

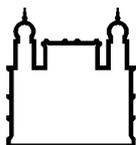
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

Acompanhamento da parasitemia, dos níveis sorológicos e da evolução clínica de portadores da doença de Chagas crônica residentes no Mato Grosso do Sul, onze anos após tratamento com benznidazol

CLARA CAROLINA SILVA DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CLARA CAROLINA SILVA DE OLIVEIRA

Acompanhamento da parasitemia, dos níveis sorológicos e da evolução clínica de portadores da doença de Chagas crônica residentes no Mato Grosso do Sul, onze anos após tratamento com benznidazol

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto

Colaborador: Prof. Dr. José Borges Pereira

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

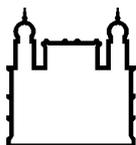
O48 Oliveira, Clara Carolina Silva de

Acompanhamento da parasitemia, dos níveis sorológicos e da evolução clínica de portadores da doença de Chagas crônica residentes no Mato Grosso do Sul, onze anos após tratamento com benznidazol / Clara Carolina Silva de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2013.
xix,118 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.
Bibliografia: f. 81-108

1. Doença de Chagas. 2. Benznidazol. 3. Níveis de IgG. 4. Parasitemia. 5. Cardiopatia. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CLARA CAROLINA SILVA DE OLIVEIRA

Acompanhamento da parasitemia, dos níveis sorológicos e da evolução clínica de portadores da doença de Chagas crônica residentes no Mato Grosso do Sul, onze anos após tratamento com benznidazol

ORIENTADORA: Profa. Dra. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto

COLABORADOR: Prof. Dr. José Borges Pereira

Aprovada em: 25/03/2013

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro - Presidente

Profa. Dra. Silvana Maria Eloi Santos

Profa. Dra. Kátia Calabrese

Prof. Dr. Adeilton Brandão (Suplente)

Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa (Suplente)

Rio de Janeiro, 25 de março de 2013.

A todos aqueles que contribuíram para os caminhos que percorri,
para os méritos que conquistei, para as lições que aprendi,
para os momentos que vivenciei.

Clara Carolina

Agradecimentos

Aos meus queridos e maravilhosos pais e mães por absolutamente tudo: obrigada por minha vida, por minhas oportunidades, pela paciência e principalmente, por minha formação enquanto pessoa.

Ao meu querido irmão André Luiz que eu tanto amo.

A cada um de meus amigos, que sabem o quanto representam para mim.

Às pessoas com as quais tive a honra de grandes aprendizados.

Aos meus professores que me acompanham/acompanharam desde o início dessa jornada, em especial à Profa. Dra. Joelma Mesquita.

Aos meus orientadores e professores Dra. Constança Britto e Dr. José Borges, pela oportunidade, atenção e ensinamentos.

Ao Dr. Otacilio Moreira, também meu orientador e professor, pela paciência, interesse, apoio e atenção que foram tão fundamentais e que perduraram por todo o período de meu Mestrado.

À incomparável Myllena Melo, muito obrigada!

À Angélica Cardoso, pela constante presença, participação e carinho.

Ao Dr. Carlos Alves, pelo apoio desde o início do processo seletivo.

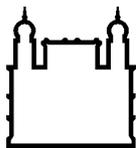
A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, especialmente à amiga Ana Carolina Mondaine.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias, pela atenção e contribuição, que foram essenciais para a conclusão desse Mestrado.

Ao estatístico Júlio Lima, pela atenção e receptividade.

A escadaria só é concluída quando o último degrau é atingido,
mas é no decorrer do percurso que
aprendemos a dar cada passo...

Clara Carolina



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Acompanhamento da parasitemia, dos níveis sorológicos e da evolução clínica de portadores da doença de Chagas crônica residentes no Mato Grosso do Sul, onze anos após tratamento com benznidazol

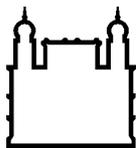
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clara Carolina Silva de Oliveira

A doença de Chagas representa um sério problema para a saúde pública, causando grandes impactos econômicos e sociais. Os estudos referentes à essa patologia apresentam várias lacunas incluindo a necessária identificação de novas terapias mais seletivas (em especial para portadores crônicos) e de ferramentas laboratoriais a serem utilizadas para diagnóstico e monitoramento de falha terapêutica e progressão das patologias clínicas, das quais a mais evidente é a cardiomiopatia chagásica crônica. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi monitorar no período de 11 anos (1999-2010/2011), a evolução da parasitemia, dos níveis séricos e dos sinais clínicos em pacientes portadores da infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*, residentes no Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul). Para tais fins, realizamos (i) ensaios moleculares de PCR qualitativa e PCR quantitativa (qPCR) para acompanhamento da parasitemia e carga parasitária, (ii) testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA recombinante e hemaglutinação (HAI) para acompanhamento dos níveis séricos de Ig G, (iii) além da avaliação clínica pela anamnese e pelo eletrocardiograma de repouso (ECG) para avaliação da evolução da cardiopatia. Na primeira parte do estudo (1999) 110 portadores crônicos de doença de chagas foram recrutados e submetidos aos exames/técnicas mencionados anteriormente. Destes, devido a recusa/contra indicação médica, somente 63 foram tratados por 60 dias com benznidazol (Bz) na dose de 5mg/kg/dia (grupo Bz), restando 47 indivíduos que constituíram o grupo sem terapia (grupo não tratado - NT). Na segunda parte do estudo (2010/2011),

após ativo recrutamento desta coorte inicial, 50 portadores consentiram em dar continuidade ao estudo, sendo 28 indivíduos tratados e 22 não tratados. O estudo longitudinal global (n=50) revelou queda de 75% na positividade da parasitemia detectada pela PCR qualitativa. Quando discriminamos esta redução entre os grupos “tratado” e “não tratado” não observamos diferenças na evolução da carga parasitária. A quantificação da carga parasitária por qPCR dos indivíduos que mantiveram-se positivos em 2010/11 para PCR convencional também não detectou diferenças entre ambos os grupos (Bz e NT). A avaliação sorológica por IFI mostrou uma redução significativa dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* no conjunto dos portadores avaliados (n=50) no período, sendo a redução somente significativa no grupo de pacientes tratados pelo Bz. Porém, os ensaios de ELISA e de HAI demonstraram aumento dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* no curso do acompanhamento dos portadores sendo apenas significativo para o grupo tratado com Bz. Com relação a evolução clínica, observamos que a ausência de óbitos em portadores com ECG normal em 1999 foi indicativa de bom prognóstico. Por outro lado, houve menor progressão de cardiopatia no grupo Bz em comparação ao não tratado, indicativo de efeito protetor da terapia etiológica. Nossos dados sugerem que o uso de Bz possa contribuir para inibir/retardar a progressão da cardiopatia crônica induzida pela infecção por *T. cruzi* resultando em aumento de sobrevida e melhoria da qualidade de vida dos portadores, ainda que os indicadores sorológicos e moleculares aplicados no presente trabalho não tenham revelado a erradicação do parasitismo pelo benznidazol.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Acompanhamento da parasitemia, dos níveis sorológicos e da evolução clínica de portadores da doença de Chagas crônica residentes no Mato Grosso do Sul, onze anos após tratamento com benznidazol

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clara Carolina Silva de Oliveira

Chagas disease represents a serious threat to public health, causing major economic and social impacts. Studies regarding this pathology present several shortcomings including the necessary identification of new therapies more selective (especially for chronic patients) and laboratorial tools to be used for diagnosis and follow-up of treatment failure and to monitor the progression of clinical pathologies, being chronic Chagas cardiomyopathy the most evident. In this context, the aim of the present work was to monitor in a 11-year period (1999-2010/2011), the evolution of parasitaemia, serum levels and clinical signs in patients with chronic infection with *Trypanosoma cruzi*, residents in Rio Verde Sanitary District (Mato Grosso do Sul). For such purposes, we performed (i) molecular assays for qualitative PCR and quantitative PCR (qPCR) to monitor the parasitaemia and parasite load, (ii) serological tests including indirect immunofluorescence (IIF), recombinant ELISA and hemagglutination (HAI) for monitoring the levels of IgG in sera and, (iii) clinical assessment by history and resting electrocardiogram (ECG) to evaluate the progression of heart disease. In the first part of the study (1999) 110 patients with chronic Chagas disease were recruited and subjected to the tests/techniques mentioned above. Of these, due to refusal or against medical advice, only 63 were treated for 60 days with benznidazol (Bz) at a dose of 5mg/kg/day (Bz group) and 47 subjects constituted the group that do not receive treatment (untreated group - NT). In the second part of the study (2010/2011), after active recruitment of this initial

cohort, 50 patients consented to continue the study, being 28 treated subjects and 22 that not undergo therapy with Bz. The global longitudinal study (n = 50) showed a reduction of 75% in the positivity of parasitaemia detected by qualitative PCR. When this reduction was discriminated between "treated" and "untreated" groups, no differences in the evolution of parasite load were observed. The quantification of parasite load by qPCR from individuals who remained positive in 2010/11 for conventional PCR also showed no differences between both groups (Bz and NT). The serological evaluation by IIF showed a significant reduction in the IgG anti-*T. cruzi* titers in the totality of patients evaluated (n = 50) in the period, with significant reduction observed only in the Bz treated group. However, ELISA assays and HAI demonstrated increased levels of IgG anti-*T. cruzi* in the course of monitoring patients, being significant only for the Bz treated group. With regard to the clinical outcome, we observed that the absence of deaths in patients with normal ECG in 1999 was an indicative of good prognosis. On the other hand, there was less progression of heart disease in the Bz treated group compared to the untreated patients, suggesting a protective effect of the etiologic therapy. Our data suggest that the use of Bz may contribute to inhibit/slow the progression of chronic heart disease induced by *T. cruzi* infection resulting in increased survival and improved quality of life for the patients, although the serological and molecular indicators used in the present work have not revealed the eradication of parasitism by benznidazol.

Lista de figuras

Figura 1.1: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 1.2: Representação esquemática da molécula de minicírculo de *T. cruzi*.

Figura 1.3: Evolução sorológica e parasitológica durante a infecção aguda e crônica da doença de Chagas.

Figura 1.4: Manifestações gastrointestinais da doença de Chagas crônica.

Figura 4.1: Estado do Mato Grosso do Sul e a localização do Distrito Sanitário de Rio Verde representado por 12 municípios.

Figura 4.2: Estudo descritivo da coorte de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (MS) em 1999 (primeira parte do estudo).

Figura 4.3: Situação da coorte de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (MS) entre 1999 - 2010/2011.

Figura 4.4: Estudo longitudinal da coorte de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) entre 1999 - 2010/2011.

Figura 5.1: Distribuição atual (2010/2011) dos grupos de indivíduos portadores de DC residentes no Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) recrutados em 1999.

Figura 5.2: Segundo o gênero, distribuição da população de portadores de DC estudada no distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) em 2010/2011.

Figura 5.3: Segundo a naturalidade, distribuição da população de portadores de DC do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul).

Figura 5.4: Acompanhamento da parasitemia pelo teste de PCR qualitativo na população de portadores de DC do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS), nos anos 1999 e 2010/2011.

Figura 5.5: Curva padrão com 9 pontos da diluição de DNA de *T. cruzi* (CL Brener) em sangue contendo guanidina-EDTA para verificação do desempenho da amplificação pelo sistema TaqMan, através da avaliação dos parâmetros da curva padrão.

Figura 5.6: Curvas de amplificação do ensaio de qPCR em tempo real - sistema TaqMan para o alvo DNA nuclear satélite de *T. cruzi*.

Figura 5.7: Acompanhamento da parasitemia pelo teste de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) nos 8 portadores de DC (positivos pela PCR qualitativa em 2010) da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS), nos anos 1999 e 2010/2011.

Figura 5.8: Frequências de cardiopatia na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Lista de tabelas

Tabela 4.1: Características dos 12 municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS).

Tabela 5.1: Distribuição das frequências dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de IFI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.2: Evolução dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* pelo teste de IFI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.3: Evolução dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de IFI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.4: Evolução dos índices de reatividade de Ig G anti-*T. cruzi* pelos testes de ELISA recombinante em soros da população urbana de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.5: Evolução das médias das densidades ópticas de Ig G anti-*T. cruzi* identificadas por testes de ELISA recombinante em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.6: Distribuição das frequências dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de HAI em soros da população urbana de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.7: Evolução dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* pelo teste de HAI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.8: Evolução dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de HAI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.9: Distribuição dos graus de cardiopatia na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.10: Evolução da cardiopatia na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.11: Percentuais de óbitos registrados na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Tabela 5.12: Aspectos demográficos e eletrocardiográficos de evolução para óbito na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Lista de siglas e abreviaturas

°C: Graus Celsius

µg/µL: Micrograma por mililitro

µL: Microlitro

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BENEFIT - Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis

BZ: Benznidazol

CA-2: Trypomastigote surface protein

CEP: Comitê de Ética e Pesquisa

CL Brener: cepa do parasita *T. cruzi*

Cone Sul: Região composta pelas zonas austrais da América do Sul, ao sul do Trópico de Capricórnio.

CRA: Cytoplasmic Repetitive Antigen

Ct: Threshold cycle

cut-off: limite de corte

DC: doença de Chagas

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DO: Densidade óptica

DSRV: Distrito Sanitário de Rio Verde

DTUs: Discret Taxonomic Units

ECG: Eletrocardiograma

EDTA: Ácido etilenodietildinitrotetracético

ELISA rec: Recombinant Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

et al.: Expressão latina que significa "e outros".

F= Ferramenta estatística para análise de variância

FC-ALTA: Anti-live trypomastigotes antibody by flow-cytometry

fg: fentograma

Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz

FRA: Flagellar Repetitive Antigen

GEB: Solução de Guanidina-EDTA

Guanidina-HCl: Cloridrato de guanidina

h: hora

HAI: Hemaglutinação indireta

Hemosul: Centro Hematologia Hemoterapia Mato Grosso do Sul Geral

HIV/AIDS: Human immunodeficiency virus / Acquired immunodeficiency syndrome

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFI: Imunofluorescência indireta

Ig: Imunoglobulina

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

IR: Índice de reatividade

kDNA: DNA do cinetoplasto

KMP-11: Kinetoplastid Membrane Protein 11

LIT: Liver Infusion Tryptose

LMCo: Teste de Lise Mediada pelo Complemento

M: molar

MAP: Microtubule-Associated Protein

mg/Kg: Miligrama/Quilograma

mL: Mililitro

mm Hg: Milímetro de mercúrio

mM: Milimolar

mpk: miligrama por quilo de peso

MS: Mato Grosso do Sul

N= Total de pacientes

ND: Não detectado

NFX: Nifurtimox

ng/ μ L: Nanograma por microlitro

nm: Nanômetros

nM: Nanomolar

NTC: Negative Template control

NYHA: The New York Heart Association classification

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

P. : Panstrongylus

p= Probabilidade de significância

PAHO: Pan American Health Organization

pb: Pares de base

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGE: pulse field gel electrophoresis

pH: Potencial hidrogeniônico

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

qsp: Quantidade suficiente para

RJ: Rio de Janeiro

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

SAPA: Shed-Acute-Phase-Antigen

sp: Citação de uma espécie de um gênero

T. cruzi: Trypanosoma cruzi

T.: Trypanosoma

TBE: Trizma base; Ácido Bórico; EDTA

TDR-WHO: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases

TE: Tris-EDTA

TESA-blot: Trypomastigote excreted-secreted antigens

U/ μ L: Unidades por microlitro

UFMS: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

WHO: World Health Organization

Xeno: Xenodiagnóstico

SUMÁRIO

1. Introdução	2
1.1. Breve histórico da doença de Chagas	2
1.2. Aspectos gerais da doença de Chagas: Epidemiologia	3
1.3. Agente etiológico – <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.3.1. Ciclo biológico	6
1.3.2. Genoma e Diversidade Genética	8
1.4. Aspectos Clínicos da Doença de Chagas	11
1.4.1. Fases e Formas Clínicas	11
1.4.2. Patologia e Patogênese	16
1.5. Diagnóstico da doença de Chagas	17
1.5.1. Testes Parasitológicos Indiretos	19
1.5.2. Diagnóstico Molecular	20
1.5.3. Testes sorológicos	22
1.6. Tratamento etiológico	26
1.7. Critérios de cura	28
1.8. Doença de Chagas no Estado de Mato Grosso do Sul	31
2. Justificativa	33
3. Objetivos	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. Material e Métodos	35
4.1. Casuística	35
4.1.1. Características da área de estudo	35
4.1.2. População em estudo	36
4.2. Avaliação laboratorial	39
4.2.1. Métodos moleculares	40
4.2.1.1. Clivagem do alvo kDNA	40
4.2.1.2. Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)	40
4.2.1.3. Reação em cadeia da polimerase qualitativa (PCR convencional)	41
4.2.1.4. Eletroforese em gel de agarose	42
4.2.1.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	43
4.2.2. Métodos sorológicos	44
4.2.2.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)	44
4.2.2.2. ELISA recombinante (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	45
4.2.2.3. Hemaglutinação Indireta (HAI)	46
4.3. Avaliação clínica	46
4.3.1. Avaliação eletrocardiográfica	47
4.3.2. Comprometimento miocárdico	47
4.3.3. Evolução da miocardiopatia	48
4.4. Análise Estatística	49
5. Resultados	50
5.1. Avaliação da população de Mato Grosso do Sul	50
5.1.1. Dados epidemiológicos	50
5.2. Avaliação laboratorial	52
5.2.1. Molecular	52
5.2.2. Sorológica	58
5.2.2.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)	58
5.2.2.2. ELISA recombinante	60

5.2.2.3. Hemaglutinação Indireta (HAI).....	61
5.3. Avaliação clínica	64
5.3.1. Eletrocardiograma	64
6. Discussão.....	68
7. Conclusões.....	78
8. Referências	81
9. Anexos	109

1. Introdução

1.1. Breve histórico da doença de Chagas

A enfermidade de Chagas existe no continente americano há mais de 6.000 anos. A hipótese clássica propõe que a doença tenha sido originada na região Andina, quando os indivíduos começaram a domesticar animais, adquirindo hábitos sedentários e adotando a agricultura (Ferreira *et al.*, 2011). A análise por ensaios moleculares, efetuados a partir de amostras obtidas de múmias humanas exumadas de regiões costeiras e de vales do norte do Chile e sul do Peru, demonstrou a presença do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Essas múmias correspondem a distintos grupos culturais e aos primeiros humanos na América (Aufderheide *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2011).

Entre os anos de 1907 e 1909, um jovem médico e cientista brasileiro chamado Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879–1934), foi enviado para investigar um surto de malária no município de Lassance, em Minas Gerais, durante a construção da importante ferrovia denominada Central do Brasil. A doença, primariamente confundida com sífilis, causava insuficiência cardíaca e um número significativo de mortes repentinas. Poucas semanas após Carlos Chagas ter identificado o parasito *Trypanosoma* no intestino de triatomíneos, ele examinou uma criança de nome Berenice, que apresentava inchaço em uma das pálpebras, além de febre e mal-estar. Uma gota de seu sangue revelou o mesmo *Trypanosoma* encontrado no inseto vetor, e assim, o médico brasileiro descreveu as manifestações clínicas do primeiro caso agudo em humanos, além de definir por completo o ciclo de transmissão (vetores, hospedeiros e um novo parasito – o *Trypanosoma cruzi*) (Chagas, 1909; 1911; Massad, 2008).

Apesar do parasito ter sido identificado em 1909, somente a partir de 1960 os programas de controle da doença de Chagas foram estabelecidos pela primeira vez (Abad Franch *et al.*, 2011; Dias, 2009; Silveira, 2002).

1.2. Aspectos gerais da doença de Chagas: Epidemiologia

A enfermidade denominada doença de Chagas é causada pela infecção adquirida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual é naturalmente transmitido através de fezes/urina contaminadas do inseto vetor, depositadas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (Chagas, 1909). Outras importantes vias de transmissão do parasito incluem transfusão de sangue, congênita, que ocorre entre 1–10% das mulheres grávidas infectadas e via oral, que ocorre através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Além desses mecanismos, podem ser citados com menores frequências, o transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (Prata, 2001; WHO, 2007). A forma de transmissão por via oral foi recentemente identificada como causa de vários surtos epidêmicos da doença de Chagas aguda, como por exemplo, na Amazônia legal e no Sul do Brasil (Coura & Dias, 2009; Valente, 2005; Alarcón de Noya *et al.*, 2010; Rodriguez-Morales, 2008).

A doença de Chagas (DC) é considerada a doença parasitária com o maior impacto sócio-econômico na América Latina, devido à elevada morbidade e mortalidade, incluindo a ocorrência de mortes súbitas (Santos *et al.*, 2012). A doença afeta atualmente um número estimado de 8 milhões de pessoas em 21 países endêmicos, com 28 milhões de indivíduos sob risco de contrair a infecção e incidência de aproximadamente 50.000 novos casos por ano (WHO, 2010; Rassi *et al.*, 2010). Essa enfermidade é um exemplo de endemia resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente, das distorções econômicas e dos contrastes sociais (Vinhaes & Dias, 2000). A doença afeta primariamente as populações rurais em áreas carentes, onde o contato de humanos com os vetores é freqüente. Programas de controle de vetores têm tido sucesso na redução de incidência de novos casos da doença, entretanto, há ainda a necessidade de oferecer cuidados/tratamento aos portadores que já apresentam infecção crônica estabelecida (WHO, 2012).

A doença é endêmica em uma ampla faixa territorial que se estende desde o México até a Argentina. Nas últimas décadas, a migração rural para áreas urbanas permitiu a difusão da doença para essas áreas, enquanto mais recentemente, a migração em larga escala de indivíduos dessa região endêmica para outra não

endêmica, tais como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Japão, Austrália e muitos países da Europa, fez com que a doença se disseminasse pelo mundo, assumindo um aspecto globalizado (Schmunis, 2007; Gascon *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2010). Nos EUA, estima-se que 325.671 imigrantes nos EUA estejam infectados com *T. cruzi*, sendo a maioria proveniente do México e América Central (Bern & Montgomery, 2009). A Espanha possui o segundo maior número de imigrantes infectados, em torno de 47.738 – 67.423, a maioria originária do Equador, Argentina, Bolívia e Peru (Gascon *et al.*, 2010), seguida por Canadá com 5.553 infectados e Austrália com 3.088 casos notificados (Schmunis & Yadon, 2010). Embora a triagem das bolsas de sangue para doença de Chagas tenha sido recentemente instituída nos EUA e em outros países não endêmicos (Bern *et al.*, 2008), receptores de sangue contaminado e/ou de órgãos advindos de portadores de DC, ainda permanecem sob risco de desenvolver essa patologia nos próximos anos, demandando cuidados. Além disso, o vetor é encontrado no sudeste dos EUA, onde casos da doença autóctone foram reportados (Dorn *et al.*, 2007).

Os vetores triatomíneos capazes de veicular o parasito representam mais de cem espécies, sendo responsáveis pela transmissão vetorial da infecção pelo *T. cruzi*, intervindo diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia da doença de Chagas (Vinhaes & Dias, 2000). A partir de 1990, iniciativas regionais e internacionais contribuíram para o controle vetorial, reduzindo substancialmente o número de novas infecções na América Latina (Mott *et al.*, 1990; WHO, 2002). Considera-se que Chile, Uruguai, Brasil e grande parte da América Central (Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicarágua) estejam livres da transmissão vetorial a partir dos vetores domésticos, fato suportado pelo decréscimo na proporção de crianças em países endêmicos que demonstram a presença de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* (Moncayo & Ortiz, 2006).

O número de infecções relacionadas à transfusão também diminuiu substancialmente em todos os países Latino Americanos, a partir de triagem em bancos de sangue, que passou a ser compulsória (Schmunis, 1991). Mesmo assim, após mais de cem anos de sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa uma ameaça à saúde pública, considerando que milhões de pessoas com infecção crônica por *T. cruzi* estão sob risco de desenvolver patologias cardiovasculares e/ou digestivas, aliado ao elevado número de casos da doença, fazendo com que essa patologia represente uma das principais causas de morbidade cardiovascular e morte prematura na América Latina (Coura, 2009; Coura & Dias, 2009; Oliveira *et*

al., 2007; Rassi Jr, Rassi, Rezende, 2012). Contextualmente, a grande massa de infectados pelo *T. cruzi* nos países endêmicos deve-se ao clássico contato homem-suscetível/triatomíneo-infectado no âmbito de vivendas e condições de vida insalubres. Como apontado anteriormente, a evolução dos fatos históricos e sociais contribuiu para a urbanização da doença nos grandes centros, proporcionando assim, o aumento do risco de contrair a doença de Chagas por via transfusional ou transplante de órgãos em regiões não-endêmicas (Dias & Schofield,1998; Dias, 2007).

A prevalência da infecção chagásica nas Américas foi mais investigada nos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai) e Venezuela, por intermédio de inquéritos sorológicos mais extensos, os quais serviram para demonstrar a importância da doença como problema de saúde pública, tendo sido assim, determinantes para a instituição e implementação das ações de controle (Silveira, 2000). Assim, um marco de considerável relevância foi assumido pelos países do Cone Sul em Brasília, em julho de 1991, onde aprovaram a Iniciativa Internacional de Controle da Doença de Chagas, pela qual ficou estabelecido que além das ações de eliminação do *Triatoma infestans* domiciliar dessas regiões endêmicas, essa iniciativa também objetivava a interrupção de transmissão de *T. cruzi* por via transfusional (Schofield & Dias, 1999; Moncayo, 1999). Esse exemplo foi seguido pelos países do Pacto Andino (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) e da América Central (El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicarágua) a partir de 1997 (WHO, 1997; Moncayo, 1999). Vale ressaltar que a Iniciativa dos países do Cone Sul das Américas não deve ser entendida como o marco inicial de controle da doença de Chagas na sub-região, pois vários países já tinham um programa de controle.

Embora ainda se considere que no Brasil não exista mais a transmissão vetorial por *Triatoma infestans* (principal espécie domiciliada), surtos têm sido documentados com frequência, como os de transmissão oral, podendo estar relacionados à presença de outros vetores e/ou reservatórios infectados (Lainson *et al.*, 1980; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1999; Valente, 2005; Dias, 2006; Steindel *et al.*, 2007; Nobrega *et al.*, 2009). A transmissão oral da doença de Chagas deve ser considerada quando mais de um caso agudo de doença febril, sem outras causas, estiver relacionado com a suspeita alimentícia. Tal suspeita deve ser confirmada pela presença do parasito após exame (microscopia direta) do sangue ou amostra de fluidos biológicos do paciente (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

Como brevemente relatado anteriormente, a doença de Chagas transmitida por via oral é geralmente responsável pela ocorrência de surtos esporádicos de infecção aguda em áreas desprovidas de insetos vetores domiciliados, resultando em apresentação clínica aguda mais severa e altas taxas de mortalidade (Pereira *et al.*, 2009). Situações imprevisíveis na região da Amazônia Brasileira e mais raramente, em áreas que não apresentam endemicidade, têm revelado casos emergentes de doença de Chagas (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

1.3. Agente etiológico – *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário do filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, ordem Kinetoplastida, que compreende as famílias Bodonidae e Trypanosomatidae. Nestas famílias encontramos flagelados com 1 ou 2 flagelos que se originam de uma invaginação, conhecida como bolsa flagelar e normalmente contém uma estrutura paraflagelar, além de uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior dessa mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (Clayton, 2002).

1.3.1. Ciclo biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, apresentando variações morfológicas e funcionais durante seu desenvolvimento em insetos vetores e hospedeiros mamíferos, com alternância entre estágios que sofrem divisão binária e formas não replicativas e infectantes (Brener, 1971; 1973). O inseto triatomíneo se torna infectado no ato do repasto sanguíneo, através da ingestão de sangue de animais ou humanos que tenham parasitas circulantes (forma tripomastigota). No trato digestivo dos triatomíneos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (forma multiplicativa) e depois, em formas tripomastigotas metacíclicas, na porção final do intestino do hospedeiro invertebrado, um processo conhecido como metaciclogênese (Contreras *et al.*, 1993).

A infecção nos mamíferos tem início quando estes entram em contato com as formas metacíclicas infectantes do parasita, que são eliminadas com as fezes e urina de triatomíneos após o repasto sanguíneo. Esse contato ocorre através da mucosa ou injúria tecidual, que pode ser pré-existente ou resultante da picada do

inseto. O parasita não penetra a pele intacta, somente infectando o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele (Contreras *et al.*, 1993).

As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir diferentes tipos celulares que encontram no hospedeiro vertebrado, incluindo macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Ao invadir estas células, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas, que se proliferam intracelularmente por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas, que são as principais formas liberadas na corrente sanguínea pela ruptura da célula. Os tripomastigotas podem então invadir novas células localizadas no sítio de infecção ou podem atingir a via linfática e sanguínea, e potencialmente atingir diferentes tecidos do hospedeiro, invadindo os mais diversos tipos celulares, em especial células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e ganglionares.

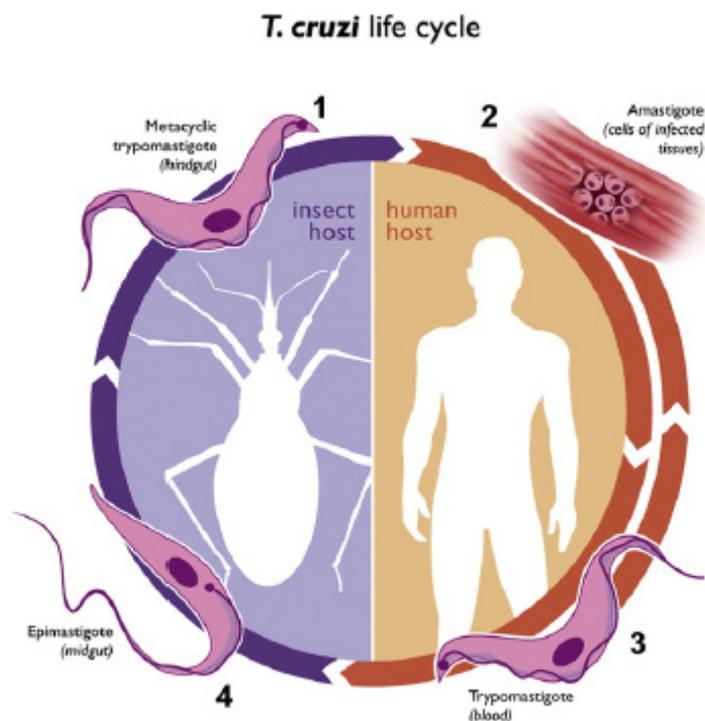


Figura 1.1: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotas metacíclicos infectantes são transmitidos para o hospedeiro vertebrado através das fezes e urina de insetos vetores Reduviidae durante o repasto sanguíneo obrigatório (1). No vertebrado, as formas metacíclicas infectam vários tipos celulares, incluindo células cardíacas musculares, onde se diferenciam em formas amastigotas e multiplicam-se por fissão binária (2). Amastigotas intracelulares diferenciam-se em tripomastigotas que, ao serem liberados na corrente sanguínea, podem invadir outras células de diferentes tecidos ou serem ingeridos pelo inseto triatomíneo, completando o ciclo (3). No trato digestivo do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas que se multiplicam no lúmen do intestino (4) e posteriormente, migram para a porção final do intestino, dando origem às formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas excretas do inseto. Fonte: Cuervo, Domont, Jesus (2010).

1.3.2. Genoma e Diversidade Genética

Da mesma forma que ocorre em outros eucariotos, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria (Klingbeil & Shapiro, 2009). Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria é única e contém uma região especializada, denominada de cinetoplasto, que alberga o DNA mitocondrial, também chamado de DNA do cinetoplasto ou kDNA. No *T. cruzi*, o DNA mitocondrial perfaz cerca de 20 a 25% do

DNA total da célula e é composto por dois tipos de moléculas, os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos (20.000 pb; 50 cópias por célula) codificam para proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial (Verlag & Verlag, 2001). Os minicírculos (1.400 pb; 10.000 a 20.000 cópias por célula) codificam para RNAs pequenos (RNAs guia) que participam do processo de edição dos transcritos pelo maxicírculo.

O minicírculo contém quatro regiões de seqüência conservada intercaladas por quatro regiões de seqüência variável (Figura 1.2). Estas últimas apresentam alta taxa de mutação, que confere grande diversidade entre os minicírculos dos isolados de *T. cruzi* (Degraeve *et al.*, 1988). Nas regiões de seqüência conservada, observa-se a ocorrência de blocos de seqüências conservadas ou *mini repeats*, utilizadas como molde para o desenho de oligos iniciadores em processos moleculares de detecção e tipagem de *T. cruzi*, estudos laboratoriais, diagnósticos, clínicos e epidemiológicos (Sturm *et al.*, 1989).

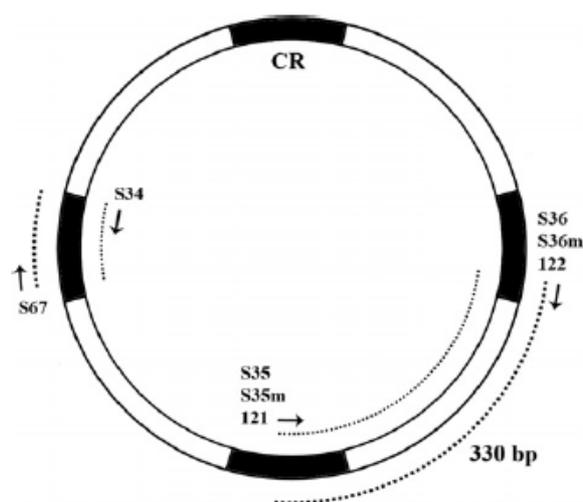


Figura 1.2: Representação esquemática do minicírculo de *T. cruzi*, mostrando as quatro regiões conservadas (retângulos em preto), de aproximadamente 120 pb cada, com os respectivos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, sentido da amplificação por PCR (setas) e os produtos de amplificação (linhas tracejadas). Os retângulos em cor branca, correspondem às quatro regiões de seqüências hiper variáveis dos minicírculos. Fonte: Flegontova *et al.*, 2012.

Em 2005, a seqüência completa do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* foi obtida por um consórcio internacional, juntamente com os dados do genoma de dois outros tripanossomatídeos causadores de importantes doenças tropicais, o *Trypanosoma brucei* e a *Leishmania major* (El-Sayed *et al.*, 2005). Naquela

oportunidade foram identificados pares de alelos para metade dos genes de CL Brener. A anotação da seqüência completa do genoma, que apresenta um conteúdo de G+C de 51%, indicou a existência de 22.570 genes codificando proteínas sendo que destes, 12.570 representam pares de alelos. Deste total (cerca de 12.000 genes), foi possível determinar a função de 50.8% com base na literatura e em resultados de similaridade com proteínas já caracterizadas ou na presença de domínios funcionais característicos (El-Sayed *et al.*, 2005).

Apesar do número exato de cromossomos na espécie não ter sido ainda definido, uma vez que esses não se condensam durante a divisão celular (De Souza, 2002), análises de PFGE (*pulse field gel electrophoresis*) de várias cepas seguidas de hibridação com seqüências teloméricas e sondas de genes conservados, levaram à conclusão de que trata-se de um genoma diplóide com um número estimado entre 20 e 40 cromossomos homólogos apresentando tamanhos muito diferentes (Teixeira *et al.*, 2006). Além disso, o genoma nuclear do *T. cruzi* tem como característica a escassez de íntrons, os quais foram identificados em apenas quatro genes. Há uma grande variedade de seqüências repetidas, demonstrando ser um genoma de grande plasticidade (Clayton, 2002). Outra característica peculiar do genoma dos tripanossomatídeos é a presença de longas unidades de transcrição policistrônica (Muhich & Boothroyd, 1988), que inclui vários genes organizados em tandem, os quais em geral, não são funcionalmente relacionados (Tschudi & Ullu, 1988) e não apresentam o mesmo padrão de regulação (Clayton, 2002; Tschudi & Ullu, 1988).

A diversidade do genoma de *T. cruzi* e a multiplicidade de seus genótipos e fenótipos são bem reconhecidas (Dvorak *et al.*, 1982; Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000; Devera *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2009). *T. cruzi* é uma espécie heterogênea, representada por subgrupos de cepas, estoques ou isolados que circulam entre hospedeiros mamíferos e insetos vetores.

Em 1999, a comunidade científica reuniu os isolados de *T. cruzi* em dois grupos principais com características epidemiológicas particulares e estes passaram a ser denominados por consenso, grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Anonymous, 1999). As cepas do grupo *T. cruzi* I predominam no ciclo silvestre e cepas do grupo *T. cruzi* II predominam no ciclo doméstico da transmissão do parasita (Briones *et al.*, 1999). Posteriormente, com base na análise de outros marcadores genéticos, foi proposta a substituição do grupo *T. cruzi* II em cinco sub-grupos (Brisse *et al.*, 2000), ficando então a nova classificação denominada DTUs (*Discret Taxonomic Units*) I, IIa, IIb,

Ilc, Ild, Ile. Apesar de não ter sido oficialmente recomendada, esta nomenclatura vem sendo citada pela comunidade científica. Em 2005, Freitas e colaboradores propuseram a existência de uma terceira linhagem principal em *T. cruzi*, designada de *T. cruzi* III (Freitas *et al.*, 2005). Foi também evidenciada a presença de isolados híbridos originados por trocas genéticas entre cepas parentais. É interessante salientar que o clone CL Brener, organismo de referência do projeto genoma de *T. cruzi*, é um isolado híbrido (El-Sayed *et al.*, 2005). Mais recentemente, a nomenclatura sub-específica de *T. cruzi* foi revisada. Esta nova revisão inclui seis DTUs (*T. cruzi* I - VI), baseada em diferentes marcadores moleculares e características biológicas do parasito (Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012). Os conceitos de DTUs e evolução clonal foram estabelecidos no contexto da pesquisa relacionada à modelo de evolução em *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1986). Nos países que integram o Cone Sul, as DTUs TcII, TcV e TcVI são as principais responsáveis pela doença de Chagas, sendo que TcII predomina nos estados do leste e centro do Brasil, TcV na Argentina, Bolívia e Paraguai, e TcVI no Gran Chaco. TcI está relacionada com a doença humana na Amazônia, países Andinos, América Central e México (Zingales *et al.*, 2012).

1.4. Aspectos Clínicos da Doença de Chagas

1.4.1. Fases e Formas Clínicas

A fase inicial da infecção com *T. cruzi* pode durar de 4 a 8 semanas, quando gradativamente se instala a fase crônica, que persiste por toda a vida do portador (Laranja *et al.*, 1956; Dias, 1984; WHO, 2002). A fase aguda da doença de Chagas é reconhecida em apenas 1 a 2% dos indivíduos infectados. Geralmente é assintomática, mas pode compreender os fenômenos clínicos que se estabelecem nas primeiras semanas da infecção (doença febril não específica) e, do ponto de vista laboratorial, caracteriza-se pela demonstração, por meio de exame direto, das formas tripomastigotas no sangue e líquido dos pacientes (Laranja, 1953; Hoff *et al.*, 1978). Se a infecção ocorrer pela via vetorial, os indivíduos podem apresentar ou não os sinais de porta de entrada do parasito, caracterizados por uma lesão inflamatória na pele com formação cutânea ligeiramente saliente, arredondada, com

alguns centímetros de diâmetro, eritematosa, dura, quente e circundada por um edema elástico, denominado chagoma de inoculação (Mazza & Freire, 1940; Huggins *et al.*, 1996; Prata, 2001). Quando a porta de entrada se dá na região ocular, forma-se o sinal de Romaña, caracterizado por edema bipalpebral unilateral, elástico e indolor. Nessa fase, o indivíduo pode apresentar manifestações sistêmicas, tais como: edema localizado ou generalizado, aumento de linfonodos, alterações exantemáticas, esplenomegalia, hepatomegalia, comprometimento cardíaco e manifestações nervosas.

A ocorrência de mortes em pacientes na fase aguda é baixa, acometendo geralmente crianças (< 5% dos casos sintomáticos), sendo resultante de miocardite ou meningoencefalite graves, ou ambas (WHO, 2002; Rassi *et al.*, 2010). A gravidade da doença em neonatos com doença de Chagas adquirida congenitamente pode abranger desde a ausência de sintomatologia (Freilij & Altchek, 1995) até a doença fulminante culminando em óbito (Flores-Chavez *et al.*, 2008).

Levando em consideração que a maioria dos indivíduos na fase aguda pode não apresentar sintomatologia da doença, a mesma pode passar despercebida, sem ser diagnosticada, diminuindo assim, a possibilidade de cura parasitológica com o uso de tratamento específico (Prata, 2001). Por outro lado, terapias imunossupressivas (Nishioka, 2000) e infecções por HIV (Cordova *et al.*, 2008) podem desencadear a reativação das manifestações clínicas de fase aguda (miocardite aguda ou meningoencefalite), em pacientes com infecção crônica pelo *T. cruzi* (Hemmige *et al.*, 2012).

Após a fase aguda, a maior parte dos indivíduos (60 - 70% da população infectada) desenvolve uma resposta imune protetora (desaparecimento progressivo de IgM e elevação dos anticorpos específicos da classe IgG), resultando na queda da parasitemia e ausência de sinais e sintomas clínicos evidentes. Esses indivíduos entram então na forma indeterminada da infecção caracterizada pela presença de sorologia específica e ausência de manifestações clínicas, isso é, sem anormalidades eletrocardiográficas e/ou radiológicas no coração, esôfago ou cólon. Essa fase pode persistir por alguns meses até uma vida inteira (WHO, 2002). A maioria dos casos agudos não tratados evolui para a forma crônica indeterminada. A Figura 1.3 mostra o perfil da evolução sorológica e parasitológica durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas, em função da administração ou não de quimioterapia específica anti-*T. cruzi* (extraído de Rassi Jr *et al.*, 2012).

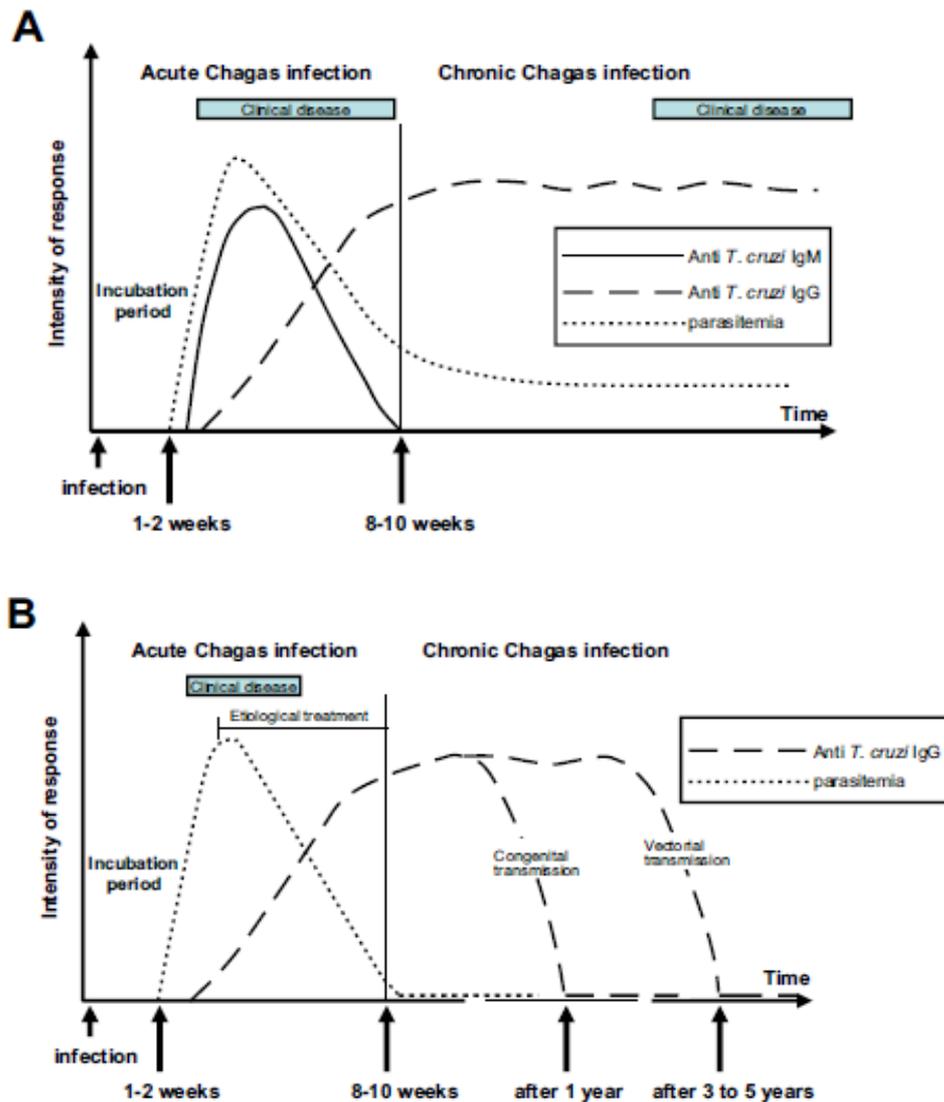


Figura 1.3: Evolução sorológica e parasitológica durante a infecção aguda e crônica da doença de Chagas. (A) Pacientes não-tratados. Uma a duas semanas após a infecção com *T. cruzi*, indivíduos apresentam a fase aguda com duração aproximada de até 2 meses. Essa fase da doença é caracterizada por intensa parasitemia, altos níveis de imunoglobulinas IgM anti- *T. cruzi* e aumento dos níveis de imunoglobulinas G (IgG). Com o término da infecção aguda, a parasitemia reduz significativamente em função do aumento de imunoglobulinas IgG, as quais atingem um nível elevado que pode persistir por toda a fase crônica da infecção. **(B) Pacientes tratados e curados.** A cura na fase aguda é acompanhada por *clearance* da parasitemia, observada imediatamente após o tratamento etiológico. A negatização da sorologia pós-tratamento ocorre após cerca de 1 ano para doença de Chagas congênita, e após 3 a 5 anos nos casos de transmissão vetorial. Pacientes tratados e não curados apresentam uma resposta similar àquela dos pacientes não tratados. Fonte: Rassi Jr, Rassi, Rezende, 2012.

Após anos ou décadas, 15 - 30% dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas desenvolvem complicações da infecção pelo *T. cruzi*, principalmente as cardiovasculares que podem levar à morte prematura, dependendo do grau de severidade. As conseqüências da infecção pelo *T. cruzi* em um determinado indivíduo resultam de interações complexas entre o perfil genético do parasito, o "background" imunogenético do hospedeiro e fatores ambientais (Rassi *et al.*, 2009. WHO, 2012). Como acima descrito, a fase crônica é caracterizada pela positividade sorológica para imunoglobulinas anti-*T. cruzi*, baixa parasitemia ou parasitemia subpatente e parasitismo tissular escasso, sendo difícil detectar o *T. cruzi* através de métodos parasitológicos diretos. As manifestações típicas da fase crônica estão relacionadas com o envolvimento de patologias no coração, esôfago, cólon, ou uma combinação destas, sendo agrupadas em três formas principais: cardíaca (20 a 30%), digestiva (10 a 15%) (Rassi Jr *et al.*, 2000; Marin-Neto *et al.*, 1999; 2010). A forma mista, que compreende envolvimento cardíaco e digestivo, também é observada em menor freqüência (Rezende, 1997; Prata, 2001; Santos *et al.*, 2012).

A forma digestiva da doença de Chagas é caracterizada por anormalidades intestinais e esofágicas ou megasíndromes (Figura 1.4), que caracterizam o megaesôfago e o megacólon chagásicos (Rezende, 1997). As alterações nessa forma em particular resultam principalmente de distúrbios no sistema nervoso entérico, essencialmente no plexo mioentérico de Auerbach. Além de notável redução, as células nervosas desse plexo apresentam fenômenos degenerativos durante o processo inflamatório (Andrade & Andrade, 1966; Tafuri & Brener, 1967). A desnervação ocorre de maneira irregular e em intensidade variável, em função de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro, ainda não completamente elucidados. Os principais sintomas gastrointestinais são disfagia e constipação severa (Teixeira *et al.*, 1980; Santos & Hudson, 1981).

Segundo Dias (2000), um dos fatores que constitui a gênese das diferenças regionais na prevalência da forma digestiva da doença de Chagas, está provavelmente relacionado às diferenças nas cepas/DTUs do parasito. Esta apresentação clínica predomina no Brasil central e Chile e ainda não foi identificada na Venezuela e América Central (Miles *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012).

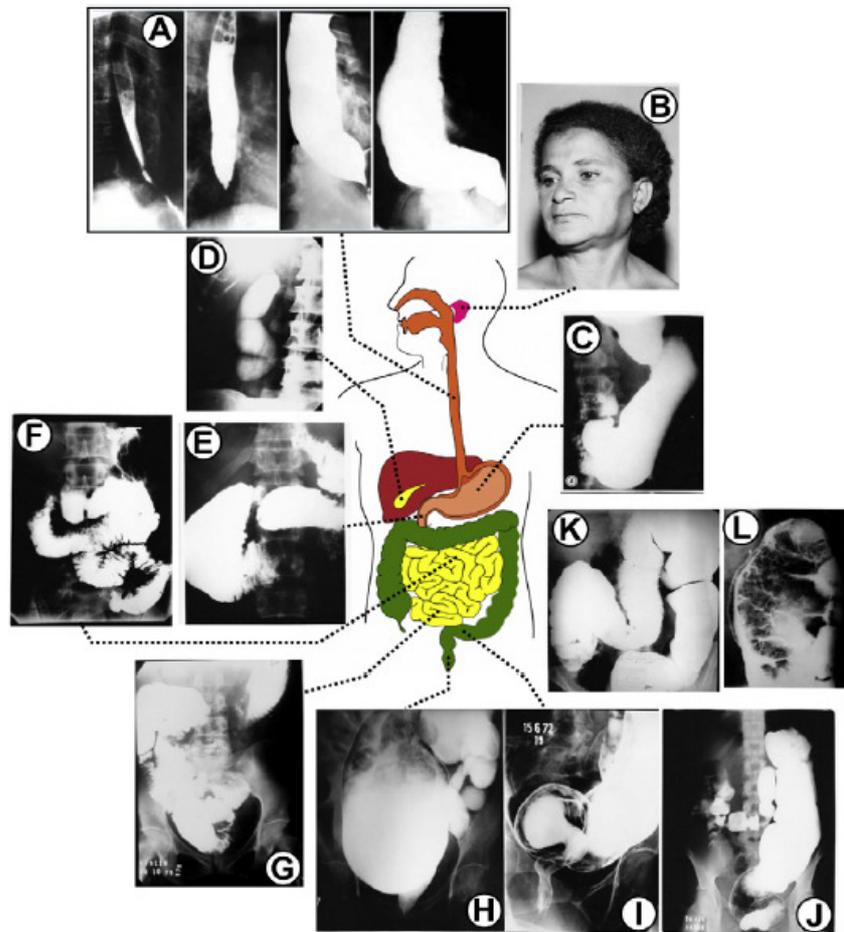


Figura 1.4: Manifestações gastrointestinais da doença de Chagas crônica. (A) Megaesôfago (grupos I,II,III e IV). (B) Parótidas hipertróficas em um paciente com megaesôfago. (C) Megaestômago associado com megaesôfago grupo IV. (D) Colecistomegalia. (E) Megaduodeno. (F) Megajejuno. (G) Megaíleo. (H) Megareto. (I) Megasigmóide. (J) Megaretosigmóide. (K) Megacólon total. (L) Fecaloma. C,D,E,F e G são manifestações raras. Fonte: Rassi Jr, Rassi, Rezende, 2012.

A forma cardíaca, por sua vez, é responsável pela maioria dos óbitos decorrentes da infecção chagásica, sendo considerada a forma clínica mais grave da infecção pelo *T. cruzi*. A severidade da doença é dependente do seu tempo de duração, assim como da localização e natureza das lesões cardíacas (Rassi *et al.*, 2010). A cardiopatia chagásica crônica é caracterizada, do ponto de vista anatomopatológico, por áreas de fibrose que substituem o tecido muscular cardíaco, gerando a destruição das fibras do coração, do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático e pela presença de um exsudato inflamatório ativo e progressivo. Além disso, observa-se cardiomegalia, caracterizada pelo aumento do coração

devido à dilatação e alteração do tecido muscular cardíaco. Aneurisma apical do ventrículo esquerdo é freqüente e, em certos casos, pode ocorrer tromboembolia e sinais de congestão passiva. As alterações eletrocardiográficas mais freqüentes na doença de Chagas cardíaca são extra-sístoles ventriculares isoladas ou repetitivas, alterações primárias da repolarização ventricular, que podem simular cardiopatia isquêmica, bloqueio completo do ramo direito isolado ou associado ao hemibloqueio anterior esquerdo, zonas eletricamente inativas, bloqueios atrioventriculares e taquiarritmia supraventricular (Gascon *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2006; Rassi Jr *et al.*, 2000; 2012). Radiografias de tórax são importantes no manejo dos pacientes nessa forma, pois permitem uma categorização mais precisa, através da análise do tamanho do coração e da circulação pulmonar. Na cardiopatia chagásica crônica, a disfunção sistólica global do ventrículo esquerdo apresenta-se como um importante fator prognóstico. Uma classificação para insuficiência cardíaca, considerando a função sistólica do ventrículo esquerdo obtida através de ecocardiografia, foi adotada para identificação de subgrupos de cardiopatas chagásicos crônicos (Ministério da Saúde, 2005). Mais recentemente, Rassi e colaboradores propuseram uma classificação esquemática da doença de Chagas cardíaca em quatro estágios, a fim de auxiliar os médicos no aprimoramento do entendimento da heterogeneidade do curso clínico (Rassi Jr *et al.*, 2010).

A forma crônica nervosa da doença de Chagas não tem sido configurada como entidade clínica, devido à ausência de evidências de um substrato anátomo-patológico que a justifique. Esta forma foi admitida naqueles indivíduos que apresentavam manifestações neurológicas diversas e, eventualmente, déficit mental, alterações que foram atribuídas a sequelas da meningoencefalite da fase aguda (Vieira, 1966; Queiroz, 1973).

1.4.2. Patologia e Patogênese

Importantes estudos clínico-epidemiológicos para avaliação da morbidade e evolução da doença de Chagas têm sido conduzidos em diferentes áreas do Brasil (Macêdo *et al.*, 1982; Coura, 1975; Coura *et al.*, 1983; 1984; 1985; 1999; Borges-Pereira *et al.*, 1985; Coura & Borges-Pereira, 2010). Inquéritos eletrocardiográficos demonstraram que, além de uma grande variação regional na morbidade, aproximadamente 30% dos casos de forma indeterminada evoluem para forma cardíaca leve (grau II segundo The New York Heart Association classification –

NYHA 1973), mas com excelente prognóstico, similar aos de controles negativos da mesma idade e sexo (Coura & Borges-Pereira, 2011). Uma maior prevalência de alterações eletrocardiográficas foi encontrada nos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás e Piauí. Em outros estados, como Rio Grande do Sul e Sergipe, não foram observadas diferenças entre as frequências de alterações eletrocardiográficas entre pacientes com doença de Chagas e indivíduos não infectados (Macêdo *et al.*, 1982).

Durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, os danos aos órgãos e tecidos são causados pela própria presença do parasito e pela resposta imunoinflamatória aguda do hospedeiro, a qual é induzida pela presença do parasito (Andrade, 1999). Ao longo da infecção crônica, o balanço entre imunidade mediada para contenção do parasito e seus danos aos tecidos do hospedeiro provavelmente determina o curso da doença. Se a resposta imunológica for ineficiente ou paradoxalmente exacerbar dano tecidual, ocorrerá um aumento de ambos, carga parasitária e inflamação imuno-mediada. Por outro lado, uma resposta imune eficiente, levará à diminuição da carga parasitária, reduzindo os efeitos de inflamação e resultando em menor dano tecidual (Tarleton, 2003).

Embora a patogênese da doença de Chagas crônica cardíaca ainda não seja completamente compreendida, um consenso crescente indica que a persistência do parasito, mesmo em condição de baixo parasitismo, é necessária para o desenvolvimento da doença (Andrade *et al.*, 1991; Tarleton, 2003; Kierszenbaum, 2007; Bonney & Engman, 2008). A persistência do parasito conduz à reações inflamatórias (Higuchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1993; Brandariz *et al.*, 1995; Bellotti *et al.*, 1996) e outras alterações do sistema imune do hospedeiro e tem sido implicada no dano progressivo do miocárdio em resposta a infecção (Kierszenbaum, 1999; Machado *et al.*, 2000). Entretanto, ainda não se sabe se o dano tecidual é causado principalmente por fatores diretos do parasito e/ou se é desencadeado pela imunopatologia direcionada pelo parasito e/ou até mesmo por mecanismos autoimunes (Tarleton & Zhang, 1999; Soares *et al.*, 2001; Marin-Neto *et al.*, 2007).

1.5. Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado com base na epidemiologia e clínica do paciente e confirmado quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial. A estratégia de diagnóstico a ser adotada irá depender da fase da

doença. Assim, o Ministério da Saúde determina que para diagnosticar a infecção na fase aguda sejam utilizados os métodos parasitológicos diretos através de observação ao microscópio e que os métodos sorológicos sejam utilizados durante a fase crônica, que é caracterizada por baixa e intermitente parasitemia (Ministério da Saúde, 2005). Embora o diagnóstico laboratorial seja efetuado habitualmente usando-se sangue venoso, outros líquidos orgânicos podem ser utilizados para a investigação parasitológica durante a fase aguda, tais como: líquor, urina, líquido pericárdico, etc.

Na fase aguda ou durante a reativação da doença observada em indivíduos imunocomprometidos, o diagnóstico é realizado por detecção direta de tripomastigotas no sangue através de microscopia (WHO, 2002; Gomes *et al.*, 2009). Devido à grande quantidade de parasitos circulantes nesta fase da doença, diversos métodos diretos para a observação podem ser usados, tais como esfregaço, gota espessa, exame de sangue a fresco, método de Strout ou métodos parasitológicos indiretos, que permitem a reprodução artificial do ciclo do parasito (hemocultura e xenodiagnóstico) (Cerisola *et al.*, 1971; Gomes *et al.*, 1997). Na fase aguda, estes métodos são considerados sensíveis, além de apresentarem alta especificidade (100%), pois o agente etiológico é direta ou indiretamente demonstrado. O teste de microhematócrito tem sido o método de escolha na identificação de infecção congênita devido à sua elevada sensibilidade e por requerer pequeno volume de sangue coletado do recém-nascido. O exame microscópico de cordão umbilical ou sangue periférico do neonato pela técnica de microhematócrito é fortemente recomendado durante o primeiro mês de vida (Bittencourt, 1976; Freilij & Altcheh, 1995). Com relação ao diagnóstico sorológico na fase aguda, a busca por imunoglobulinas da classe IgM, características dessa fase, é pouco empregada devido à falta de kits comerciais aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela carência de controles positivos para IgM (Ministério da Saúde, 2005). Os testes sorológicos para Igs específicas para *T. cruzi* podem ser negativos na fase aguda (Anez *et al.*, 1999).

Durante a fase crônica, devido à escassez de parasitos circulantes e ao aumento da resposta humoral desenvolvida pelo hospedeiro, a presença de IgG contra antígenos de *T. cruzi* deve ser detectada por pelo menos dois métodos sorológicos diferentes (geralmente ELISA, Imunofluorescência Indireta - IFI ou Hemaglutinação Indireta - HAI), para confirmação do diagnóstico (Ministério da Saúde, 2005; Gomes *et al.*, 2009). Em geral, estes testes apresentam taxas de

sensibilidade acima de 90%, mas, podem apresentar reações cruzadas com antígenos de outros protozoários parasitas (*Leishmania* sp; *Trypanosoma rangeli*, além de outros tripanosomatídeos). Os testes parasitológicos, apesar de serem extremamente específicos, apresentam baixa sensibilidade na fase crônica, podendo levar a resultados falso-negativos (Chiari *et al.*, 1989; Galvão *et al.*, 1993). Os métodos de demonstração indireta do parasito, como o xenodiagnóstico e hemocultura, necessitam de 30 ou mais dias para obtenção do resultado e apresentam tendência de aumento da positividade com o número de repetições dos testes, quantidade de sangue empregada, meio de cultivo, intervalo de tempo entre a coleta de sangue e cultivo (Chiari *et al.*, 1989). Além disso, estes testes consomem muito tempo, são laboriosos e requerem condições especiais de biossegurança no laboratório (Brenner, 1962; Gomes *et al.*, 1999). Atualmente, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase ou PCR, tem sido recomendada e usada com sucesso como ferramenta complementar para o diagnóstico da infecção crônica pelo *T. cruzi*. Devido à sua maior sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos convencionais e com potencial de confirmação diagnóstica nos casos de resultados discordantes entre os testes sorológicos empregados, o uso da PCR tem sido fortemente recomendado (Ministério da Saúde, 2005).

1.5.1. Testes Parasitológicos Indiretos

A técnica de hemocultura é utilizada desde a década de 50, com resultados inicialmente inferiores aos obtidos com o xenodiagnóstico (Pifano, 1954; Chiari & Brenner, 1966). Desde a sua introdução, modificações na técnica vêm sendo realizadas, tais como, a retirada de plasma contendo Igs, coleta de maior volume de sangue (30mL) e o processamento a 4°C, levando ao aumento de positividade no diagnóstico parasitológico (Chiari *et al.*, 1989; Luz *et al.*, 1994). A positividade também pode ser aumentada consideravelmente pela repetição da hemocultura no mesmo paciente, em coletas de sangue seriadas (Chiari *et al.*, 1989; Luz *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 2002).

O xenodiagnóstico foi descrito inicialmente por Brumpt em 1914, sofrendo modificações sucessivas para otimizar os resultados (Schenone *et al.*, 1968; Cerisola *et al.*, 1974). O método consiste basicamente na alimentação de ninfas do triatomíneo, livres de infecção, com sangue do paciente suspeito. Caso o parasito

esteja presente, o mesmo multiplicará no tubo digestivo do triatomíneo, sendo eliminado nas fezes e urina das ninfas examinadas 30 e 60 dias após o repasto sanguíneo. O xenodiagnóstico pode ser natural quando os triatomíneos são alimentados diretamente na pele do paciente ou artificial, quando os triatomíneos são alimentados com o sangue coletado do paciente, mantido com anticoagulante até o momento do repasto. O xenodiagnóstico artificial foi muito utilizado, com resultados semelhantes ou melhores que o método natural (Santos *et al.*, 1995; Pineda *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1998) e é empregado nos casos em que indivíduos hiperalérgicos apresentem reações adversas e/ou recusa por parte dos mesmos. A positividade do xenodiagnóstico em pacientes crônicos tem apresentado valores de 13 até 58,5% com exame único, dependendo da região estudada, da quantidade de ninfas utilizadas e da espécie do triatomíneo aplicado (Cerisola *et al.*, 1974; Borges-Pereira & Coura, 1987). Da mesma forma que a hemocultura, a taxa de positividade do xenodiagnóstico aumenta consideravelmente quando este exame é repetido, empregando uma série de aplicações (Coura *et al.*, 1991).

1.5.2. Diagnóstico Molecular

Com a ausência de um teste padrão ouro, isto é, um método que detecte consistentemente a presença de parasitos naqueles indivíduos infectados com *T. cruzi*, torna-se difícil avaliar a sensibilidade de testes sorológicos convencionais (Tarleton *et al.*, 2007). O desenvolvimento de metodologias diagnósticas de alta sensibilidade e especificidade para serem empregadas nos laboratórios como ferramentas de determinação da infecção ativa pelo *T. cruzi* tem sido uma realidade necessária nos últimos anos. Neste sentido, a tecnologia da PCR, devido à sua ampla capacidade em detectar quantidades ínfimas de ácidos nucléicos, foi introduzida para a detecção específica de DNA de *T. cruzi* em sangue, gerando assim, novas possibilidades de diagnóstico e monitoramento de pacientes tratados (Moser *et al.*, 1989; Sturm *et al.*, 1989; Avila *et al.*, 1991, 1993; Russomando *et al.*, 1992; Britto *et al.*, 1993, 1995, 2001; Wincker *et al.*, 1994a, b; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1998, 1999; Castro *et al.*, 2002; Galvão *et al.* 2003; Britto, 2009). O seu emprego como diagnóstico alternativo tem contribuído, por exemplo, na elucidação de casos com sorologia convencional

discordante e para controle pós-terapêutico (Britto *et al.*, 1995; Galvão *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2003; Zulantay *et al.*, 2004; Britto, 2009). No entanto, a detecção do DNA do parasito pela PCR durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* é menos sensível do que os testes sorológicos (revisto por Britto, 2009). Assim como os métodos parasitológicos de xenodiagnóstico e hemocultura, os resultados obtidos pela técnica de PCR podem apresentar variações de sensibilidade devido a uma série de fatores: (i) Características epidemiológicas das populações estudadas (origem geográfica, níveis parasitêmicos, diferenças genéticas entre cepas e isolados de *T. cruzi*); (ii) Volume de sangue coletado (presença intermitente do parasito na fase crônica e quantidade de parasitos circulantes no momento da coleta de sangue) (Castro *et al.*, 2002); (iii) Método usado para o isolamento de DNA de sangue; (iv) Escolha de sequências-alvo do genoma do parasito, reagentes usados, condições de termo-ciclagem, além do uso de controles internos para checagem da viabilidade do teste (revisto por Britto, 2009).

Vários alvos para a detecção de *T. cruzi* por PCR foram originalmente descritos, sendo mais utilizado regiões conservadas do DNA de minicírculos do cinetoplasto, ou kDNA (Figura 1.2) e uma seqüência de repetição *em tandem* de DNA genômico nuclear satélite (Sturm *et al.*, 1989; Avila *et al.*, 1991; Russomando *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1993; Britto *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2002). Recentemente, pesquisadores da América Latina reconheceram a necessidade de padronizar e validar um protocolo de PCR consensual para uso clínico na doença de Chagas, pela detecção de DNA de *T. cruzi* em sangue (TDR/WHO, 2008; Schijman *et al.*, 2011). Com a consolidação de um estudo multicêntrico coordenado pelo TDR-WHO (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*), quatro métodos baseados em PCR demonstraram melhores desempenhos e aguardam validação através de estudos prospectivos em diferentes cenários (Schijman *et al.*, 2011).

Pesquisadores vêm investindo na implementação de ensaios moleculares de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para a determinação da carga parasitária de *T. cruzi* (Cummings & Tarleton, 2003; Virreira *et al.*, 2006; Piron *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2012) e também para a tipagem molecular de genótipos do parasito (Freitas *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009). A maior contribuição desta nova metodologia reside no seu potencial acurado de estimar a concentração de parasitos circulantes, permitindo assim, o seu uso no acompanhamento de indivíduos submetidos a tratamento específico anti-*T. cruzi*,

como indicador da resposta terapêutica durante o curso da doença de Chagas (Vallejo and Reyes, 2005; revisto por Britto, 2009; Marin-Neto *et al.*, 2009).

Cummings e Tarleton (2003) foram pioneiros no desenvolvimento da metodologia de qPCR para a quantificação mais precisa e sensível da carga parasitária de camundongos infectados com *T. cruzi*. O método foi capaz de confirmar o parasitismo mais elevado nos camundongos com infecção aguda em relação àqueles infectados cronicamente. O grupo também descreve maiores níveis de carga parasitária nos tecidos de animais inoculados com maior número de parasitos. Virreira *et al.* (2006) compararam dois métodos de PCR utilizando iniciadores desenhados para as seqüências nucleares satélites e para o kDNA do parasito, visando ao diagnóstico de infecção congênita através da análise do líquido amniótico de mães infectadas por *T. cruzi*. Nesse estudo, também determinaram o número de parasitos nas amostras de sangue de mães positivas, por qPCR utilizando o alvo kDNA. Piron *et al.* (2007) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real baseado no uso de sonda fluorogênica (sistema TaqMan) desenhada para as sequências de DNA satélite de *T. cruzi*, visando o diagnóstico de pacientes infectados (indivíduos crônicos adultos e uma criança com infecção congênita aguda). Os dados mostram assim, o verdadeiro potencial da PCR em tempo real tem sido reconhecido para o diagnóstico de infecção congênita, monitoramento da parasitemia durante tratamento etiológico, detecção precoce de recidivas, como por exemplo, após transplante de coração e outras circunstâncias imunomoduladoras, e mesmo uso em ensaios clínicos para teste de novos quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas (revisto por Britto, 2009).

1.5.3. Testes sorológicos

Ensaio sorológicos são amplamente usados para diagnóstico clínico e triagem em bancos de sangue, assim como em estudos epidemiológicos. O diagnóstico só poderá ser gerado se a presença de Igs for confirmada por pelo menos dois testes sorológicos de princípios distintos (Ministério da Saúde, 2005). Kits comerciais combinando múltiplas modalidades sorológicas ou antígenos têm sido desenvolvidos (Gomes *et al.*, 2009). Três tipos de testes convencionais baseados na detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* têm sido amplamente usados para imunodiagnóstico: hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), e o ensaio imunoenzimático de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent*

assay). Dentre eles, o ELISA constitui o primeiro teste de escolha em virtude de sua facilidade de execução, baixo custo e possibilidade de automatização (da Silveira *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2009). Os testes diagnósticos disponíveis comercialmente empregam preparações de extrato bruto contendo antígenos de *T. cruzi*, de frações semi-purificadas, ou antígenos recombinantes. A maioria dos testes apresenta 94% – 99.5% de sensibilidade e 94% – 96% de especificidade frente ao diagnóstico da fase crônica da doença de Chagas e estas variações são dependentes da natureza do kit comercial empregado. Testes cromatográficos rápidos constituídos por uma mistura de antígenos recombinantes têm sido utilizados em países da América Latina para demonstração de anticorpos anti-*T. cruzi* em sangue total de soro, assim como em sangue de cordão umbilical de mães infectadas no momento do parto, gerando resultados variáveis (Umezawa *et al.*, 1999; Luquetti *et al.*, 2003).

O teste de IFI consiste na reação de antígenos obtidos de cultura “in vivo” (epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y), adsorvidos em lâmina e incubados com diferentes diluições de soro de portadores ou suspeitos de infecção pelo *T. cruzi*. A reação é revelada pelo uso de anti-imunoglobulina humana conjugada com fluorocromo como o isotiocianato de fluoresceína e seguido pela leitura em microscópio para fluorescência.

No Brasil, o teste de HAI foi padronizado por Camargo *et al.* (1971) e sua ampla utilização se deve à facilidade de execução, rapidez de leitura (1 a 2h) e de não necessitar de equipamentos adicionais.

A HAI consiste na aglutinação de hemácias estabilizadas e incubadas com antígenos totais de *T. cruzi* (antígenos solúveis), quando colocadas em contato com diferentes diluições de soros de pacientes portadores ou suspeitos da doença de Chagas. Existem múltiplas variedades descritas de HAI, utilizando hemácias de diferentes espécies (humana, de aves, de carneiro, etc), assim como métodos de sensibilização e de origem dos antígenos. Este teste tem várias vantagens, incluindo a facilidade de execução, mas apresenta como principal limitação a sensibilidade, em geral menor que a dos outros testes, motivo pelo qual sempre deve ser acompanhado de uma segunda prova, de maior sensibilidade, como o teste IFI ou ELISA.

O ensaio imunoenzimático (ELISA), padronizado e aplicado originalmente por Voller *et al.* (1975) no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, é a técnica sorológica mais utilizada, considerando sua maior sensibilidade e especificidade, dependentes do antígeno empregado, do *cut-off* utilizado e da habilidade de

processar ampla quantidade de amostras rapidamente (Bern *et al.*, 2008). Segundo Camargo (1987), uma das vantagens do ELISA é que o resultado do teste demonstra a capacidade de ligação das Igs de uma forma direta e não por titulação, como obtido por hemaglutinação e imunofluorescência indireta, métodos que pesquisam até qual diluição a reação é observada. A intensidade de cor revelada através da leitura em espectrofotômetro indica a concentração de imunoglobulinas existentes na amostra de soro avaliada quando comparado aos controles. Os kits de ELISA convencionais utilizam extratos totais e/ou antígenos brutos de cepas de *T. cruzi* que, em virtude de sua complexidade antigênica, resultam em problemas de padronização, baixa confiabilidade e possibilidade de reatividade cruzada com outros microrganismos, principalmente com espécies do gênero *Leishmania* (Pan *et al.*, 1992; da Silveira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2012). Uma forma de resolver este problema é através da produção e utilização de proteínas recombinantes específicas do parasita e/ou peptídeos sintéticos que podem ser utilizados como elementos de sensibilização de kits diagnósticos, os quais podem ser obtidos numa forma purificada e em grande escala.

Entre eles, os mais estudados são os antígenos CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*), FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*), SAPA (*Shed-Acute-Phase-Antigen*), KMP-11 (*Kinetoplastid Membrane Protein 11*), MAP (*Microtubule-Associated Protein*) e o CA-2 (*Trypomastigote surface protein*), que já foram descritos na literatura e utilizados para diagnóstico da infecção, apresentando valores de sensibilidade com variação entre 62 a 100% e especificidade de 76 a 100%, tendo em vários casos apresentado reatividade cruzada com outros patógenos (Ibañez *et al.*, 1988; Afranchino *et al.*, 1989; Lafaille *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1989; Moncayo & Luquetti, 1990; Frasci *et al.*, 1991; Stebeck *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2004). No entanto, a utilização de proteínas multi-epítipo (poliantígenos) foi proposta para melhorar o desempenho dos testes diagnósticos e assegurar uma melhor padronização entre eles (Camussone *et al.*, 2009). A fusão dos antígenos CRA e FRA, por exemplo, elevou para 100% os valores de sensibilidade e especificidade em uma pequena amostra estudada (Almeida *et al.*, 1990), bem como a utilização do poliantígeno CA-2-CRATcD-TcE, que resultou em valores acima de 99% para ambos os parâmetros (especificidade e sensibilidade) (Hernández *et al.*, 2010). O teste de ELISA recombinante possui como princípio a detecção de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* a partir da formação de imunocomplexos (Igs específicas do soro do paciente com os antígenos recombinantes obtidos a partir

dos estágios epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*). Com isso, os problemas de especificidade podem ser transpostos pelo uso de antígenos recombinantes que contenham epítomos de *T. cruzi* específicos. Embora o uso de preparados de antígeno purificado aumente a especificidade de testes de ELISA, sua disponibilidade nos sistemas de saúde ainda é limitada devido ao alto custo (Gomes *et al.*, 2001; Luquetti *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012).

Enquanto os métodos sorológicos utilizados em diagnóstico de rotina de infecção por *T. cruzi* são muito efetivos na detecção de indivíduos infectados com altos ou médios títulos de imunoglobulinas, estes testes são limitantes em pacientes com baixos níveis de Igs. Essas e outras limitações têm sido as maiores razões de continuidade de pesquisa para otimização da técnica de ELISA e identificação de antígenos-alvo, com a finalidade de eliminar a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos (Zarate *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). Pode ser destacado que, apesar dos esforços, os antígenos utilizados nem sempre são capazes de reconhecer cepas de *T. cruzi* de diferentes regiões geográficas, podendo ocorrer reações falso negativas.

Martins-Filho *et al.* (1995) introduziram a imunofluorescência indireta através da citometria de fluxo (FC-ALTA [*Anti-live trypomastigotes antibody by flow-cytometry*]), na tentativa de substituir a LMCo (teste de Lise Mediada pelo Complemento). A LMCo é uma técnica que consiste na incubação de tripomastigotas do *T. cruzi* vivos com o soro-teste diluído e adicionado a soro fresco humano normal como fonte de complemento (Krettli & Brener, 1982), principalmente devido à LMCo ser uma técnica muito trabalhosa, que oferece risco ao operador e de leitura subjetiva. Por sua vez, a citometria de fluxo é menos trabalhosa (técnica de análise automatizada), apresenta maior sensibilidade, praticidade e maior segurança na leitura, além de não necessitar da adição de Complemento para a execução da técnica (Martins-Filho *et al.*, 2002).

Uma das inovações no diagnóstico sorológico da doença de Chagas é o TESA-blot (Umezawa *et al.*, 2009). Essa técnica é um ensaio de *imunoblot* que tem sido amplamente utilizado devido à alta sensibilidade e especificidade comparada aos métodos sorológicos convencionais (Umezawa *et al.*, 1996; Umezawa *et al.*, 1999; Umezawa & Silveira, 1999; Zarate-Blades *et al.*, 2007). TESA-blot tem apresentado grande utilidade na resolução de sorologia duvidosa e antigenicidade cruzada com outros protozoários em regiões onde a doença de Chagas é endêmica (Umezawa *et al.*, 2009). Sendo assim, essa técnica tem sido selecionada como

padrão-ouro em estudos distintos, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (Ramírez *et al.*, 2009).

1.6. Tratamento etiológico

Na atualidade, aceita-se que a terapia precoce seja capaz de modificar a evolução natural da enfermidade de Chagas (APT *et al.*, 2008). O objetivo de um tratamento específico contra a infecção pelo *T. cruzi* é o de eliminar o agente etiológico e, dessa forma, reduzir a probabilidade do desenvolvimento da doença de Chagas sintomática, além de deter a transmissão do parasito. Dados disponíveis indicam que o sucesso no tratamento reflete: a fase da infecção na qual o tratamento foi administrado, a idade do paciente no momento em que recebeu o tratamento e a região onde o paciente foi infectado, devido provavelmente às diferenças em suscetibilidade à drogas entre as cepas de *T. cruzi* que predominam em diferentes regiões geográficas e mesmo as características genéticas da população em dada região (Filardi & Brener, 1987). Mesmo com progresso limitado obtido no tratamento das pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, a quimioterapia é fortemente recomendada em todos os casos de infecção aguda, congênita e reativação da infecção, assim como para todas as crianças infectadas e para jovens pacientes com a doença crônica recente menores que 15 anos de idade (Ministério da Saúde, 2005; Bern *et al.*, 2007). Entretanto, existem exceções de obrigatoriedade de tratamento para: cardiopatas portadores da doença com *Core Bovis* ou insuficiência cardíaca terminal (Andrade & Andrade, 2000; Teixeira, Nascimento, Sturn, 2006). Os dois fármacos registrados para o tratamento da doença de Chagas foram introduzidos nos anos 60 (Nifurtimox, Bayer) e 70 (Benzonidazol, LAFEPE). Porém, ambos requerem um tratamento prolongado (30 dias) e apresentam efeitos colaterais freqüentes que podem levar à descontinuidade do tratamento. Frente à toxicidade dos fármacos disponíveis, o tratamento não é recomendado durante a gestação, em lactantes e em indivíduos com insuficiência hepática e renal grave (Ministério da Saúde, 2005). Curiosamente, uma alta tolerância à administração de nifurtimox e benzonidazol pode ser verificada em bebês nascidos com infecção congênita, para os quais o tratamento é recomendado (CLAP/PAHO/WHO, 2007).

O Benzonidazol ou 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) é o único fármaco disponível para o tratamento específico da doença de Chagas no

Brasil e sua atividade quimioterápica contra o *T. cruzi* foi demonstrada nos trabalhos pioneiros de Grunberg *et al.* (1968), após a identificação da eficácia em animais infectados pelo uso de nitrofurazona, descrito por Brener em 1961. O tratamento da doença de Chagas humana com Benzonidazol (BZ) e Nifurtimox (NFX) fornece resultados distintos tanto na fase aguda como crônica, principalmente em indivíduos chagásicos de áreas geográficas distintas. Vários estudos clínicos demonstraram que ambas as drogas, são efetivas para o tratamento de recém-nascidos, com índices de cura de até 99% (Russomando *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003) e indivíduos na fase aguda da infecção, com até 80% cura, definida por soroconversão e negatização da parasitemia (Rassi & Luquetti, 1992; Andrade *et al.*, 1996; Sosa-Estani *et al.*, 1998; Galvão *et al.*, 2003). Resultados significativamente inferiores são encontrados na fase crônica tardia da doença, onde até 80% dos pacientes tratados durante a infecção crônica tardia não demonstram cura parasitológica (revisto por Britto, 2009). O NFX pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ao BZ, embora seja de difícil obtenção no Brasil, mas tem alcançado bons resultados principalmente quando administrado na fase aguda da infecção (Blanco *et al.*, 2000; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Schijman *et al.*, 2003).

No Brasil, Coura *et al.* (1997), conduziram um estudo comparativo controlado de uso do BZ, NFX e placebo na forma crônica da doença de Chagas, e observaram que o efeito foi melhor observado com BZ, enquanto os efeitos colaterais secundários foram semelhantes entre os dois fármacos. O tratamento tripanocida na doença de Chagas cardíaca com baixo a moderado nível de severidade clínica, está sendo atualmente investigado no escopo do estudo BENEFIT - *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* (Marin-Neto *et al.*, 2008). Esse estudo visa a comparação do uso de BZ *versus* placebo em 3.000 pacientes, com idades entre 18 a 75 anos, e que foram randomizados em diferentes centros clínicos na América Latina. O BENEFIT tem como princípio de que uma redução significativa da carga parasitária pode levar a uma evolução clínica mais lenta ou mesmo evitar a progressão da doença (Viotti *et al.*, 2006), indicando assim, que a terapia com BZ seja também vantajosa para pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca (Marin-Neto *et al.*, 2009).

Desde os estudos de 1984 até hoje, os requisitos mais importantes para uma droga ideal para a quimioterapia da doença de Chagas são: capacidade para induzir cura parasitológica em ambas as fases (aguda e crônica) da doença, atividade oral em dose única ou em poucas doses, ausência de efeitos colaterais significantes, ser

viável para tratamento ambulatorial com monitoramento mínimo e baixa probabilidade de desenvolvimento de parasitas resistentes. Além do BZ e NFX, outros fármacos têm se revelado ativos sobre o *T. cruzi*, em especial, os inibidores de síntese de purinas, inibidores de proteases, ligantes de DNA, entre outros (Rassi *et al.*, 1997; Brener, 2000; Pinto-Dias, 2006). Foi sugerido que NFX atua pela geração de radicais livres (ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e metabólitos eletrofílicos), enquanto o BZ atua via processo de óxido-redução, inibindo a síntese protéica, reduz a incorporação dos precursores de RNA e diminui a incorporação de timidina no DNA, interferindo na biossíntese de macromoléculas (Polak & Richle, 1978), além de também atuar sobre a cadeia respiratória do *T. cruzi* (Brener, 2000). Contudo, ambos NFX e BZ, apresentam efeitos colaterais ao usuário como, vômito, alterações hematológicas, neurológicas, dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e, ocasionalmente, síndrome de Stevens Johnson (Pinto Dias, 2004; Steverding & Tyler, 2005; Apt & Zulantay, 2011).

Em virtude dos efeitos colaterais, novos alvos farmacológicos têm sido intensamente pesquisados em diversos países, por muitos grupos e empresas farmacêuticas. Os avanços consideráveis na identificação, validação e caracterização de alvos moleculares para drogas representam apenas um passo inicial no longo e complexo processo de identificação e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Em geral, as prioridades na pesquisa em doença de Chagas deveriam focar na produção de novas drogas que pudessem ser administradas por um período mais curto de tratamento, com menores efeitos colaterais (Urbina, 2010). Combinações de drogas já disponíveis e novos fármacos são recomendadas para evitar resistência medicamentosa. Associações de compostos com diferentes mecanismos de ação também têm sido indicadas como novas alternativas ao tratamento da doença de Chagas (WHO, 2012).

1.7. Critérios de cura

Para avaliar a resposta à quimioterapia específica da doença de Chagas, três categorias de testes laboratoriais estão disponíveis, incluindo métodos parasitológicos, moleculares e testes sorológicos. O sucesso de cura na doença de Chagas é confirmado pela queda/negativação da sorologia anti-*T. cruzi*, revelado pela persistência de resultados negativos (soroconversão), enquanto falha

terapêutica é caracterizada pela persistência de parasitos circulantes e conseqüentemente, permanência da infecção (WHO, 2002). Porém, marcadores sorológicos podem levar muitos anos para que alcancem níveis significativos de queda, mesmo quando os testes parasitológicos tenham sido repetidamente negativos (Andrade *et al.* 1988, 1991), principalmente em se tratando de quimioterapia aplicada aos indivíduos com doença de Chagas crônica tardia que correspondem à grande maioria da população infectada pelo *T. cruzi* (Cançado, 1999; Ministério da Saúde, 2005). Por esta razão, sorologia positiva não significa infecção ativa, enquanto resultados persistentemente negativos de testes sorológicos indicam ausência de falha terapêutica e provável cura.

A avaliação de cura da doença de Chagas é certamente um dos aspectos mais complexos de seu tratamento, levando na maioria das vezes a resultados diversos e controversos em relação à definição de ambas, cura parasitológica e clínica. Segundo Cançado (1963), o indivíduo curado deve necessariamente apresentar testes sorológicos convencionais e parasitológicos persistentemente negativos. Por outro lado, Krettli & Brener (1982) consideram que a ausência de anticorpos líticos no soro de pacientes tratados é indicativa de cura, mesmo na presença de testes sorológicos convencionais positivos (Galvão *et al.*, 1993). A persistência da positividade da sorologia, na grande maioria dos pacientes tratados na fase crônica, tem levado alguns autores a considerá-la como memória imunológica com a manutenção de anticorpos na ausência de infecção pelo *T. cruzi*. Andrade *et al.* (1988) demonstraram em modelo murino, que antígenos parasitários retidos nas células dendríticas do baço podem ser responsáveis por esta memória imunológica, sendo assim capaz de manter o organismo em processo de estimulação antigênica constante.

O controle de cura desde o início preconizou a utilização da hemocultura e xenodiagnóstico como métodos parasitológicos de primeira escolha. Hoje, além destes métodos, temos os testes moleculares (PCR) que muito tem contribuído no monitoramento pós-terapêutico em casos agudos ou crônicos da doença de Chagas, possibilitando detectar precocemente falha terapêutica (Britto *et al.*, 1995; Russomando *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001; Solari *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2003; Zulantay *et al.*, 2004; Sánchez *et al.* 2005). Assim, PCR pode ser usado como um marcador precoce de resistência à quimioterapia específica anti-*T. cruzi*, anos antes da reversão sorológica. Entretanto, maiores estudos prospectivos ainda se fazem necessários para elucidar o real valor

de ensaios de PCR como critério de cura na doença de Chagas (revisto por Britto, 2009). Deve ser ressaltado que testes parasitológicos como o xenodiagnóstico, possuem sensibilidade limitada de 30% a 50%, enquanto o diagnóstico molecular por PCR costuma fornecer sensibilidades que variam entre 60% a 90%. Conseqüentemente, um teste parasitológico positivo (hemocultura ou xenodiagnóstico) ou a detecção de DNA de *T. cruzi* por PCR significa falha terapêutica, enquanto resultados negativos repetidos não necessariamente indicam cura parasitológica e sucesso do tratamento. Em relação à PCR, tais resultados são indicativos da ausência de DNA do parasito no momento da realização do teste. Resultados negativos por ambos, sorologia e PCR, são muito provavelmente indicativos de cura (Britto *et al.*, 2001; WHO, 2002; Britto, 2009).

Se a persistência de resultados positivos de PCR é considerada falha terapêutica, a determinação da carga parasitária por ensaios quantitativos de PCR em Tempo Real (qPCR) pode ainda ser correlacionada com o impacto do tratamento tripanocida na evolução da doença. A implementação de ensaios de qPCR para determinação do grau de parasitemia e seu monitoramento durante o tratamento, poderia ser particularmente útil como um indicador de resposta em regimes terapêuticos prolongados (Urbina, 2001). Até o momento, não está bem definido se pacientes crônicos ou assintomáticos que apresentam níveis de parasitos circulantes extremamente baixos ou até mesmo não detectáveis, deveriam apresentar uma melhor resposta ao tratamento em relação aqueles com maior nível parasitêmico (revisto por Britto, 2009).

Segundo Cançado (2002) e de acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005), a negatização da sorologia convencional tem sido considerada o único método tradutor de cura associado a métodos parasitológicos persistentemente negativos. Com este cenário, uma técnica diagnóstica para demonstração de cura parasitológica torna-se urgentemente necessária para a avaliação de novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas (Médecins Sans Frontières, 2008; WHO, 2012).

1.8. Doença de Chagas no Estado de Mato Grosso do Sul

A história da doença de Chagas na região Sul do antigo Estado do Mato Grosso teve seu início em 1918, com Chagas revelando a presença de *T. cruzi* em animais como tatus (Chagas, 1918; Pompilio *et al.*, 2005). A existência da doença na extensão geopolítica que define o atual Estado do Mato Grosso do Sul (MS) pode ser configurada nos trabalhos de Neiva & Pinto (1923), registrando a presença dos vetores *Panstrongylus megistus* e *Triatoma sordida* nas unidades domiciliares. Entre 1975 e 1979, foi confirmada a presença da infecção autóctone em humanos, em reservatórios domésticos e silvestres na região de Fátima do Sul, assim como o encontro de *T. infestans* naturalmente infectado nos domicílios rurais e *T. sordida*, *Rhodnius neglectus* e *P. geniculatus* em biótopos naturais (Silva, 1979). Os resultados do inquérito entomológico nacional realizado entre 1975 - 1983 representam a última publicação indexada feita sobre a fauna de triatomíneos no estado de MS (Silveira & Vinhaes, 1998), com o registro de *T. sordida* como espécie predominante no peridomicílio em todo o estado, com maior prevalência na área do Distrito Sanitário de Rio Verde (DSRV). Entretanto, essa espécie apresenta baixo potencial de transmissão da doença de Chagas, devido ao seu caráter pouco antropofílico (Perlowagora-Szumlewicz & Müller, 1982). Também foi documentada a ausência de captura de *T. infestans* a partir de 1995, assim como *P. megistus*, principais espécies transmissoras do Brasil (Cunha *et al.*, 2001).

No Inquérito Sorológico Nacional sobre a doença de Chagas, realizado no período 1975 - 1980, estimou-se em 2,5% a soroprevalência para todo o estado do Mato Grosso do Sul (Camargo *et al.*, 1984). Posteriormente, em novo inquérito sorológico realizado em escolares de 7 a 14 anos, no período de 1994 - 1997, estimou-se a soroprevalência de 0,05% (2 casos em 3.891 examinados) (Silveira & Vinhaes, 1998). Em estudo realizado em 1999, por Aguiar & Aguiar, foi determinada soropositividade de 1,1% em primodoadores matriculados no Hemosul de Campo Grande, no período de julho/1984 a fevereiro/1985, ressaltando a ausência de casos autóctones da doença de Chagas (Borges-Pereira *et al.*, 2005). No período de janeiro/1998 a dezembro/1999, foi realizada uma triagem sorológica em 14.700 habitantes da população urbana de 12 municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde em Mato Grosso do Sul (DSRV/MS), e foi encontrada uma soroprevalência de 1,83%, predominantemente entre os alóctones (Borges-Pereira *et al.*, 2001).

Com relação à morbidade, Pompilio *et al.* (1998), revisando 200 prontuários de pacientes chagásicos atendidos no ambulatório do Hospital Universitário da UFMS, no período de 1986 a 1996, observaram que 1% dos pacientes tinha diagnóstico de doença de Chagas aguda; 45,5% forma crônica indeterminada; 39,5% forma cardíaca crônica; 11% forma digestiva crônica e 3% forma mista da doença (forma cardíaca e digestiva).

No DSRV/MS, Borges *et al.* (2001) encontraram prevalência de 24,6% de cardiopatia, relacionada exclusivamente à infecção pelo *T. cruzi*. Em relação aos aspectos epidemiológicos da população estudada nos 12 municípios do DSRV, observou-se predominância de alóctones procedentes principalmente de áreas rurais, com baixa escolaridade e antecedente de contato com triatomíneos. Esse perfil não difere do referido nos estudos da mesma natureza, ressaltando que a maior participação de alóctones expressa as características da população do Mato Grosso do Sul, constituída por uma parcela significativa de migrantes principalmente da região Sul do Brasil (Borges-Pereira *et al.*, 2001). Nesse estudo foram identificados 26,1% de xenodiagnósticos positivos, sem diferença significativa em relação à procedência e sexo dos pacientes. Contudo, a frequência foi significativamente menor entre aqueles com idades de 40 a 59 anos. O confronto desses dados com os de outros trabalhos mostra que esse percentual de positividade não difere dos percentuais encontrados em áreas endêmicas de Minas Gerais (Borges-Pereira *et al.* 1992) e Goiás (Castro *et al.*, 1999).

Sobre o tratamento etiológico com benzonidazol em pacientes chagásicos crônicos do estado do Mato Grosso do Sul, não encontramos nenhuma referência bibliográfica até o momento da estruturação dessa proposta de trabalho. Entretanto, a literatura nos apresenta um conjunto de estudos que servirão para compararmos com os resultados obtidos no presente estudo.

2. Justificativa

A captura quase que exclusiva de *Triatoma sordida* na área do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), a intensa atividade na pecuária e agricultura em extensas áreas e a instalação de grandes contingentes de pessoas de outras regiões do Brasil, principalmente de estados com elevadas prevalências de infecção chagásica, constituíram os determinantes para a realização desse estudo, que teve início em 1999 na área mencionada. Assim, o objetivo na primeira etapa do trabalho, há onze anos atrás, foi avaliar o comportamento da infecção chagásica humana e a morbidade nas populações autóctone e alóctone (Borges-Pereira *et al.*, 2001). Com a colaboração das Secretarias Municipais de Saúde do Distrito Sanitário de Rio Verde, foi feita uma busca ativa desses pacientes. Os localizados que atenderam ao chamado foram reexaminados em seus municípios de origem, visando avaliar a evolução clínica, parasitológica e sorológica no intervalo de 11 anos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Realização de estudo longitudinal na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) para avaliar a evolução da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e suas manifestações clínicas em pacientes portadores da doença de Chagas crônica (tratados e não tratados com benzonidazol) após onze anos de acompanhamento.

3.2. Objetivos específicos

Na presente dissertação, objetivamos avaliar a possível correlação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e manifestações clínicas em portadores da doença de Chagas crônica (tratados e não-tratados com benzonidazol) após onze anos de acompanhamento, através do emprego de métodos laboratoriais e clínicos, investigando os seguintes parâmetros:

- Análise da variação qualitativa e quantitativa da parasitemia pelo uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e PCR em tempo real (qPCR), respectivamente;
- Determinação dos níveis séricos de IgG anti-*T. cruzi* através dos testes de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e ensaio imunoenzimático recombinante (ELISA rec);
- Investigação sobre a cardiopatia chagásica crônica através de exame clínico e eletrocardiograma de repouso.

4. Material e Métodos

4.1. Casuística

4.1.1. Características da área de estudo

O Estado de Mato Grosso do Sul está limitado pelos Estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, além dos países Paraguai e Bolívia. O Distrito Sanitário de Rio Verde, área de estudo do presente trabalho, está representado pelos municípios de Alcinópolis, Bandeirantes, Camapuã, Corguinho, Coxim, Jaraguari, Pedro Gomes, Rio Negro, Rio Verde, Rochedo, São Gabriel e Sonora (Figura 4.1), com uma população urbana estimada de 115.000 habitantes até 2000/2001 (Borges-Pereira *et al.*, 2001). Atualmente, estima-se uma população de 143.211 habitantes (IBGE, 2011).

Destaca-se que o clima, geografia e temperatura da região de estudo propiciaram uma intensa atividade econômica na pecuária e agricultura em extensas áreas (Borges-Pereira *et al.*, 2001), levando à instalação de um número elevado de pessoas de outras regiões do Brasil no Distrito Sanitário de Rio Verde, atraídas por esta nova fronteira agropecuária do país (Tabela 4.1).

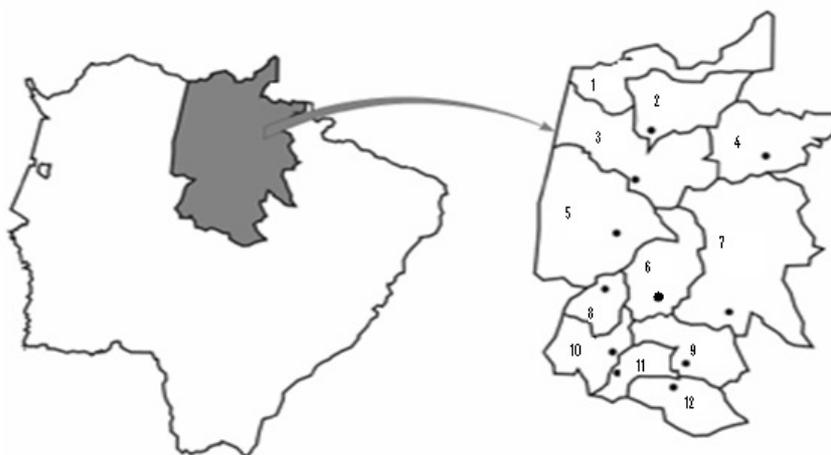


Figura 4.1: Estado do Mato Grosso do Sul e a localização do Distrito Sanitário de Rio Verde representado por 12 municípios: [1] Sonora; [2] Pedro Gomes; [3] Coxim; [4] Alcinópolis; [5] Rio Verde de Mato Grosso; [6] São Gabriel do Oeste; [7] Camapuã; [8] Rio Negro; [9] Bandeirantes; [10] Corguinho; [11] Roghedo; [12] Jaraguari.

Tabela 4.1: Características dos 12 municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS).

Município	Latitude Sul	Longitude Oeste	Altitude (metros)	Clima	Densidade hab/km²
ALCINÓPOLIS	18°19'27"	53°42'22"	443	tropical	1,053
BANDEIRANTES	18°55'04"	54°21'50"	629	tropical de altitude	2,125
CAMAPUÃ	19°31'51"	54°02'38"	409	tropical	2,185
CORGUINHO	19°49'55"	54°49'44"	320	tropical	1,877
COXIM	18°30'25"	54°45'36"	238	tropical	5,031
JARAGUARI	20°08'31"	54°23'56"	589	tropical de altitude	2,201
PEDRO GOMES	18°06'03"	54°33'07"	282	tropical	2,169
RIO NEGRO	19°26'56"	54°59'13"	279	tropical	2,769
RIO VERDE	18°55'04"	54°50'38"	330	tropical	2,324
ROCHEDO	19°57'11"	54°53'34"	260	tropical	3,185
SÃO GABRIEL	19°23'42"	54°33'57"	658	tropical de altitude	5,851
SONORA	17°34'37"	54°45'28"	442	tropical	3,739

4.1.2. População em estudo

Como demonstrado na Figura 4.2, a primeira parte desse trabalho foi constituída por uma *coorte* de 110 indivíduos portadores da doença de Chagas crônica, estabelecida em 1999 após inquérito sorológico. Todos os portadores eram soropositivos para IgG anti-*T. cruzi* pelo teste de imunofluorescência. Estes indivíduos foram diagnosticados através de exames laboratoriais e clínicos, avaliados e classificados segundo OMS/OPAS (1974). Todos os participantes do estudo, na época, foram informados sobre os objetivos do projeto e confirmaram participação assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, processo aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa em seres humanos da Fiocruz (RJ).

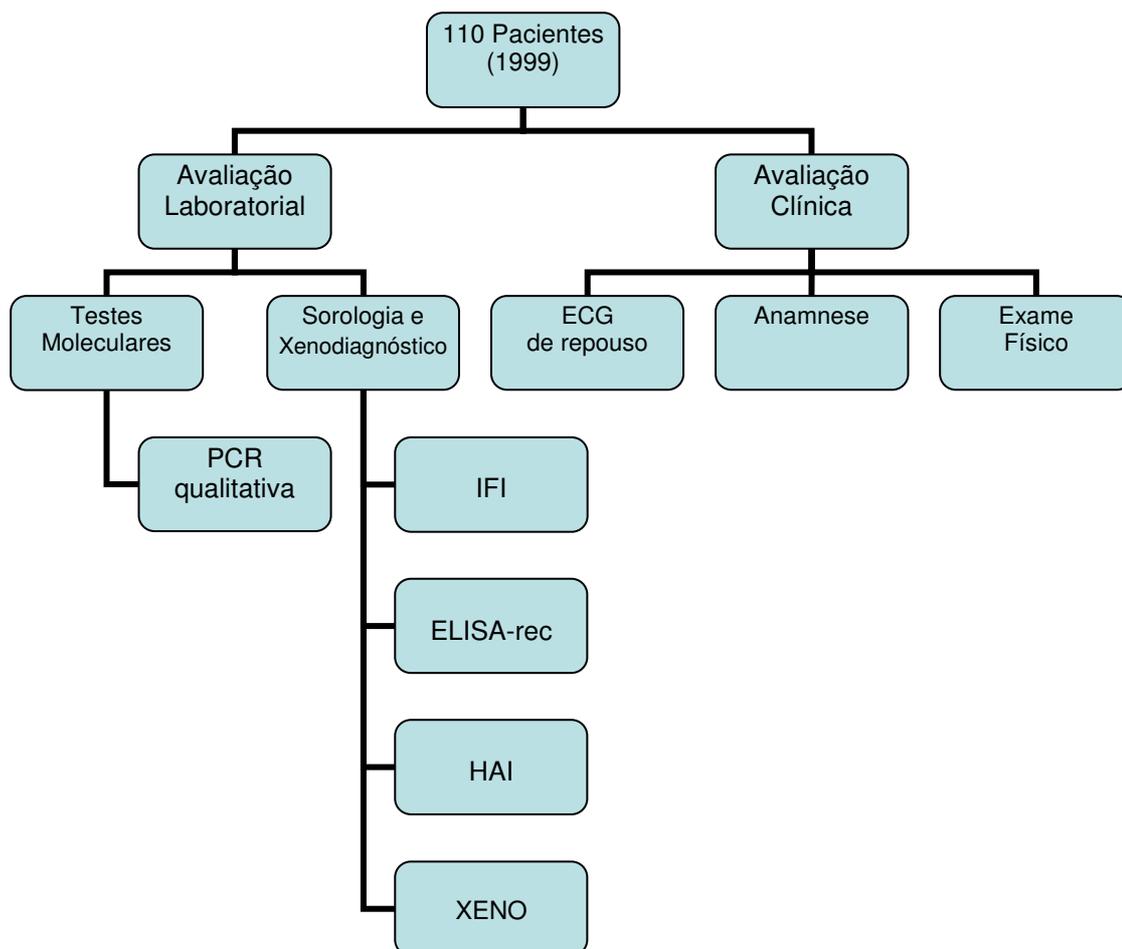


Figura 4.2: Estudo descritivo da *coorte* de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (MS) em 1999 (primeira parte do estudo).

De janeiro a abril de 1999 foram tratados com benzonidazol, 63 indivíduos na fase crônica da doença de Chagas, conforme o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (1996), sendo que não receberam tratamento 47 indivíduos crônicos, entre 29 a 67 anos, por não aceitarem ou por apresentarem contra-indicações clínicas ao uso do benznidazol (BZ-Rochagan®) (Figura 4.3). O BZ foi fornecido pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, através da Regional da Fundação Nacional de Saúde de Mato Grosso do Sul. Para cada paciente foram administrados comprimidos de benzonidazol na dose diária de 5 mg/Kg, fracionada em 12/12 horas, por 60 dias. Durante a quimioterapia, os pacientes foram acompanhados pelo Dr. José Borges, responsável pelo projeto e por médicos do sistema de saúde de cada município, dos quais receberam as devidas orientações. É importante enfatizar que a contra-indicação para o

tratamento foi: alcoolismo inveterado, gestação, efeitos colaterais e recusa por motivos pessoais.

A segunda parte desse trabalho constitui um estudo longitudinal de uma coorte de 50 pacientes reexaminados em 2010/2011, dos quais 28 receberam tratamento no ano de 1999, com benzonidazol e 22 não aderiram ao tratamento por motivos distintos, como já mencionados. Ressalta-se que o grupo denominado migrante refere-se aos pacientes inseridos no estudo de 1999 e que não fizeram parte da segunda etapa (2010/2011) devido à mudança residencial (Figura 4.3). Em anexo, uma tabela demonstra os dados referentes aos 110 pacientes (1999-2010/2011).

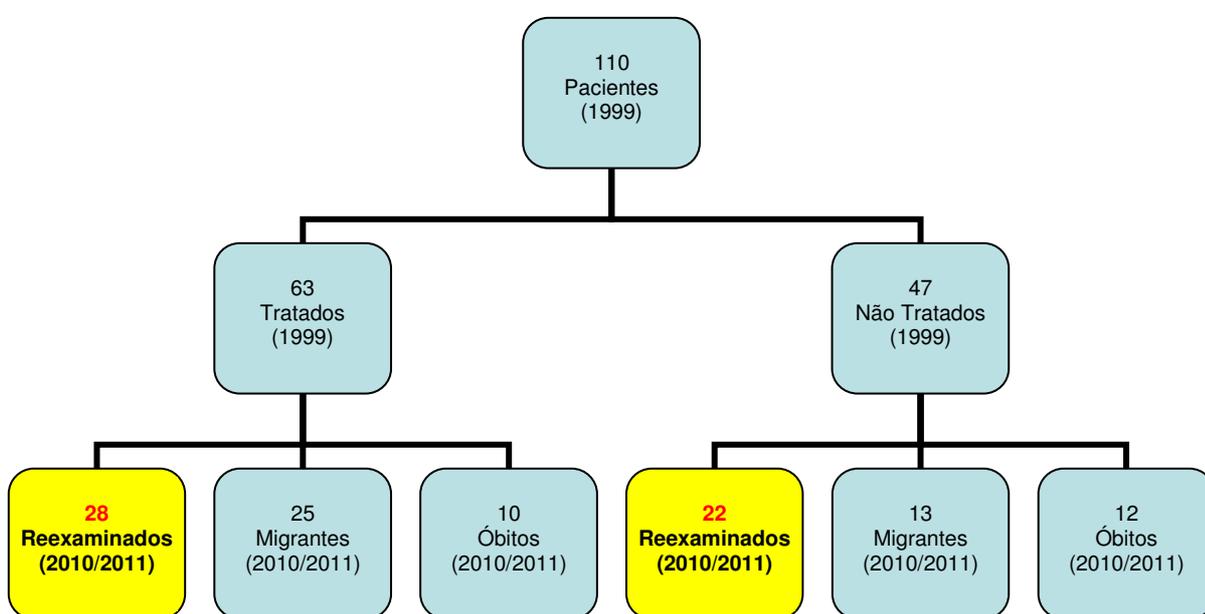


Figura 4.3: Situação da coorte de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (MS) entre 1999 - 2010/2011. As caixas em amarelo representam os indivíduos que foram reavaliados no presente estudo.

Assim como na primeira parte do estudo, os 50 pacientes reavaliados no presente trabalho foram submetidos aos exames laboratoriais e clínicos, como demonstrado na Figura 4.4. Todos os pacientes foram informados acerca dos objetivos do projeto e confirmaram ciência com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa em seres humanos da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/Fiocruz N° 597/11) (Anexo).

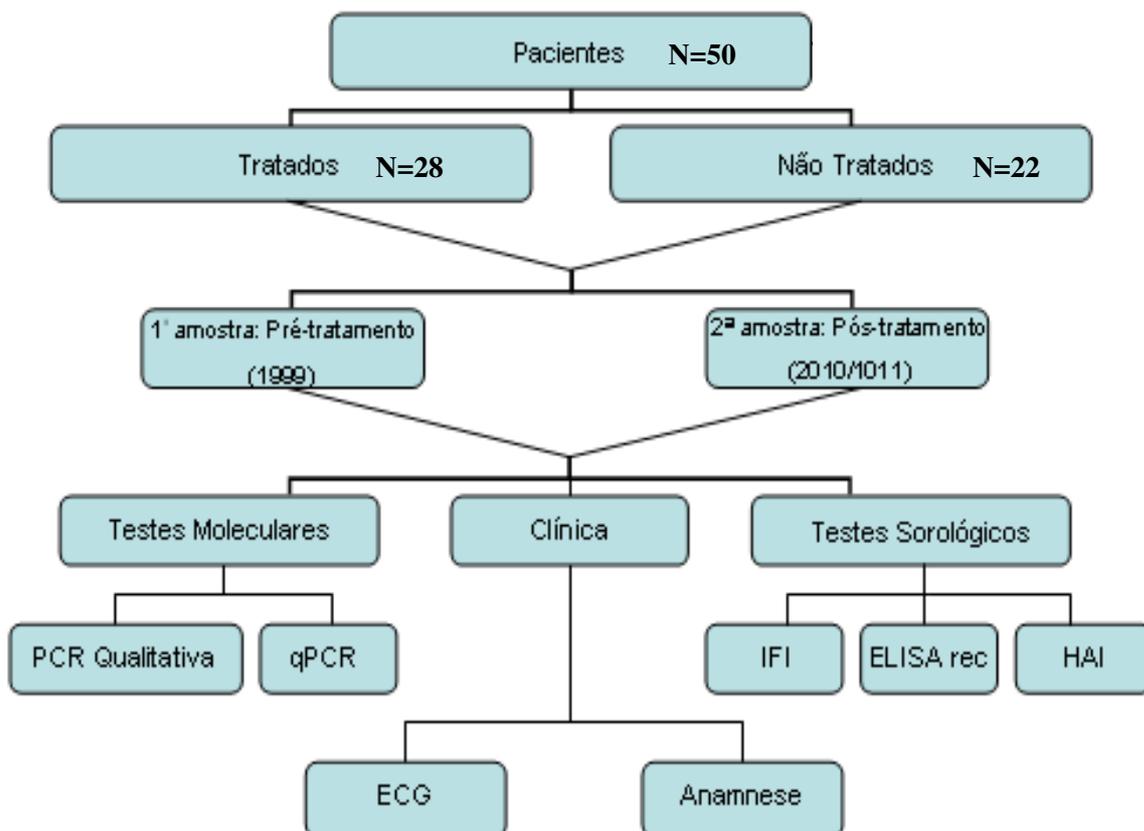


Figura 4.4: Estudo longitudinal da coorte de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) entre 1999 - 2010/2011.

4.2. Avaliação laboratorial

Os voluntários participantes desse estudo consentiram doar 20 mL de sangue venoso periférico coletado com sistema *vacutainer*, estéril e descartável, para a realização dos testes moleculares e sorológicos. Para os ensaios moleculares baseados em PCR, foram coletados 10 mL de sangue venoso sem anticoagulante (Vacuntainer BD) que foram imediatamente adicionados a um mesmo volume (1:1)

de solução de lise contendo cloridrato de guanidina 6M (Guanidina-HCl) e ácido etilenodietildinitrotetracético (EDTA) 0,2M/pH=8,0 (Avila *et al.*, 1991). As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) para a realização da metodologia molecular de detecção do parasito. Um tubo distinto foi utilizado para a coleta de 10 mL de sangue venoso para a realização da metodologia sorológica. Para a obtenção do soro, as amostras foram postas em repouso em uma estante laboratorial por 2 horas à temperatura ambiente. A centrifugação procedeu-se a 3.000 rpm por 10 minutos para coleta dos sobrenadantes, armazenados em tubos eppendorf a -20°C e encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias/IOC, local onde os testes sorológicos foram realizados.

Para este estudo duas coletas de sangue venoso de cada participante foram necessárias para a execução das propostas mencionadas. A primeira realizada em 1999 (antes do tratamento com benzonidazol) e a segunda, no período 2010/2011 (11 anos após o tratamento com benzonidazol).

4.2.1. Métodos moleculares

4.2.1.1. Clivagem do alvo kDNA

As amostras de lisados de sangue (10 mL de sangue total e 10 mL da solução de Guanidina-EDTA - GEB), foram mantidos à temperatura ambiente durante sete dias, foram fervidos em banho-maria a 100°C durante 15 minutos para clivagem física do kDNA por calor, como descrito por Britto *et al.*, (1993). Dois dias após a fervura, as amostras foram estocadas a 4°C até o momento da extração de DNA.

4.2.1.2. Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)

Para extração de DNA, foi utilizado o método “in-house” de fenol-clorofórmio, empregado por Wincker *et al.* (1994), com algumas modificações: Ao volume de 200 µL do lisado de sangue (GEB), foram acrescentados 200 µL de solução fenol:clorofórmio:etanol (v/v; Introgen Corporation®, CARLSBAD, CA) e centrifugado (14.000 rpm, 10 minutos, 25°C). O sobrenadante obtido (S1) foi coletado e reservado e o precipitado foi lavado com 200 µL de H₂O *milli-Q*, por centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos, 25°C), para obtenção do segundo sobrenadante (S2). Os dois

sobrenadantes foram reunidos para serem tratados (v/v) com clorofórmio (Merck® S.A.) e centrifugados (14.000 rpm, 10 minutos, 25°C). O novo sobrenadante (S3) foi recuperado e o DNA precipitado em 0,3 M de acetato de sódio, pH= 5,5 (Sigma Chemical Co.®, USA) e dois volumes de etanol absoluto (Merck® S.A.), com incubação em banho de gelo (15 minutos, à 4°C) e posterior centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos, 25°C). O precipitado final foi seco em placa de aquecimento por 5 minutos a 80°C e o DNA ressuspensão em 50 µL de Tris-EDTA (TE) 1X, pH=8. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C e sua pureza e concentração foram determinadas pelo espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) nas absorvâncias 260/280 e 260/320 nm.

4.2.1.3. Reação em cadeia da polimerase qualitativa (PCR convencional)

A PCR foi efetuada de acordo com método validado durante o Workshop & Symposium em Buenos Aires, Argentina, patrocinado pela WHO-TDR, com o objetivo de padronizar e validar o uso da PCR convencional para detecção da infecção pelo *T. cruzi* em sangue (Schijman *et al.*, 2011). Foram utilizados iniciadores para os minicírculos do kDNA de *T. cruzi* (121: 5'- AAA TAA TGT ACG GGK GAG ATG CAT GA -3' e 122: 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3') (Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil), descritos por Sturm *et al.* (1989) e modificados por Wincker *et al.* (1994), que amplificam um fragmento de 330 pb. A reação de PCR foi realizada em volume final de 50 µL contendo: 10x PCR Buffer (Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil), solução de Cloreto de Magnésio [4 mM] (Promega®, Madison, WI), *Taq Platinum* DNA polimerase [0,025 U/µL] (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), solução de cada desoxinucleotídeo: dATP, dCTP, dGTP, dTTP [0,2 mM cada], iniciadores 121 e 122 [3 ng/µL cada], H₂O de vacina qsp + 5 µL da amostra de DNA extraído do lisado de sangue.

A amplificação foi efetuada em um termociclador (GeneAmp 9600 PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA), nas seguintes condições de ciclagem térmica: uma etapa inicial de 94°C por 3 minutos para ativação da enzima *Taq Platinum*, seguida de 2 ciclos iniciais de 98°C por 1 minuto e 64°C por 2 minutos. Posteriormente a técnica prosseguiu-se com 38 ciclos: 94°C por 1 minuto e 64°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Em todas as etapas, incluindo a extração de DNA, foram utilizados controles negativos (DNA recuperado de lisado de sangue de indivíduo comprovadamente não infectado), positivos (DNA recuperado de sangue de indivíduo com carga parasitária confirmada) e de reagentes (amostra contendo todos os reagentes da PCR na ausência de DNA) em cada um dos experimentos.

As amostras que foram negativas para a detecção de *T. cruzi* foram testadas em outro ensaio paralelo de PCR para amplificação do gene humano de beta-globina. Para tal foram empregados os iniciadores PCO3 (5'- ACA CAA ACT GTG TTC ACT AGC-3') e PCO4 (5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'), na concentração final de 3 ng/μL, os quais amplificam um fragmento de 110 pb, utilizando as mesmas condições de reagentes e ciclagem térmica já descritas para o alvo kDNA de *T. cruzi*. A PCR para beta-globina atua como um controle endógeno, constitutivo para controlar a integridade do DNA extraído de sangue humano, assim como verificar a possível presença de inibidores da enzima *Taq* DNA polimerase nas amostras de DNA a serem diagnosticadas.

4.2.1.4. Eletroforese em gel de agarose

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, empregando géis de agarose a 1,5% (Seakem® e NuSieve®, FMC Bioproducts, Rockland, USA), preparados em TBE 1X [0,089 M Trizma base; 0,088 M Ácido Bórico; 0,0027 M EDTA, pH=8]. Alíquotas de 17 μL dos produtos da PCR foram misturadas com 2 μL do tampão de aplicação de amostras (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 1 hora e meia à 80 V. O peso molecular dos *amplicons* foi determinado pelo marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder- Invitrogen Life Technologies®) incluído nos géis. Segmentos específicos de 330 pb (referentes à *T. cruzi*) ou de 110 pb (referentes à beta-globina humana), foram visualizados sob luz ultravioleta, após coloração dos géis com corante Nancy-520® (Sigma Life Science) [5 μg/μL]. Todos os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel - UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

4.2.1.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Para a quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* presente nos lisados de sangue (GEB), foram realizados ensaios de PCR em tempo real multiplex utilizando o sistema TaqMan (Life Technologies), com um alvo direcionado para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi* e um alvo para o gene da RNase P humana. Para tal, foram selecionados os iniciadores e sonda para as sequências repetidas do DNA satélite nuclear de *T. cruzi*: Cruzi 1 (5'- AST CGG CTG ATC GTT TTC GA- 3') e Cruzi 2 (5'- AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA- 3'), que amplificam um fragmento de 166 pares de base, e a sonda TaqMan Cruzi 3 (5'-FAM CAC ACA CTG GAC ACC AA- 3'MGB), conforme descrito por Piron *et al.* (2007). Os ensaios foram realizados em multiplex utilizando o kit comercial pré-desenvolvido para o gene da RNase P humana (*TaqMan Human RNase P detection reagent*, Life Technologies), como controle interno de amplificação. Para permitir a realização do ensaio em multiplex, a sonda TaqMan para RNase P foi marcada com o repórter 5'-VIC e o quencher 3'-TAMRA. As concentrações finais dos reagentes foram: 1 X *Universal Master Mix* (Life Technologies); 0,5X reagente de detecção da RNase P; 300 nM dos iniciadores Cruzi 1 e Cruzi 2; 100 nM sonda TaqMan (Cruzi 3), 2 µL de DNA, em um volume final de 20 µL de reação.

As amostras foram amplificadas em termociclador ABI Prism 7500 Fast (Life Technologies, Foster City, CA), nas seguintes condições de ciclagem térmica: um passo de 2 minutos à 50°C, seguido de uma etapa de 10 minutos à 95°C e 40 ciclos de amplificação (15 segundos à 95°C e 1 minuto à 58°C).

Foram realizados ensaios de quantificação absoluta, onde em cada placa de PCR em tempo real foi inserida uma curva padrão de DNA extraído de lisado de sangue humano (comprovadamente livre de infecção por *T. cruzi*) em guanidina-EDTA (GEB), contaminado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi*, cepa CL Brener. Para tal, alíquotas de 200 µL de GEB foram contaminadas artificialmente com 10^7 epimastigotas de *T. cruzi*/mL, seguido da extração de DNA, conforme o protocolo descrito no item 4.2.1.2. A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas na base 10 do DNA obtido acima, atingindo concentrações que variaram de 10^7 a 10^{-1} equivalentes de parasito/mL. Como diluente, foi utilizado um *pool* de DNA humano, obtido a partir de lisado de sangue de indivíduo comprovadamente não infectado por *T. cruzi*. Cada diluição foi correspondente a um ponto que compôs a

curva padrão para quantificação absoluta da parasitemia dos pacientes deste estudo. A curva padrão foi incluída em todos os ensaios quantitativos, em duplicatas para cada ponto da curva.

Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e todas as placas de ensaios de qPCR contiveram controles positivos (1 fg e 10 fg DNA/ μ L), e controles negativos (NTC: *Negative Template control* - 5 μ L água ultrapura, e Controle negativo para *T. cruzi*: 5 μ L DNA extraído a partir de 200 μ L de lisado de sangue de indivíduo comprovadamente não infectado).

Nos ensaios de quantificação utilizamos as mesmas amostras de DNA de pacientes, referentes aos dois momentos da análise (1999 e 2010/2011), as quais foram extraídas com fenol-clorofórmio para os ensaios de PCR convencional. Para a análise dos resultados, as amostras foram consideradas válidas quando o controle interno (gene humano da RNase P) foi amplificado com um valor de Ct (*Threshold cycle*) estatisticamente semelhante à média dos Cts obtidos para este mesmo alvo na curva padrão. Além disso, foram consideradas positivas as amostras cuja carga parasitária foi estimada em um valor acima do limite de detecção deste método (0,07 equivalentes de parasito/mL) validado no LABIMDOE/IOC/FIOCRUZ.

4.2.2. Métodos sorológicos

4.2.2.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)

A metodologia foi realizada empregando antígeno das formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Y após cultivo em meio LIT, produzido por Bio-Manguinhos (IFI-CHAGAS®). Para a realização do teste, foram utilizadas lâminas de microscopia para fluorescência contendo 12 poços que foram sensibilizados com 10 μ L de suspensão antigênica em solução salina NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS). A secagem das lâminas foi feita à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados às lâminas 20 μ L de soro de cada paciente na diluição 1:40, assim também para os controles. Em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida à 37°C por 30 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, cinco minutos cada, por imersão e uma vez com água destilada e posteriormente foram secas à 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados em cada poço, 20 μ L do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína

(FLUOLINE G®) na diluição de 1:80. As lâminas foram incubadas à 37°C por 30 minutos, depois foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com água destilada e, em seguida secas à 37°C por 5 minutos. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínulas, e a leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Zeiss – Modelo HBO 50) e objetiva de 40X.

Foram consideradas reativas as amostras de soro que apresentaram fluorescência na diluição igual ou superior a 1:40. Em cada lâmina foi adicionado um controle positivo e um negativo. A leitura foi feita imediatamente após a montagem final da lâmina por dois observadores (os mesmos que realizaram-na em 1999) e o título final foi aquele do consenso. Foi considerada variação do nível de IgG, a queda ou aumento da positividade de dois ou mais títulos como descrito na literatura.

4.2.2.2. ELISA recombinante (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Para este teste, foi empregado o kit produzido por Biomanguinhos/Fiocruz (antígenos CRA e FRA; *cut-off* de 0,175) para as análises realizadas em 1999, e o kit comercial Chagatest Wiener (ELISA recombinante v.3.0; *cut-off* de 0,335) nas análises posteriores, ambos processados segundo as recomendações do fabricante. Em uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato, os soros dos pacientes foram diluídos na proporção 1:20, sempre com a inclusão de controles positivos e negativos. As amostras e controles foram analisadas em espectrofotômetro (modelo ELS/311) com comprimento de onda de 450 nm a 650 nm. Foram consideradas reativas as amostras com absorbâncias maiores ao limite superior à zona de indeterminação ou zona cinza (definida por ponto de corte ou *cut-off* \pm 10%) e não reativas as que apresentaram absorbâncias menores ao limite inferior à zona de indeterminação. Ressalta-se que em virtude dos diferentes kits empregados nas análises sorológicas realizadas na primeira etapa do trabalho (1999) e nesta fase atual (2010/2011), dois pontos de corte foram determinados, *cut-off* de 0,175 e 0,335, respectivamente. Arbitrariamente consideramos como índice de reatividade (IR) da amostra o resultado da razão entre a densidade óptica obtida e o “*cut-off*” calculado para cada placa, assim expresso: $IR = D.O \text{ (densidade óptica) da amostra} / \text{“cut-off”}$. Para esse teste, consideramos variação no nível de IgG, os resultados que apresentaram queda ou aumento no IR de 1,5 vezes ou mais.

4.2.2.3. Hemaglutinação Indireta (HAI)

Esse teste foi realizado utilizando o kit HEMACRUZI® (BIOMÉRIEUX), conforme as recomendações do fabricante. A reação consistiu na diluição 1:40 das amostras e soros controles em diluente apropriado (PBS 0,01 M pH 7,2). Os soros diluídos foram transferidos para uma placa de fundo em “V” e adicionado o antígeno, constituído de hemácias de carneiro sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*. A seguir as placas foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por uma hora até realização da leitura. A leitura do teste foi efetuada de acordo com a aparência visualizada em cada poço da microplaca, em comparação com os soros controles reagentes e não reagentes. A amostra foi considerada reativa quando a aglutinação foi observada na diluição 1:40, caracterizada pela formação de um “véu” de hemácias de dimensão superior ao soro controle não reativo, e considerada não reativa quando apresentou um botão compacto de hemácias sedimentadas no fundo da cavidade da microplaca, de dimensão menor ou igual ao soro controle. Não foi adotada diluição 1:20 nesse estudo a fim de evitar a intensificação de reações inespecíficas, já que algumas amostras de soro apresentam “aglutininas naturais” de classe IgM, que podem causar aglutinação inespecífica. Para uma análise quantitativa (titulação), os soros foram testados na diluição de 1:40 até 1:2560 em microplaca distinta, obedecendo a razão 2. Foram incluídos os soros controles. A leitura desse teste foi efetuada a partir da mesma base de interpretação do teste qualitativo. Do mesmo modo que na IFI, foram consideradas variações nos níveis de IgG os resultados com queda ou aumento de duas ou mais diluições.

4.3. Avaliação clínica

Em ambos os momentos, inicial e final do estudo, a avaliação clínica foi realizada pelo mesmo profissional responsável, mediante preenchimento de ficha clínico-epidemiológica na qual constam anamnese e exame físico para identificação de sintomas e sinais associados aos aparelhos cardiovascular e digestivo, representados principalmente por: dispnéia, palpitações e dor precordial em repouso e frente aos esforços; perda da consciência, presença ou não de arritmias, sopros e desdobramento das bulhas cardíacas à ausculta, referência à

disfagia, pirose, regurgitações, obstipações intestinais, uso de laxativos, realização de cirurgias e recepção ou doações de sangue. A pressão arterial foi avaliada em repouso, empregando-se esfigmanômetro braquial, considerando-se hipertensão arterial valores acima de 95 mm Hg (diastólica) e 160 mm Hg (sistólica). Em anexo, consiste na Ficha Epidemiológica e Clínica.

4.3.1. Avaliação eletrocardiográfica

Em ambos os momentos, inicial e final, obtiveram-se traçados eletrocardiográficos em repouso (ECG), registrando-se no mínimo três complexos por cada uma das doze derivações clássicas, mais D2 longo no caso de arritmias à ausculta ou referências de palpitações. Os traçados eletrocardiográficos foram avaliados segundo critérios preconizados pela New York Heart Association - NYHA (1973) considerando-se normais, as freqüências de 60 a 120 bpm e arritmias sinusais. A leitura e análises dos traçados foram feitas por dois profissionais qualificados, considerando-se o laudo consensual. Os resultados foram utilizados para classificar os indivíduos na primeira fase do estudo (1999) e nas avaliações posteriores (2010/2011). Foram consideradas mais sugestivas de cardiopatia chagásica crônica as seguintes alterações eletrocardiográficas:

- (1) bloqueios atrioventriculares (BAV),
- (2) bloqueio completo do ramo direito (BCRD),
- (3) bloqueio da divisão ântero-superior do ramo esquerdo (BDAS),
- (4) extrassístoles ventriculares complexas (EVC) e
- (5) zonas eletricamente inativas (ZEI).

4.3.2. Comprometimento miocárdico

O nível de comprometimento miocárdico em ambos os momentos inicial e final do estudo, foi considerado com base nos critérios clínicos e eletrocardiográficos contidos nos documentos da OMS/OPAS (1974) e Macêdo (1976), assim expressos:

- ❖ **Grau I:** Infecção chagásica sem indicações clínicas e eletrocardiográficas de lesão cardíaca; ou grau C0 (cardiopatia ausente) de Macêdo (1976).

- ❖ **Grau II:** Infecção chagásica com sintomatologia cardíaca moderada ou nula com alterações eletrocardiográficas do tipo extrassístoles ventriculares, bloqueio incompleto ou completo do ramo direito do feixe de His, bloqueio atrioventricular (exceto BAV total), bloqueio incompleto ou completo do ramo esquerdo do feixe de His e alterações de repolarização ventricular; ou grau C1 (sintomatologia nula, cardiopatia leve) e grau C2 (sintomatologia moderada, cardiopatia moderada) de Macêdo (1976).

- ❖ **Grau III:** Infecção chagásica com sintomatologia evidente, alterações eletrocardiográficas do tipo bloqueio completo do ramo direito do feixe de His com desvio do eixo elétrico para a esquerda; zonas eletricamente inativas; bloqueio atrioventricular total (BAVT), fibrilação ou *flutter* atriais; ou grau C3 (cardiopatia grave) de Macêdo (1976).

- ❖ **Grau IV:** Infecção chagásica com sintomatologia muito pronunciada, apresentando insuficiência cardíaca e o eletrocardiograma indicando alterações graves e múltiplas (arritmias complexas e graves ou extensas zonas eletricamente inativas); ou grau C4 (cardiopatia gravíssima) de Macêdo (1976).

4.3.3. Evolução da miocardiopatia

Na avaliação dos aspectos evolutivos da miocardiopatia chagásica, no período considerado (1999 - 2010/2011), foram utilizados os critérios estabelecidos por Coura *et al.* (1985) e Borges-Pereira *et al.* (1985) (1990), a partir de estudos longitudinais, assim resumidos:

- ❖ **Evolução inalterada** – quando não houve mudança no grau da cardiopatia – manutenção do padrão clínico e eletrocardiográfico.

- ❖ **Evolução progressiva** – quando houve mudança do menor para maior grau da cardiopatia - mudança no padrão clínico associado à migração do ECG de normal para alterado ou ao agravamento do traçado inicial.

- ❖ **Evolução regressiva** – quando houve normalização do ECG ou mudança de maior para menor grau da cardiopatia.
- ❖ **Óbito:** informações de causas e tipos de morte foram obtidas através das secretarias de saúde, cartório e familiares.

4.4. Análise Estatística

O programa R versão i386 2.15.1. (Verzani, 2005) foi utilizado para fazer a estatística da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa, através do teste de McNemar (Conover, 1980), considerando nível de significância de 5% para a aceitação da hipótese nula.

Para avaliação das técnicas sorológicas de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e ELISA recombinante, assim como na avaliação eletrocardiográfica, foi utilizado o pacote contido no programa EPI-INFO versão 6.0 (Centers for Disease Control-CDC, 2000) considerando nível de significância de 5% para a aceitação da hipótese nula.

5. Resultados

5.1. Avaliação da população de Mato Grosso do Sul

5.1.1. Dados epidemiológicos

A amostra inicial desse estudo foi constituída por 110 indivíduos examinados e orientados clinicamente pela primeira vez no ano de 1999. No entanto, devido aos casos de óbitos (N=22; 20%) e migração (N=38; 34,5%), a amostra atual (2010/2011) ficou composta por 50 (45,5%) pacientes (Figura 5.1), conforme já descrito. Todos os pacientes responderam a um questionário complementar aos exames efetuados.

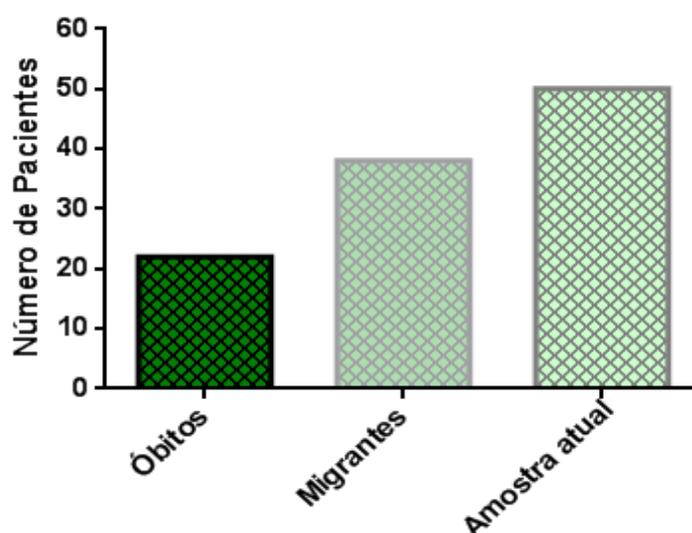


Figura 5.1: Distribuição atual (2010/2011) dos grupos de indivíduos portadores de DC residentes no Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) recrutados em 1999.

Quanto ao gênero, 32 (64%) são do sexo feminino e 18 (36%) do sexo masculino (Figura 5.2). No início do estudo, em 1999, a faixa etária dos indivíduos variou de 19 a 67 anos, sendo a média de 46 anos.

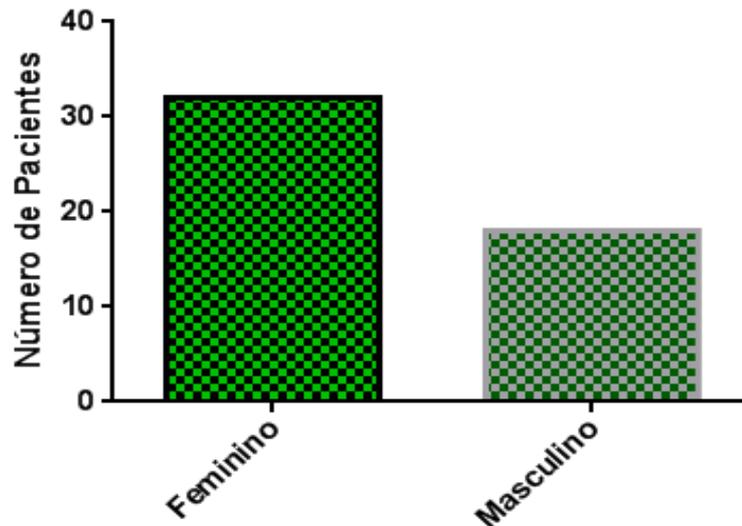


Figura 5.2: Segundo o gênero, distribuição da população de portadores de DC estudada no distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) em 2010/2011.

Seguindo as recomendações médicas, dos 50 pacientes estudados, 28 (56%) realizaram o tratamento completo com benzonidazol - BZ [N-benzil-2-nitro-1-imidazole-acetamide] na dosagem de 5 mg/Kg/dia, via oral, durante 60 dias consecutivos, no ano de 1999. Efeitos colaterais leves (anorexia, perda de peso, cefaléia e náuseas) foram referidos por 8 (28,6%) dos pacientes, mas não houve casos de interrupção do tratamento.

De acordo com a investigação epidemiológica, 26 pacientes são agricultores, 15 desempenham atividades no lar, 8 são comerciários e 1 aposentado; 46 são alfabetizados e 4 analfabetos. Metade da população estudada é natural do Estado do Mato Grosso do Sul (MS) [N=25], sendo a outra metade composta por indivíduos nascidos nos estados de Minas Gerais (MG) [N=4], São Paulo (SP) [N=4], Rio Grande do Sul (RS) [N=4], Ceará (CE) [N=4], Pernambuco (PE) [N=3], Paraná (PR) [N=2], Bahia (BA) [N=2], Goiás (GO) [N=1] e Santa Catarina (SC) [N=1] (Figura 5.3).

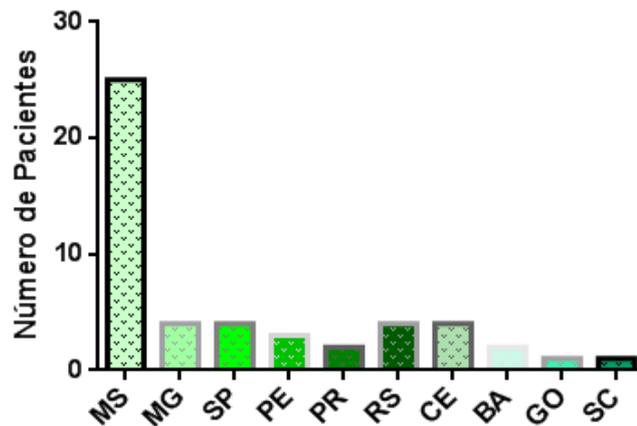


Figura 5.3: Segundo a naturalidade, distribuição da população de portadores de DC do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul).

Dados coletados no início do estudo (1999) revelaram que, com relação ao conhecimento acerca de triatomíneos, 95% dos entrevistados disseram que já tinham ouvido falar da doença de Chagas e dos triatomíneos (barbeiros) através de agentes de saúde da extinta SUCAM (Superintendência de Campanha de Saúde Pública). Entretanto, somente 9 (18%) relataram terem sido picados. Não houve relato de recepção de transfusão de sangue. Morte súbita na família foi referida por 7 (14%) pacientes. Quanto ao tipo de residência (em 1999), 40 (80%) dos pacientes viviam em casas de alvenaria e 10 (20%) em casas de madeira.

5.2. Avaliação laboratorial

5.2.1. Molecular

❖ Reação em cadeia da polimerase qualitativa (PCR)

A avaliação qualitativa pela técnica de PCR foi positiva para a detecção de DNA de *T. cruzi* em 64% do total de pacientes analisados em 1999 contra 16% de positividade observada na análise realizada 11 anos depois em ambos os grupos (tratado e não tratado) (Figura 5.4 B), indicando uma diferença estatisticamente significativa ($p=0$) para o total de pacientes (N=50) entre os períodos avaliados. Como demonstrado na figura 5.4 A, observa-se que do total de negativos no último momento da avaliação, 23/28 ou 82,1% dos indivíduos que receberam tratamento

com BZ em 1999, mantiveram-se negativos ou negativaram o resultado da PCR. A ocorrência de resultados falso-negativos foi descartada, considerando que todas as amostras com resultados negativos para *T. cruzi* foram simultaneamente analisadas para a amplificação do gene da β -globina humana, confirmando assim a acurácia dos resultados (Figura 5.4 C e D).

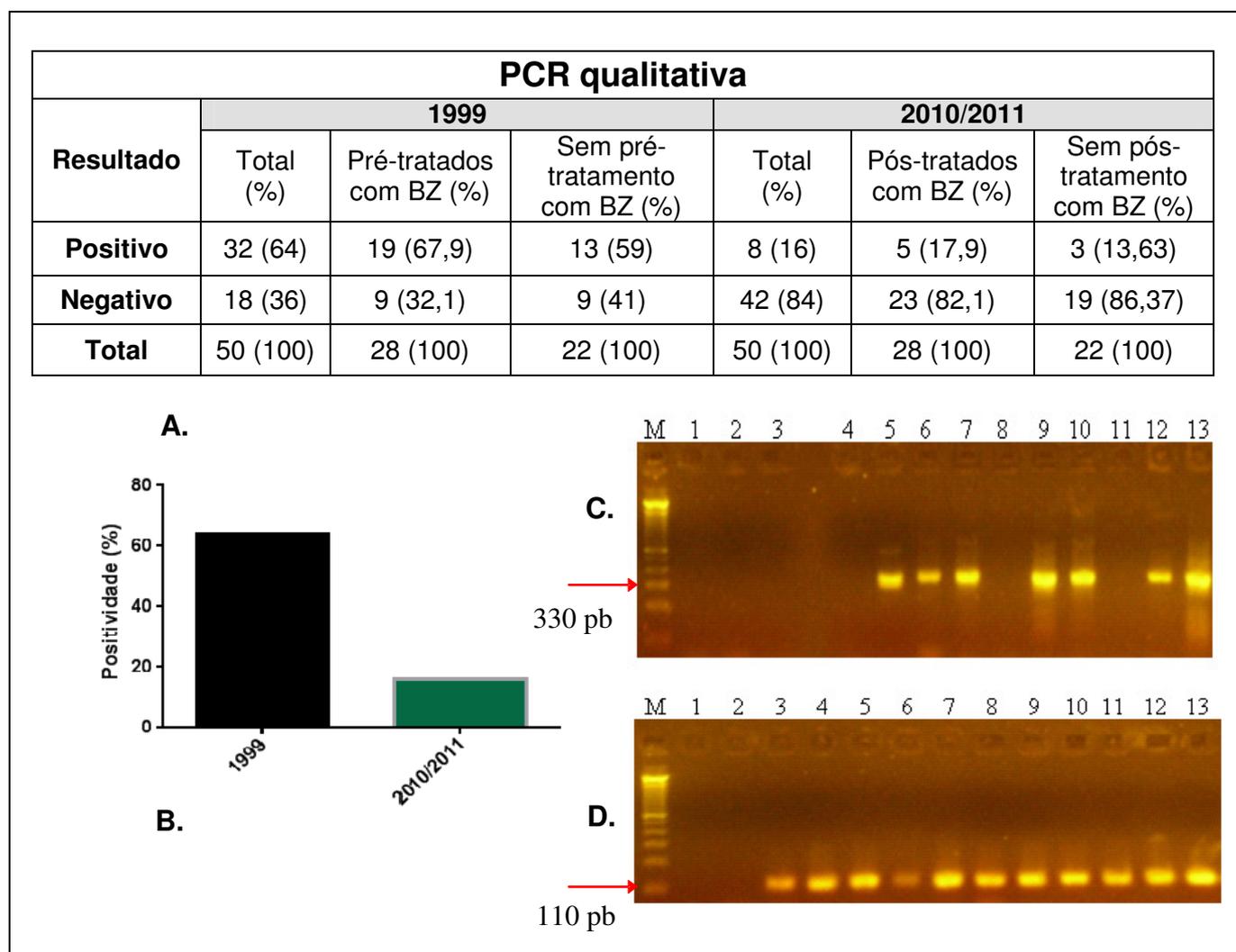


Figura 5.4: Acompanhamento da parasitemia pelo teste de PCR qualitativo na população de portadores de DC do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS), nos anos 1999 e 2010/2011. A. Distribuição dos pacientes quanto à Positividade ou Negatividade do teste molecular. **B.** Percentual de positividade da PCR. **C.** Exemplo de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Nancy-520® [5 µg/µL] para a detecção do fragmento de 330 pb do kDNA de *T. cruzi* (iniciadores 121/122); M: marcador de peso molecular (padrão de 100 pb); coluna 1: controle negativo da mistura de reação (todos os reagentes sem amostra de DNA); coluna 2: controle negativo utilizado para teste de descontaminação do fluxo laminar no qual o DNA foi aplicado (apenas água de vacina estéril); coluna 3: controle negativo (DNA extraído a partir do sangue total de humano não infectado); colunas 4, 8 e 11:

amostras de pacientes negativas para a presença de DNA de *T. cruzi*; colunas 5, 6, 7, 9, 10 e 12: amostras de pacientes positivas para a presença de *T. cruzi*; coluna 13: controle positivo (DNA extraído de paciente comprovadamente positivo para infecção pelo *T. cruzi*).
D. Gel de agarose a 2% corado com Nancy-520® [5 µg/µL] para a detecção do fragmento de 110 pb do gene da β-globina humana (iniciadores PCO3/PCO4), confirmando a integridade do DNA purificado e a ausência de inibidores da reação de PCR; M: marcador de peso molecular (padrão de 100 pb); coluna 1: controle negativo da mistura de reação (todos os reagentes sem amostra de DNA); coluna 2: controle negativo utilizado para teste de descontaminação do fluxo laminar no qual o DNA foi aplicado (apenas água de vacina estéril); colunas 3 a 12: amostras de indivíduos que foram negativas para a presença de *T. cruzi* e positivas para o gene da β-globina humana; coluna 13: controle positivo (DNA extraído a partir de sangue humano).

❖ **Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)**

A Figura 5.5 demonstra um exemplo de curva padrão construída a partir de DNA extraído de lisado de sangue humano em guanidina-EDTA (GEB), contaminado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi*, cepa CL Brener. Foram feitas diluições seriadas na base 10 do DNA obtido, atingindo concentrações que variaram de 10^7 a 10^{-1} equivalentes de parasito/mL. Na Figura 5.6 estão representadas curvas de amplificação (*amplification plot*) geradas pelo equipamento ABI Prism 7500 durante os ensaios de quantificação. Cada curva no gráfico representa uma determinada amostra que emite sinal de fluorescência (eixo Y) em um dado ciclo de amplificação (eixo X), dependendo da quantidade de DNA alvo presente na amostra.

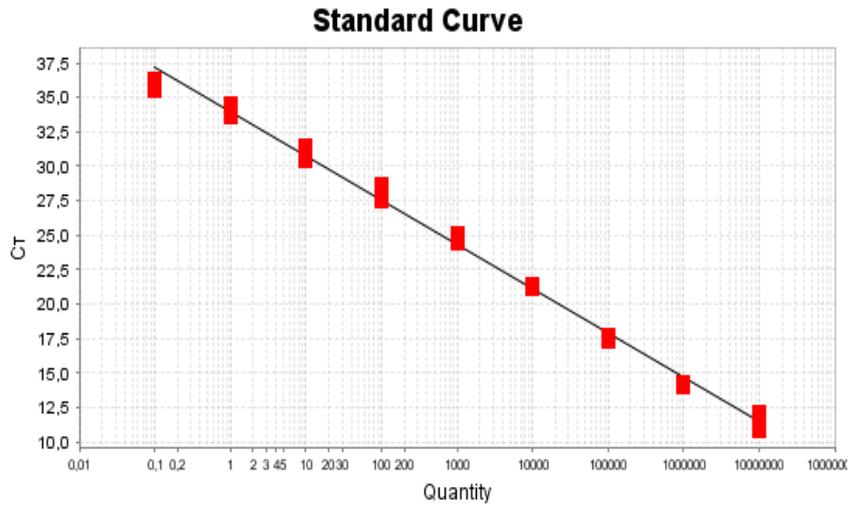


Figura 5.5: Curva padrão com 9 pontos da diluição de DNA de *T. cruzi* (CL Brener) em sangue contendo guanidina-EDTA para verificação do desempenho da amplificação pelo sistema TaqMan, através da avaliação dos parâmetros da curva padrão: Eficiência =104,5% e $R^2=0,99$. Este exemplo de curva foi usado em todos os ensaios de quantificação.

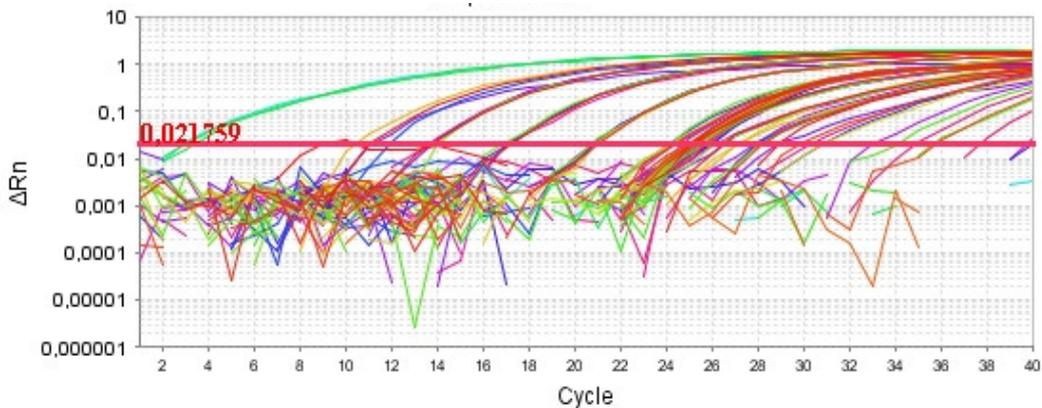


Figura 5.6: Curvas de amplificação do ensaio de qPCR em tempo real - sistema TaqMan para o alvo DNA nuclear satélite de *T. cruzi*. Eixo X: Número de ciclos; Eixo Y: fluorescência gerada pela clivagem da sonda TaqMan (Cruzi3). A linha horizontal no gráfico (em vermelho) corresponde ao *Threshold* selecionado pelo *software*, o que permite indicar o ciclo (Ct) no qual a fluorescência de cada amostra ultrapassa a linha *Threshold*.

Todas as 50 amostras de pacientes coletadas em 2010/2011 foram avaliadas quantitativamente para a estimativa da carga parasitária, 1999 e 2010/2011, porém, só exploramos os resultados dos 8 pacientes que foram positivos na PCR qualitativa realizada em 2010/2011, a fim de compará-los com o período inicial do estudo (Fig. 5.7). O limite de quantificação do método foi estimado em 0,07 equivalentes de parasito por mililitro de sangue e as amostras foram validadas pelo uso do controle interno, gene humano da RNase P, utilizado em multiplex no sistema Taqman de qPCR.

Das 8 amostras, em duas (#31 e #1469 – coletadas em 1999) não foi possível detectar DNA de *T. cruzi* por qPCR, corroborando os resultados obtidos com a PCR convencional para ambas as amostras no início do estudo. O paciente #31 foi tratado e sua carga parasitária em 2010/2011 se manteve muito baixa, próxima ao limite de quantificação, sendo que o mesmo foi observado para o paciente #1250, o qual revelou uma queda na parasitemia de cerca de 10X em relação ao acompanhamento 11 anos após tratamento. O de #972 não recebeu tratamento com BZ e também permaneceu com carga parasitária extremamente baixa equivalente a apresentada em 1999. Foi observada uma redução de 25% de carga parasitária para o paciente #76, 11 anos pós-tratamento. Alternativamente, dois pacientes tratados (#1131 e #1457) demonstraram um aumento aproximado de 1,6X e 3,6X, respectivamente, em suas cargas parasitárias. Enquanto o paciente #1424 (não tratado) teve um aumento significativo superior a 800X no nível de parasitemia na última análise (Figura 5.7).

PCR quantitativa (qPCR)			
Paciente	1999		2010/2011
	Eq. parasito/mL ± SD	Tratamento	Eq. parasito/mL ± SD
31	ND	Sim	0,06 ± 0,07
76	18,89 ± 8,08	Sim	14,02 ± 6,45
1131	47,57 ± 13,06	Sim	76,48 ± 17,07
1250	0,83 ± 0,32	Sim	0,07 ± 0,01
1457	1,34 ± 0,12	Sim	4,78 ± 0,18
972	0,1 ± 0,04	Não	0,09 ± 0,04
1424	0,08 ± 0,09	Não	69,93 ± 5,42
1469	ND	Não	2,56 ± 0,61

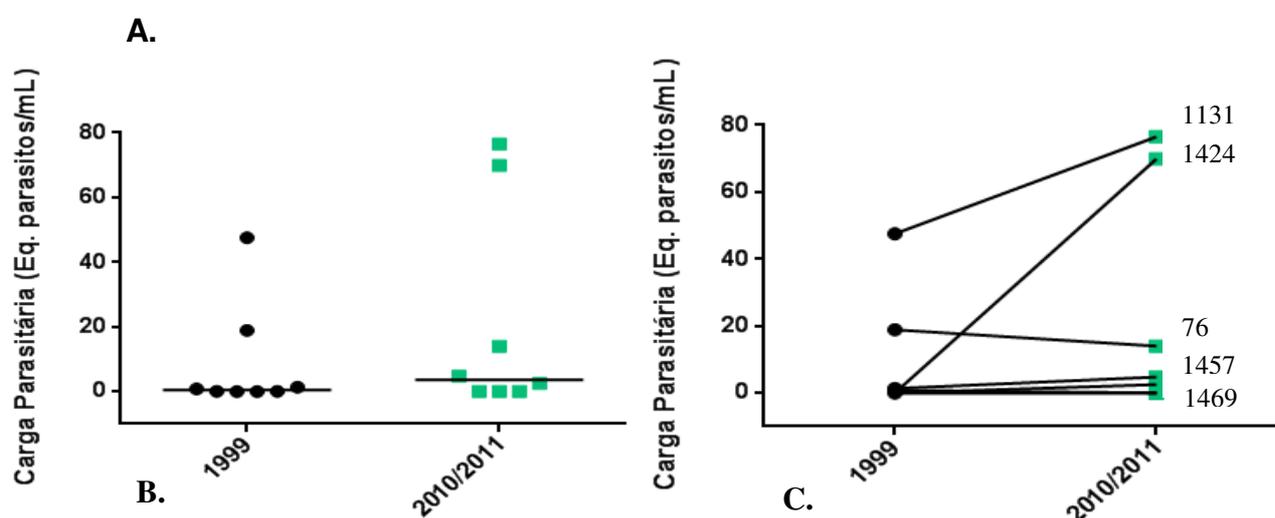


Figura 5.7: Acompanhamento da parasitemia pelo teste de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) nos 8 portadores de DC (positivos pela PCR qualitativa em 2010) da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (MS), nos anos 1999 e 2010/2011. A: Distribuição dos pacientes quanto à carga parasitária estimada pelo teste molecular quantitativo (SD: desvio padrão; ND: não detectado); **B:** Gráfico mostrando a distribuição do nível de parasitemia avaliada no momento inicial e final do estudo; **C:** Gráfico indicando a variação da carga parasitária nos dois momentos da avaliação.

5.2.2. Sorológica

Nos dados que seguem, dois aspectos foram abordados na análise de testes sorológicos. No primeiro, utilizamos como parâmetro a frequência de pacientes inseridos em cada grupo, ou seja, o número de pacientes em uma dada circunstância. Como segundo parâmetro, avaliamos a média dos inversos de títulos/densidade óptica, a qual permite uma visão global dos níveis de imunoglobulinas em cada grupo de pacientes. Tais parâmetros buscam sugerir uma possível correlação entre os dados obtidos e o tratamento com BZ.

5.2.2.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)

No total de soros testados, os títulos identificados variaram de 1:40 até 1:1280, com mediana de 1:80 em ambos os momentos (1999-2010/2011), as médias dos inversos dos títulos foi 278 ± 332 em 1999 e 149 ± 228 em 2010/11 ($F=5,11$; $p=0,025$). As frequências dos títulos estão expressas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Distribuição das frequências dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de IFI em soros de portadores de DC do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011, frente ou não ao tratamento por BZ.

Títulos de Ig G anti- <i>T. cruzi</i>	Pacientes tratados com BZ				Pacientes Não tratados com BZ				Total			
	Pré-tratamento 1999		Pós-tratamento 2010/11		Pré-tratamento 1999		Pós-tratamento 2010/11		Pré-tratamento 1999		Pós-tratamento 2010/11	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
< 1: 40	-	-	7	25,0	-	-	9	40,9	-	-	16	32,0
1: 40	3	10,7	4	14,3	13	59,1	4	18,2	16	32,0	8	16,0
1: 80	6	21,4	3	10,7	4	18,2	2	9,1	10	20,0	5	10,0
1:160	2	7,1	7	25,0	2	9,1	6	27,3	4	8,0	13	26,0
1:320	6	21,4	4	14,3	3	13,6	-	-	9	18,0	4	8,0
1:640	8	28,6	2	7,1	-	-	1	4,5	8	16,0	3	6,0
1:1.280	3	10,8	1	3,6	-	-	-	-	3	6,0	1	2,0
TOTAL	28	100,0	28	100,0	22	100,0	22	100,0	50	100,0	50	100,0

Foi observado que a frequência de pacientes com redução dos títulos foi maior no grupo de tratados (53,6%) em comparação ao grupo de não tratados (36,4%), sem atingir nível de significância estatística (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Evolução dos inversos dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* pelo teste de IFI em soros da população de portadores do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011, frente ou não ao tratamento por BZ.

Evolução dos inversos dos títulos de Ig G *	Pacientes Tratados		Pacientes Não Tratados		Estatística	
	N	%	N	%	X ²	p
Inalterada	11	39,3	12	54,5	1,15	0,28
Com aumento	2	7,1	2	9,1	0,07	0,78#
Com redução	15	53,6	8	36,4	1,47	0,22
TOTAL	28	100,0	22	100,0	-	

*Critérios página 45;

Yates corrigido

De acordo com a análise comparativa das médias dos inversos dos títulos Ig G anti-*T. cruzi*, observou-se redução significativa das médias no total de pacientes ($p < 0,05$) e no grupo de tratados com BZ (Tabela 5.3), indicando assim, dependência de variação dos níveis de imunoglobulinas com o tratamento efetuado.

Tabela 5.3: Evolução das médias dos inversos dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de IFI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Pacientes	Em 1999	Em 2010/11	Estatística*	
	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão	F	p
Tratados (N= 28)	421 ± 381	195 ± 272	6,50	0,013
Não Tratados (N=22)	96 ± 98	90 ± 138	0,03	0,869
TOTAL (N = 50)	278 ± 332	149 ± 228	5,11	0,025

*Análise de comparação das médias;

F=Ferramenta estatística para análise de variância.

5.2.2.2. ELISA recombinante

No total de soros testados, as densidades ópticas variaram de 0.025 a 0.967 (para *cut off* = 0.175 e mediana de 0.243) em 1999 e de 0.024 a 2.629 (para *cut off* de 0.355 e mediana de 0.680) em 2010/2011.

Na Tabela 5.4 observa-se que o percentual de pacientes tratados com BZ revelou maior reatividade, expresso pelo aumento da densidade óptica (DO), sendo significativamente superior ao de portadores não tratados ($X^2 = 7,22$; $p = 0,007$), indicando influência do tratamento no aumento do índice de reatividade.

Tabela 5.4: Evolução dos índices de reatividade de Ig G anti-*T. cruzi* pelos testes de ELISA recombinante em soros de portadores de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011, frente ao tratamento ou não com BZ.

Evolução do índice de reatividade*	Pacientes Tratados		Pacientes Não Tratados		Estatística	
	N	%	N	%	X ²	p
Inalterada	6	21,4	10	45,5	3,27	0,07
Com aumento	17	60,7	5	22,7	7,22	0,007
Com redução	5	17,9	7	31,8	1,32	0,25
TOTAL	28	100,0	22	100,0	-	

*Critérios página 45

As médias das densidades ópticas nos dois momentos (1999-2010/2011), embora resultantes de testes com *cut-off* distintos, apresentaram propriedades de equivalências de frações que permitiram estimativas, demonstrando assim, aumentos significativos das médias nos testes finais (Tabela 5.5), tanto no total de pacientes como no grupo tratado com BZ, indicando dessa forma, dependência do aumento dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* identificados por esse teste com o tratamento efetuado.

Tabela 5.5: Evolução das médias das densidades ópticas de Ig G anti-*T. cruzi* identificadas por testes de ELISA recombinante em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Pacientes	Em 1999*	Em 2010/11**	Estatística	
	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão	F	p
Tratados (N= 28)	393 ± 255	1428 ± 981	5,40	0,02
Não tratados (N=22)	257 ± 256	513 ± 886	1,30	0,26
TOTAL (N = 50)	333 ± 261	1025 ± 1037	20,9	0 ,000014

*Kit EIE.Chagas Biomanguinhos com Ag CRA+FRA

** Kit Chagas Wiener V 3.0 com Ag recombinantes não identificados

F= Ferramenta estatística para análise de variância

5.2.2.3. Hemaglutinação Indireta (HAI)

No total de soros testados, os títulos identificados variaram de 1:40 até 1:2.560, com mediana de 1:80 em 1999 e mediana de 1:40 em 2010/2011. As médias dos inversos dos títulos foram de 134 ± 210 em 1999 e de 384 ± 699 em 2010/11 ($F = 5,86$; $p = 0,017$) (Tabela 5.8). As frequências dos títulos estão expressas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6: Distribuição das frequências dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de HAI em soros da população urbana de doze municípios do distrito sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Títulos de Ig G anti- <i>T. cruzi</i>	Pacientes tratados com BZ				Pacientes Não tratados com BZ				Total			
	Pré-tratamento 1999		Pós-tratamento 2010/11		Pré-tratamento 1999		Pós-tratamento 2010/11		Pré-tratamento 1999		Pós-tratamento 2010/11	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
< 1: 40	4	14,3	9	32,1	8	36,4	16	72,8	12	24,0	25	50,0
1: 40	4	14,3	4	14,3	8	36,4	3	13,7	12	24,0	7	14,0
1: 80	7	25,0	1	3,6	1	4,5	1	4,5	8	16,0	2	4,0
1:160	8	28,5	2	7,1	1	4,5	-	-	9	18,0	2	4,0
1:320	4	14,3	1	3,6	3	13,7	-	-	7	14,0	1	2,0
1:640	1	3,6	4	14,3	-	-	-	-	1	2,0	4	8,0
1:1.280	-	-	5	17,9	1	4,5	1	4,5	1	2,0	6	12,0
1:2.560	-	-	2	7,1	-	-	1	4,5	-	-	3	6,0
TOTAL	28	100,0	28	100,0	22	100,0	22	100,0	50	100,0	50	100,0

A frequência de pacientes com aumento dos títulos foi significativamente maior no grupo de tratados (35,7%) em comparação ao grupo de não tratados (9,1%) ($X^2 = 4,79$; $p = 0,02$), conforme demonstrado na Tabela 5.7, indicando dependência do aumento de níveis sorológicos com a administração de BZ.

Tabela 5.7: Evolução dos inversos dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* pelo teste de HAI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Evolução dos inversos dos títulos de Ig G *	Pacientes Tratados		Pacientes Não tratados		Estatística	
	N	%	N	%	X^2	p
Inalterada	16	57,2	17	77,3	2,22	0,13
Com aumento	10	35,7	2	9,1	4,79	0,02
Com redução	2	7,1	3	13,6	0,08	0,77
TOTAL	28	100,0	22	100,0		#

*Critérios página 46;
Yates corrigido

A análise comparativa das médias dos inversos dos títulos Ig G anti-*T. cruzi*, demonstrou aumento significativo das médias no total de pacientes ($p < 0,05$). Entretanto, as diferenças dentro dos grupos (pacientes tratados e não tratados) não foram estatisticamente significativas, indicando assim, independência da variação dos títulos com o tratamento (Tabela 5.8).

Tabela 5.8: Evolução das médias dos inversos dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* determinados pelo teste de HAI em soros da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Pacientes	Em 1999	Em 2010/11	Estatística*	
	Média \pm desvio padrão	Média \pm desvio padrão	F	p
Tratados (N= 28)	140 \pm 140	534 \pm 748	2,74	0,109
Não tratados (N=22)	127 \pm 279	192 \pm 594	0,71	0,404
TOTAL (N = 50)	134 \pm 210	384 \pm 699	5,86	0,017

*Análise de comparação das médias;
F= Ferramenta estatística para análise de variância.

5.3. Avaliação clínica

5.3.1. Eletrocardiograma

Quanto à distribuição de gravidade da cardiopatia (Tabela 5.9), observa-se que houve diminuição do N de pacientes com grau IV (cardiopatia gravíssima) no grupo tratado com BZ, quando dados de 1999 e 2010/2011 foram comparados. Esses resultados indicam, provavelmente, uma ação benéfica do BZ nesses pacientes.

Tabela 5.9: Distribuição dos graus de cardiopatia na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

GRAU DA CARDIOPATIA*	Pacientes Tratados		Pacientes Não Tratados		Total	
	1999 N (%)	2010/2011 N (%)	1999 N (%)	2010/2011 N (%)	1999 N (%)	2010/11 N (%)
I	13 (46,5)	12 (42,8)	17 (77,3)	10 (45,5)	30 (60,0)	22 (44,0)
II	10 (35,7)	8 (28,6)	3 (13,6)	10 (45,5)	13 (26,0)	18 (36,0)
III	3 (10,7)	8 (28,6)	2 (9,1)	2 (9,1)	5 (10,0)	10 (20,0)
IV	2 (7,1)	-	-	-	2 (4,0)	-
TOTAL	28 (100,0)	28 (100,0)	22 (100,0)	22 (100,0)	50 (100,0)	50 (100,0)

*Critérios OMS/OPAS (1974)

Considerando não cardiopatas os pacientes que apresentaram grau I e cardiopatas os pacientes que apresentaram graus II, III e IV, o percentual de pacientes com cardiopatia no grupo não tratado com BZ aumentou de modo significativo ($X^2 = 4,70$; $p = 0,03$) (22,7% para 54,6%), em comparação ao aumento visto no grupo de tratados (53,5% para 57,3%), indicando que a administração de BZ inibe a evolução/progressão de cardiopatia nos portadores de DC (Figura 5.8). Quanto ao grupo não tratado, houve diminuição dos percentuais de pacientes não sintomáticos (77% em 1999 para 45% em 2010/2011), assim como aumento do número de pacientes com grau II (13% para 45%), demonstrando que nesse grupo, houve aumento no número de pacientes com cardiopatia chagásica em 2010/2011 (Tabela 5.9).

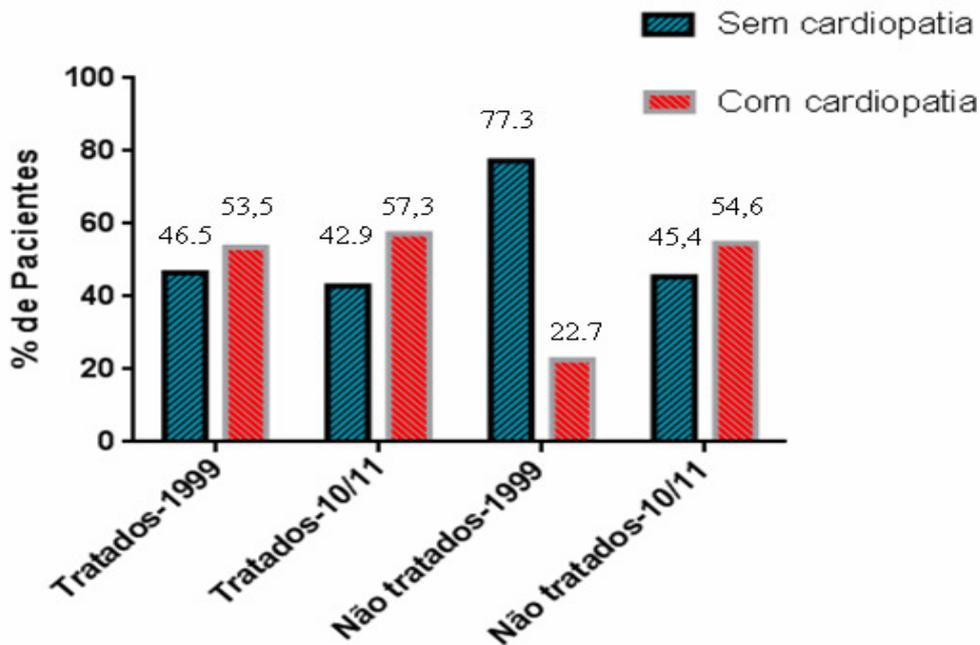


Figura 5.8: Frequências de cardiopatia na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Quanto ao tipo de evolução da cardiopatia, a Tabela 5.10 mostra que a evolução progressiva da cardiopatia foi menor entre os portadores da doença de Chagas crônica tratados com BZ, apesar da não significância estatística, em comparação aos não tratados. O dado de regressão exclusiva no grupo de tratados indica o impacto desse fármaco na redução do processo progressivo da cardiopatia entre portadores da doença de Chagas crônica, principalmente com cardiopatia grave e gravíssima, destacando-se que quatro pacientes apresentaram extrassístoles ventriculares freqüentes (EV), polimórficas (EVP) e bigeminadas (EVB) em 1999, as quais não foram identificadas em 2010/2011. Por outro lado, os distúrbios de condução diagnosticados no exame em 1999 mantiveram-se em 2010/2011.

Tabela 5.10: Evolução da cardiopatia na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Evolução da cardiopatia*	Pacientes Tratados		Pacientes Não Tratados		Estatística	
	N	%	N	%	X ²	p
Inalterada	20	71,4	14	63,6	0,34	0,55
Progressiva	4	14,3	8	36,4	3,29	0,06
Regressiva	4	14,3	-	-		
TOTAL	28	100,0	22	100,0		

*Critérios de Borges-Pereira & Coura (1985)

✓ Óbitos

Entre os 110 pacientes do estudo inicial, foram registrados 22 (20%) óbitos no período 1999-2011, sendo 10 (15,9%) entre os 63 tratados com BZ e 12 (25,5%) entre os 47 não tratados ($X^2 = 1,57$; $p = 0,21$), identificados na Tabela 5.12. Não houve óbitos entre os pacientes com ECG normal em 1999, indicando o bom prognóstico para esse padrão eletrocardiográfico. Por outro lado, os pacientes que evoluíram para óbitos eram portadores de alterações eletrocardiográficas ou de cardiopatia nos diversos graus. Nesse contexto, destaca-se a ausência de óbitos entre os pacientes no grau IV tratados com BZ e a ocorrência de óbitos em 100% dos não tratados, portadores do mesmo grau de cardiopatia (Tabela 5.11).

Tabela 5.11: Percentuais de óbitos registrados na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Grau da cardiopatia*	Pacientes Tratados com BZ			Pacientes Não Tratados com BZ			Total		
	N	Óbitos	%	N	Óbitos	%	N	Óbitos	%
I	31	-	-	25	-	-	56	-	-
II	19	5	26,3	11	3	27,3	30	8	26,7
III	11	5	45,5	6	4	66,7	17	9	52,9
IV	2	-	-	5	5	100,0	7	5	71,4
TOTAL	63	10	15,9	47	12	25,5	110	22	20,0

*Critérios OMS/OPAS (1974)

Tabela 5.12: Aspectos demográficos e eletrocardiográficos de evolução para óbito na população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul), no intervalo de 1999-2010/2011.

Paciente	Naturalidade	Idade 1999 (anos)	Sexo	Eletrocardiograma	Uso de Benznidazol
1388	PG*	75	M	BRE I	Não
438	MG	63	F	EV	Não
513	MS	80	M	EVP	Não
72	MS	72	F	BRD III, HBAE	Não
957	MG	67	F	BRD III, HBAE	Não
1085	MG	50	M	BRD III, HBAE, EV	Não
1483	MS	65	M	FA	Não
1015	BA	45	M	BAV III - MP	Não
1277	MS	58	M	BRE III, SAE, EVB	Não
1356	SP	64	M	BAV I, BRD III, HBAE, EV	Não
1415	MG	48	M	BRE III	Não
1491	MG	62	M	BRD III, HBAE, EVB	Não
978	SP	75	M	BAV I	Sim
644	SP	44	F	QT Longo	Sim
852	SP	58	F	QT Longo	Sim
961	MG	63	F	APRV	Sim
1451	MG	53	F	APRV	Sim
443	MS	53	M	BRD III, HBAE, ZEI	Sim
993	MS	78	M	FA	Sim
998	MG	78	M	BAV II	Sim
1036	PR	65	F	ADRV, EV	Sim
1249	PR	32	M	EVB, APRV	Sim

*Paraguai; FA: fibrilação atrial

6. Discussão

Estudos clínico-epidemiológicos para avaliação da morbidade e evolução da doença de Chagas, conduzidos em diferentes regiões do Brasil, têm demonstrado a existência de grande diversidade regional na severidade da doença, tornando-se assim complexas as comparações entre diferentes áreas geográficas (Macêdo *et al.*, 1982; Coura *et al.*, 1999; Coura & Borges-Pereira, 2010). Entre os fatores que podem influenciar tal variabilidade destacam-se diferenças na casuística relacionadas ao componente imunogenético do hospedeiro, fatores ambientais e a diversidade genética do parasito em regiões geográficas distintas (Miles *et al.*, 2003; Macêdo *et al.*, 2004; revisto por Campbell *et al.*, 2004), além dos métodos utilizados na avaliação e tempo de seguimento. Estudos em modelos experimentais têm revelado que características genéticas das cepas do *Trypanosoma cruzi* possuem um importante papel na patogênese da doença (morbidade) e podem influenciar na resposta ao tratamento tripanocida (Andrade *et al.*, 1975; Andrade & Magalhães, 1996; Toledo *et al.*, 2003; 2004).

A primeira parte desse trabalho, iniciada em 1999, teve como propósito avaliar 110 pacientes portadores da doença de Chagas crônica com ou sem alterações cardíacas, residentes no Estado do Mato Grosso do Sul, através de exames laboratoriais (sorológicos: IFI, HAI e ELISA recombinante; parasitológico: xenodiagnóstico; molecular: PCR) e clínicos (ECG, anamnese e exame físico). Dos 110 pacientes, 63 receberam tratamento com benzonidazol (BZ) no ano de 1999. A segunda fase do estudo, objeto da presente dissertação, foi realizada a partir de 50 pacientes reexaminados em 2010/2011, considerando 22 óbitos e 38 que migraram para outros estados e teve como objetivo avaliar a evolução da infecção pelo *T. cruzi* nesses pacientes, após onze anos de acompanhamento. Para tal, empregaram-se os mesmos testes laboratoriais e clínicos utilizados em 1999, com exceção do teste de xenodiagnóstico, que foi excluído da análise final, por ser um método laborioso, pelo tempo gasto para obtenção dos resultados, além da sua sensibilidade limitada para os casos crônicos da doença de Chagas. Incluímos nesta última análise a metodologia de PCR quantitativa (qPCR) para estimativa da carga parasitária durante o monitoramento dos pacientes. Ressalta-se que dos 50 pacientes da atual casuística, 28 foram tratados em 1999 e 22 corresponderam ao grupo não tratado.

Na época do tratamento, dos 28 pacientes que receberam BZ, 13 não apresentavam cardiopatia (46,5%), 9 tinham cardiopatia moderada e um paciente exibia com cardiopatia leve, totalizando 10 pacientes classificados com grau II (35,7%), 3 com cardiopatia grave (10,7%) e 2 com a forma mais grave de cardiopatia, apresentando insuficiência cardíaca (7,1%).

Tem-se o conhecimento que as drogas usadas na atualidade para o tratamento da doença de Chagas são insatisfatórias e foram desenvolvidas há mais de três décadas (Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006). A maior limitação destes compostos é a sua baixa atividade antiparasitária na fase crônica da doença, onde 80 a 100% dos pacientes tratados não são curados, conforme os critérios parasitológicos e sorológicos estabelecidos por diversos autores (Cançado, 2002; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Viotti *et al.*, 1994; Braga *et al.*, 2000). Vários estudos têm sugerido que o tratamento etiológico na fase crônica, embora seja falho em esterilizar o parasito, pode evitar as alterações clínicas e eletrocardiográficas associadas com a progressão da doença (Viotti *et al.*, 1994, 2006; Fabbro de Suasnábar *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2005; Bustamante *et al.*, 2007). Entretanto, outros estudos são conflitantes com estes achados, sugerindo que o tratamento específico é falho em prevenir a progressão da doença ou suas complicações (Lauria-Pires *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2008).

Os testes sorológicos aplicados neste estudo estão em conformidade com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) e do Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2005), que preconizam a utilização de dois testes sorológicos de princípios diferentes para a definição do diagnóstico e/ou controle de cura da doença de Chagas. No presente trabalho, foram utilizados dois testes convencionais (IFI e HAI) e um terceiro teste sorológico (ELISA recombinante), sendo esse normalmente considerado de maior especificidade comparado aos testes que empregam preparações de antígenos totais de *T. cruzi* (Luquetti *et al.*, 2003). A literatura aponta o questionamento sobre a especificidade de técnicas sorológicas quanto à antigenicidade cruzada entre *T. cruzi* e parasitas relacionados a outras doenças causadas por protozoários (Umezawa *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato destas técnicas utilizarem extratos brutos do parasita ou parcialmente purificados, os quais podem ocasionar resultados falso-positivos. A fim de evitá-los, antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos têm sido utilizados com sucesso (Houghton *et al.*, 1999; Umezawa & Silveira, 1999).

Segundo Souza & Amato Neto (2012), analisando 4.000 amostras de soro para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, os autores relatam a ocorrência de resultados discrepantes entre os três testes empregados simultaneamente na análise (IFI, HAI e ELISA), mesmo considerando o uso de kits comerciais de um mesmo fabricante e os mesmos operadores para as análises. Foram observadas variações na sensibilidade dos testes nos indivíduos na fase crônica com infecção parasitologicamente comprovada. O mesmo foi relatado por Teixeira & Pereira (1981), onde os autores afirmam que uma importante condição para uma reação sorológica positiva seria a presença de quantidades suficientes de imunoglobulinas no soro, para que possa ser revelado pelos testes sorológicos na fase crônica da doença. Com isso, frequentemente são encontradas discrepâncias entre técnicas, como demonstrado por Shikanai-Yasuda *et al.* (2008), que na tentativa de encontro do melhor método de triagem para detecção de infecção por *T. cruzi* em bancos de sangue, utilizaram diferentes metodologias, destacando entre elas os testes sorológicos convencionais (IFI, HAI, ELISA com antígenos epimastigota e tripomastigota), além de testes sorológicos de referência (TESA blot e ELISA quimioluminescente) aplicados em indivíduos com sorologia inconclusiva, indivíduos não portadores da doença de Chagas e portadores da doença de Chagas crônica. Assim, foi visto que TESA blot apresentou a melhor performance quando utilizado como único teste em todos os grupos, demonstrando ser um bom teste confirmatório no grupo inconclusivo. Esses achados destacam a necessidade da busca de métodos diagnósticos alternativos quando os testes sorológicos forem inconclusivos. Nesse contexto, testes moleculares ainda são extremamente necessários para auxiliar o diagnóstico sorológico, nos casos de discordância de resultados entre testes e atuando como ferramenta complementar a sorologia para a determinação da resposta terapêutica (Luquetti *et al.*, 2003; Gomes *et al.* 2001; revisto por Britto 2009).

No presente trabalho, a análise comparativa da evolução dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi*, no intervalo de 1999-2010/2011, mostrou redução significativa das médias de títulos identificada apenas pelo teste de IFI ($p=0,013$; Tabela 5.3), porém um aumento significativo das médias das DO identificado pelo ELISA recombinante ($p=0,02$; Tabela 5.5) nos portadores tratados com BZ. Em relação ao teste de HAI, ressalta-se que apesar de ter sido observado um aumento nas médias dos títulos para o grupo tratado, esta diferença não foi significativa ($p>0,05$; Tabela 5.8).

Na literatura encontramos estudos longitudinais de mais de 10 anos de evolução, envolvendo o tratamento etiológico de adultos portadores de infecção crônica pelo *T. cruzi*, cujos resultados mostram queda significativa dos níveis de imunoglobulinas identificados pelos testes de IFI e ELISA, diferindo do presente trabalho quanto aos resultados observados pelas técnicas de HAI e ELISA. Nestes estudos, índices de soroconversão variando de 0 – 19,1% têm sido encontrados no Brasil e na Argentina (Lauria-Pires *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2000; Cançado, 2002; Viotti *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009). Como tentativa para explicar estas disparidades, ressalta-se que a IFI detecta uma imunoglobulina específica que reage com um antígeno de membrana do parasito, enquanto a HAI detecta um anticorpo que reage com um antígeno subcelular. Cada uma destas reações sorológicas opera em diferentes sistemas de especificidade. Assim, o anticorpo indicado pelo teste de IFI pode não ser o mesmo daquele demonstrado pela HAI (Souza & Amato Neto, 2012).

Estudos experimentais de Andrade *et al.*, (1991) ao tratar camundongos na fase crônica, têm mostrado resultados sorológicos semelhantes ao nosso trabalho em humanos, com a justificativa dos autores de que a presença e o aumento de Ig G contra os antígenos solúveis de *T. cruzi* observados nos testes de HAI e ELISA podem estar relacionados com a resposta do organismo aos estímulos contínuos promovidos por antígenos protéicos identificados no interior de células esplênicas dos camundongos após o tratamento, enquanto a redução dos níveis evidenciada pelo teste de IFI pode estar associada à queda de parasitemia, ou seja, das formas circulantes ou de seus antígenos de superfície.

Em estudo longitudinal de 10 anos com pacientes portadores da doença de Chagas crônica, sem tratamento, habitantes em Virgem da Lapa (Minas Gerais), Zauza & Borges-Pereira (2001) verificaram aumento significativo dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* pelos testes de IFI, HAI e ELISA, principalmente no grupo de pacientes com evolução progressiva da cardiopatia, achados que contribuem para aumentar a necessidade de indicação do tratamento da infecção crônica.

Como mencionado, entre os três testes sorológicos utilizados nesse trabalho, IFI foi o único que revelou queda significativa das médias dos níveis de Ig G anti-*T. cruzi* no grupo de pacientes tratados com BZ, enquanto a HAI e ELISA recombinante revelaram aumento, sendo este significativo apenas para o ELISA recombinante. Os resultados obtidos pela técnica de IFI podem ser comparados à queda de

positividade demonstrada pela PCR no grupo de tratados (Figura 5.4), onde em 1999, 67,9% dos tratados foram positivos contra 17,9% de positividade em 2010/11, apesar destes dados não mostrarem diferenças estatísticas entre os dois grupos, tratados e não tratados. A PCR qualitativa revelou uma redução significativa da parasitemia ($p=0$), a níveis não detectados pelo método, apenas na análise global dos 50 pacientes. Entretanto, as análises quantitativas por qPCR dos 8 pacientes (sendo 5 tratados) que foram positivos na PCR em 2010/11, revelaram aumentos aproximados de 1,6X e 3,6X na carga parasitária de dois indivíduos que receberam tratamento ($p>0,05$; Figura 5.5), e os outros três permaneceram com baixa parasitemia ou mostraram redução da carga parasitária. Neste trabalho, o tratamento com BZ, de acordo com o esperado, produziu a queda significativa da parasitemia e a redução do estímulo imunológico por antígenos de membrana das formas tripomastigotas do *T. cruzi*, o que pode justificar os resultados observados com o teste de IFI.

De acordo com estudos recentes, a presença do parasito e o processo inflamatório levam à evolução patológica da doença de Chagas crônica (Marin-Neto *et al.*, 2007; Urbina, 2009). A PCR é uma ferramenta bem estabelecida, com elevada sensibilidade e especificidade para avaliar a susceptibilidade de parasitos frente a tratamentos específicos. Trabalhos usando camundongos tratados com BZ durante infecção crônica pelo *T. cruzi* têm demonstrado que este fármaco não induz a completa eliminação do parasito, mas provoca uma redução na carga parasitária (Garcia *et al.*, 2005). Similarmente, estudos que investigam o efeito do tratamento com BZ em casos de infecção crônica humana pelo *T. cruzi* revelaram uma redução na parasitemia através de hemocultura e PCR (Castro *et al.*, 2006; Galvão *et al.*, 2003). Usando PCR em sangue como um controle de cura, níveis de eficácia ao tratamento de 37,5% - 60,4% têm sido revelados em pacientes e modelos experimentais tratados com BZ durante a fase crônica da doença de Chagas (Guedes *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003). Em um estudo recente em modelo cão para avaliar eficácia do BZ, observaram-se resultados de PCR negativos em 80% dos animais tratados, 30 dias após o tratamento durante a fase crônica da infecção; no entanto, um aumento na parasitemia foi detectada 12 meses após o tratamento, onde apenas 40% dos cães tratados exibiram resultados de PCR negativo em sangue (Santos *et al.*, 2012). Vale a pena ressaltar que a técnica de PCR quando usada isoladamente, os resultados negativos gerados não caracterizam cura parasitológica, podendo retratar momentos de parasitemia intermitente (Britto, 2009).

Neste estudo, a notável queda de parasitemia observada pela técnica de PCR qualitativa nos 50 pacientes avaliados, reduzindo de 64 para 16% na análise final (Figura 5.4), também foi revelada por Prata *et al.* (1999), através do emprego da técnica de repetição de xenodiagnóstico em um estudo longitudinal de 13 anos para avaliação do comportamento da parasitemia em 202 pacientes crônicos infectados por *T. cruzi*, não submetidos ao tratamento etiológico e residentes em área endêmica. De acordo com o trabalho relatado, no geral, a parasitemia observada nos pacientes em 1988/1991 declinou significativamente em comparação ao período de 1976/1978. Outros estudos têm reportado diferenças importantes usando métodos parasitológicos (hemocultivo e xenodiagnóstico) ou PCR em sangue ou tecido, realizados após administração de BZ em humanos ou modelos experimentais com infecção crônica (Guedes *et al.*, 2002; Fragata Filho *et al.*, 1995; Braga *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2008).

A fim de avaliar a evolução da carga parasitária no total de pacientes, tratados e não tratados, no período 1999-2010/11, aplicamos a metodologia de qPCR. Encontramos valores estimados variando de $0,08 \pm 0,09$ a $47,57 \pm 13,06$ equivalentes de parasito/mL de sangue (em 1999), sendo que 13 pacientes não foram detectados neste primeiro momento, e de $0,06 \pm 0,07$ a $76,48 \pm 17,07$ equivalentes de parasito/mL (em 2010/2011), com 36 pacientes apresentando parasitemia não detectável pelo método quantitativo na última análise (dados não apresentados). Os resultados da PCR qualitativa revelaram uma maior proporção de resultados negativos, sendo 18/50 (em 1999) e 42/50 (em 2010/11). Essas diferenças podem ser consideradas pelos diferentes alvos moleculares utilizados (kDNA para a PCR, e seqüências nucleares satélites para a qPCR) e pelos princípios intrínsecos de cada metodologia. Ressalta-se, entretanto, que ambas as regiões alvo apresentam número de cópias similares no genoma de *T. cruzi*. Curiosamente, o paciente #1131 que recebeu tratamento com BZ foi o que apresentou a maior carga parasitária nos dois momentos da análise ($47,57 \pm 13,06$ e $76,48 \pm 17,07$ equivalentes de parasito/mL em 1999 e 2010/11, respectivamente), apesar do aumento da parasitemia no último momento não ter sido significativo ($p > 0,05$). Os resultados da medida de carga parasitária, neste estudo, corroboram a baixa parasitemia observada em pacientes crônicos cardiopatas, do Brasil, envolvidos no estudo BENEFIT e avaliados antes da administração do BZ, comparados aos pacientes da Argentina e Colômbia (Moreira *et al.*, 2013).

Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005), via de regra não ocorre cura espontânea em casos crônicos da doença de Chagas, embora casos esporádicos bem documentados tenham sido registrados na Costa Rica, no Uruguai e no Brasil (Ministério da Saúde, 2005). Quanto aos critérios de cura pós tratamento estabelecidos para avaliação de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, diferentes autores consideram aspectos distintos. De acordo com Cançado (2002) e o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005), a negatização da sorologia convencional tem sido considerada como único método tradutor de cura associado à métodos parasitológicos persistentemente negativos. Todavia, enfatiza-se que, para os objetivos propostos, o xenodiagnóstico foi substituído na segunda parte do estudo (2010/2011) por ensaios moleculares baseados em PCR, tomando como base a revisão de Britto (2009), visto que o diagnóstico molecular costuma fornecer sensibilidades mais elevadas do que o xenodiagnóstico, na fase crônica da doença de Chagas, variando entre 60% a 90%, além de apresentar potencial de confirmação diagnóstica nos casos de testes sorológicos inconclusivos (discordantes) (Ministério da Saúde, 2005). Conforme Médecins Sans Frontières (2008) e WHO (2012), diante desse cenário, uma técnica diagnóstica de elevada sensibilidade para demonstração de cura parasitológica, torna-se urgentemente necessária para a avaliação de novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas. Neste contexto, a introdução da metodologia de qPCR é de grande valor, pois, mesmo na ausência de cura parasitológica, os ensaios quantitativos poderiam responder se o tratamento foi capaz de reduzir carga parasitária nestes indivíduos, e se esta redução poderia favorecer a história natural da doença de Chagas crônica cardíaca. No nosso estudo, as análises quantitativas dos indivíduos que foram positivos na PCR convencional em 2010/11, revelaram em dois pacientes tratados (#1131 e #1457) um ligeiro aumento de carga parasitária, enquanto um paciente não tratado (#1424) revelou um aumento significativo de parasitemia (Figura 5.5).

O envolvimento cardíaco na doença de Chagas é um dos principais mecanismos responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade. Devido às limitadas opções terapêuticas para esta doença, os benefícios potenciais do tratamento com BZ durante a fase crônica, visando a preservação da função cardíaca, deveriam ser cuidadosamente investigados (Santos *et al.*, 2012). Neste sentido, está sendo conduzido o estudo BENEFIT, que corresponde ao mais amplo

ensaio clínico na doença de Chagas e que certamente irá esclarecer a ação da terapia tripanocida na prevenção da progressão da doença cardíaca e morte. Os resultados do estudo deverão ser disponibilizados para a comunidade científica e clínicos em 2014 (Marin-Neto *et al.*, 2009).

A apresentação clínica da doença de Chagas varia enormemente de acordo com o grau de dano ao miocárdio, e os sinais da evolução cardiomiopática podem ser monitorados por eletrocardiograma e ecocardiografia (Viotti *et al.*, 2004; Biolo *et al.*, 2010). Estudos longitudinais com casuísticas de portadores da doença de Chagas crônica não tratados com BZ, têm caracterizado a progressão da cardiopatia chagásica crônica, principalmente pela maior incidência de alterações primárias da repolarização ventricular (APRV), do bloqueio do ramo direito (BRD III) isolado ou associado ao hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE), extrassístoles ventriculares (EV) e zona eletricamente inativa (ZEI) (Dias 1982; Dias & Kloetzel, 1967; Macêdo 1976; Coura *et al.*, 1985; Borges-Pereira 1997). No presente estudo, apesar da pequena casuística, o dado de regressão exclusiva no grupo de tratados indicou o impacto do BZ na redução do processo progressivo da cardiopatia, principalmente na cardiopatia grave e gravíssima, destacando-se que quatro pacientes apresentaram extrassístoles ventriculares freqüentes, polimórficas e bigeminadas em 1999, as quais não foram identificadas em 2010/2011. Este achado pode ser um indicador de benefício clínico-eletrocardiográfico do uso do fármaco, com reflexo imediato sobre a freqüência de óbitos, visto que essas alterações são consideradas de mau prognóstico para os portadores da doença de Chagas crônica (Laranja *et al.*, 1956). Nesse contexto, destaca-se a ausência de óbitos entre os pacientes no grau IV tratados com BZ e a ocorrência de óbitos em 100% dos não tratados, portadores do mesmo grau de cardiopatia (Tabela 5.11).

Os resultados observados nesse estudo quanto ao tipo de evolução da cardiopatia, indicam menor progressão para os pacientes tratados com BZ, apesar da ausência de significância estatística, em comparação aos não tratados, sugerindo que o tratamento possa retardar a evolução clínica da doença. A regressão da cardiopatia só foi observada no grupo de tratados, correspondendo a 14,3% destes pacientes (Tabelas 5.10 e 5.9). No grupo de pacientes não tratados com BZ, houve um aumento significativo do percentual de pacientes com cardiopatia (graus II, III e IV), de 22,7% em 1999 para 54,6% em 2010/11 ($p = 0,03$), em comparação ao grupo de tratados (53,5% para 57,3%) (Figura 5.8), indicando assim, relação direta entre a prevalência de pacientes portadores da cardiopatia chagásica crônica e uso de

tratamento etiológico. No geral, estes dados reforçam as evidências de que o tratamento com BZ contribui para retardar a evolução clínica da doença de Chagas (Viotti *et al.*, 2006), ainda que os indicadores sorológicos e moleculares aplicados no presente trabalho não tenham conduzido ao diagnóstico de cura.

Neste estudo também foi visto um menor percentual de óbitos no grupo de tratados com BZ em comparação ao grupo de não tratados, 15,9% e 25,5%, respectivamente, apesar desta diferença não ter sido significativa ($p > 0,05$, Tabela 5.12). Destaca-se que não houve óbitos entre os pacientes com eletrocardiograma normal em 1999, dados semelhantes aos encontrados em distintos estudos longitudinais, com monitoramentos de 6 a 10 anos, tais como o de Macêdo (1976) em São Felipe - BA, Borges-Pereira & Coura (1985) em Virgem da Lapa - MG e Coura *et al.* (1997) em Pains e Iguatama - MG, com o propósito de avaliar a eficácia terapêutica e a tolerância ao nifurtimox e ao benzonidazol. Por outro lado, no presente trabalho, no intervalo de 1999 a 2010/2011, os pacientes que evoluíram para óbitos eram portadores de alterações eletrocardiográficas ou de cardiopatia nos diversos graus, revelando assim, um prognóstico ruim para esses pacientes.

Foram poucas as análises conduzidas no presente estudo que revelaram diferenças significativas favoráveis ao tratamento com BZ, representando um fator indicativo relevante para investigação contínua destes pacientes, considerando a prevalência de 24,6% de cardiopatia, relacionada exclusivamente ao componente chagásico, encontrada no Distrito Sanitário de Rio Verde/MS (Borges *et al.*, 2001). Sendo assim, apesar do acompanhamento de 11 anos indicar um bom prognóstico para um grupo de pacientes, enfatiza-se que, no período inicial (1999), 100% dos indivíduos foram reativos para o teste de IFI, sendo 50% desses, natural do Estado do Mato Grosso do Sul. Embora no Brasil a transmissão vetorial tenha sido controlada, surtos têm sido documentados com frequência, como os de transmissão oral, podendo estar relacionados à presença de vetores e/ou reservatórios infectados (Lainson *et al.*, 1980; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1999; Valente, 2005; Dias, 2006; Steindel *et al.*, 2007; Nobrega *et al.*, 2009). Em função disso, embora a população em estudo seja classificada como urbana, ressalta-se que parte representativa dos indivíduos seja procedente de áreas rurais. Por isso, confrontando os quadros clínicos com a epidemiologia atual da doença na área urbana do Mato Grosso do Sul (MS), a probabilidade desses indivíduos terem

adquirido a infecção em outro estado é ampla, considerando a transmissão vetorial interrompida na área de estudo.

Tem-se conhecimento de que alguns fatores possam contribuir para a permanência da sorologia positiva em pacientes que obtiveram cura parasitológica, tais como: mecanismos auto-ímmunes, antígenos do parasito em células dendríticas e cardíacas, anticorpos anti-idiotípicos, imunoglobulinas anti-laminina, os quais podem induzir a positividade de testes sorológicos convencionais (Gazzinelli *et al.*, 1987; 1988; Krettli 2009). Assim, um dos maiores desafios na investigação da doença de Chagas ainda é o de avaliar o impacto da quimioterapia nos parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes. Apesar de hoje em dia muitos avanços já terem sido conquistados, como o controle vetorial e transfusional, existem ainda controvérsias principalmente sobre os reais benefícios que o tratamento etiológico traz para o paciente infectado pelo *T. cruzi* (Bahia *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012).

7. Conclusões

Após realização de estudo longitudinal de onze anos de acompanhamento em uma *coorte* da população urbana de doze municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde (Mato Grosso do Sul) para avaliar a evolução da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e de suas manifestações clínicas em pacientes portadores da doença de Chagas crônica (tratados e não tratados com benzonidazol), observou-se:

- Queda da parasitemia nos pacientes avaliados a partir do emprego da técnica molecular de PCR qualitativa, de modo que a diferença detectada foi estatisticamente significativa ($p=0$) para todos os pacientes, tratados e não tratados, no período de 1999 a 2010-2011.
- Detecção de carga parasitária com o emprego da técnica molecular de PCR quantitativa em 2010/2011 para todos os pacientes que apresentaram positividade para a técnica de PCR qualitativa no mesmo ano, ressaltando que dois pacientes cujas cargas parasitárias não foram determinadas (ND) em 1999, apresentaram cargas parasitárias estimáveis onze anos após.
- Redução significativa dos títulos de Ig G anti-*T. cruzi* no total de pacientes avaliados, assim como no grupo de tratados com BZ a partir do emprego do teste de IFI, indicativo da relação entre queda dos níveis de imunoglobulinas e o tratamento efetuado. Contudo, embora a frequência de pacientes com redução dos títulos pela IFI tenha sido maior no grupo de tratados (53,6%) em comparação ao grupo de não tratados (36,4%), tal diferença não atingiu nível de significância estatística entre os dois grupos.
- A análise do teste de ELISA recombinante (1999-2010/2011), demonstrou aumentos significativos dos níveis de Ig G anti- *T. cruzi* nos testes realizados após 11 anos de acompanhamento no grupo tratado com BZ, podendo ser indicativo da relação entre o aumento dessa imunoglobulina com o tratamento efetuado. Ressalta-se que o percentual de pacientes tratados com aumento

do índice de reatividade, foi significativamente superior ao de pacientes não tratados.

- A análise comparativa de títulos Ig G anti-*T. cruzi* obtidas pelo teste de HAI, demonstrou aumento significativo das médias no grupo de pacientes tratados com BZ, sendo esses dados comparados aos de ELISA recombinante. A freqüência de pacientes com aumento dos títulos foi significativamente maior no grupo de tratados (35,7%) em comparação ao grupo de não tratados (9,1%), indicando relação entre o aumento de títulos e o uso do BZ.
- Ausência de óbitos em pacientes com ECG normal em 1999, indicou bom prognóstico para esse padrão eletrocardiográfico.
- Aumento significativo do percentual de pacientes com cardiopatia (grau II, III e IV) no grupo não tratado em comparação ao grupo de tratados, no período 1999 a 2010/11, indicou dependência da redução da prevalência de pacientes com cardiopatia chagásica crônica e o tratamento efetuado com BZ.
- Foi menor a evolução progressiva de cardiopatia entre os portadores da doença de Chagas crônica tratados com BZ (14,3%), em comparação aos pacientes não tratados (36,4%) ($p > 0,05$).
- A evolução regressiva de cardiopatia entre pacientes tratados com BZ, portadores de alterações eletrocardiográficas consideradas graves e a ausência de óbitos entre pacientes clinicamente graves tratados, pode ser indicadora, no presente trabalho, de que o tratamento etiológico de pacientes com cardiopatia chagásica grave deve ser reavaliado na perspectiva de que é possível ampliar o tempo e a qualidade de vida dessas pessoas.
- Os resultados comparativos das análises eletrocardiográficas entre os grupos tratados e não tratados, no período 1999 a 2010/11, sugerem que o tratamento etiológico possa contribuir em retardar a progressão da doença de

Chagas crônica cardíaca, ainda que os indicadores sorológicos e moleculares aplicados no presente trabalho não tenham conduzido ao diagnóstico de cura.

8. Referências

Abad Franch F, Celeste Vega M, Rolón MS, Santos WS, Rojas de Arias A. Community participation in Chagas disease vector surveillance: systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1207.

Affranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Aslund L, Pettersson U, Frasch AC. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*, 34:221-8, 1989.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suárez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O 2010a. Large urban outbreak of orally-acquired acute Chagas disease, at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 201: 1308-1315.

Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85:513-7, 1990.

Andrade AL, Zicker F, Oliveira RM, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996; 348: 1407–13.

Andrade SG, Figueira RM, Carvalho ML, Gorini DF 1975. Reaction of the *Trypanosoma cruzi* strains to the experimental therapeutical response to Bay 2502 (results of long term treatment). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 17: 380-399.

Andrade SG, Freitas LAR, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M. *Trypanosoma cruzi* antigens detected by immunoelectron microscopy in the spleen of mice serologically positive but parasitologically cured by chemotherapy (preliminary report). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 21: 41– 42, 1988.

Andrade SG, Freitas LA, Peyrol S et al. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull World Health Organ* 1991; 69: 191–7.

Avila HA, Borges-Pereira J, Thiemann O, de Paiva E, Degrave W, Morel CM, Simpson L 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31: 2421-2426.

Andrade SG, Magalhães JB 1996. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.

Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1991 Apr-Jun;86(2):187-200.

Andrade Z, Andrade S. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. *Patologia da Doença de Chagas*. Eds. Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M. Guanabara Koogan. 2. ed. Rio de Janeiro 2000; 201-30.

Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (suppl 1): 71–80.

Anez N, Carrasco H, Parada H, et al. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 215–222.

Anonymous, 1999. Anonymous recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:549-562.

Apt W, Heitmann I, Jercic I, Jofré L, Muñoz P, Noemi I, Martín A, Sapunar J, Torres M, Zulantay I. Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease. *Rev Chilena Infectol*. 2008 Oct;25(5):384-9, discussion 387. Epub 2008 Oct 1.

Apt W, Zulantay I. Update on the treatment of Chagas' disease. *Rev Med Chil*. 2011 Feb;139(2):247-57.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2034-9.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan S, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular Biochemical Parasitology*, 48: 211 - 222, 1991.

Bahia-Oliveira LMC, Gomes JAS, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZP, Moreira MC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection 14–30 Years Ago. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 634 – 638, 2000.

Barnabé, C., Brisse, S., Tibayrenc, M., 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 120, 513–526.

Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, Esteves-Filho A, Kalil R, Weiss R, Jatene A, Pileggi F 1996. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* 131: 301-317.

Bern C, Coura JC, Goldenberg S, Guhl F, Junqueira ACV, Lorca M, et al. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 May-Jun;41(3):315-9.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 2007; 298: 2171–81.

Bern C, Montgomery SP, Katz L, et al. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 476–482.

Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49:52–54.

Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. *Am J Dis Child* 1976; 130: 97–103.

Blanco SB, Segura EL, Cura EM, Chuit R, Tulián L, Flores I, Garbarino G, Villalonga JF, Gurtler RE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, 5 (4): 293 – 301, 2000.

Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med* 2008; 8: 510–18.

Borges-Pereira J, Willcox HPF, Coura JR. Morbidade da doença de Chagas. Estudo longitudinal de seis anos, Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80: 63 – 72, 1985.

Borges-Pereira J, Coura Jr. Morbidade da doença de Chagas em populações urbanas do sertão da Paraíba. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20: 101-107, 1987.

Borges-Pereira J, Cunha RV, Willcox HPF, Coura JR. Evolução da cardiopatia chagásica crônica humana no Sertão do estado da Paraíba, Brasil, no período de 4,5 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 23: 141-147, 1990.

Borges-Pereira J, Willcox HPF, Coura JR. Evolução da cardiopatia chagásica crônica. I – influência da parasitemia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 101-108, 1992.

Braga MS, Lauria-Pires L, Arganãraz ER et al. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev Inst Med Trop de São Paulo* 2000; 42: 157–61.

Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C, Levin MJ 1995. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease [Letter]. *Lancet* 346: 1370-1371.

Brener Z. Laboratory-Acquired Chagas Disease: Endemic disease among parasitologist? In: Morel CM (ed.) *Genes and Antigens of parasites. A laboratory manual*. 2ª edição. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, pag 3-9, 1984.

Brener Z 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4: 389-396.

Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 13: 171-78.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol* 1973;27:347-82.

Brener Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Eds. Brener Z, Andrade Z. y Barral-Neto M. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 2000; 379-88.

Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales. The evolution of the two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:219-32.

Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111:95-105.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1993 Jan-Mar;88(1):171-2.

Britto C, Cardoso MA, Vanni CMM, Haslocher-Moreno A, Xavier SS, Wincker P 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241-247.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macedo V, Fernandes O 2001. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 823-826.

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (suppl. I): 122 – 135, 2009.

Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 37: 1319-1327.

Bustamante JM, Lo Presti MS, Rivarola HW et al. Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. *Int J Atimicrob Agents* 2007; 29: 733–7.

Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Aug;14(8):1045-9. Epub 2007 May 23.

Caldas IS, Talvani A, Caldas S et al. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res* 2008; 103: 413–21.

Camargo ME. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Ars. Curandi Cardiologia*, 9: 29 – 38, 1987.

Camargo ME, Hoshino-Shimizu S, Correa NS, Peres BA. Hemagglutination test for Chagas disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 13: 45-50, 1971.

Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 2004; 4: 549–62.

Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol*, 16:899-905, 2009.

Cançado JR. Aspectos clínicos na padronização dos métodos para avaliação dos efeitos da terapêutica na doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, 9(Suppl): 212 – 232, 1963.

Cançado J.R. - Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl.I): 331-335, 1999.

Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(1): 29 – 37, 2002.

Cançado R. Tratamiento etiológico do doença de Chagas pelo benznidazol. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds. Brener Z, Andrade Z. y Barral-Neto M. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000; 389-405.

Castro C, Macêdo V, Prata A. Comportamento da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos durante 13 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 157-165, 1999.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*, 2002 Oct;88(10):894-900. Epub 2002 Jun 15.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A et al. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2006; 99: 379–83.

Cerisola JA, Rohwedde R, Segura EL, Del Prado CE, Alvarez M, Martini GJW. *El xenodiagnóstico*. Buenos Aires: Imp Inst Nac Invest Cardiovasc, 157p, 1974.

Chagas C. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanun cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1909; 1:159-218.

Chagas C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1911; 3 (2):219-275.

Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8: 134 - 138, 1966.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19-23.

CLAP/PAHO/WHO. Report of the Technical Consultation on Information, Education, and Communication (IEC) on Congenital Chagas Disease. Montevideo, Uruguay, 17–18 May 2007.

Clayton C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 2002;21:1881-8.

Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012 Jul 6;61(26):477-9.

Contreras VT, Araque WH, Delgado VS. Biological properties of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes: usefulness for studying Chagas' disease. *Biol Res* 1993;26:315-6.

Cordova E et al. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIVinfected patients in Argentina, 1992–2007. *International Journal of Infectious Diseases*, 2008, 12:587–592.

Coura Jr, Anunziato N & Willcox HP. Chagas disease morbidity. I. Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78: 363-372, 1983.

Coura JR, Abreu LL, Borges-Pereira J, Wilcox HP. Morbidade da doença de Chagas. IV – Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80(1): 73 – 80, 1985.

Coura JR, Abreu LL, Wilcox HPF, Petana W. Evaluation of the xenodiagnosis of chronic Chagas patients infected ten years or over in an area where transmission has been interrupted – Iguatama and Pains, West Minas Gerais State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(4): 395 – 398, 1991.

Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997 Mar-Apr;30(2):139-44.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 3–24.

Coura, J. R. (2009): Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 549-54.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Sep;106(6):641-5.

Cummings KL, Tarleton RL 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 129: 53-59.

Cunha, Rivaldo et al. (2001). Doença de Chagas na população urbana do distrito sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil.

da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol*. 2001 Jun;17(6):286-91.

de Andrade AL, Martelli CM, Pinheiro ED, Santana CL, Borges FP, Zicker F. Serologic screening of infectious diseases in blood banks as an indicator of morbidity in the population. *Rev Saude Publica*. 1989 Feb;23(1):20-5.

de Oliveira FA, Teixeira Vde P, Lino Rde S, Jr., Vinaud MC, dos Reis MA. Macroscopic aspects of chronic Chagas heart disease in aging. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Apr;88(4):486-90.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 2002;8:269-285.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, Van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1988;27:63-70.

Devera, R., Fernandes, O., Coura, J.R., 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 1–12.

Dias JCP. Acute Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79 (suppl): 85–91.

Dias JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22: 147-156, 1989.

Dias JC, Schofield CJ. The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998 Jul-Aug;31(4):373-83.

Dias JC. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:11-8.

Dias JCP. Natural history of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 1995; 65: 359–66.

Dorn PL, Perniciaro L, Yabsley MJ, et al. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 605–607.

Dias JCP. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(Suppl 1):41-5.

Dvorak, J.A., Hall, T.E., Crane, M.S., Engel, J.C., Mcdaniel, J.P., Uriegas, R., 1982. *Trypanosoma cruzi* – flow Cytometric Analysis.1. Analysis of total DNA organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* 29, 430–437.

El Ghouzzi M-H, Boiret E, Wind F, et al. Testing blood donors for Chagas disease in the Paris area, France: first results after 18 months of screening. *Transfusion* 2010; 50: 575–583.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005;309:409-15.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). II. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal Immunology*, 109: 129 – 135, 1972.

Fabbro de Suasnábar D, Arias E, Streiger M et al. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and

untreated chronic chagasic patients. *Rev Inst Med Trop Saõ Paulo* 2000; 42: 99–110.

Ferreira, L.F.; Jansen, A.M.; Araújo, A. (2011). Chagas disease in prehistory. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 83(3): 1041-1044.

Flores-Chavez M, Faez Y, Olalla J, et al. Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Cases J* 2008; 1: 302.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1987, 81:755–759.

Fragata Filho AA, da Silva MA, Boainain E. Etiologic treatment of acute and chronic Chagas' disease. *Saõ Paulo Med J* 1995; 113: 867–72.

Frasch AC, Cazzulo JJ, Aslund L, Pettersson U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol Today*, 7:148-51, 1991.

Freilij H, Altchek J. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 551–555.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 35: 411-417.

Galvão LMC, Nunes RMB, Cañado JR, Brener Z, Krettli AU. Litic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a ten years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87: 220-223, 1993.

Galvão LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. 2003; *J Clin Microbiol* 41: 5066-5070.

Garcia S, Ramos CO, Senra JF et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1521–8.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other nonendemic countries. *Acta Trop*. 2010;115:22-7.

Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E 1998. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88: 28-33.

Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Feb;60(2):205-10.

Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MD, Ferreira AG, Silva ED, Ogatta SF, Krieger MA, Goldenberg S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 May;96(4):497-501.

Gomes YM, Pereira VRA, Krieger MA, Goldenberg S. Emprego do kit EIE-Recombinante-Chagas-BioManguinhos no diagnóstico da doença de Chagas crônica. *Salud y Ciencia*, 2004.

Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:115-21.

Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, De Lorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, Richle R, Brener Z. Anti-protozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 513 – 519, 1968.

Guedes PM, Veloso VM, Tafuri WL et al. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop* 2002; 84: 9–17.

Guedes PM, Fietto JL, Lana M et al. Advances in Chagas disease chemotherapy. *Anti-Infect Agents Med Chem* 2006; 5: 175–86.

Hernández P, Heimann M, Riera C, Solano M, Santalla J, Luquetti AO, Beck E. Highly effective serodiagnosis for Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol*, 17:1598-604, 2010.

Higuchi ML, Brito T, Reis M, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol* 2: 101-106.

Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS, Mott KE. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med* 1978; 298: 604–606.

Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, Skeiky YA, Leiby DA, Badaro R, Reed SG. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis*. 1999 May;179(5):1226-34.

Ibañez CF, Affranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Pettersson U, Frasch AC. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol*, 30:27-33, 1988.

Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e592.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Venencak-Jones C, Mc Curley TL 1993. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-357.

Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 129-132.

Kierszenbaum F 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12: 210-223.

Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitol* 2007; 52: 1–12.

Klingbeil MM, Shapiro TA. Unraveling the secrets of regulating mitochondrial DNA replication. *Mol Cell*. 2009;35:490-501.

Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of Immunology*, 128: 2009 – 2012, 1982.

Kropf SP. Carlos Chagas and the debates and controversies surrounding the disease of Brazil (1909-1923). *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2009 Jul;16 Suppl 1:205-27.

Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Padrón T, De Souza W, Goldenberg S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol*, 35:127-36, 1989.

Laranja FS. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. *Revista Brasileira de Medicina*, 10: 482 - 491; 1953.

Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 1956; 14: 1035–60.

Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC et al. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 111–8.

Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyatip, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg*, 41:530-8, 1989.

Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Gaunt, M.W., Yeo, M., Carrasco, H.J., Miles, M.A., 2009. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int. J. Parasitol.* 39, 1305–1317.

Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, Añez N, Zingales B, Ramgel-Aldao R, Gonzalez A, Levin MJ, Umezawa ES, Franco da Silveira J. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003 Aug;46(4):265-71.

Luquetti AO et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 46:265–271.

Luz ZMP, Coutinho MC, Cançado Jr, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27: 143-148, 1994.

Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D.J., 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 1–12.

Macêdo V. Forma indeterminada da doença de Chagas. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 38: 34-40, 1980.

Macêdo V, Prata A, Da Silva GR, Castilho E. Prevalência de alterações eletrocardiográficas em chagásicos (informações preliminares sobre o inquérito

eletrocardiográfico nacional). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 38(4): 261 – 264, 1982.

Machado CR, Camargos ER, Guerra LB, Moreira MC 2000. Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Hum Pathol* 31: 3-10.

Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AV. Chagas heart disease. *Arq Bras Cardiol* 1999; 72: 247–80.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007; 115: 1109–23.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Maciel BC, Simões MV, Schmidt A. Chagas heart disease. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ, eds. *Evidence-based cardiology*, 3rd edn. London: BMJ Books, 2010: 823–41.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007; 115: 1109–23.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, et al, on behalf of BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2008; 156: 37–43.

Marin-Neto JA et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, 104 Suppl 1:319–324.

Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JAC, Cançado Jr, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2: 569 – 573, 1995.

Martins-Filho OA, Eloi-Santos SM, Carvalho AT, Côrrea-Oliveira R, Rassi A, Luquetti AO, Rassi GG, Brener Z. Double-Blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 1107-1113, 2002.

Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JC et al. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1319–27.

Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect.* 2008 Sep;136(9):1153-64.

Médecins Sans Frontières. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41: 315–19.

Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 2003; 326: 1444–48.

Miles MA. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*, 2009, 136:1509–1528.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Tratamento etiológico da doença de Chagas. 32p, 1996.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 (suppl 3): 7–29

Moncayo A, Luquetti AO. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Oct-Dec;85(4):489-95.

Moncayo, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (Supl. I): 401 – 404, 1999.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100: 663–677.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989 Jul;27(7):1477-82.

Mott KE et al. Parasitic diseases and urban development. *Bulletin of the World Health Organization*, 1990, 68:691–698.

Muhich ML, Boothroyd JC. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol Cell Biol*. 1988;8:3837-40.

Nishioka SA. Benznidazole in the primary chemoprophylaxis of the reactivation of Chagas' disease in chronic chagasic patients using corticosteroids at immunosuppressive doses: is there sufficient evidence for recommending its use? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2000, 33:83–85.

OMS/OPAS – Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas. Informe de una reunión conjunta OMS/OPS de investigadores. *Bolletín Oficial Sanit Panam*, 76: 141 – 158, 1974.

Pan AA, Rosenberg GB, Hurley MK, Schock GJ, Chu VP, Aiyappa A. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J Infect Dis*, 165:585-8, 1992.

Pastini AC, Iglesias SR, Carricarte VC, Guerin ME, Sánchez DO, Frasch AC. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for

screening donated blood and diagnosing Chagas disease. Clin Chem, 1994 Oct;40(10):1893-7.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas disease as a foodborne illness. J Food Prot 2009; 72: 441–46.

Pifano CF. El diagnostico parasitológico de la enfermedad de Chagas crônica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. Arch Venez Patol Parasitol Med, 21: 20-55, 1954.

Pineda JP, Luquetti A, Castro C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31: 473-480, 1998.

Pinto Dias J. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. En XII Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión transfusional de la Tripanosomiasis Americana (INCOST/Chagas). Washington DC. Pan American Health Organization 2004; 129-34.

Pinto Dias JC. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). Ann Intern Med, 2006 May 16;144(10):772-4.

Polak A, Richle R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. An Trop Med Parasitol, 72: 45-54, 1978.

Prata A. Classification of Chagas' infection in humans. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 23:109 - 113, 1990.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis, 2001 Sep;1(2):92-100.

Queiroz AC. Tumor-like lesions of the brain caused by *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg, 22: 473-476, 1973.

Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, Restrepo S. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol.* 2009 Dec;47(12):3945-51. Epub 2009 Oct 21.

Rassi A, Luquetti AO 1992. Therapy of Chagas disease. In S Wendel, Z Brener, E Camargo, A Rassi, Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine, ISBT, São Paulo, p. 237-247.

Rassi A, Rassi Jr A, Rassi S. Cardiopatía crónica: arritmias. Eds. Pinto Dias J. Coura J. Doença de Chagas. Um manual para o clinico general. Rio de Janeiro. Fiocruz 1997; 201-22.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas heart disease. *Clin Cardiol* 2000; 23: 883–89.

Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, 104:152–158.

Rezende-Filho J, Moreira-Junior H, Rezende JM. Métodos radiológicos e manométricos para o diagnóstico da esofagopatia e da colopatia chagásica. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Ed. JR Coura. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2005; 653-666.

Rodriguez-Morales AJ. Chagas disease: an emerging food-borne entity? *J Infect Dev Ctries* 2008; 2: 149–150.

Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 1992 Nov;30(11):2864-8.

Russomando G, De Tomassone MM, De Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueiredo A. Treatment of congenital Chaga's disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 487 – 491, 1998.

Sánchez G, Coronado X, Zulantay I, Apt W, Gajardo M, Solari S, Venegas J 2005. Monitoring the efficacy of specific treatment in chronic Chagas disease by polymerase chain reaction and flow cytometry analysis. *Parasite* 12: 353-357.

Santos AH, Silva IG, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e artificial em chagásicos crônicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28: 367-373, 1995.

Santos Lda S, Torres RM, Machado-de-Assis GF, Bahia MT, Martins HR, Teixeira-Carvalho A, Coelho-Dos-Reis JG, Albajar-Viñas P, Martins-Filho OA, Lana Md. In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Feb;45(1):35-44.

Schenone H, Alfaro E, Reyes H, Taucher E. Valor Del xenodiagnóstico en la infección chagásica crônica. *Bolletín Chileno Parasitología*, 23: 149-154, 1968.

Schijman AG, Altchek J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chaga's disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial and chemotherapeutic*, 52: 441 – 449, 2003.

Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jan 11;5(1):e931.

Schmunis GA. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion, 1991, 31:547–557.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop 2010; 115: 14–21.

Silva IG, Azevedo YB, Rassi A, Galvão ACR, Silva APR. Correlação existente entre a quantidade de sangue usada no xenodiagnóstico artificial e sua positividade. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31(supl I): 240-241, 1998.

Silveira AC. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. Cad Saude Publica. 2000;16 Suppl 2:35-42.

Silveira AC, editor. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América: história de uma iniciativa internacional 1991-2001. Brasília: Organização Panamericana da Saúde; 2002. p. 15-43.

Silveira CAN, Castilho E, Castro C. Avaliação do tratamento específico para o Trypanosoma cruzi em crianças, na evolução da fase indeterminada. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33(2): 191-196, 2000.

Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An Acad Bras Cienc 2001; 73: 547–59.

Solari A, Ortíz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, Salinas P, Rojas A, Schenone H 2001. Treatment of Trypanosoma cruzi-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. J Antimicrob Chemother 48: 515-519.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 526–29.

Souza & Amato Neto, 2012.

Stebeck CE, Beecroft RP, Singh BN, Jardim A, Olafson RW, Tuckey C, Prenevost KD, Pearson TW. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 71:1-13, 1995.

Steverding D, Tyler KM. Novel antitypanosomal agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 Aug;14(8):939-55.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989 Mar;33:205-14.

Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 1999; 15: 94–99.

Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease: cause and effect. In: Tyler KM, Miles MA, eds. *World class parasites: American trypanosomiasis*, vol 7. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 2003: 107–16.

Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE 2007. The challenges of Chagas disease - grim outlook or glimmer of hope? *PLoS Med* 4: 1852-1857.

Teixeira AR, Pereira LM. Discrepâncias entre resultados de três reações sorológicas empregadas para diagnóstico da doença de Chagas. *Rev Bras Biol*. 1981;41:789-95.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Aug;101(5):463-91.

Teixeira ARL, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J* 2006;82:788–98.

Teixeira SMR. Ancestral genomes sex and population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens* 2006;2:226-235.

TDR/WHO. Standardization and validation of clinical use of PCR for *Trypanosoma cruzi* DNA detection in clinical Chagas. Workshop and symposium. Available from: <http://www.who.int/tdr/svc/newsevents/eventus/tdr/chagas-pcr-workshop-symposium>. [update 2008; cited 2009 Mar 13], 2008.

Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 115–119.

Thomas MC, García-Pérez JL, Alonso C, López MC. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol*, 19:47-57, 2000.

Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, de Lana M 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 223-230.

Toledo MJ, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J Antimicrob Chemother* 53: 1045-1053.

Tschudi C, Ullu E. Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J* 1988;7:455-8.

Tyler KM, Engman DM. The life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA, eds. *American trypanosomiasis. World class parasites: vol 7*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 2003: 1–11.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1996 Sep;34(9):2143-7.

Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1554-60.

Umezawa ES, Silveira JF. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:285-8.

Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, Marcili A, Camargo LM, Camacho AA, Stolf AM, Teixeira MM. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.* 2009 Jul;111(1):15-20. Epub 2009 Jan 19.

Urbina J. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, 2010, 115:55–68.

Urbina JA. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin in Infect Dis*, 2001; 14: 733-741.

Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 Suppl 1: 311–8.

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop.* 1999 Mar 15;72(2):203-12.

Verlag U, Verlag F. Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA

network replication. *Protist* 2001;152:255-62.

Venable, W.N.; Smith, D.M. Na Introduction ro R; texto em PDF encontrado em cran.us.r-projet.org; The Comprehensive R network.

Verzani, John; Using R for Introductory Statistics; USA, Chapman Hall/CRC Press; 2005.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da Moléstia de Carlos Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1911; 3: 276-293.

Vieira CB. A forma nervosa crônica da doença de Chagas vista pelo clínico geral. *Revista Goiana Medicina*, 12: 31-48, 1966.

Vinhaes MC, Dias JC. Chagas disease in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2000;16 Suppl 2:7-12

Viotti R, Vigliano C, Armenti H et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serological evaluation of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994; 127: 151–62.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 May 16;144(10):724-34.

Virreira M, Martínez S, Alonso-Vega C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Parrado R, Truyens C, Carlier Y, Svoboda M 2006. Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1082-1084.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett AA. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. *Lancet*, 305: 426 – 428, 1975.

Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Brenière SF. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of

Trypanosoma cruzi kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiol Lett. 1994 Dec 15;124(3):419-23.

Winker P, Britto C, Borges Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM 1994b. Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect Trypanosoma cruzi in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am J Trop Med Hyg 51: 771-777.

WHO. Andean countries initiative launched in Colômbia. TDR News 53, 3, 1997.

WHO. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 905. Geneva; 2000.

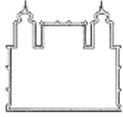
WHO. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series no 905. Geneva: World Health Organization, 2002.

WHO. Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease. Buenos Aires, Argentina, 17-20 April 2005. Update July 2007. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Zarate-Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, da Silveira JF, Umezawa ES. Diagnostic performance of tests based on Trypanosoma cruzi excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. Diagn Microbiol Infect Dis_ 2007 Feb;57(2):229-32. Epub 2006 Oct 3.

Zulantay I, Honores P, Solari A, Apt W, Ortiz S, Osuna A, Rojas A, López B, Sánchez G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect Trypanosoma cruzi in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48: 253-257, 2004.

9. Anexos

	<p>Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório de Doenças Parasitárias - LDP</p> <p>Pavilhão Arthur Neiva, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, CEP. 21045-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL</p> <p>Tel: (21) 2562-1469/ 1445/ 1492/ 1206, Fax: (21) 2280-3740</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: EVOLUÇÃO DA PARASITEMIA, DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IgG ANTI-*Trypanosoma cruzi* E DA CARDIOPATIA EM PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS DE MATO GROSSO DO SUL, ONZE ANOS DEPOIS DO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL.

Responsável: Dr. José Borges Pereira, médico, CREMERJ 52 31485-4

Sr (a) _____, como voluntário(a), convido-lhe para participar desse projeto que tem como objetivo avaliar os benefícios do uso do benznidazol (Rochagan) na evolução da doença de Chagas crônica. Sua participação será inteiramente voluntária, podendo sair do projeto a qualquer tempo ou recusar-se a realizar qualquer procedimento, sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

Problema de saúde. A doença de Chagas é causada pelo parasito chamado *Trypanosoma cruzi*, transmitido principalmente pelas dejeções (fezes e/ou urina) eliminadas durante a picada dos insetos chamados de *barbeiros*. As pessoas que adquirem este parasito podem desenvolver doença no coração, esôfago e intestinos, com elevado risco de morte. Sabe-se que o benznidazol tem elevada eficácia no tratamento desse parasito na fase inicial ou aguda da doença de Chagas, porém tem pouca eficácia durante a fase tardia ou crônica, mesmo assim o consenso de especialistas indica seu uso seletivo, na expectativa de produzir benefícios aos usuários. Ainda é pequeno o conhecimento sobre esses benefícios, ao longo prazo, após o uso do benznidazol. Com a intenção de contribuir para ampliar esse conhecimento estamos propondo esse estudo.

Procedimentos: Para realizar este estudo estão programados os seguintes procedimentos: avaliação clínica com a medida da pressão arterial, exame físico e anamnese cardiovascular, obtenção de eletrocardiograma de repouso, coleta 20 mL de sangue venoso com sistema vacutainer, estéril e descartável, destinados a pesquisa do *T. cruzi* pela técnica da reação em cadeia da polimerase e xenodiagnóstico indireto e a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*, através dos testes sorológicos de imunofluorescência indireta e ELISA. O diagnóstico de alterações clínicas determinará o tratamento por nós ou o encaminhamento para serviços especializados da rede pública de saúde.

Benefícios: O(a) Sr(a) poderá não obter qualquer benefício pessoal, contudo, o conhecimento adquirido poderá beneficiar outras pessoas no futuro. Para isso as informações obtidas serão transmitidas na forma de publicações científicas, mantendo-se o anonimato dos participantes. Os resultados dos exames serão fornecidos ao Sr(a) na forma de cópias ou originais; assim como serão oferecidas novas prescrições e medicamentos diante do diagnóstico de fracasso terapêutico inicial.

Inconvenientes: no local da veia punccionada poderá ocorrer dor e/ou hematoma (rouxidão) por 3 a 5 dias. **Riscos potenciais:** diante dos demais exames aos quais o(a) Sr(a) será submetido(a) não foram identificados riscos, até o momento.

Eu, _____, como voluntário, declaro estar ciente do inteiro teor deste termo de consentimento, decidindo participar desse projeto de pesquisas, depois de formular perguntas e ter recebido respostas satisfatórias, estando ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo. Autorizo o armazenamento, por tempo indeterminado (a - 20 °C na soroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC/FIOCRUZ, sala 16 do Pavilhão Arthur Neiva, sob a responsabilidade do Coordenador), de minha amostra de soro para a pesquisa atual e reutilização futura em pesquisas sobre a evolução da doença de Chagas, condicionadas a aprovação prévia do Comitê de ética da FIOCRUZ.

Assino ou coloco minha impressão digital, estando ciente de que uma cópia deste termo ficará comigo e outra arquivada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro.

Assinatura ou impressão digital do voluntário:

Endereço _____

Data: ____/____/2011

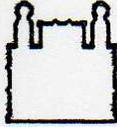
Testemunhas:

1 _____ RG _____

2 _____ RG _____

Assinatura do médico responsável: Dr. José Borges Pereira

(Tel: 21 9911 2648, 21 8897 9413 e 21 38229413). Endereço – no cabeçalho.



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Fernandes Figueira
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 12 de novembro de 1997

Do: **Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/FIOCRUZ**

Título do Projeto de Pesquisa "Aspectos epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença de Chagas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil"

Coordenadores Responsáveis: **Dr José Borges Pereira**
Dr José Rodrigues Coura

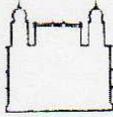
A deliberação do Comitê de Ética baseou-se no entendimento de que o protocolo demonstrou a importância e a singularidade do estudo, consistência metodológica e do tratamento etiológico e procedimentos éticos conforme as exigências da Resolução 196/96, sendo considerado **APROVADO**.

Outrossim, um detalhe formal deve ser alterado - o título do termo de consentimento deve ser "Consentimento Livre e Esclarecido".

Cordialmente,

Dra Marlene Braz

Coordenadora Adjunta do Comitê de Ética em Pesquisa -
CEP/FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2011.

Carta: 086/11

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dr. José Borges Pereira e
- Dra. Mariza G. Morgado

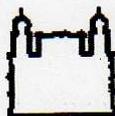
Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do **protocolo 597/11** intitulado **“Evolução da Parasitemia, dos Níveis séricos de IgG Anti-Trypanosoma cruzi e da Cardiopatia em pacientes chagásicos crônicos de Mato Grosso do Sul, onze anos depois do tratamento com Benznidazol”** com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.736 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS-CEP FIOCRUZ-IOC

Rio de Janeiro, 21 de Novembro de 2011.

PARECER APROVADO

Título do Projeto: "Evolução da Parasitemia, dos Níveis séricos de IgG Anti-Trypanosoma cruzi e da Cardiopatia em pacientes chagásicos crônicos de Mato Grosso do Sul, onze anos depois do tratamento com Benznidazol"

Registro do Projeto no CEP Fiocruz-IOC: **597/11**

Pesquisador (a) Responsável: **José Borges Pereira**

Instituição (ões): O projeto será realizado em parceria com a Secretaria de Saúde dos Municípios que compõem o distrito sanitário de Rio Verde e com o Hospital universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Síntese do projeto:

O projeto visa estudar a evolução de indivíduos chagásicos de MS (Campo Grande + 12 Municípios) tratados com Benznidazol em 1998, e de indivíduos chagásicos não tratados (recusa, contraindicações), para avaliar e identificar possíveis benefícios desse tratamento, como a regressão ou estabilização da doença de Chagas crônica, nas suas formas cardíaca ou digestiva, repetindo os exames feitos na época.

O projeto visa através de um estudo longitudinal após onze anos na área com pacientes chagásicos analisar o impacto do tratamento etiológico da doença de Chagas sobre a parasitemia, a imunoglobulinemia anti-T. cruzi e a cardiopatia tanto em pacientes chagásicos submetidos ao tratamento com Benznidaxil como também naqueles que são portadores, mas se recusaram ou há contra indicação em realizarem o tratamento.

Objetivos:

- Determinar a variação qualitativa e quantitativa da parasitemia através do xenodiagnóstico e da reação em cadeia da polimerase nos grupos de chagásico tratados e não tratados com Benznidazol há onze anos.

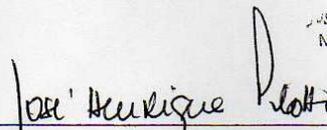
- Determinar a variação dos níveis séricos de IgG anti-Trypanosoma cruzi através dos testes de Imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA), nos grupos de chagásicos tratados e não tratados com Benznidazol há onze anos.
- Identificar a evolução da cardiopatia chagásica crônica através do exame clínico e eletrocardiograma de repouso, nos grupos de chagásicos tratados e não tratados com Benznidazol há onze anos.
- Realizar tipagem molecular dos isolados de *T. cruzi* obtidos das amostras de sangue dos pacientes chagásicos (tratados e não tratados), e correlacionar estes isolados quanto à sensibilidade ou resistência ao tratamento com Benznidazol.

Deliberação do CEP-Fiocruz-IOC:

Após análise das respostas ao parecer pendente, com base nas diretrizes éticas para pesquisas com seres humanos, expressas na *Resolução CNS 196/96*, este Comitê delibera **APROVADO** o projeto supracitado.

Apresentar relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa são responsabilidades indelegáveis do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP FIOCRUZ-IOC.



José Henrique da Silva Pilotto
Matrícula SIAPE 0627357
CRM 52.37829-7

José Henrique da Silva Pilotto
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
(CEP Fiocruz-IOC)

INTEGRA O CEP FIOCRUZ-IOC OS SEGUINTE MEMBROS	
Parecer deliberado na 165ª reunião ordinária deste Comitê, realizada em 21.11.2011	
Adalberto Rezende Santos - Membro	José Henrique da Silva Pilotto - Coordenador
Adriana Lima Vallochi - Membro	Kycia Maria Rodrigues Do Ó - Membro
Carlos Augusto Ferreira Andrade - Membro	Marcelle Coelho do Rosário - Membro
Carlos Norberto Varaldo - Rep. Usuários	Márcia de Cássia Cassimiro - Coordenadora Adjunta
Catarina Macedo Lopes - Membro	Marcos Adriano Lessa - Membro
Dumith Chequer Bou-Habib - Membro	Maria Regina Reis Amendoeira - Coordenadora Adjunta
Gerson Rosenberg - Membro	Vera Bongertz - Membro
	Yara Hahr Marques Hökerberg - Membro



Ministério da Saúde - MS
 Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
 Instituto Oswaldo Cruz - IOC
 Laboratório de Doenças Parasitárias - LDP
 Pavilhão Arthur Neiva, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, CEP. 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ - BRASIL
 Tel: (21) 2562-1469/ 1445/ 1492/ 1206, Fax: (21) 2280-3740

INVESTIGAÇÃO SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS

Estado: MG	Município: Virgem da Lapa	Localidade:	Registro:
Nome:		Idade	Sexo
Endereço			
Profissão:	Escolaridade:	Naturalidade	

DATA DO EXAME	EX 01	EX 02	EX 03	EX 04	EX 05	EX 06	EX 07	EX 08	EX 09	EX 10
ASPECTOS										
Conhece o barbeiro?										
Foi picado pelo barbeiro?										
Morou em casa que tinha barbeiro?										
Recebeu sangue de alguém?										
Doou sangue?										
Mãe tem doença de Chagas?										
Houve morte súbita na família?										
Pressão arterial										
Dispnéia em repouso										
Dispnéia aos esforços										
Palpitações em repouso										
Palpitações aos esforços										
Dor precordial em repouso										
Dor precordial aos esforços										
Perda da consciência										
Arritmia à ausculta										
Desdobramento de B1										
Desdobramento de B2										
Sopro sistólico										
Sopro diastólico										
Hiperfonese de bulhas										
Hipofonese de bulhas										
Disfagia										
Pirose										
Regurgitação ativa										
Regurgitação passiva										
Obstipação de 5 a 10 dias										
Obstipação > 10 dias										
Usa laxativo ocasional										
Usa laxativo obrigatório										
Cirurgia de megaesôfago										
Cirurgia de megacolon										

S - SIM, N - NÃO, NS - NÃO SABE

DATA DO EXAME	EX 01	EX 02	EX 03	EX 04	EX 05	EX 06	EX 07	EX 08	EX 09	EX 10
EXAMES COMPLEMENTARES										
Número do soro na soroteca										
Imunofluorescência indireta										
ELISA recombinante										
ELISA convencional										
Hemaglutinação indireta										
Xenodiagnóstico										
Reação em cadeia da polimerase										
Hemocultura										
Eletrocardiograma: Normal										
Anormal										
Bradicardia (FC =)										
Fibrilação atrial										
Flutter atrial										
Baixa voltagem do QRS										
Extra-sístoles supraventricular										
Extra-sístoles ventricular										
Bloqueio AV grau										
Bloqueio do ramo direito grau										
Bloqueio do ramo esquerdo grau										
Hemibloqueio anterior esquerdo										
Alt. seq. da repolarização ventricular										
Alt. dif. da repolarização ventricular										
Sobrecarga atrial (Dir) (Esq)										
Sobrecarga ventricular (dir) (esq)										
Zona eletricamente inativa										
Ecocardiograma: Normal										
Anormal										
• Fração de ejeção										
• Hipocinesia										
• Acinesia										
• Discinesia										
• Outras										
Raios-X tórax: normal										
• Cardiomegalia (ICT =)										
Raios-X do esôfago: Normal										
• Megaesôfago grupo										
Forma clínica										
Indeterminada										
Cardíaca										
Digestiva										
Mistá										
Tratamento: sintomático										
• etiológico										
Grupo sistema ABO										
Fator Rh										
Óbito										

S – sim, N – não, Po – Positivo, Ne – Negativo, NR – Não realizado.

Aspectos demográficos, cardiológicos, parasitológicos e sorológicos dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica reexaminados no período 1999-2010/2011

Pac	NAT	ID i	SX	BZD	Card i	Card f	EV Card	PCR i	PCR f	IF i	IF f	ELR i	ELR f	HAI i	HAI f
1303	MS	45	M	NÃO	G II	G II	Inalterada	PO	NE	40	20	48	34	40	0
543	CE	63	F	NÃO	G II	G II	Inalterada	PO	NE	40	80	525	42	0	0
620	MS	49	F	NÃO	G II	G II	Inalterada	PO	NE	320	640	689	2197	320	1280
850	MS	68	M	NÃO	G III	G III	Inalterada	NE	NE	40	20	55	37	40	0
1013	MS	28	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	NE	NE	40	160	243	24	0	0
136	PE	49	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	PO	NE	80	20	87	32	0	0
1002	MS	30	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	NE	NE	40	0	48	33	40	0
1394	MS	48	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	NE	NE	40	40	205	37	0	0
1261	MS	35	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	PO	NE	40	0	45	39	40	0
1424	MS	85	M	NÃO	G I	G I	Inalterada	PO	NE	80	160	245	39	0	0
1305	GO	27	M	NÃO	G I	G I	Inalterada	NE	NE	40	160	44	40	0	0
1311	MS	35	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	PO	NE	40	40	56	45	40	0
1096	MS	61	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	NE	NE	160	40	58	66	40	0
972	CE	56	F	NÃO	G I	G I	Inalterada	PO	PO	80	80	689	2142	320	80
621	PR	34	M	NÃO	G III	G III	Progressiva	PO	NE	320	160	423	1876	160	80
986	MS	37	F	NÃO	G I	G II	Progressiva	PO	NE	160	160	750	2116	1280	160
989	MS	36	F	NÃO	G I	G II	Progressiva	PO	NE	320	160	723	2200	320	2560
941	MS	67	M	NÃO	G I	G II	Progressiva	NE	NE	80	0	46	40	40	0
1247	MS	20	M	NÃO	G I	G II	Progressiva	NE	NE	40	0	50	41	80	0
1420	MS	34	M	NÃO	G I	G II	Progressiva	PO	NE	40	0	315	60	0	0
1469	MS	43	F	NÃO	G I	G II	Progressiva	NE	PO	40	40	140	61	40	80
918	SP	43	F	NÃO	G I	G II	Progressiva	PO	NE	40	0	178	100	0	0
1315	MS	54	M	SIM	G II	G II	Inalterada	NE	NE	80	20	68	39	40	0
890	BA	63	M	SIM	G II	G II	Inalterada	PO	NE	320	20	542	2053	80	320
448	RS	52	F	SIM	G II	G II	Inalterada	NE	NE	640	160	489	2063	80	80
1250	MS	62	F	SIM	G II	G II	Inalterada	PO	PO	40	80	385	2189	80	640
1330	MG	54	F	SIM	G II	G II	Inalterada	NE	NE	640	160	191	2490	320	2560
861	BA	42	F	SIM	G III	G III	Inalterada	PO	NE	320	320	756	1730	160	1280
1496	MG	40	F	SIM	G III	G III	Inalterada	PO	NE	1280	160	389	2629	160	640

Pac	NAT	ID i	SX	BZD	Card i	Card f	EV Card	PCR i	PCR f	IF i	IF f	ELR i	ELR f	HAI i	HAI f
25	MS	35	M	SIM	G III	G III	Inalterada	PO	NE	40	20	201	73	40	0
1312	CE	22	F	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	80	0	25	24	0	0
1086	RS	10	F	SIM	G I	G I	Inalterada	NE	NE	80	160	175	33	40	0
495	MG	59	F	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	1280	80	368	35	80	40
189	MS	30	F	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	80	40	175	39	0	0
1306	MS	33	M	SIM	G I	G I	Inalterada	NE	NE	40	0	52	42	0	0
277	PR	42	F	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	160	20	210	1278	80	0
895	SP	57	M	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	640	640	840	1530	160	160
31	MG	35	M	SIM	G I	G I	Inalterada	NE	PO	640	320	539	1939	80	160
1457	PE	52	M	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	PO	320	160	545	2217	320	1280
2153	RS	46	M	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	320	80	504	2458	320	640
369	MS	57	F	SIM	G I	G I	Inalterada	PO	NE	640	160	202	2596	160	40
1162	RS	34	F	SIM	G II	G II	Inalterada	PO	NE	80	20	87	1790	0	0
1442	MS	56	F	SIM	G I	G III	Progressiva	NE	NE	1280	640	755	2115	320	2560
881	MS	40	F	SIM	G II	G III	Progressiva	PO	PO	320	320	402	1950	160	640
405	PE	67	F	SIM	G II	G III	Progressiva	PO	NE	640	160	276	2045	160	1280
1131	SC	61	F	SIM	G I	G II	Progressiva	PO	PO	160	40	348	2285	160	1280
639	SP	54	F	SIM	G IV	G III	Regressiva	NE	NE	640	320	967	1367	640	1280
76	SP	60	M	SIM	G IV	G III	Regressiva	PO	PO	640	1280	632	2254	160	40
1310	MS	25	F	SIM	G II	G I	Regressiva	NE	NE	80	40	662	44	40	0
862	CE	69	M	SIM	G II	G II	Regressiva	PO	NE	320	40	208	680	80	40