inclusão e exclusão**

Trata-se de um estudo do tipo coorte prospectivo de pacientes com DC em tratamento com benznidazol realizado no serviço de referência em Atenção Farmacêutica do Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas (LPDC) da Universidade Federal do Ceará no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2021.

Foram incluídos no estudo pacientes com idade igual ou superior a 18 anos que chegaram ao LPDC com diagnóstico confirmado para doença de Chagas (exames sorológicos reagentes por duas metodologias diferentes) e com prescrição de benznidazol. Foram excluídos os pacientes com tratamento prévio para a doença de Chagas, gravidez, qualquer tipo de imunossupressão, comorbidades como doenças hepáticas ou renais e pacientes que não compareceram a pelo menos uma consulta farmacêutica durante o tratamento.

### **2.2 População do estudo**

Foram avaliados 37 pacientes, destes 51,3 % (n=19) eram do sexo masculino e 48,7% (n=18) eram do sexo feminino com média de idade de  $54,55 \pm 10,05$  anos com DC crônica nas formas indeterminada (n=18), cardíaca (n=15) e digestiva (n=4). O acompanhamento dos pacientes em tratamento e avaliação das reações adversas foi realizado na metade e no final do tratamento, em média de 30 e 60 dias após o início da terapia com

BNZ. Durante todo o tratamento, além do acompanhamento farmacêutico do LPDC os pacientes também receberam acompanhamento médico pelo ambulatório de Cardiologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. Ao identificar as reações adversas, o farmacêutico do serviço encaminhava o paciente ao médico prescritor para realizar as devidas intervenções como suspensão do tratamento com BNZ e a prescrição de medicamentos de acordo com o tipo de reação apresentada.

### **2.3 Mensuração da citocina Interferon (IFN- $\gamma$ ) no soro**

As amostras de sangue coletadas dos pacientes em todos os atendimentos foram centrifugadas para obtenção do soro e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio. As concentrações de IFN- $\gamma$  foram determinadas no soro utilizando imunoensaio por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Kit BD OptEIA™ Set Human IFN- $\gamma$ , número do catálogo 555142, fabricante BD Biosciences Pharmingen.

### **2.4 Identificação dos polimorfismos nos genes Fator Regulador de Interferon (IRF)**

#### ***2.4.1 Processamento da amostra***

Amostras de sangue total foram coletadas em tubos com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*). Após centrifugação, o plasma foi removido e descartado e ao sedimento foi adicionado 1 ml da solução de lise (Bicarbonato de amônio + Cloreto de amônio) e transferido para um tubo de fundo cônico contendo 24 mL da solução de lise. Essa solução foi colocada em banho de gelo por 15 minutos. Após esse tempo, a solução foi submetida a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 250 $\mu\text{l}$  de PBS (Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*) e 750 $\mu\text{l}$  de trizol e transferido para um microtubo e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### ***2.4.2 Extração do DNA***

A extração de DNA das amostras processadas e armazenadas dos pacientes com DC e dos controles (20 doadores voluntários de sangue, saudáveis, selecionados aleatoriamente) foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo pelo fabricante.

A primeira etapa foi a adição de clorofórmio (remoção das proteínas) na amostra e submetido a centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. Retirou-se e descartou-se a fase aquosa superior com auxílio de pipeta. Adicionou-se na fase orgânica + 500µL de BEB (*Back Extraction Buffer* - 4M isotiocianato de guanidina + 50mM citrato de sódio di-hidratado pH 8,5 + 1M Tris-HCL pH 8,0) e homogeneizado por 1 minuto no vórtex. Em seguida, a amostra foi incubada por 30 min a 25°C sob agitação constante. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Para precipitação do DNA, após a centrifugação acima, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 400 µL de isopropanol e homogeneizado por inversão. Após essa etapa a amostra foi incubada a -20°C *overnight*. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet (DNA) formado foi lavado duas vezes com 100 µL etanol (70%) e centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, essa etapa foi repetida quatro vezes. Após descartar o sobrenadante, para secar o pellet, o tubo foi invertido e o excesso de álcool foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta de 20 µL. Ao pellet totalmente seco, foi diluído 15 µL de Tris EDTA (TE) pH 8,0 e deixada à temperatura ambiente durante 30 minutos para hidratar, depois incubação em banho maria a 50°C por 10 minutos e refrigerada (2-8 °C) durante 2 dias.

A pureza das amostras foi analisada em espectrofotômetro de microvolumes (nanodrop, Thermo Scientific – Suécia), analisando a relação DNA/ proteínas através da razão de absorbâncias a 260/280 nm; a amostra é considerada pura quando apresenta uma razão entre 1,7 e 2,0. Após esse processo as amostras do presente estudo foram consideradas adequadas.

#### **2.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real**

Para a genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) foi utilizado o TaqMan da *Applied Biosystems* que usa a sonda TaqMan 5'-nuclease para amplificar e detectar polimorfismos específicos em amostras de DNA genômico purificado. Cada ensaio permite a genotipagem de indivíduos para um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e consiste em dois primers específicos de sequência e duas sondas TaqMan ligante de sulco menor (MGB) com *quenchers* não fluorescentes (NFQ).

A sonda TaqMan é conjugada com marcadores fluorescentes VIC® (verde) e FAM™ (azul), que detectam o polimorfismo no gene promotor do IRF1 (rs839) e IRF8

(rs10514611). As sondas TaqMan consistem em oligonucleotídeos específicos do alvo com: Um corante repórter é ligado à extremidade 5' de cada sonda: – Corante VIC® para a sonda do alelo 1 – Corante FAM™ para a sonda do alelo 2. Para o gene IRF1 nomea-se o gene selvagem de AA, o heterozigoto AG e GA e o gene polimorfo de GG e para o gene IRF8 se o gene selvagem de CC, o heterozigoto CT e TC e o gene polimorfo de TT.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi realizada no aparelho *CFX96 Real Time PCR System (C1000 Touch – Thermal Cycler – Bio-Rad)*. As reações foram realizadas em duplicata, utilizando sondas TaqMan (*minor groove binder - MGB*). O volume final de cada reação foi de 10µl, sendo 5 µL de *Taqman Mastermix* (enzima polimerase, MgCl<sub>2</sub>, fosfato, desoxirribose e bases nitrogenadas, tampão), 0,25µl de primer (*Taqman genotyping assay mix*), 2,75 µL de água livre de DNase e 2 µL da amostra de DNA purificada. As condições de termociclagem compreendem 4 etapas: etapa de pré-aquecimento a 50° C por 2 minutos, etapa de condicionamento a 95° C por 10 minutos, etapa de desnaturação a 95° C por 15 segundos e a etapa de anelamento e extensão a 60° C por 1 minuto. Foram realizados 40 ciclos, sendo as etapas de desnaturação, anelamento e extensão repetida 40 vezes.

O grupo controle utilizado para análise do polimorfismo dos genes IRF1 e IRF8 foi composto por 20 doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) saudáveis, selecionados aleatoriamente.

## 2.5 Análise estatística

As variáveis do estudo foram níveis de IFN-γ, reações adversas ao BNZ, concentração de BNZ no soro, formas da doença de Chagas, comorbidades, polimorfismos dos genes IRF 1 e IRF8. Os dados foram analisados utilizando o programa *Graphpad Prism* versão 6.0 e apresentados por meio da média + desvio padrão. A normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação da média entre dois grupos distintos, foi aplicado o teste T de independência. Para comparação de mais de dois grupos foi utilizado *oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey. O comportamento linear entre variáveis foi avaliado através da correlação de Pearson. A regressão logística binária foi aplicada como um modelo que permite a predição de valores tomados por uma variável categórica binária, a partir de uma série de variáveis contínuas e binárias. Distribuições de frequências em variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste de Fisher. Para todas as análises foi considerado  $p < 0,05$ .

## 2.6 Considerações éticas

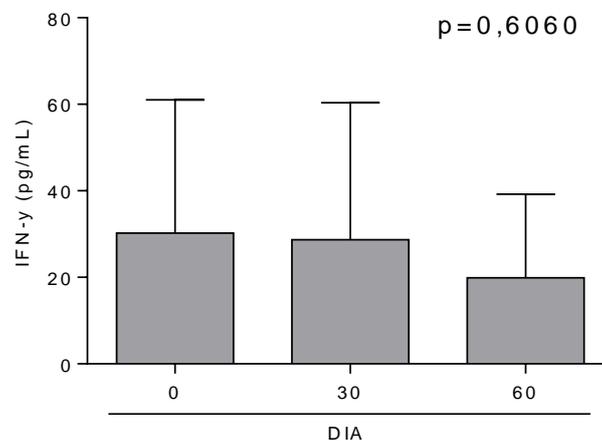
O projeto foi aprovado pelo Comitê do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), de acordo Resolução nº 466/12 do conselho Nacional de Saúde – CNS do Ministério da Saúde, considerando o respeito pela dignidade humana, sob o número de parecer 3.284.027.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Influência do benznidazol nos níveis de IFN- $\gamma$

Inicialmente, foram avaliados os níveis séricos de IFN- $\gamma$  antes do tratamento (Dia 0) com BNZ, 30 dias (Dia 30) e 60 dias (Dia 60) após o início do tratamento para verificar se o medicamento teria influência nos níveis dessa citocina no soro. A análise não mostrou diferença estatística entre os grupos (FIGURA 1).

Figura 1: Níveis séricos de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica, antes e durante o tratamento com Benznidazol (BNZ).



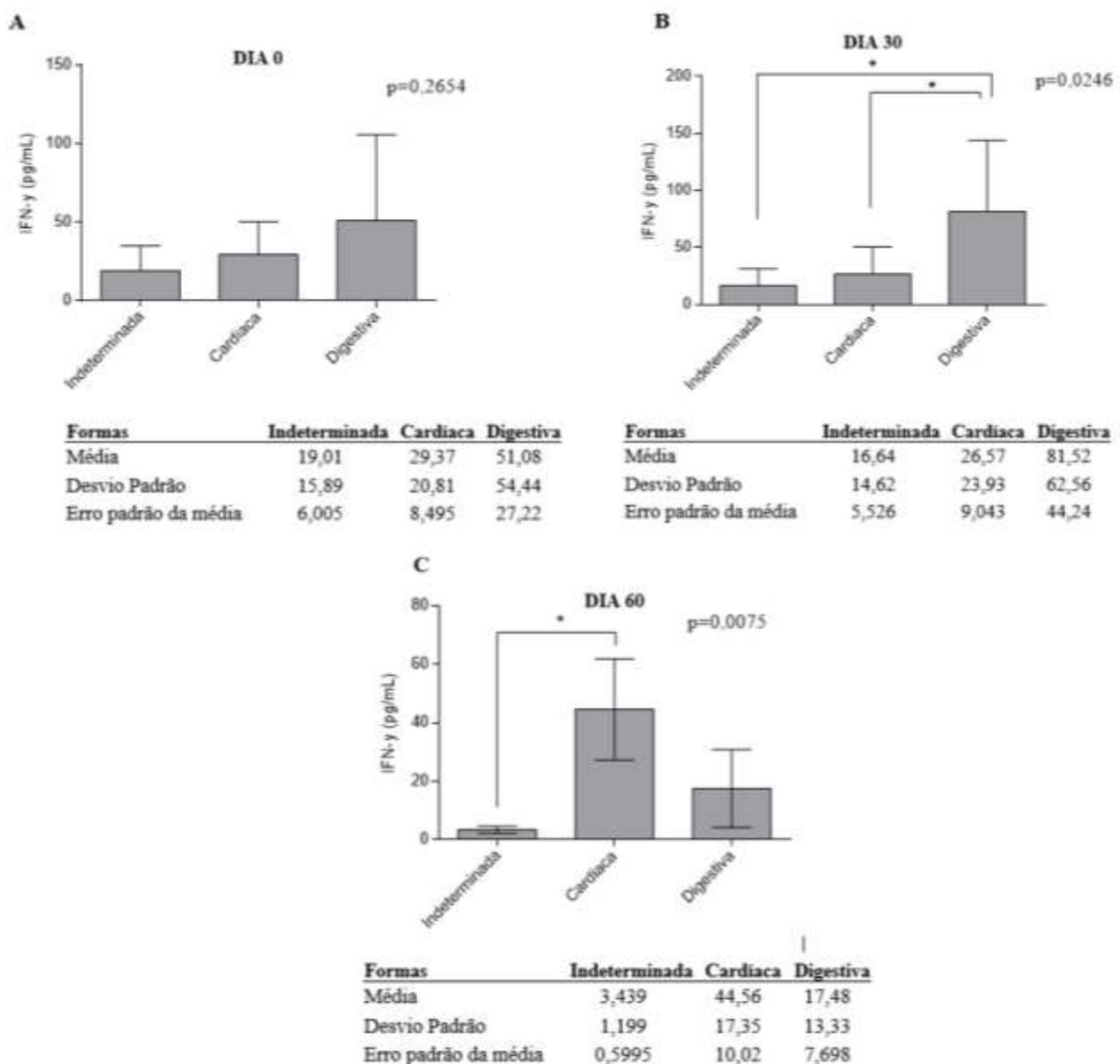
Coleta	1	2	3
Média	30,21	28,69	19,88
Desvio Padrão	30,82	31,69	19,37
Erro Padrão da Média	7,474	7,923	5,591

Legenda: DIA 0 – Antes do tratamento com BNZ; DIA 30 – 30 dias após o início do tratamento; DIA 60 – 60 dias após o início do tratamento.

Quando os pacientes foram classificados de acordo com as formas da doença (indeterminada, cardíaca e digestiva), não foi observada diferença nos níveis séricos de IFN- $\gamma$  antes do tratamento com BNZ; contudo, este perfil alterou-se após o tratamento (FIGURA 2.A).

Após 30 dias do início do tratamento os pacientes na forma digestiva apresentaram níveis mais elevados deste marcador quando comparado aos pacientes com as formas cardíaca ou indeterminada (FIGURA 2.B). Após 60 dias do início do tratamento, os pacientes portadores da forma cardíaca apresentavam níveis de IFN- $\gamma$  maiores que aqueles com a forma indeterminada (FIGURA 2.C).

Figura 2 - Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com doença de Chagas crônica nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva antes do tratamento, 30 dias e 60 dias após o início do tratamento com Benznidazol (BNZ).



Legenda: A: Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva antes do tratamento. Dia 0 – Antes do tratamento com BNZ.

B: Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva 30 dias após o início do tratamento. Dia 30 – 30 dias após o início do tratamento

C: Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva 60 dias após o início do tratamento. Dia 60 – 60 dias após o início do tratamento

\* $p < 0,05$  com base no teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

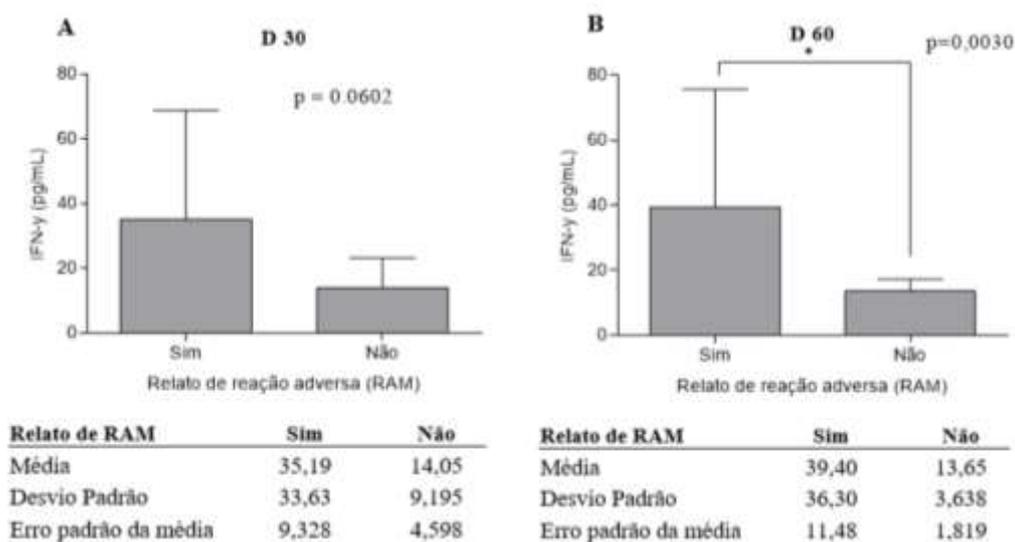
### 3.2 Níveis de IFN- $\gamma$ na presença de reações adversas

Dos pacientes participantes do estudo, 27 (73%) apresentaram reações adversas. Foi investigado se os níveis de IFN- $\gamma$  estariam relacionados à presença das reações adversas induzidas por BNZ. As reações mais frequentes relacionadas ao BNZ foram dermatológicas como prurido (n=15), manchas vermelhas/erupção cutânea (n=15) e descamação da pele (n=8).

Como mostrado na figura 3.A, 30 dias após o início do tratamento os níveis de IFN- $\gamma$  eram semelhantes entre todos os pacientes, e não houve diferença entre os pacientes que relataram reações adversas e os que não relataram ( $p = 0,0602$ ).

Contudo, no D 60, ou seja, 60 dias após o início do tratamento, os níveis de IFN- $\gamma$  se encontravam mais elevados, o que poderia contribuir para uma maior frequência de reações adversas ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 3.B).

Figura 3 - Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com doença de Chagas crônica 30 dias e 60 dias após o início do tratamento com BNZ e que apresentaram reações adversas ao BNZ.



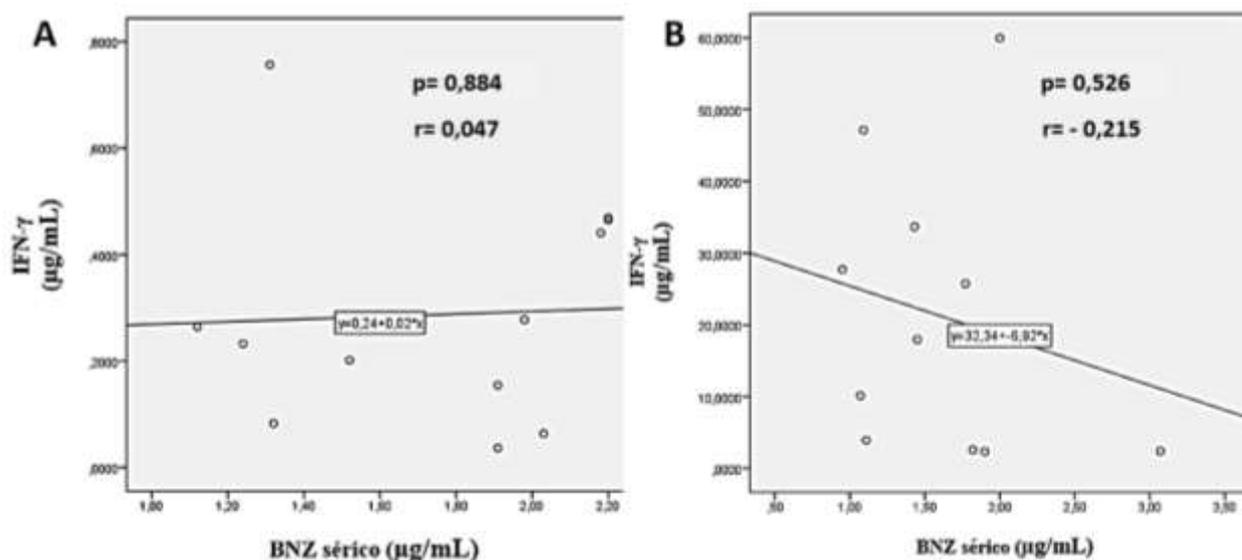
Legenda: A: Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica antes do tratamento e que posteriormente apresentaram reações adversas. D 30 – 30 dias após o início do tratamento.

B: Níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica 30 dias após o início do tratamento e que posteriormente apresentaram reações adversas. D 60 – 60 dias após o início do tratamento.

\* $p < 0,05$  com base no teste T não pareado.

No sentido de relacionar os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e BZN foi feita uma análise estatística de correlação de Pearson, que permitiu mostrar que não existe correlação entre as variáveis de 30 dias ( $p = 0,884$ ) e 60 dias ( $p = 0,526$ ) após o início do tratamento (FIGURA 4).

Figura 4 – Correlação entre as concentrações séricas de BNZ e os níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com doença de Chagas crônica 30 dias e 60 dias após o início do tratamento.



Legenda: r = Correlação de Pearson (coeficiente). A: Correlação entre as concentrações séricas de BNZ e os níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica 30 dias após o início do tratamento. B: Correlação entre as concentrações séricas de BNZ e os níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com DC crônica, 60 dias após o início do tratamento.

No presente estudo, 21 (56,7%) pacientes apresentavam outras comorbidades além da DC como hipertensão arterial, arritmia cardíaca, diabetes e dislipidemia e a presença dessas doenças poderiam influenciar na ocorrência das reações adversas ao BNZ. Através de um teste de regressão logística binária verificou-se que a presença de comorbidades e níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  são indicadores de desenvolvimento de reações adversas ao BNZ. O teste foi significativo ( $p < 0,05$ ), indicando que indivíduos com comorbidades e valores mais

altos de IFN- $\gamma$  têm 1,25 vezes mais chances de desenvolver reações adversas (*Odds ratio* = 1,25) (TABELA 1).

Tabela 1 – Níveis de IFN- $\gamma$ , presença de comorbidades e as chances de apresentar reações adversas ao BNZ em pacientes com DC crônica

<b>Odds ratio</b>	<b>p- value</b>	<b>CI 95%</b>	
1,25	0,045*	0,935	15,918

\* teste de regressão logística binária

Legenda: CI – Intervalo de confiança; Odds ratio – razão de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

### 3.3 Frequência dos polimorfismos dos genes IRF1 e IRF8 nos pacientes com DC crônica

Ao analisarmos a presença de polimorfismo em nucleotídeo único (SNP) nos genes IRF1 (rs839) e IRF8 (rs10514611) nos indivíduos com a doença de Chagas, não mostrou diferença estatística entre as frequências dos grupos quando comparado com os indivíduos sem a DC (controle),  $p = 0,489$  (teste exato de Fisher) para IRF-1 e 0,644 para IRF-8 (TABELA 2).

Tabela 2 – Frequência dos genes selvagem, heterozigoto e polimorfo de IRF1 e IRF8 nos pacientes com DC crônica.

<b>Gene IRF1 (rs839)</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Doença de Chagas (n=37)</b>	<b>Controle (n=20)</b>
AA	16 (43,24%)	12 (60%)
AG ou GA	15 (40,54%)	6 (40%)
GG	6 (16,22%)	2 (10%)
Total	37 (100%)	20 (100%)
*Teste exato de Fisher: $p = 0,489$		
<b>Gene IRF8 (rs10514611)</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Doença de Chagas (n=37)</b>	<b>Controle (n=20)</b>
CC	29 (78,38%)	14 (70%)
CT ou TC	6 (16,22%)	5 (25%)
TT	2 (5,40%)	1 (5%)
Total	37 (100%)	20 (100%)
*Teste exato de Fisher: $p = 0,644$		

Legenda: IRF 1 – Fator Regulador de Interferon 1; IRF 8 - Fator Regulador de Interferon 8; AA – gene selvagem de IRF-1; AG ou GA – gene heterozigoto de IRF-1; GG – gene polimorfo de IRF-1; CC – gene selvagem de IRF-8; CT ou TC – gene heterozigoto de IRF-8; TT – gene polimorfo de IRF-8.

Quando os indivíduos foram estratificados de acordo com as formas clínicas da doença (cardíaca, digestiva e indeterminada), não foi observada diferença entre as frequências dos grupos quanto ao polimorfismo do gene IRF1 ( $p = 0,525$  – teste exato de Fisher). Contudo, os resultados sugerem que a forma indeterminada da doença está mais relacionada a indivíduos sem polimorfismos (gene selvagem) para IRF8 com  $p = 0,014$  (TABELA 3).

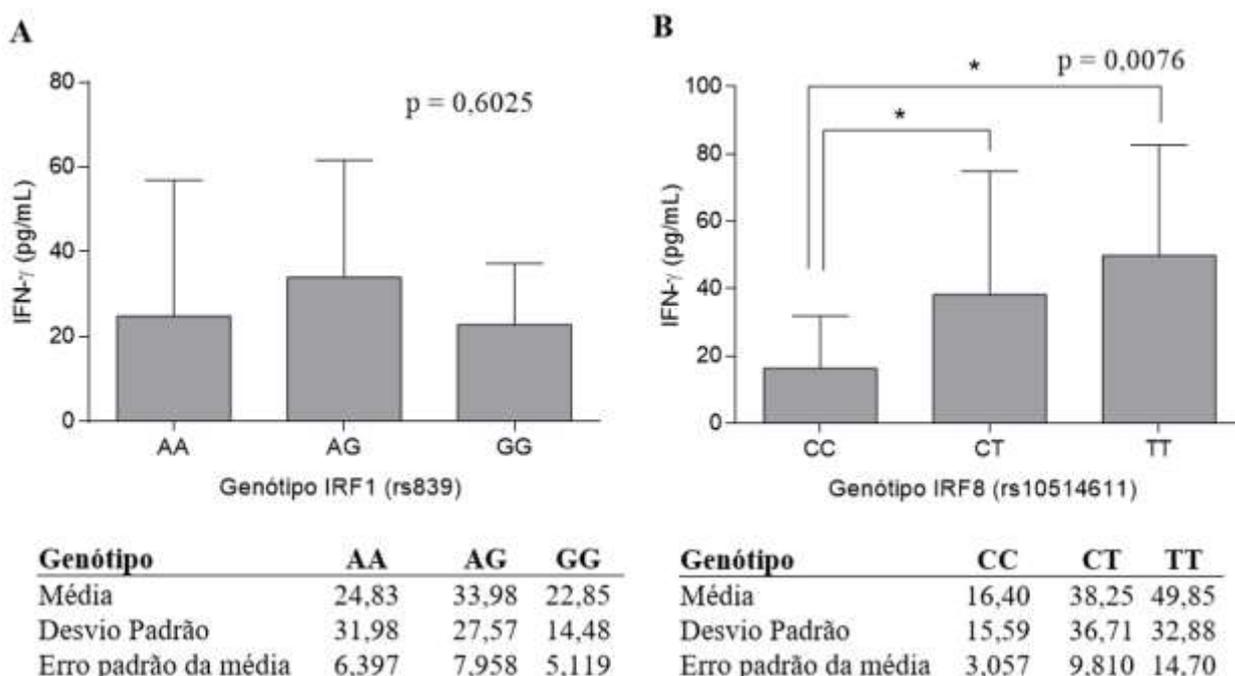
Tabela 3 – Frequência dos genes selvagem, heterozigoto e polimorfo de IRF1 e IRF8 nos pacientes com DC crônica nas formas cardíaca, digestiva e indeterminada (n=37).

<b>IRF1 (rs839)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Cardíaca (n=15)</b>	<b>Digestiva (n=4)</b>	<b>Indeterminada (n=18)</b>
AA	7 (46,67%)	1 (25,00%)	8 (44,44%)
AG ou GA	6 (40,00%)	1 (25,00%)	8 (44,44%)
GG	2 (13,33%)	2 (50,00%)	2 (11,11%)
Total	15 (100%)	4 (100%)	18 (100%)
*Teste exato de Fisher: $p = 0,525$			
<b>IRF8 (rs10514611)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Cardíaca (n=15)</b>	<b>Digestiva (n=4)</b>	<b>Indeterminada (n=18)</b>
CC	10 (73,33%)	2 (50,00%)	18 (88,89%)
CT ou TC	3 (20,00%)	1 (25,00%)	0 (11,11%)
TT	2 (6,67%)	1 (25,00%)	0
Total	15 (100%)	4 (100%)	18 (100%)
*Teste exato de Fisher: $p = 0,014$			

Legenda: IRF 1 – Fator Regulador de Interferon 1; IRF 8 - Fator Regulador de Interferon 8; AA – gene selvagem de IRF-1; AG ou GA – gene heterozigoto de IRF-1; GG – gene polimorfo de IRF-1; CC – gene selvagem de IRF-8; CT ou TC – gene heterozigoto de IRF-8; TT – gene polimorfo de IRF-8.

No sentido de se avaliar como os polimorfismos do IRF interferiram na expressão de IFN- $\gamma$ , pode-se perceber que para o polimorfismo rs10514611 do IRF8, o genótipo selvagem (CC) apresentou níveis séricos mais baixos da citocina em comparação com os demais genótipos (FIGURA 5.B). Contudo, não houve diferença entre os grupos para o polimorfismo rs839 da IRF1 (FIGURA 5.A).

Figura 5 - Avaliação dos polimorfismos do IRF (IRF 1 e IRF 8) com a expressão de IFN- $\gamma$  em indivíduos com doença de Chagas crônica em tratamento com BNZ (n=37).



Legenda: A: AA: Gene selvagem de rs839, AG: Gene heterozigoto de rs839 e GG: Gene polimorfo de rs839;

B: CC: Gene selvagem de rs10514611, CT: Gene heterozigoto de rs10514611; TT: Gene polimorfo de rs10514611.

\*p<0,05 com base no teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey

#### 4 DISCUSSÃO

Existem poucos estudos que avaliam o efeito do tratamento com BNZ na resposta imune em indivíduos com a doença de Chagas na fase crônica. Mas sabe-se que esse medicamento pode adiar ou prevenir a progressão clínica da doença em humanos e modelos experimentais (DE ANDRADE *et al.*, 1996, SOSA-ESTANI *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2005). E os efeitos do fármaco somado com a resposta imunológica do hospedeiro

influenciam na eliminação do *T. cruzi* e no controle da morbidade da doença (MICHAILOWSKY *et al.*, 1998; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2006).

Ribeiro *et al.* (2008) verificaram uma maior produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes com a forma digestiva em relação aos indivíduos com a forma indeterminada, diferente do que foi observado no presente estudo. As alterações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas de acometimento cardíaco ou digestivo podem estar envolvidas com uma resposta mediada por IFN- $\gamma$ . É importante ressaltar que, quando se analisa as concentrações de citocinas no soro humano devemos considerar a possibilidade da contribuição por outros processos inflamatórios do organismo (PISSETTI *et al.*, 2009).

Um estudo avaliou os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas diferentes formas da DC e não observou diferença nos níveis dessas citocinas quando comparados com o grupo controle (indivíduos sem a DC), contudo, como observado no presente estudo, deve-se considerar o uso do BNZ na análise, uma vez que antes da administração do medicamento não foi observada diferença entre as formas da DC com relação aos níveis de IFN- $\gamma$  (PISSETTI *et al.*, 2009).

Alguns estudos mostraram que o BNZ está relacionado a um *down-regulation* na expressão média de citocinas como níveis mais baixos de IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  em pacientes tratados em comparação com os não tratados, levantando a hipótese que o tratamento durante a fase crônica pode ter um impacto de suporte, modulando o perfil de citocinas inflamatórias de pacientes na forma indeterminada da doença, reduzindo as chances de uma evolução para a forma cardíaca (REVELLI *et al.*, 1999; PIAGGIO *et al.*, 2001; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2006; BUSTAMANTE *et al.*, 2008; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2012).

O aumento de IFN- $\gamma$  após o tratamento com BNZ pode ser explicado pelo fato de que o medicamento causa a morte do *T. cruzi*, liberando antígenos que podem estimular a expansão clonal de células produtoras de IFN- $\gamma$  e resultar no seu aumento, podendo ser mantidas por antígenos parasitários residuais (SATHLER-AVELAR *et al.* 2006; LAUCELLA *et al.*, 2009).

Laucella *et al.*, (2009) verificaram em seu estudo um aumento inicial de IFN- $\gamma$  após 2 meses até 6 meses do tratamento com BNZ, seguido de uma diminuição nos níveis dessa citocina após 12 meses do tratamento. Verificaram através desse monitoramento da produção de IFN- $\gamma$  antes e após o tratamento com BNZ, em um subconjunto de indivíduos, que o tratamento com esse fármaco tem um impacto nas respostas de células T específicas ao parasito, observaram respostas relativamente estáveis antes do tratamento, seguidas por grandes reduções em 12 a 36 meses pós-tratamento.

O tratamento com BNZ durante a fase crônica pode induzir simultaneamente citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e anti-inflamatórias como IL-10, indicando um efeito no controle da replicação do parasito e também dano tecidual (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2008).

No estudo de Bahia-Oliveira *et al.* (1998), indivíduos com a DC na forma aguda tratados com BNZ e curados mostraram uma maior produção de IFN- $\gamma$  que os pacientes crônicos sem tratamento com esse medicamento, sugerindo um papel protetor para essa citocina no processo de cura da DC associada ao tratamento com BNZ. Foi demonstrado que o tratamento de pacientes na forma indeterminada, no início da fase crônica, leva à produção de IFN- $\gamma$ , porém isso não foi observado nos pacientes da presente pesquisa, provavelmente, porque os pacientes não estavam no início da fase crônica da doença.

No presente estudo, os níveis de IFN- $\gamma$  após 60 dias do início do tratamento com BNZ estavam aumentados nos indivíduos com a forma cardíaca. Alguns autores sugerem que o paciente na forma cardíaca tem uma tendência a produzir mais IFN- $\gamma$ , comparado com os pacientes na forma indeterminada, sob estimulação com antígenos do parasito (GOMES *et al.*, 2003; SILVERIO *et al.*, 2012).

O IFN- $\gamma$  tem um papel fundamental na inflamação crônica da DC, atuando como estimulador de macrófago. Macrófagos ativados secretam as citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  que são fundamentais na indução de uma resposta celular específica. IL-12 secretada é capaz de induzir as células Natural Killer a secretarem IFN- $\gamma$  que, em sinergismo com TNF- $\alpha$ , resulta em uma produção significativa de óxido nítrico (NO) capaz de efetuar a morte do parasito através do estresse oxidativo. Além disso, a IL-12 pode também desencadear a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> com perfil Th1, a produzir níveis ainda maiores de IFN- $\gamma$  para controlar a infecção, enquanto isso a IL-10 desempenha um papel de modulação da síntese de IL-12 e IFN- $\gamma$ , evitando desta maneira uma excessiva resposta imune que poderia causar uma intensa e extensa inflamação e dano aos tecidos do hospedeiro (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2008).

Concentrações mais elevadas de IFN- $\gamma$  foram associadas à eficácia terapêutica (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000). Então, além de destruir o parasito através da formação de radicais livres, modula resposta imune do hospedeiro estimulando altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Este fato pode explicar a provável eficácia do BNZ em prevenir e/ou retardar a progressão da doença, causando uma estabilidade, uma vez que a resposta imune do hospedeiro pode influenciar nessa evolução.

Elevado percentual de pacientes apresentou reações adversas e altos níveis de IFN- $\gamma$ . Sabe-se que, como consequência da formação de radicais livres resultantes do

mecanismo de ação do BNZ, células do hospedeiro também podem ser lesadas, levando ao surgimento de reações adversas. São relatadas em adultos tratados com BNZ sérias reações adversas, incluindo dermatopatia alérgica, manifestações gástricas, neuropatia periférica, neutropenia e leucopenia (COLOSIO *et al.*, 2007). Dessa forma, podemos sugerir que níveis mais altos de IFN- $\gamma$  poderiam contribuir para uma maior frequência de reações adversas.

Acredita-se que as reações cutâneas ao BNZ sejam produzidas por reações de hipersensibilidade tardia ou tipo IV com resposta Th2 (SALVADOR *et al.*, 2015), as quais são mediadas por linfócitos T e podem ocorrer dias após o início do tratamento. As reações que afetam principalmente a pele, devem-se a riqueza em linfócitos T e células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas presente na pele. Esse tipo de hipersensibilidade pode ocasionar erupção cutânea exantemática, lesão hepática induzida por drogas e doenças renais, pustulose exantemática generalizada aguda e reações mais graves como reação cutânea associada a eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS), síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) e necrólise epidérmica tóxica (NET) (REGATEIRO E FARIA, 2016).

No presente estudo foi observado um aumento de IFN- $\gamma$ , o que fortalece a hipótese de que se trata de uma reação de hipersensibilidade apresentando perfil Th1 predominante. Contudo, existem contradições entre os estudos com relação ao perfil de citocinas nas reações de hipersensibilidade não imediatas. Autores abordam que o perfil Th2 está ativado diante das reações cutâneas (SALVADOR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016, LLAGUNO *et al.*, 2019) e outros abordam a presença de um perfil Th1 de células T (XU *et al.*, 1996; TRUBIANO *et al.*, 2018; KLAEWSONGKRAM *et al.* 2019), logo, é possível que o padrão de citocinas em reações de hipersensibilidade não imediatas seja um perfil misto Th1 e Th2 (LEBREC *et al.*, 2001).

A citocina IFN- $\gamma$  desempenha um papel central na reação inflamatória cutânea (XU *et al.*, 1996). Diante de uma reação alérgica a fármacos, podem ser detectadas células T circulantes produtoras de IFN- $\gamma$  e conseqüentemente, um aumento nesta citocina. Estudo realizado por Klaewsongkram *et al.* (2019) propôs que a quantificação de células produtoras de IFN- $\gamma$  poderia funcionar como uma ferramenta para confirmar os fármacos causadores de reações adversas graves, estimulando células mononucleares do sangue periférico com os fármacos suspeitos. Wang *et al.*, (2016) verificaram elevados níveis séricos de IFN- $\gamma$ , CXCL9 e CXCL10 em reações de hipersensibilidade a fármacos não imediatas. Mostrando que IFN- $\gamma$  está relacionada à inflamação cutânea causada pela hipersensibilidade a fármacos.

Ao analisar os níveis séricos de IFN- $\gamma$  com as concentrações séricas de BNZ e, conseqüentemente, com a ocorrência de reações adversas, não foi observada correlação entre

as variáveis de 30 dias e 60 dias após o início do tratamento, sugerindo que existem outros fatores que vão influenciar na transcrição e tradução desta citocina pelo indivíduo, além da quantidade de BNZ recebida como polimorfismos genéticos, comorbidades, predisposições metabólicas e, até mesmo, uso de outros medicamentos.

Os pacientes do presente estudo tinham média de idade de  $54,55 \pm 10,05$  anos, isso pode explicar a maior frequência de comorbidades nos indivíduos estudados (ZAZZARA *et al.*, 2021) e muitos possuíam mais de duas doenças crônicas coexistentes. Algumas pesquisas abordam que o aumento da idade pode representar um fator de risco para a ocorrência de RAM, idosos têm uma probabilidade maior de desenvolver reações alérgicas a medicamentos em comparação com adultos mais jovens (MANGONI E JACKSON, 2004; LATTANZIO *et al.*, 2012; STEVENSON, DAVIES, MARTIN, 2019).

O envelhecimento altera a homeostase do organismo e está relacionado a alterações fisiológicas e condições que podem aumentar o risco de eventos indesejáveis, alterando a farmacocinética com mudanças no metabolismo, depuração de medicamentos e volume de distribuição, que podem contribuir para prolongar a meia-vida de um determinado medicamento, aumentando o risco de toxicidade (MANGONI E JACKSON, 2004; DAVIES E O'MAHONY, 2015). Além disso, nessa população encontra-se facilmente a presença de comorbidades e polifarmácia (uso prolongado de mais que 5 medicamentos), o que também pode provocar alterações na farmacocinética (MANGONI E JACKSON, 2004; KLOTZ, 2009; LATTANZIO *et al.*, 2012; DAVIES E O'MAHONY, 2015).

Observou-se na presente pesquisa que indivíduos com comorbidades e valores mais altos de IFN- $\gamma$  têm 1,25 vezes mais chances de desenvolver reações adversas. Estudos sugerem que o risco de RAM aumenta de acordo com o aumento do número de doenças crônicas. Maior probabilidade de interação fármaco-doença pode explicar a causa desse problema. E isso pode acontecer porque ao usar um medicamento para tratar uma condição de saúde, pode exacerbar os sintomas de outra doença subjacente ou a presença de uma doença pode alterar o metabolismo dos medicamentos, como doenças hepáticas ou doenças renais (LATTANZIO *et al.*, 2012; CALDERÓN-LARRAÑAGA *et al.*, 2017; ONDER *et al.*, 2018).

Ao avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes IRF1 e IRF8, verificou-se uma relação entre o genótipo selvagem do IRF8 com níveis séricos mais baixos IFN- $\gamma$ . Não se sabe ao certo quais fatores determinam o curso clínico da DC crônica, ou seja, o porquê de indivíduos desenvolverem formas mais graves da doença e outros permanecerem na forma indeterminada, mas o padrão de citocinas produzidas parece influenciar nessas respostas. Perfil Th1 de citocinas como IFN- $\gamma$ , provavelmente está associado à resistência à infecção

pelo *T. cruzi* e a produção exacerbada desta pode levar a danos cardíacos graves (VILA-DEL SOL, PUNZÓN, FRESNO, 2008; CHEVILLARD *et al.*, 2018; LLAGUNO *et al.*, 2019). Por outro lado, um perfil Th2 de citocinas estaria associado a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (LLAGUNO *et al.*, 2019).

IFN- $\gamma$  é produzido por células NK e células T ativadas, sendo responsável pela ativação e diferenciação de macrófagos e induz a transcrição de vários genes pró-inflamatórios, como Óxido Nítrico (NO) sintase induzível (iNOS). As enzimas citosólicas Janus quinases (JAK1 e JAK2) atuam no receptor de IFN- $\gamma$ , induzindo sua fosforilação em tirosina. Por isso, o fator de transcrição Stat1 $\alpha$  é fosforilado por JAKs. Este fator fosforilado (Stat1 $\alpha$ ) dimeriza e transloca para o núcleo, onde induz a ativação transcricional de vários genes como o fator regulador de IFN (IRF-1 a IRF-9) que também são fatores de transcrição e mediam a regulação transcricional induzida por IFN- $\gamma$  (BOEHM, KLAMP e GROOT, 1997; BLANCO *et al.*, 2000; SHTRICHMAN E SAMUEL, 2001; TAMURA *et al.* 2008).

Por se tratar do primeiro estudo que analisa a presença de polimorfismo em nucleotídeo único no gene IRF8 (rs10514611), não se sabe o que esse polimorfismo pode ocasionar na resposta imunológica contra o *T. cruzi*. Mas se sabe que a função do gene selvagem de IRF8 é promover a diferenciação de células mieloides progenitoras para as linhagens de fagócitos mononucleares (monócitos, macrófagos e células dendríticas) e que um polimorfismo que ocasionasse a perda da função desse gene leva a uma deficiência na produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos, uma produção defeituosa de IFN- $\gamma$  por células linfóides e células Natural Killer e um defeito na polarização para um perfil Th1 da resposta imune, levando a uma maior suscetibilidade a infecções virais, bacterianas e parasitárias *in vivo*. Macrófagos deficientes em IRF8 são suscetíveis à infecção *ex vivo* com *Mycobacterium bovis*, *Salmonella typhimurium* e *Legionella pneumophila* (SALEM E GROS, 2013; TAMURA *et al.*, 2008), e camundongos com ausência desse gene são suscetíveis *in vivo* à infecção com patógenos intracelulares, incluindo *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* e *Brucella abortus* (TAMURA *et al.*, 2008; SALEM E GROS, 2013; TAMURA, KUROTAKI, KOIZUMI, 2015).

Existem vários genes que são regulados pelo IRF8, entre eles, temos genes que codificam proteínas envolvidas no reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos por células dendríticas e macrófagos; membros da família de receptores *Toll-like*; proteínas que participam de processamento e apresentação de antígenos em células apresentadoras de antígeno (APC) como moléculas de MHC de Classe I e Classe II; como também proteínas com funções de destruição do microrganismo invasor como lisar a

membrana do vacúolo que contém o patógeno, destruindo seu nicho de replicação e causando a liberação de antígenos para ativação da resposta imune inata que são as proteínas de ligação a guanilato (GBPs) (NGO E MAN, 2017). Então, IRF8 é imprescindível nas funções das células mieloides e nas defesas do hospedeiro contra infecções por patógenos intracelulares (SALEM, SALEM, GROS, 2020).

Então, um polimorfismo que pode causar a perda da ligação de IRF8 leva à expressão defeituosa de genes críticos para a via de apresentação de antígenos e citocinas que ativam células T. Estudos mostram que variantes de IRF8 estariam associadas como fatores de risco genético para doenças infecciosas ou inflamatórias (JOSTINS *et al.*, 2012; BEECHAM *et al.*, 2013; OKADA *et al.*, 2014; LANGLAIS; BARREIRO; GROS, 2016). Sugere-se que a presença do gene selvagem IRF8 pode estar relacionada com o não desenvolvimento de uma forma sintomática da DC (a indeterminada), iniciando e permanecendo em uma forma assintomática, sendo responsável pelo equilíbrio “saudável” entre o parasito e o hospedeiro. Indivíduos com o polimorfismo no gene selvagem IRF8 podem ter uma resposta imune deficiente no início da infecção pelo *T. cruzi*, ocasionando o desenvolvimento das formas sintomáticas da doença como as formas cardíaca, digestiva ou mista.

A suscetibilidade genética às formas mais graves da doença pode resultar de polimorfismos genéticos relevantes que levam a variações na intensidade da resposta imune inata ou adquirida, nas citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da doença (CHEVILLARD *et al.*, 2018).

Levanta-se também a hipótese de que um polimorfismo em nucleotídeo único no gene IRF8 poderia levar a uma resposta imune exacerbada, sem controle, ocasionando as formas sintomáticas da DC, visto que as lesões teciduais observadas nessas formas são caracterizadas pela ocorrência de reação inflamatória nos tecidos cardíacos e na rede neuronal mioentérica (DUTRA *et al.* 2009). Estudos sugerem que o IFN- $\gamma$  ocasiona a inflamação na miocardite e insuficiência cardíaca em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CHEVILLARD *et al.*, 2018).

Dados da literatura mostram que IFN- $\gamma$  desempenha diferentes funções na doença de Chagas como a sua relação com o aparecimento das reações adversas ao BNZ, pois o mesmo parece aumentar as concentrações séricas desta citocina (LLAGUNO *et al.*, 2019), como também a relação da citocina com a progressão da doença para as formas sintomáticas, principalmente a forma cardíaca, ao mediar danos teciduais (BRENER E GAZZINELLI, 1997; ALIBERTI *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003).

A forma indeterminada da DC parece estar associada a uma produção equilibrada

de IFN- $\gamma$  observada no presente estudo, e na forma cardíaca o IFN- $\gamma$  está atrelada a uma resposta imunológica exacerbada (HÖLSCHER *et al.*, 1998; WU Y *et al.*, 2011). Conhecer as funções das diferentes citocinas na resposta imune contra o *T. cruzi* e na suscetibilidade do indivíduo ao parasito permite entender a ação dessas citocinas nos mecanismos regulatórios da resposta imune, e como participam da patologia influenciando na evolução clínica da doença de Chagas (ABRAHAMSOHN, 2017).

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo foi encontrado aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  em 30 dias e 60 dias após o início do tratamento com BNZ nas formas digestiva e cardíaca, respectivamente. Indicando que o BNZ altera os níveis dessa citocina dependendo da forma da doença. Também níveis mais altos de IFN- $\gamma$  foi observado em 60 dias após o início do tratamento que contribuíram para uma maior frequência de reações adversas. Neste estudo, a presença de doenças concomitantes á DC estavam relacionadas ao aparecimento de reações adversas, pois indivíduos com comorbidades e valores mais elevados de IFN- $\gamma$  têm 1,25 vezes mais chances de desenvolver RAM. Os resultados também sugerem que a forma indeterminada da doença está mais relacionada a indivíduos sem polimorfismos no gene IRF8 e com níveis mais baixos de IFN- $\gamma$ .

Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que favorecem a predisposição a uma determinada forma clínica nos indivíduos acometidos por essa doença ou no aparecimento das reações adversas ao BNZ. Porém, os resultados apresentados mostram a necessidade da ampliação de estudos clínicos que avaliem frequências de polimorfismos genéticos e as concentrações de citocinas nos diferentes estágios da doença de Chagas.

A maior limitação do estudo foi à redução do número de participantes devido a pandemia da Covid-19 que ocasionou a suspensão dos atendimentos no período de 2020 e 2021. A proposta era obter um número maior de pacientes visto que o Estado do Ceará apresenta diversas áreas com risco de transmissão da DC (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2021), além disso, trata-se de uma doença, silenciosa, o que dificulta a realização de um diagnóstico precoce.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, A; LORD, K.A; HOFFMAN-LIEBERMANN, B. AND LIEBERMANN, D.A. Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition. **Cell Growth Differ.**, v. 2, p. 401–407, 1991.

ABRAHAMSOHN, I.A. **Citocinas na doença de Chagas: uma perspectiva pessoal sobre três décadas de pesquisa.** 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/resposta-imune/>. Acesso em: 02 mar. 2022.

ALIBERTI, J.C *et al.* Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol.**, v. 158, p. 1433–1440, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64094-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64094-1).

BAHIA-OLIVEIRA, L.M. *et al.* IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz J Med Biol Res.**, v. 31, p. 127–131, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100017>.

BEECHAM, A.H. *et al.* Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. **Nat Genet.**, v. 45, p.1353–1360, 2013.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2770>

BLANCO, J. C., *et al.* Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon  $\gamma$ -dependent cyclooxygenase 2 expression. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 2131-2144, 2000.

BOEHM, U., T. KLAMP, M. GROOT, J. C. Howard. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p.749-795, 1997.

BRENER, Z; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 114, p.103–110, 1997.  
<https://doi.org/10.1159/000237653>.

BUSTAMANTE, J.M; BIXBY, L.M; TARLETON, R.L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nat**

**Med.**, v.14, p. 542-550, 2008.

CALDERON-LARRAÑAGA, A. *et al.* Assessing and measuring chronic multimorbidity in the older population: a proposal for its operationalization. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 72, n. 10, p. 1417–1423, 2017.

CHEVILLARD, C. *et al.* Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02791>

COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **J. Immunol.**, v. 121, p. 813-816, 1978.

COLOSIO, R. C. *et al.* Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde- Paraná, Brasil. **Cien Cuid Saúde**, Paraná, p. 355-363, 2007.

DAVIES, E.A; O'MAHONY, M.S. Adverse drug reactions in special populations—the elderly. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 80, n. 4, p. 796–807, 2015.

DE ANDRADE, A.L *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet.**, v. 343, p. 1407-13, 1996.

DIAS, J. C. P *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2016. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 1, 2016.

DING, S *et al.* Tagging Single Nucleotide Polymorphisms in the *IRF1* and *IRF8* Genes and Tuberculosis Susceptibility. **PLoS ONE**, v, 7, n. 8, p. e42104, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042104>

DUTRA, W.O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208- 218, 2009.

EHRT, S., *et al.* Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **J Exp Med.**, v.194, p.1123–40, 2001. doi: 10.1084/jem.194.8.1123

ENSINA, L.F, *et al.* Reações de hipersensibilidade a medicamentos. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 32, n. 2, p. 42-47, 2009.

GARCIA, S, *et al.* Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.

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.** v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

HÖLSCHER, C., *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun.**, v. 66, p.1208–15, 1998.  
<https://doi.org/10.1007/s41999-021-00481-9>

JOSTINS, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 491, p.119–124, 2012.  
<https://doi.org/10.1038/nature11582>

JUNQUEIRA, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12; n. 29, p. 1-23, September 2010.

KLAEWSONGKRAM, J *et al.* Analysis of HLA-B allelic variation and interferon-gamma ELISpot responses in patients with severe cutaneous adverse reactions associated with drugs. **J Allergy Clin Immunol Pract.**, v.7, n.1, p. 219-227.e4, 2019.

KLOTZ, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. **Drug Metab Rev.**, v. 41, n. 2, p. 67–76, 2009.

KUROTAKI, D., *et al.* IRF8 inhibits C/EBP $\alpha$  activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. **Nat. Commun.**, v.5, p. 4978, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5978>

LANGLAIS, D; BARREIRO, L.B; GROS, P. The macrophage IRF8/IRF1 regulome is

required for protection against infections and is associated with chronic inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 213, n. 4, p. 585–603, 2016. [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20151764](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20151764)

LATTANZIO, F. *et al.* Geriatric conditions and the risk of adverse drug reactions in older adults: a review. **Drug Saf.**, v. 35, n. 1, p. 55–61, 2012.

LAUCELLA, S.A., *et al.* Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses following treatment: surrogate markers of treatment efficacy. **Clin Infect Dis.**, v. 49, n. 11, p.1675–1684, December, 2009. doi:10.1086/648072.

LEBREC, H. *et al.* Th1:Th2 responses to drugs. **Toxicology**, v. 158, p. 25–29, 2001.

LEE, Y.J *et al.* Associations between interferon regulatory factor–1 polymorphisms and Behçet’s disease. **Human Immunology**, v.68, n. 9, p. 770-778, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.06.002>.

LEVICK, S.P; GOLDSPIK, P.H. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? **Heart Fail Rev.** v.19, p. 227–36, 2014.  
doi: 10.1007/s10741-013-9393-8

LLAGUNO, M *et al.* T-Cell Immunophenotyping and Cytokine Production Analysis in Patients with Chagas Disease 4 Years after Benznidazole Treatment. **Infection and Immunity**, v. 87, n.8, p. 1-11, 2019.

MAMANE, Y., *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. **Gene**, v. 237, p.1–14, 1999.

MANGONI, A.A; JACKSON, S.H.D. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 57, n.1, p. 6–14, 2004.

MATOS, D.M *et al.* Indeterminate Form of Chagas Disease: Some Immunological Insights. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online], v. 55, p. 1-3, 2022. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0594-2021>.

MICHAILOWSKY, V. *et al.* Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, p. 2549-2556, 1998.

NEHYBAJ, HRDLICKOVÁ, R; BOSE, H.R. Dynamic evolution of immune system regulators: the history of the interferon regulatory factor family. **Mol Biol Evol.**, v. 26, n.11, p. 2539-50, 2009.

NGO, C.C; MAN, S.M. Mechanisms and functions of guanylatebinding proteins and related interferon-inducible GTPases: roles in intracellular lysis of pathogens. **Cell Microbiol.**, v. 19, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1111/cmi.12791>

NOGUEIRA, N. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. **J. Immunol.**, v. 128, p.2142-2146, 1982.

OKADA, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, v. 506, p. 376–381, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature12873>

OLIVEIRA, M.A. *et al.* Leishmania sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. **Exp Parasitol.**, v. 95, p. 96 –105, 2000. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4523>.

ONDER, G. *et al.* Accounting for frailty when treating chronic diseases. **Eur J Intern Med.**, v. 56, p. 49–52, 2018.

OPAS, Organização Pan-americana de Saúde. **70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas.** 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

PIAGGIO, E., *et al.* Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Parasitol Res.**, v.87, p.539-47, 2001.

PICHLER, W.J; HAUSMANN, O. Classification of drug hypersensitivity into allergic, p-i, and pseudo-allergic forms. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 171, n. 3–4, p.166–179, 2016.

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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n.4, Ago 2009. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000400013>

PONTES, Vânia Maria Oliveira de *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 182-187, abr. 2010.

RASSI, A; RASSI JÚNIOR, A; RASSI, G.G. Fase aguda. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.231-45, 2000.

REGATEIRO, F e FARIA, E. Mecanismos imunopatológicos das reações de hipersensibilidade a fármacos. **Rev Port Imunoalergologia**, v.24, n.2, p. 63 – 78, 2016.

REVELLI, S., *et al.* Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clin Exp Immunol**, v. 118, p. 271-7, 1999.

RIBEIRO, B.M.; CREMA, E. E RODRIGUES JR., V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human Immunology**, v. 69, p. 484-489, 2008.

SALEM, S., *et al.* A novel role for interferon regulatory factor 1 (IRF1) in regulation of bone metabolism. **J. Cell. Mol. Med.**, v.18, p. 1588–1598, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12327>

SALEM, S; GROS, P. Genetic determinants of susceptibility to Mycobacterial infections: IRF8, a new kid on the block. **Adv Exp Med Biol.**, v.783, p. 45-80, 2013. doi: 10.1007/978-1-4614-6111-1\_3.

SALEM, S; SALEM, D.; GROS, P. Role of IRF8 in immune cells functions, protection against infections, and susceptibility to inflammatory diseases. **Human Genetics**, v. 139, n. 6-7, p. 707+, 2020.

SALVADOR, F. *et al.* Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with Chagas disease. **Clin Infect Dis**. v. 61, n.11, p.1688-94, Dec.,2015. doi: 10.1093/cid/civ690.

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

SATHLER-AVELAR, R, *et al.* Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term

in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **BMC Infectious Diseases**, v.12, p.123, 2012.

SATHLER-AVELAR, R., *et al.* Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites na activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes Infect.**, v.10, p.103–113, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.10.009>.

SHTRICHMAN, R., SAMUEL, C.E. The role of  $\gamma$  interferon in antimicrobial immunity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.4, p. 251-259, 2001.

SILVERIO, J.C.; *et al.* CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog.** v. 8, n. 4, e1002645, 2012.

SOSA-ESTANI, S. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 59, p.526-9, 1998.

STEVENSON, J.M; DAVIES, J.G; MARTIN, F.C. Medication-related harm: a geriatric syndrome. **Age Ageing.**, v. 49, n. 1, p. 7–11, 2019.

TAKAOKA, A; TAMURA, T; TANIGUCHI, T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. **Cancer Sci.**, v. 99, n.3, p.467-78, 2008.

TAMURA, T, *et al.* ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. **Immunity.**, v. 13, p.155–165, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00016-9)

TAMURA, T., *et al.* The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 535–584, 2008.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>

TAMURA, T; KUROTAKI, D; KOIZUMI, S. Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. **Int J Hematol.**, v.101, n.4, p. 342-51, Apr. 2015. doi: 10.1007/s12185-015-1761-9.

TANIGUCHI, T. *et al.* IRF family of transcription factors as regulators of host defense. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p. 623–55, 2001.

TESTA, U., *et al.* Impaired myelopoiesis in JEM Vol. 213, No. 4 603 mice devoid of interferon regulatory factor 1. **Leukemia**, v. 18, p. 1864–1871, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403472>

TRUBIANO, J.A *et al.* The Combined Utility of Ex vivo IFN-g Release Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay and In vivo Skin Testing in Patients With Antibiotic-Associated Severe Cutaneous Adverse Reactions. **J. allergy clin. Immunol. Pract.**, v. 6, n.4, p.1287-1296, 2018.

VILA-DEL SOL, V; PUNZÓN, C; FRESNO, M. IFN-gamma-induced TNF-alpha expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. **J Immunol.**, v.181, p.4461–70, 2008.

WANG, F. *et al.* Serum IFN- $\gamma$ -inducible chemokines CXCL9 and CXCL10 are elevated in non-immediate drug hypersensitivity reactions. **Asian Pac J Allergy Immunol.**, v.34, p. 236-241, 2016. DOI 10.12932/AP0679

WHITE, K.D, *et al.* Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 136, p. 219–234, 2015.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

WU Y. *et al.* Up-regulation and sustained activation of Stat1 are essential for interferon-gamma (IFN-gamma)-induced dual oxidase 2 (Duox2) and dual oxidase A2 (DuoxA2) expression in human pancreatic cancer cell lines. **J Biol Chem**, v. 286 pm. 12245–56, 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.191031

XU, H; DILULIO, N.A; FAIRCHILD, R.L.T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: IFN-g producing (Tcl) effector CD8\_ T and IL-4:IL- 10 producing (Th2) negative regulatory CD4\_ T cells. **J. Exp. Med.**, v.183, p. 1001–1012, 1996.

ZAZZARA, M.B *et al.* Adverse drug reactions in older adults: a narrative review of the literature. **European Geriatric Medicine**, v. 12, p. 463–473, 2021.

## DISCUSSÃO GERAL

O perfil de reações por intolerância ao BNZ foi semelhante ao relatado em outros estudos observacionais focados na segurança e tolerância do benznidazol no tratamento de pacientes com doença de Chagas como o estudo de Gotijo *et al.* (2020) e o estudo de Salvador *et al.* (2015). Gotijo *et al.* (2020) com 62 pacientes mostrou uma prevalência de RAM de 66,1% (n=41) e as reações mais apresentadas foram reações dermatológicas como prurido e reações gastrointestinais como náusea e dor abdominal. Segundo Salvador *et al.* (2015), a reação cutânea associada ao benznidazol é uma reação adversa medicamentosa compatível com uma reação de hipersensibilidade não mediada por IgE (imediate) e sim uma reação retardada. Segundo estes autores, a reação cutânea relacionada ao BNZ é uma reação mediada por células T com uma resposta Th2 produzindo IL-5, com aumento de IL-10. A IL-10 desempenha um papel de modulação da síntese de IL-12 e INF- $\gamma$ , evitando uma excessiva resposta imune que poderia causar inflamação extensiva e dano aos tecidos do hospedeiro, além de diminuir o desenvolvimento de respostas imunes mediadas por Th2.

Como RAM associada ao sistema central e periférico, observamos a parestesia. A frequência de parestesia (n=10, 55,6%) chama a atenção, pois, trata-se de uma reação que pode ser irreversível. A parestesia é um sintoma caracterizado pela sensação de dormência ou formigamento em alguma parte do corpo. Pode acometer os membros como braços, pernas, mãos, como também em áreas menos comuns, como a boca. No caso do tratamento com BNZ, as partes mais acometidas foram os membros superiores (mãos e braços) ou membros inferiores (pernas e pés). Esse tipo de reação deve ser identificado o quanto antes para iniciar o protocolo de suspensão do tratamento e iniciar o tratamento sintomático com medicamentos anticonvulsivantes (BERAN, 2015). No presente estudo, os casos de parestesia foram reversíveis seguindo as recomendações do II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2016).

A interrupção do tratamento ocorrido no presente estudo foi devido à presença de reações adversas, sendo, portanto responsáveis pela interrupção temporária e definitiva do tratamento com BNZ. As variáveis idade e sexo parecem não influenciar no desenvolvimento de reações adversas ao BNZ.

As principais reações responsáveis pela suspensão temporária do BNZ foram reações relacionadas ao sistema dermatológico (descamação da pele, prurido, erupções bolhosas); relacionadas ao sistema cardiovascular como edema de membros superiores e/ou inferiores. E as reações responsáveis pela interrupção definitiva do tratamento foram

relacionadas ao sistema nervoso central e periférico como a parestesia e relacionada aos órgãos do sentido como a ageusia.

Quando observamos na literatura as reações adversas provocadas pelo Nifurtimox, o BNZ parece ser uma melhor alternativa ao tratamento, pois o Nifurtimox apresenta uma menor tolerância digestiva, refletida na anorexia com perda de peso e distúrbios psíquicos, logo, o BNZ tornou-se a primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas (BRASIL, 2005). No Brasil, o Nifurtimox somente é utilizado nos casos de intolerância ao BNZ (DIAS *et al.*, 2016).

A suspensão do BNZ por 10 dias e a retomada do tratamento associado a anti-histamínicos parece ser uma boa alternativa para a conclusão do tratamento da doença de Chagas na presença de reações adversas dermatológicas, no entanto, poucos relatos de experiência estão disponíveis sobre a eficácia dos esteroides para prevenir ou conter reações cutâneas devido ao BNZ (GÁRGOLAS *et al.*, 2013). Dos 9 (22,5%) pacientes que tiveram o tratamento suspenso, sete deles (77,8%) fizeram uso de corticoide (prednisona ou prednisolona) por 5 dias para a resolução da reação adversa cutânea.

Com relação essa distinção entre homens e mulheres no desenvolvimento de reações adversas ao BNZ, devemos considerar alguns fatores como diferenças entre os organismos femininos e masculinos que podem afetar todo o processo farmacocinético dos fármacos, tanto anatômico como fisiológicos. As mulheres possuem maior gordura corporal, o que pode afetar a distribuição e armazenamento de drogas lipofílicas, levando a um aumento do seu volume de distribuição e tempo de meia-vida. O contrário é válido para fármacos hidrofílicos. As mulheres ainda apresentam diferente capacidade de filtração glomerular, bem como esvaziamento gástrico, fatores que podem afetar a eliminação e a absorção de fármacos, respectivamente (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017). A variável sexo não foi significativa, mas as mulheres mostraram uma tendência maior de desenvolver RAM durante o tratamento com BNZ em comparação com os homens.

Estudo realizado por Molina *et al.* (2017) avaliou a farmacocinética do BNZ em adultos saudáveis e verificou que os homens apresentaram uma concentração plasmática maior que as mulheres, além disso, apresentaram volume médio de distribuição em função da biodisponibilidade maior que o sexo feminino, justificaram esse resultado com base nas variações do pH gástrico, taxa de esvaziamento gástrico, tempo de trânsito intestinal, expressão intestinal de proteínas de transporte e a composição corporal. Por tanto, apesar de não ter sido observada uma relação significativa, foi coerente encontrar uma maior frequência de reações adversas nas mulheres, mesmo não sendo conhecido o mecanismo exato dessa

maior predisposição.

Apesar do alto índice de RAM relacionadas ao tratamento com BNZ, este dado é amenizado pela predominância de reações consideradas moderadas e leves, dessa forma, podemos considerar que o BNZ é um medicamento seguro para o tratamento da DC, salvo os casos em que o BNZ não é indicado (MORILLO *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2016).

As reações adversas laboratoriais apresentadas durante o tratamento foram alterações hematológicas e alterações bioquímicas leves, no entanto foi verificado neutrofilia, por aumento de segmentados e linfopenia, após 30 dias de tratamento com o BNZ.

As drogas, seja diretamente ou após o processamento pelas células dendríticas, ativam as células T que podem produzir citocinas, recrutando células como neutrófilos, resultando em dano tecidual e resposta inflamatória, justificando a presença de neutrofilia (GRAAUW *et al.*, 2015; WHITE *et al.*, 2015).

A reação idiossincrática à droga parece ser o mecanismo mais provável responsável pelas reações adversas causadas pelo BNZ, uma vez que há mais de um órgão/sistema do organismo afetado, além disso, observa-se a recuperação rápida das reações adversas após a retirada da droga (DOOLEY *et al.*, 2002; NOVAES *et al.*, 2015). Não há estudos clínicos na literatura que consigam responder diretamente os mecanismos que envolvem as RAM induzidas por BNZ (PAVAN *et al.*, 2018), por isso mais estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos para traçar estratégias no tratamento e acompanhamento dos pacientes que necessitem utilizar esse medicamento, uma vez que não temos outras opções disponíveis no mercado farmacêutico.

Este estudo mostrou que muitos pacientes foram capazes de completar o tratamento com benznidazol sem nenhuma incidência de RAM grave, sucesso este atribuído a estratégia de acompanhamento próximo juntamente com aconselhamento e tratamento sintomático das RAM visando à segurança do paciente. Devemos utilizar os resultados do presente estudo como forma de melhorar a atenção prestada, visando à promoção de uma farmacoterapia mais segura para esses pacientes.

O serviço de atenção farmacêutica ao paciente com doença de Chagas do estado do Ceará é referência em acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes com doença de Chagas, apesar de todas as suas limitações, tem tentado fazer uma atenção mais humana e especializada a esses pacientes, através da atuação fundamental do farmacêutico durante o tratamento com benznidazol.

O método de Guerrero *et al.*, (2011) foi adequado para a quantificação do BNZ em soro humano. A adaptação consistiu na mudança da amostra de plasma sanguíneo a -40°C

para soro humano armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por um tempo de armazenamento de 1 a 2 anos, de forma que essa mudança não alterasse o cumprimento dos requisitos de quantificar, detectar o BNZ, ser preciso, linear e ter curto tempo de preparo.

São raros estudos que quantificaram BNZ em soro humano, apenas em plasma (RAAFLAUB, 1980; WORKMAN *et al.*, 1984; WALTON, WORKMAN, 1986; MORILLA *et al.*, 2003; GUERRERO *et al.*, 2011; PINAZO *et al.*, 2013; ALTCHER *et al.*, 2014; SALVADOR *et al.*, 2015; MOLINA *et al.*, 2017). O soro humano é obtido após a centrifugação do sangue coletado em tubos sem anticoagulantes, ou seja, a diferença entre soro e plasma é que o plasma apresenta fibrinogênio, importante proteína do processo de coagulação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL, 2010). Alguns estudos em animais mostraram que o soro apresentou uma maior estabilidade frente ao plasma em todas as condições de estoque estabelecidas na análise de alguns parâmetros bioquímicos como ureia, creatinina, colesterol, entre outros (FERNANDES, TEIXEIRA, SANTOS, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Baseando-se nesses estudos, o soro parece apresentar uma estabilidade maior que o plasma.

Os resultados do presente estudo, além do plasma humano, mostraram que o soro humano armazenado por 1 a 2 anos no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  pode ser utilizado com segurança para a quantificação do BNZ, ou seja, a mudança da amostra, tempo e temperatura de armazenamento não comprometeu a eficácia e qualidade do método analítico de Guerreiro *et al.*, (2011).

Dos pacientes analisados, 58,82% (n=10) estavam com BNZ sérico dentro da faixa tripanocida após 30 dias de tratamento. Nenhum paciente apresentou dose tóxica (concentração sérica de BNZ  $>20\ \mu\text{g/mL}$ ). Assim como no estudo de Pinazo *et al.* (2013), verificou-se que a dose de 5 mg/kg/dia seguida em protocolos terapêuticos (DIAS *et al.*, 2016) é a dose adequada que permite níveis tripanocidas ideais em pacientes crônicos adultos, mas o tempo de tratamento ainda permanece divergente em alguns estudos (FRADE *et al.*, 2020), logo são necessários estudos clínicos randomizados que avaliem esquemas terapêuticos mais curtos, com boa tolerabilidade e boa eficácia para que o paciente tenha uma farmacoterapia segura e eficaz.

As concentrações séricas de BNZ não estavam relacionadas com as reações adversas. Cançado (2002) relacionou sintomas/sinais neurológicos e músculo esquelético como parestesia e artralgia com altas concentrações de BNZ no final do tratamento devido ao acúmulo do fármaco, mas essa relação não foi encontrada no presente estudo, assim como também não foi observado por Pinazo *et al.* (2013) e Salvador *et al.* (2015).

Os resultados apresentados mostram que as concentrações séricas de BNZ nas doses atualmente recomendadas (DIAS *et al.*, 2016) não estão associadas a reações adversas, corroborando com os únicos estudos encontrados na literatura que abordavam essa questão Pinazo *et al.* (2013) e Salvador *et al.* (2015). Logo, são necessários estudos que esclareçam os mecanismos responsáveis pelas RAM. Além disso, deve-se avaliar o papel potencial dos metabólitos do BNZ tanto na toxicidade quanto na atividade antiparasitária (PINAZO *et al.*, 2013).

Com relação aos níveis de IFN- $\gamma$ , observou-se aumento desta citocina na forma digestiva com 30 dias e na forma cardíaca com 60 dias após o início do tratamento. Indicando que o BNZ altera os níveis dessa citocina dependendo da forma da doença.

Alguns estudos mostraram que o BNZ está relacionado a um *down-regulation* na expressão média de citocinas como níveis mais baixos de IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  em pacientes tratados em comparação com os não tratados, levantando a hipótese que o tratamento durante a fase crônica pode ter um impacto de suporte, modulando o perfil de citocinas inflamatórias de pacientes na forma indeterminada da doença, reduzindo as chances de uma evolução para a forma cardíaca (REVELLI *et al.*, 1999; PIAGGIO *et al.*, 2001; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2006; BUSTAMANTE *et al.*, 2008; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2012).

Alguns autores sugerem que o paciente na forma cardíaca tem uma tendência a produzir mais IFN- $\gamma$ , comparado com os pacientes na forma indeterminada, sob estimulação com antígenos do parasito (GOMES *et al.*, 2003; SILVERIO *et al.*, 2012).

O aumento de IFN- $\gamma$  após o tratamento com BNZ pode ser explicado pelo fato de que o medicamento causa a morte do *T. cruzi* que libera antígenos que podem estimular a expansão clonal de células produtoras de IFN- $\gamma$  que resulta no seu aumento e que poderiam ser mantidas por antígenos parasitários residuais (SATHLER-AVELAR *et al.* 2006; LAUCELLA *et al.*, 2009).

O tratamento com BNZ durante a fase crônica pode induzir simultaneamente citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e anti-inflamatórias como IL-10, indicando um efeito no controle da replicação do parasito e também dano tecidual (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2008).

Níveis mais altos de IFN- $\gamma$  contribuíram para uma maior frequência de reações adversas. Concentrações mais elevadas de IFN- $\gamma$  foram associadas à eficácia terapêutica (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000). Então, além de destruir o parasito através da formação de radicais livres, modula resposta imune do hospedeiro estimulando altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Este fato pode explicar a provável eficácia do BNZ

em prevenir e/ou retardar a progressão da doença, causando uma estabilidade, já que a resposta imune do hospedeiro pode influenciar nessa evolução como também, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias possam ocasionar as RAM.

A citocina IFN- $\gamma$  desempenha um papel central na reação inflamatória cutânea (XU *et al.*, 1996). Diante de uma reação alérgica a fármacos, podem ser detectadas células T circulantes produtoras de IFN- $\gamma$  e conseqüentemente, um aumento nesta citocina. Estudo realizado por Klaewsongkram *et al.* (2019) propôs que a quantificação de células produtoras de IFN- $\gamma$  poderia funcionar como uma ferramenta para confirmar os fármacos causadores de reações adversas graves, estimulando células mononucleares do sangue periférico com os fármacos suspeitos. Wang *et al.*, (2016) verificaram elevados níveis séricos de IFN- $\gamma$ , CXCL9 e CXCL10 em reações de hipersensibilidade a fármacos não imediatas. Mostrando que IFN- $\gamma$  está relacionada à inflamação cutânea causada pela hipersensibilidade a fármacos.

São relatadas em adultos tratados com BNZ sérias reações adversas, incluindo dermatopatia alérgica, manifestações gástricas, neuropatia periférica, neutropenia e leucopenia (COLOSIO *et al.*, 2007). Dessa forma, podemos sugerir que níveis mais altos de IFN- $\gamma$  poderiam contribuir para uma maior frequência de reações adversas.

Ao analisarmos os níveis séricos de IFN- $\gamma$  com as concentrações séricas de BNZ e, conseqüentemente, com a ocorrência de reações adversas, não foi observada correlação entre as variáveis de 30 dias e 60 dias após o início do tratamento, sugerindo que existem outros fatores que vão influenciar na transcrição e tradução desta citocina pelo indivíduo, além da quantidade de BNZ recebida como polimorfismos genéticos, comorbidades, predisposições metabólicas e, até mesmo, uso de outros medicamentos.

Observou-se que indivíduos que tinham ao mesmo tempo comorbidades e valores elevados de IFN- $\gamma$ , as chances de desenvolver RAM ao BNZ foram de 1,25 vezes. Estudos sugerem que o risco de RAM aumenta de acordo com o aumento do número de doenças crônicas. Maior probabilidade de interação fármaco-doença pode explicar a causa desse problema. E isso pode acontecer porque ao usar um medicamento para tratar uma condição de saúde, pode exacerbar os sintomas de outra doença subjacente ou a presença de uma doença pode alterar o metabolismo dos medicamentos, como doenças hepáticas ou doenças renais (LATTANZIO *et al.*, 2012; CALDERÓN-LARRAÑAGA *et al.*, 2017; ONDER *et al.*, 2018).

Os pacientes do presente estudo tinham média de idade de  $54,55 \pm 10,05$  anos, isso pode explicar à maior frequência de comorbidades nos indivíduos estudados (ZAZZARA *et al.*, 2021) e muitos possuíam mais de duas doenças crônicas coexistentes. Algumas pesquisas abordam que o aumento da idade pode representar um fator de risco para a

ocorrência de RAM, idosos têm uma probabilidade maior de desenvolver reações alérgicas a medicamentos em comparação com adultos mais jovens (MANGONI E JACKSON, 2004; LATTANZIO *et al.*, 2012; STEVENSON, DAVIES, MARTIN, 2019).

O envelhecimento altera a homeostase do organismo e está relacionado a alterações fisiológicas e condições que podem aumentar o risco de eventos indesejáveis, alterando a farmacocinética com mudanças no metabolismo, depuração de medicamentos e volume de distribuição, que podem contribuir para prolongar a meia-vida de um determinado medicamento, aumentando o risco de toxicidade (MANGONI E JACKSON, 2004; DAVIES E O'MAHONY, 2015). Além disso, nessa população encontra-se facilmente a presença de comorbidades e polifarmácia (uso prolongado de  $\geq 5$  medicamentos), o que também pode provocar alterações na farmacocinética (MANGONI E JACKSON, 2004; KLOTZ, 2009; LATTANZIO *et al.*, 2012; DAVIES E O'MAHONY, 2015).

Quando avaliamos a frequência dos polimorfismos dos genes IRF1 e IRF8, encontramos uma relação entre o genótipo selvagem do IRF8 com níveis séricos mais baixos IFN- $\gamma$  e com a forma indeterminada da DC. Não se sabe ao certo quais fatores determinam o curso clínico da DC crônica, ou seja, o porquê de indivíduos desenvolverem formas mais graves da doença e outros permanecerem na forma indeterminada, mas o padrão de citocinas produzidas parece influenciar nessas respostas.

Por se tratar do primeiro estudo que analisa a presença de polimorfismo em nucleotídeo único no gene IRF8 (rs10514611), não se sabe o que esse polimorfismo pode ocasionar na resposta imunológica contra o *T. cruzi*. Mas se sabe que a função do gene selvagem de IRF8 é promover a diferenciação de células mieloides progenitoras para as linhagens de fagócitos mononucleares (monócitos, macrófagos e células dendríticas) e que um polimorfismo que ocasionasse a perda da função desse gene leva a uma deficiência na produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos, uma produção defeituosa de IFN- $\gamma$  por células linfoides e células Natural Killer e um defeito na polarização para um perfil Th1 da resposta imune, levando a uma maior suscetibilidade a infecções virais, bacterianas e parasitárias *in vivo*. Então, IRF8 é imprescindível nas funções das células mieloides e nas defesas do hospedeiro contra infecções por patógenos intracelulares como é o caso do *T. cruzi* (SALEM, SALEM, GROS, 2020).

A suscetibilidade genética às formas mais graves da doença pode resultar de polimorfismos genéticos relevantes que levam a variações na intensidade da resposta imune inata ou adquirida, nas citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da doença (CHEVILLARD *et al.*, 2018).

Um polimorfismo que pode causar a perda da ligação de IRF8 leva à expressão defeituosa de genes críticos para a via de apresentação de antígenos e citocinas que ativam células T. Levanta-se a hipótese que a presença do gene selvagem IRF8 pode estar relacionada com o não desenvolvimento de uma forma sintomática da DC (a indeterminada), iniciando e permanecendo em uma forma assintomática, sendo responsável pelo equilíbrio “saudável” entre o parasito e o hospedeiro. Indivíduos com o polimorfismo no gene selvagem IRF8 podem ter uma resposta imune deficiente no início da infecção pelo *T. cruzi*, ocasionando o desenvolvimento das formas sintomáticas da doença como as formas cardíaca, digestiva ou mista.

Pode-se levantar também a hipótese de que um polimorfismo em nucleotídeo único no gene IRF8 poderia levar a uma resposta imune exacerbada, sem controle, ocasionando as formas sintomáticas da DC, visto que as lesões teciduais observadas nessas formas são caracterizadas pela ocorrência de reação inflamatória nos tecidos cardíacos e na rede neuronal mioentérica (DUTRA *et al.* 2009). Estudos sugerem que o IFN- $\gamma$  ocasiona a inflamação na miocardite e insuficiência cardíaca em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CHEVILLARD *et al.*, 2018).

Conhecer as funções das diferentes citocinas na resposta imune contra o *T. cruzi* e na suscetibilidade do indivíduo ao parasito permite entender a ação dessas citocinas nos mecanismos regulatórios da resposta imune, e como participam da patologia influenciando na evolução clínica da doença de Chagas (ABRAHAMSOHN, 2017).

## CONCLUSÕES GERAIS

- Alta prevalência de reações adversas foi encontrada na população estudada, sendo a grande maioria de gravidade moderada.
- As reações mais frequentes foram dermatológicas, gastrointestinais e do sistema nervoso.
- Alterações laboratoriais leves.
- Muitos pacientes concluíram o tratamento sem RAM graves usando uma estratégia de acompanhamento ao paciente e tratamento sintomático.
- O método analítico de Guerrero *et al.* (2011) foi adaptado mostrando especificidade, seletividade, linearidade e precisão, portanto, adequado para a quantificação do BNZ em soro humano.
- As concentrações séricas de BNZ não estavam relacionadas com as reações adversas.
- O BNZ altera os níveis de IFN- $\gamma$  dependendo da forma da doença.
- Níveis mais altos de IFN- $\gamma$  em 60 dias após o início do tratamento contribuíram para uma maior frequência de reações adversas.
- A forma indeterminada da doença está mais relacionada a indivíduos sem polimorfismos no gene IRF8 e com níveis mais baixos de IFN- $\gamma$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, A; LORD, K.A; HOFFMAN-LIEBERMANN, B. AND LIEBERMANN, D.A. Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition. *Cell Growth Differ.*, v. 2, p. 401–407, 1991.

ABRAHAMSOHN, I.A. **Citocinas na doença de Chagas: uma perspectiva pessoal sobre três décadas de pesquisa.** 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/resposta-imune/>. Acesso em: 02 mar. 2022.

ALBA-ALVARADO, M. *et al.* Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. **Acta Trop.**, v. 178, p. 134–41, 2018. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.009

ALTICHEH, J. *et al.* Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.5, p. 1-9, 2014.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M. *et al.* IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz J Med Biol Res.**, v. 31, p. 127–131, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100017>.

BERAN, R. Paraesthesia and peripheral Neuropathy. **Reprinted from afp.**, v. 44, n.3, p. 92-95, 2015.

BERN, C. *et al.* Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States a Systematic Review. **(Reprinted) JAMA, American Med. Association**, v. 298, n. 18, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde.** Edição única. Brasília, 2014. 812p. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf). Acesso em: 07 jan. 2018.

BRASIL. Resolução RDC nº 406, de 22 de julho de 2020. Dispõe sobre as Boas Práticas de Farmacovigilância para Detentores de Registro de Medicamento de uso

humano, e dá outras providências. **Resolução RDC no - 406, de 22 de Julho de 2020.**

144. ed, p. 64. BRASIL.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, (Supl. III), Brasília, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, (Supl. III), Brasília, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico: Doença de Chagas, 14 de abril/Dia mundial.** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 38 p. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim\\_especial\\_chagas\\_14abr21\\_b.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf). Acesso em: 28 jun. 2022.

BUSTAMANTE, J.M; BIXBY, L.M; TARLETON, R.L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nat Med.**, v.14, p. 542-550, 2008.

CALDERON-LARRAÑAGA, A. *et al.* Assessing and measuring chronic multimorbidity in the older population: a proposal for its operationalization. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 72, n. 10, p. 1417–1423, 2017.

CAMANDAROBA, E.L, *et al.* Trypanosoma cruzi: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from highly resistant Colombian strain. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 36, p.201-9, 2003.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop.**, v. 44p. 29-37, 2002.

CANÇADO, J.R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. In: Brener Z, Andadre ZA, Barral-Neto M (Eds). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, 2. Ed, p. 389-405, 2000.

CARDOSO, C.S., *et al.* Longitudinal study of patients with chronic Chagas cardiomyopathy in Brazil (SaMi-Trop project): a cohort profile. **BMJ Open. British Medical Journal Publishing Group**; 2016;6: e011181. pmid:27147390

CARVALHO, N.B. *et al.* Manual de atendimento a pacientes com doença de Chagas: atenção básica 2014/2015. [S.l: s.n.], 2015.

CHEVILLARD, C. *et al.* Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02791>

COLOSIO, R. C. *et al.* Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde- Paraná, Brasil. **Cien Cuid Saúde**, Paraná, p. 355-363, 2007.

CORBETT, C.E., *et al.* Cellmediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. **Dis Colon Rectum.**, v. 44, p. 993-998, 2001.

CORREIA, O. *et al.* Increased interleukin 10, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 6 levels in blister fluid of toxic epidermal necrolysis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 47, n. 1, p. 58–62, 2002.

COSTA, A.C. *et al.* Satisfação dos pacientes com doença de Chagas atendidos por um serviço de atenção farmacêutica no estado do Ceará, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva [online]**, v. 23, n. 5, p. 1483-1494, 2018.

DAVIES, E.A; O'MAHONY, M.S. Adverse drug reactions in special populations—the elderly. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 80, n. 4, p. 796–807, 2015.

D'AVILA, D.A. *et al.* Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.104, n.1, p.100-5, 2009.

DIAS, J. C. P *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2016. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 1, 2016.

DIAS, J. C. P *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2016. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 1, 2016.

DIAS, J. C. P. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 19–37, 1998.

DIAS, J.C.P. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n.2, p. 13-34, 2000.

DIAS, J.C.P; COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p.

DOOLEY, J.S. *et al.* Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System. **Wiley-Black Well**, v.12, p 20–25, 2002.

DUTRA, W.O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208- 218, 2009.

DUTRA, W.O.; ROCHA, M.O.C.; TEIXEIRA, M.M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in parasitology, Oxford**, v. 21, n. 12, p. 581-587, 2005.

EHRT, S., *et al.* Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **J Exp Med.**, v.194, p.1123–40, 2001. doi: 10.1084/jem.194.8.1123

FABBRO, D.L. *et al.* Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, p.1–10, 2007.

FERNANDES, S.T; TEIXEIRA, M.N; SANTOS, E.S. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento nas dosagens bioquímicas de uréia e creatinina em soro ou plasma caninos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.6, p.648-651, 2001.

FIDALGO, A.S.O.B.V. *et al.* Seroprevalence and risk factors of Chagas disease in a rural population of the Quixeré municipality, Ceará, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.54, 2021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0247-2020>

- FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz, 2012. Disponível em: <http://fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe.sys.htm?tpl=home>> Ministério da Saúde. Acesso em 10 de setembro de 2017.
- FRADE, V.P. *et al.* Ideal benznidazole dose regimen in chronic chagasic patients: a systematic review. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 62, n. 52, p. 1-13, 2020.
- FREITAS, A.; *et al.* Vigilância Entomológica dos Vetores da Doença de Chagas no Município de Farias Brito, estado do Ceará. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Goiânia, v. 15, n. 2, p. 231–240, 2007.
- FREITAS, E.C. *et al.* Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 1, p. 44-51, jan./feb. 2017.
- GÁRGOLAS M *et al.* The use of steroids to prevent cutaneous reactions to benznidazole in patients with Chagas disease. **Pathog Glob Health.**, v. 107, p.157–160, 2013.
- 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.** v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.
- GOTIJO, M. K.LC.L. *et al.* Characterization of adverse reactions to benznidazole in patients with Chagas disease in the Federal District, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], v. 53. 2020.
- GOTIJO, M. K.LC.L. *et al.* Characterization of adverse reactions to benznidazole in patients with Chagas disease in the Federal District, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], v. 53. 2020.
- GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ. Secretaria de Saúde. **Boletim epidemiológico: Doença de Chagas.** Fortaleza. Grupo Técnico da doença de Chagas Célula de Vigilância Epidemiológica (CEVEP), Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica e Prevenção em Saúde (COVEP), 2021. 46 p.
- GRAAUW, E, *et al.* Eosinophilia in Dermatologic Disorders. **Immunol Allergy Clin**

**North Am.**, v. 35, p. 545-560, 2015.

GUERRERO, L, *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 49, p. 77– 82, 2011.

GUO, Z., *et al.* A distal regulatory region is required for constitutive and IFN-beta-induced expression of murine TLR9 gene. **J Immunol.**, v.175, p. 7407–18, 2005.

HASSLOCHER-MORENO, A.M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother.** v. 67, n. 5, p. 1261-67, 2012.

HASSLOCHER-MORENO, A.M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother.** v. 67, n. 5, p. 1261-67, 2012.

HOETZENECKER, W., *et al.* Adverse cutaneous drug eruptions: current understanding. **Semin Immunopathol**, v.38, p. 75–86, 2016.

JUNQUEIRA, C.,*et al.* The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 12; n. 29, p. 1-23, 2010.

KAUPPINEN, K. Fixed drug eruptions and oral rechallenge. **Cleve. Clin. J. Med.**, v.58, n.1, p. 64–65, 1991.

KLAEWSONGKRAM, J *et al.* Analysis of HLA-B allelic variation and interferon-gamma ELISpot responses in patients with severe cutaneous adverse reactions associated with drugs. **J Allergy Clin Immunol Pract.**, v.7, n.1, p. 219-227.e4, 2019.

KLOTZ, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. **Drug Metab Rev.**, v. 41, n. 2, p. 67–76, 2009.

KROGER, A., *et al.* Activities of IRF-1. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 22, p. 5–14, 2002.

KUROTAKI, D., *et al.* IRF8 inhibits C/EBP $\alpha$  activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. **Nat. Commun.**, v.5, p. 4978, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5978>

LANGLAIS, D; BARREIRO, L.B; GROS, P. The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 213, n. 4, p. 585–603, 2016.

LATTANZIO, F. *et al.* Geriatric conditions and the risk of adverse drug reactions in older adults: a review. **Drug Saf.**, v. 35, n. 1, p. 55–61, 2012.

LAUCELLA, S.A., *et al.* Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses following treatment: surrogate markers of treatment efficacy. **Clin Infect Dis.**, v. 49, n. 11, p.1675–1684, December, 2009. doi:10.1086/648072.

LEVICK, S.P; GOLDSPIK, P.H. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? **Heart Fail Rev.** v.19, p. 227–36, 2014. doi: 10.1007/s10741-013-9393-8

LUQUETTI, A.O; SCHMUÑIS, G.A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. **American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research.** Elsevier, Amsterdam, p. 743-92, 2010.

MAMANE, Y., *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. **Gene**, v. 237, p.1–14, 1999.

MANGONI, A.A; JACKSON, S.H.D. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 57, n.1, p. 6–14, 2004.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, Supl. 1, p.319–324, 2009.

MARQUET, S., *et al.* Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. **Nat Genet.**, v. 14, p. 181–184, 1996.

MARTINS-MELO, F. *et al.* Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 94, n. 2, p. 103–110, 2016.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 45, n. 5, p. 591–596, 2012.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v.130, p. 167–174, 2014.

MAYA, J.D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host (Review.) **Comp Biochem Physiol A MollIntegr Physiol** **146**, p. 601-620, 2006

MENEZES, C. *et al.* Clinical aspects of Chagas Disease and implications for novel Therapies. **Drug Dev. Res.** v. 72, n. 6, p. 471-479, 2011.

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother**, v.61, p. 01912-16, 2017. doi: 10.1128/AAC.01912-16.

MORILLO, C.A, *et al.* BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med.**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, Oct., 2015.

NEHYBAJ, HRDLICKOVÁ, R; BOSE, H.R. Dynamic evolution of immune system regulators: the history of the interferon regulatory factor family. **Mol Biol Evol.**, v. 26, n.11, p. 2539-50, 2009.

NOVAES, R.D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitol Res.**, v. 114, n. 8, p. 2873–81, 2015.

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 37, p. 209-228, 2008.

OLIVEIRA, M.J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLOS ONE**, v. 12, n.9, p. 1-13, 2017.

OLIVEIRA, M.J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects

to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLOS ONE**, v. 12, n.9, p. 1-13, set. 2017.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Monitorização da segurança de medicamentos: diretrizes para criação e funcionamento de um Centro de Farmacovigilância**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, 2005. 28 p. Disponível em:

<https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2022.

ONDER, G. *et al.* Accounting for frailty when treating chronic diseases. **Eur J Intern Med.**, v. 56, p. 49–52, 2018.

OPAS, Organização Pan-americana de Saúde. **70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas**. 2021. Disponível em:

<<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

OPAS. Organização Panamericana de Saúde. **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas**, 2006. OPS/HDM/CD/425-06.

PASTERNAK, J.J. An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases. **Hoboken: John Wiley & Sons**; 2005.

PAVAN, T.B.S, *et al.* Hepatic changes by benznidazole in a specific treatment for Chagas disease. **PLoS ONE**, v.13, n. 7, p. 1-11, 2018.

PIAGGIO, E., *et al.* Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on Trypanosoma cruzi-infected rats. **Parasitol Res.**, v.87, p.539-47, 2001.

PICHLER, W.J; HAUSMANN, O. Classification of drug hypersensitivity into allergic, p-i, and pseudo-allergic forms. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 171, n. 3–4, p.166–179, 2016.

PINAZO, M.J *et al.* Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 57, n. 1, p. 390-395 2013.

PINAZO, M.J *et al.* Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults.

**Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, p. 4896–4899, 2010.

PINAZO, M.J *et al.* Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, p. 4896–4899, 2010.

PONTES, Vânia Maria Oliveira de *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 182-187, abr. 2010.

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980.

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p. 1611-1614, 1979.

REVELLI, S., *et al.* Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clin Exp Immunol**, v. 118, p. 271-7, 1999.

RIBEIRO, B.M.; CREMA, E. E RODRIGUES JR., V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human Immunology**, v. 69, p. 484-489, 2008.

RIHET, P., *et al.* Malaria in humans: Plasmodium falciparum blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. **Am J Hum Genet.**, v. 63, p. 498–505, 1998.

RIVE, C. M; BOURKE, J; PHILLIPS, E.J. Testing for drug hypersensitivity syndromes. **Clin. Biochem. Rev.**, v.34, n. 1, p. 15–38, 2013.

ROBERTS, J. T. *et al.* A phase I study of the combination of benznidazole and CCNU in man. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 10, n. 9, p. 1745-1748, 1984.

SALEM, S., *et al.* A novel role for interferon regulatory factor 1 (IRF1) in regulation of bone metabolism. **J. Cell. Mol. Med.**, v.18, p. 1588–1598, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12327>

SALEM, S; SALEM, D.; GROS, P. Role of IRF8 in immune cells functions, protection against infections, and susceptibility to inflammatory diseases. **Human Genetics**, v. 139, n. 6-7, p. 707+, 2020.

SALVADOR, F. *et al.* Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with Chagas disease. **Clin Infect Dis.** v. 61, n.11, p.1688-94, Dec.,2015. doi: 10.1093/cid/civ690.

SALVADOR, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. **Clin Microbiol Infect**, v.20, p.706–12, 2014.

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

SATHLER-AVELAR, R, *et al.* Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **BMC Infectious Diseases**, v.12, p.123, 2012.

SHIOHARA, T; MIZUKAWA, Y; AOYAMA, Y. Monitoring the acute response in severe hypersensitivity reactions to drugs. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 294–299, 2015.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo. **Moléstia de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. 248 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA

LABORATORIAL (Brasil). **COLETA DE SANGUE VENOSO**. 2. ed. Barueri:

Manole Ltda, 2010. 130 p. Disponível em:

<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2022.

SOSA-ESTANI, S, VIOTTI, R; SEGURA, E.L. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: Insight gained in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n.1, p. 167–80, 2009.

SOSA-ESTANI, S. *et al.* Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tióctico. **Medicina** **64**, p. 1-6, 2004.

STEVENSON, J.M; DAVIES, J.G; MARTIN, F.C. Medication-related harm: a geriatric syndrome. **Age Ageing.**, v. 49, n. 1, p. 7–11, 2019.

TAKAOKA, A; TAMURA, T; TANIGUCHI, T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. **Cancer Sci.**, v. 99, n.3, p.467-78, 2008.

TAKI, S., *et al.* Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor *IRF-1*. **Immunity**, v. 6, p. 673–679, 1997.

TAMURA, T, *et al.* ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. **Immunity.**, v. 13, p.155–165, 2000.

[http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00016-9)

TANIGUCHI, T. *et al.* IRF family of transcription factors as regulators of host defense. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p. 623–55, 2001.

TESTA, U., *et al.* Impaired myelopoiesis in JEM Vol. 213, No. 4 603 mice devoid of interferon regulatory factor 1. **Leukemia**, v. 18, p. 1864–1871, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403472>

TOLEDO, M.J, *et al.* Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **J Antimicrob Chemother.**, v. 53, p.1045-53, 2004.

VIOTTI, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.7, p. 157-163, 2009.

VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med**, v.144, p.724–34, 2006.

WALTON, M.I, WORKMAN, P. Método cromatográfico líquido de alta performance de fase reversa para a determinação simultânea do 2- nitroimidazol benznidazol e seu metabólito amina em materiais biológicos. **J Chromatogr.**, v. 375, p. 190-6, 1986.

WANG, F. *et al.* Serum IFN- $\gamma$ -inducible chemokines CXCL9 and CXCL10 are elevated in non-immediate drug hypersensitivity reactions. **Asian Pac J Allergy Immunol.**, v.34, p. 236-241, 2016. DOI 10.12932/AP0679

WARD, L.S.*et al.* Serum cytokines in chronic Chagas' disease. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.32, n.3, p. 285-9, 1999.

WHITE, K.D, *et al.* Evolving models of the immunopathogenesis of T cell–mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 136, p. 219–234, 2015.

WHO, World Health Organization. **Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series n. 905.** Geneva, 2002.

WHO, World Health Organization. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases.** World Health Organization, Geneva, 2010.

WHO, World Health Organization. **World Chagas Disease Day: finding and reporting every case**, 2022. Disponível em: < <https://www.who.int/news/item/14-04-2022-world-chagas-disease-day-bringing-a-forgotten-disease-to-the-fore-of-global-attention>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

WORKMAN, P. *et al.* Farmacocinética pré-clínica do benzonidazol. **Br J Câncer**, v. 50, p. 291-03, 1984.

XU, H; DILULIO, N.A; FAIRCHILD, R.L.T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: IFN-g producing (Tcl) effector CD8\_ T and IL-4:IL- 10 producing (Th2) negative regulatory CD4\_ T cells. **J. Exp. Med.**, v.183, p. 1001–1012, 1996.

YAMADA, G., *et al.* Specific depletion of the B-cell population induced by aberrant expression of human interferon regulatory factor 1 gene in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p. 532–536, 1991.

ZAZZARA, M.B *et al.* Adverse drug reactions in older adults: a narrative review of the literature. **European Geriatric Medicine**, v. 12, p. 463–473, 2021.

