

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATÓRIAS DE
PACIENTES COM INFECÇÃO OU DOENÇA DE CHAGAS DO MUNICÍPIO DE
BERILO, VALE DO JEQUITINHONHA-MG, APÓS NOVE ANOS DO
TRATAMENTO ESPECÍFICO COM BENZONIDAZOL

AUTOR: LEONARDO DE ARAÚJO LOPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta de Lana
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Albajar Viñas

Ouro Preto, Setembro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATÓRIAS DE
PACIENTES COM INFECÇÃO OU DOENÇA DE CHAGAS DO MUNICÍPIO DE
BERILO, VALE DO JEQUITINHONHA-MG, APÓS NOVE ANOS DO
TRATAMENTO ESPECÍFICO COM BENZONIDAZOL

Autor: Leonardo de Araújo Lopes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta de Lana

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Albajar Viñas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários

Ouro Preto, Setembro de 2007.

L864a Lopes, Leonardo de Araújo.
Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de pacientes com
infecção ou doença de chagas do município de Berilo, Vale do
Jequitinhonha – MG, após nove anos do tratamento específico com
benzonidazol [manuscrito] / Leonardo de Araújo Lopes. – 2007.

xiv, 113 f.: il., color; graf., tabs., mapas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta de Lana.
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Albajar Viñas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto
de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

1. Chagas, Doença de - Berilo (MG) - Teses. 2. Tripanossomo - Teses.
3. Quimioterapia - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.937(815.1)

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

DEDICATÓRIA

A toda população de Berilo, que com tanto carinho me acolheu. Espero ter trazido algum conforto e esperança para essa gente que tanto precisa e que me mostrou a realidade longe dos livros.

EPÍGRAFE

“Você faz aquilo com que muitos sonham durante toda a vida. Sonho? Lute para realizá-lo, agonize realizando e defina fazendo-o”.

Andréa Del Sarto

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma coisa boa, mas gostaria de poder fazer muito mais a essas pessoas que me ajudaram tanto. Muito obrigado a todos.

À todos os pacientes que eu tive o prazer de conhecer e que de certa forma ajudaram muito na minha formação.

Ao Dr. Roberto Montoya Araújo, responsável pelo início de tudo e que até hoje é lembrado pelo que fez pela população de Berilo.

À Secretaria de Saúde do Município de Berilo pelo apoio logístico em diversas situações ao longo do projeto.

Agradeço a Pró-Reitoria de Extensão (PROEX) da Universidade Federal de Ouro Preto, pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

A todas as pessoas que fazem parte do Hospital Municipal de Berilo e de todos os PSF's: médicos, enfermeiros, técnicos de laboratório e enfermagem, administradores, farmacêuticos, fisioterapeuta, segurança, limpeza, cozinha, lavanderia. Ao Marcelo por dividir comigo o prazer das tardes de sábado e domingo em Berilo.

Ao Neném e a Tuca pela companhia de todo dia e pela maravilhosa comida servida no almoço e jantar.

Ao Padre José Nuno, grande colaborador deste projeto. Ao atual Prefeito do Município de Berilo pelo total apoio oferecido.

A Beth da Pousada Sol Nascente de Berilo pela calorosa acolhida.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Doença de Chagas.

Ao meu primo Fernando, um dia quem sabe, poderei retribuir a tudo o que ele me fez.

A toda turma do Mestrado.

Ao Paulo e Vanja por abrirem uma cortina quando tudo parecia escuro.

A Helen pela ajuda na realização da PCR.

A Lizziane, Silvana, Lílian, Jamile e Alf, por dividirem comigo toda responsabilidade desse projeto.

A Terezinha Bahia por toda serenidade nos momentos de tormenta e pelos inúmeros esclarecimentos, sempre pronta a me atender.

A todos que do Laboratório de Doença de Chagas do Instituto René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, por todo apoio prestado na realização deste trabalho.

A Ana Paula, Bia, Matheus, obrigado pela paciência durante a realização da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo.

Obrigado às pessoas que foram até Berilo para ajudar neste trabalho: Alexandre Rotondo, Renato, Leandro, Gemma, Débora, Montserrat e à Dra. Rosália Moraes Torres.

À querida Cida devo agradecer pela agradável companhia em momentos tão difíceis, além de resolver todos meus problemas burocráticos.

Aos meus irmãos de Maceió, sempre prontos a me ajudar em qualquer situação.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho por ter transformado minutos em horas e dias em meses, muito obrigado.

Ao Dr. Pedro Albajar Viñas, meu agradecimento, respeito e eterna gratidão por tudo que você fez por mim. Obrigado também pelas inúmeras aulas de doença de Chagas, ética, respeito, companheirismo, educação e amizade.

A Profa. Marta de Lana pela orientação, paciência, empenho e por ter me dado a chance de trabalhar nesse maravilhoso projeto. Muito obrigado e aceite minhas sinceras desculpas pelo enorme trabalho que eu lhe dei.

A FAPEMIG, CNPQ e SESU/MEC pelo apoio dado na execução deste trabalho.

Agradecimento especial:

Aos meus pais que mesmo estando longe, me ensinaram a nunca desistir e sempre enfrentar as dificuldades de cabeça erguida sem jamais humilhar ninguém para alcançar meus objetivos.

A toda minha família por tudo que fizeram por mim, sempre prontos a me acolher, mesmo nas horas mais impróprias.

Ao Sergio Kehdy e Regina Maria, por terem me acolhido como filho e confiado em mim como genro.

À Fernanda, minha esposa, tenho a dizer que devo tudo isso a você. Te amo.

RESUMO

A cura parasitológica e clínica da doença de Chagas em pacientes tratados na fase crônica é de avaliação complexa e quando observada, ocorre tardiamente especialmente nos tratados na fase crônica. A definição da cura envolve o emprego de vários exames clínicos e laboratoriais que necessitam ser repetidos por um período longo de observação. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação epidemiológica, clínica e laboratorial, antes e nove anos depois do tratamento etiológico com benzonidazol, de pacientes com infecção chagásica crônica e apresentando diferentes formas clínicas da doença. Trinta e um pacientes tratados em 1997 foram avaliados, epidemiológica, clínica (anamnesis, exame físico, ECG, RX de tórax) e laboratorialmente [hemocultura, PCR, sorologia convencional (ELISA, HAI) e não convencional (pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo (AATV))]. Foi constatada melhoria das condições de moradia de 51,7% dos pacientes. Do total de pacientes, 77,4% reconheceram os triatomíneos vetores da doença de Chagas e 70,9% deles possuem algum parente vivo com doença de Chagas ou que tenha tido esta doença como causa “mortis”. Dos pacientes tratados na forma indeterminada da doença, 95,5% (21/22) se mantiveram na forma indeterminada e somente 4,5% (4/31) do total dos pacientes apresentaram evolução clínica. Dos cinco pacientes tratados que apresentavam inicialmente alguma forma clínica, três evoluíram clinicamente e dois permaneceram clinicamente estáveis. Pós-tratamento, a hemocultura foi positiva em 9,6% (3/31) dos casos sendo todos sintomáticos; a PCR foi positiva em 40% (12/30), negativa em 16,6% (5/30) e oscilante em 43,4% (13/30) dos pacientes; as sorologias convencional e não convencional, foram positivas em todas as amostras. A reação de ELISA semiquantitativa comparada entre as amostras de soro de 18/31 pacientes obtidas antes e nove anos pós-tratamento, apresentou queda sorológica significativa ($p < 0,05$) dos níveis de anticorpos nos pacientes que receberam tratamento na forma indeterminada da doença. Não foi observada alteração significativa dos níveis de anticorpos em pacientes que antes do tratamento apresentaram alterações eletrocardiográficas ou radiológicas compatíveis com doença de Chagas. Não foi observada mudança significativa na pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo avaliada pela reação de citometria de fluxo, sete e nove anos após o tratamento. Foi demonstrado pela reação de ELISA semiquantitativa que a diluição de soro 1:320 foi melhor para discriminar a queda sorológica de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* em pacientes tratados com benzonidazol. A variação de absorvância medida antes e nove anos após tratamento confirmou que essa diluição foi melhor para avaliação precoce da eficácia terapêutica na doença de Chagas. Embora as avaliações laboratoriais não tenham revelado nenhuma cura parasitológica, cinco pacientes apresentaram dados laboratoriais (PCR e hemocultura negativas e queda na reatividade sorológica observadas apenas naqueles que apresentaram após tratamento, a forma indeterminada da doença) indicativos de ação terapêutica. Os resultados sugerem que o tratamento impediu ou retardou a evolução clínica da doença de Chagas em 95,5% (21/22) dos pacientes tratados com a forma indeterminada da doença e em 40% (2/5) pacientes tratados com alguma forma clínica da doença de Chagas. Em conjunto, estes resultados sugerem ainda, mesmo na ausência de cura parasitológica comprovada, efeitos benéficos do tratamento uma vez que o índice de evolução clínica dos pacientes tratados com a forma indeterminada da doença foi muito baixo (0,5%/ano). Novas avaliações, com período maior de acompanhamento, serão necessárias para melhor verificar a eficácia terapêutica.

ABSTRACT

The parasitological and clinical cure of the Chagas disease in patients treated in the chronic phase is of complex evaluation and when observed occurred later especially in those treated in the chronic phase. The definition of the cure involves the use of some clinical and laboratorial examinations that need to be repeated throughout a long period of time. The objective of this work was to carry out an epidemiological, clinical and laboratorial evaluation, before and nine years after the etiologic treatment with Benzonidazole of patients with chronic chagasic infection and presenting different clinical forms of the disease. Thus, thirty-one patients treated in 1997 were epidemiological, clinical (anamneses, physical examination, ECG, ray-X of thorax) and laboratorially [hemoculture, PCR, conventional (ELISA, HAI) and non-conventional (anti-live tripomastigote antibodies (ALTA) serologies] evaluated. An improvement of the housing conditions of 51.7% of the patients was verified. The triatomines vector were recognized by 77.4% of the patients and 70.9% have some alive relative with Chagas disease or that have dead having this disease as cause of death. Before treatment twenty-two patients presented the indeterminate form of the disease and in the present evaluation 95.5% (21/22) were clinically stable. Only 4.5% (4/31) of the total of patients presented clinical evolution being that three of them presented electrocardiogram or X-ray changes compatible with Chagas disease. Pos-treatment the hemoculture was positive in 9.6% (3/31) of the cases being all they symptomatic; the PCR was positive in 40% (12/30), negative in 16.6% (5/30) and oscillating in 43.4% (13/30) of the patients; the conventional serology was positive in all patients. The semiquantitative ELISA reaction, compared between sera samples of 18/31 patients, obtained before and nine years after treatment, presented significant serological decrease ($p < 0.05$) of antibodies level in patients that received treatment in the indeterminate clinical form of the disease. No significant changes of antibodies levels were observed in patients that before treatment presented electrocardiography or in ray-X/radiological changes compatible with Chagas disease. No significant changes were also observed in anti-live tripomastigote antibodies (ALTA) levels by flow cytometry in all patients seven and nine years after treatment. It was demonstrated by the semiquantitative ELISA reaction that the serum dilution of 1:320 was the best for discriminate the serological decrease of IgG antibodies anti *Trypanosoma cruzi* in patients treated with Benzonidazole. The analysis of the absorbance evaluated before and nine years after treatment confirmed that this dilution would be the best for precocious evaluation of the therapeutic efficacy in Chagas disease. Although the laboratory evaluations have not revealed any parasitological cure, five patients presented laboratorial data (negative PCR and hemoculture and significant decrease in serological reactivity observed only in patients that presented after treatment the indeterminate clinical form of the disease) indicative of therapeutic action. Data still suggest that the treatment prevented or delayed the natural evolution of Chagas disease in 95.5% (21/22) of the patients treated with the indeterminate form of the disease and in 40% (2/5) of the patients treated with some electrocardiography or ray-X compatible with Chagas disease. Data still suggest that even in absence of proven parasitological cure, benefit effects of the treatment were observed since the index of clinical evolution of patients treated with the indeterminate clinical form of the disease was very low (0.5%/year). New evaluations, with longer period of follow-up will be necessary to better verify the therapeutic efficacy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01-** Localização do município de Berilo no estado de Minas Gerais. 26
- Figura 02** – Delineamento experimental. 30
- Figura 03** - Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Formas tripomastigotas do *T. cruzi*, utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). 43
- Figura 04** - Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com controle interno da reação (A), após incubação com um soro não infectado (B) e um soro de paciente chagásico (C). O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado. 44
- Figura 05** - Gel de poliacrilamida mostrando padrão de bandas eletroforéticas de kDNA de 330 pb observadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) em eluato de sangue de pacientes portadores de doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, tratados há nove anos. 52
- Figura 6-** Resultados da reação de ELISA convencional de pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do Município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, na diluição do soro a 1:80 antes (CH) e após (CHt) tratamento com Benzonidazol e análise dos resultados e sua discriminação em função da forma clínica antes (IND e SINT) e após tratamento (INDt e SINTt). 54
- Figura 7** – Resultados da FC – ALTA na diluição de 1:256 em pacientes com doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, em dois momentos (2004 e 2006) em todos os 28 pacientes (CH) e separadamente nos grupos de pacientes apresentadores de forma indeterminada (IND) e naqueles com alguma alteração no eletrocardiograma ou raio-x (SINT). 56

Figura 8 – Gráfico de densidades ópticas em relação a diminuição da reatividade do soro em função da diluição empregada o que permitiu o estabelecer e determinar as diluições do soro que melhor segregam os grupos de pacientes na reação de ELISA semi-quantitativa. NT = Paciente não tratado TC = Paciente tratado e curado TNC = Paciente tratado e não curado NI = Paciente não infectado.

57

Figura 9 – Resultados de densidade óptica medidos pela reação de ELISA semiquantitativa dos pacientes de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, antes (CH) e após (CHt) tratamento com Benzonidazol nas diluições 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640.

59

Figura 10 – Gráficos apresentando os resultados de densidade óptica da reação de ELISA semiquantitativa medidos pela reação de ELISA semiquantitativa nos pacientes portadores da infecção chagásica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, portadores de forma indeterminada antes (IND) e após (INDt) tratamento com Benzonidazol.

61

Figura 11 – Gráficos dos resultados de densidade óptica medidos pela reação de ELISA semiquantitativa nos pacientes portadores da doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, sintomáticos, antes (SINT) e após (SINTt) tratamento com Benzonidazol.

63

Figura 12 - Resultados da queda de densidade óptica medidos pela reação de ELISA, onde se evidencia a queda de absorbância medida pela reação de ELISA semiquantitativa nos pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, nove anos após o tratamento com Benzonidazol.

65

Figura 13 – Resultados da queda de porcentagem de parasitos fluorescentes vivos (PPFP) através da pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivos (AATV) nos pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, nove anos após tratamento com Benzonidazol.

66

LISTA DE TABELAS

- Tabela I** - Faixa etária e forma clínica apresentada pelos pacientes portadores da infecção chagásica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, antes de realizar o tratamento etiológico. 28
- Tabela II** - Antecedentes epidemiológicos observados depois do tratamento, organizados por ordem de frequência nos pacientes portadores da infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, tratados há nove anos com Benzonidazol. 48
- Tabela III** - Evolução clínica dos pacientes de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, ao longo dos nove anos após o tratamento com Benzonidazol 49
- Tabela IV** - Evolução clínica dos pacientes de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, de acordo com a idade apresentada quando tratados com Benzonidazol e nove anos após tratamento. 50
- Tabela V** – Utilização dos critérios de cura atuais na avaliação da resposta laboratorial e clínica ao tratamento com Benzonidazol em pacientes portadores da infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, nove anos após tratamento. 51

LISTA DE ABREVIATURAS

AATV-	Anticorpo anti tripomastigota vivo
DNA-	Ácido desoxiribonucleico
ECG-	Eletrocardiograma
EDTA-	Etileno diamino tetra acético
ELISA-	Enzyme Linked Immunossorbent Assay
EPI-	Equipamentos de proteção individual
FITC-	Isotiocianato de fluoresceína
HAI-	Hemaglutinação indireta
IFI-	Imunofluorescência indireta
IgG-	Imunoglobulina G
kDNA-	DNA do cinetoplasto
LIT-	“Liver infusion tryptose”
LMCo-	Lise mediada pelo complemento
M-	Molar
mM-	Micro molar
μL	- Microlitros
PCR-	Reação em cadeia da polimerase
RPM-	Rotações por minuto
RAPD-	“ Randomily amplified polymorphic DNA”
RNA-	Ácido ribonucleico
rRNA-	Ácido ribonucleico ribossomal
SST-	Solução salina tamponada
T.A-	Temperatura ambiente
Taq-	<i>Termophylus aquaticus</i>
Xe	- Xenodiagnóstico

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	III
EPIGRAFE	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1.1 Indicações do tratamento	6
1.1.2 Tratamento na fase aguda da doença de Chagas	8
1.1.3 Tratamento na fase crônica da doença de Chagas	10
1.1.4 Critério de cura na doença de Chagas	16
1.1.5 Doença de Chagas em berilo	19
2.0 JUSTIFICATIVA	22

3.0 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
4.1 Área de estudo	26
4.2 Avaliação dos pacientes	27
4.3 Informações anteriores ao tratamento	27
4.3.1 Diagnóstico laboratorial e clínico	27
4.3.2 Tratamento dos pacientes	28
4.4 Avaliação pós-tratamento	31
4.4.1 Avaliação clínica	31
4.4.2 Estudo eletrocardiográfico	31
4.4.2.1 Grau de cardiopatia	32
4.4.3 Estudo radiográfico (RX)	33
4.4.3.1 Classificação da forma digestiva (megaesôfago)	33
4.5 Classificação das formas clínicas adotadas neste trabalho	34
4.6 Avaliações dos pacientes nove anos após tratamento	34

4.6.1 Evolução clínica	34
4.6.2 Avaliação epidemiológica	35
4.6.3 Avaliações laboratoriais	35
4.6.3.1 Obtenção, coleta e preparo das amostras	35
4.6.4 Avaliação parasitológica	35
4.6.4.1 Hemocultura	35
4.6.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
4.6.5 Avaliação sorológica	37
4.6.5.1 Sorologia convencional	38
4.6.5.1.1 Hemaglutinação Indireta (HAI)	38
4.6.5.1.2 Teste Imunoenzimático (ELISA)	39
4.6.5.2 Sorologia não-convencional	40
4.6.5.2.1 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo	40
4.6.5.2.1.1 Obtenção <i>do T. cruzi</i>	40
4.6.5.2.1.2 Cultivo e preparações antigênicas	41
4.6.5.2.1.3 Reação de Imunofluorescência indireta por citometria de fluxo anti-formas tripomastigotas vivas – AATV	41
4.6.5.2.1.4 Obtenção dos dados de citometria de fluxo	42
4.6.5.2.1.5 Percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP)	44
4.6.5.2.1.6 Definição do ponto de corte	45
4.7 Critério de cura	45
4.7.1 Interpretação dos resultados	45
4.8 Análise estatística	46
5.0 Resultados	47
5.1 Avaliação epidemiológica dos pacientes	48

5.2 Avaliação da evolução clínica dos pacientes	49
5.3 Avaliação do perfil laboratorial empregando o critério de cura atual	51
5.3.1 Avaliação parasitológica	51
5.3.1.1 Hemocultura	51
5.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase	51
5.3.2 Avaliação sorológica	53
5.3.2.1 Sorologia convencional (HAI e ELISA) e não-convencional (pesquisa de AATV) pós-tratamento	53
5.4 Interpretação dos resultados laboratoriais utilizados como critério de cura	53
5.5 Comparação dos resultados laboratoriais dos pacientes obtidos antes e nove anos após tratamento	53
5.5.1 Reação de ELISA	53
5.5.2 Pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota Vivo (AATV) pela citometria de fluxo	55
5.6 Padronização e estabelecimento dos critérios de interpretação para um ensaio imunoenzimático semiquantitativo aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas	56
5.7 Utilização da metodologia de ELISA semiquantitativa na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas	58
5.8 Estabelecer um método alternativo de análise da metodologia de ELISA semiquantitativa e da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas	64
6.0 DISCUSSÃO	67
7.0 CONCLUSÕES	81
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
9.0 ANEXOS	101

1.0 INTRODUÇÃO

A descoberta da doença de Chagas foi uma das mais completas e bem sucedidas da história da biologia e da patologia parasitária humana. Pela primeira vez na história, um mesmo pesquisador descobriu a doença, seu agente etiológico, vetor, reservatórios domésticos e silvestres, e animais de laboratório susceptíveis à infecção (COURA, 1997).

A história natural da doença de Chagas tem sido amplamente estudada. Carlos Chagas definiu duas fases evolutivas que denominou de aguda e crônica e fez a observação sobre o evidente contraste entre a elevada prevalência de casos crônicos frente à pequena incidência de casos agudos (CHAGAS, 1911).

Na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, são consideradas três formas clínicas principais: indeterminada, cardíaca e digestiva (PRATA, 1990). Entre os fatores que atuam na patogênese da doença de Chagas, existem alguns inerentes ao parasito, como por exemplo, seu polimorfismo, tropismo, constituintes antigênicos, carga parasitária; outros, porém, estão relacionados ao hospedeiro, como: constituição genética, sexo, idade e resistência natural (TAFURI, 1987). Portanto, a exemplo do que sucede nas doenças infecciosas em geral, múltiplos são os fatores envolvidos na doença de Chagas e em grande parte desconhecidos.

Visando estimar a prevalência da doença de Chagas no Brasil, foi realizado um inquérito sorológico em nível nacional, entre os anos de 1975-1980, sendo encontrados 8,8% de prevalência da doença de Chagas em Minas Gerais. Este estado foi considerado um dos mais endêmicos do país (CAMARGO e cols, 1984), constituindo o Vale do Jequitinhonha uma das áreas mais afetadas com prevalência estimada de 35,5%.

Neste mesmo período, foi realizado um combate exaustivo ao principal vetor da doença de Chagas, o *Triatoma infestans*, utilizando inseticida de ação residual. No ano de 1983 a dedetização alcançou todas as áreas do país reconhecidas como endêmicas para o mal de Chagas (VINHAES e DIAS, 2000).

Nos anos de 1989-1999 foi realizado um inquérito sorológico nacional em crianças na faixa etária de 7 a 14 anos e nascidas após o início do Programa de Controle da doença de Chagas, que revelou uma prevalência de 0,14% (VINHAES e DIAS, 2000). Esse resultado confirmou a eficácia do programa de combate ao *T. infestans*, e,

em 2001, Minas Gerais alcançou o certificado de interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas (DIAS, 2002).

Apesar do grande esforço das autoridades sanitárias em conter a transmissão da doença de Chagas, tanto por via vetorial (com o uso de inseticidas de ação residual, que promoveu uma drástica diminuição na densidade triatomínica) quanto por via transfusional (DIAS, 2002), existe ainda um número muito grande de pessoas com esta infecção ou que necessitam de tratamento, e um grande contingente de mulheres em idade fértil, capazes de transmitir a infecção para o recém-nascido (BLANCO e cols, 2000).

Esta endemia abrange uma região que vai do sul dos Estados Unidos passando pelo México, América Central e América do Sul. Em toda área endêmica, existem cerca de, 13 milhões de pessoas infectadas e 40 milhões em risco de adquirir a infecção. (WHO, 2005). Atualmente, 15 países possuem transmissão vetorial sendo que Uruguai, Chile e Brasil receberam o certificado de eliminação da transmissão vetorial pelo *T. infestans* em 1998, 1999 e 2000, respectivamente (WHO, 1998, 1999 e 2000).

No Brasil, 80% da área endêmica está sob vigilância epidemiológica, com taxas de infestação domiciliar por triatomíneos inferior a 5%. Da mesma forma, tem sido observada forte redução da infecção entre doadores de sangue segundo dados da hemorrede pública (DIAS, 1998). É de se esperar também, a redução dos casos de transmissão congênita uma vez que no prazo de 10 anos, praticamente não existirão mulheres em idade fértil infectadas pelo *T. cruzi* (DIAS, 1989). No entanto, existirá ainda um contingente de indivíduos já infectados que cientes ou não de sua condição clínica, buscarão atendimento na rede pública de saúde (Sistema Único de Saúde) convertendo-se em questão básica para as autoridades sanitárias. Merece destaque especial os candidatos à doação de sangue com sorologia positiva para o *T. cruzi* (ARAÚJO e cols, 2000).

Estimativas do Banco Mundial nos dá uma idéia da importância social das distintas doenças infecciosas na América Latina em termos de anos de vida útil perdidos, colocando a doença de Chagas no quarto lugar, depois das infecções respiratórias, da doença diarreica aguda e da AIDS (SCHMUNIS e cols, 1994).

A terapêutica etiológica da doença de Chagas já ultrapassou a fase experimental e a sua aplicação clínica permitiu ao médico, diante do paciente com doença de Chagas, assumir uma nova atitude abandonando a prática de mero espectador de um fenômeno sabidamente conhecido, a evolução natural da doença, para tentar modificar esta evolução, mediante o uso de um quimioterápico ativo (CANÇADO, 1997).

1.1 Revisão da literatura

Os primeiros compostos empregados para o tratamento da doença de Chagas, após sua descoberta por Carlos Chagas em 1909, não possuíam resultados efetivos contra o parasito, como os compostos de arsênico, tártaro emético e cloreto de mercúrio, empregados experimentalmente por Mayer e Rocha Lima em 1912 (COURA e CASTRO, 2002).

Passaram-se quatro décadas sem o surgimento de nenhum medicamento que atendesse os requisitos da Organização Mundial de Saúde que preconiza que o fármaco a ser utilizado no tratamento da doença de Chagas deva ser capaz de curar parasitologicamente casos agudos e crônicos, possuir efeito em baixas doses, ser de baixo custo, não apresentar efeitos teratogênicos ou tóxicos, não necessitar de internação e não induzir resistência (BRENER, 1984).

Somente no final da década de 60 e início da década de 70, dois fármacos foram usados com relativo sucesso para o tratamento da doença de Chagas: o nirfutimox, um 5-nitrofuran [3-metil-4-(5'-nitrofurfurylideneamine)] tetrahydro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide (Bayer 2502) e o benzonidazol, que é um 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida (ROCHE 7-1051), comercializados respectivamente com os nomes de Lampit e Rochagan. Na América Latina a casa Roche comercializou o benzonidazol com os nomes Rochagan®, Radanil®, Rodanil® e Ragonil®. Esses dois compostos mostraram alta atividade experimental *in vivo* e *in vitro* contra o *T. cruzi* (COURA e CASTRO, 2002).

O nifurtimox atua em nível mitocondrial, através da geração de radicais de O₂ e H₂O₂ por nitroredutases que são compostos reativos capazes de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas. Sendo o *T. cruzi* deficiente em mecanismos de detoxificação tornam-se susceptíveis a tais intermediários (anion superóxido e peróxido de hidrogênio) (COURA e CASTRO, 2002).

O benzonidazol atua por mecanismo diferente, que envolve a modificação covalente de macromoléculas por intermediários nitroreduzidos que interagem com o DNA do *T. cruzi* resultando em degradação e inibição da biossíntese dessas macromoléculas (COURA e CASTRO, 2002).

No final da década de 60, diversos pesquisadores sugeriram os benefícios do tratamento com nifurtimox ou benzonidazol na fase aguda e crônica da infecção (CERISOLA, 1977). Estes pesquisadores demonstraram através de estudos clínicos, o efeito benéfico do tratamento específico em pacientes na fase aguda, incluindo doença de Chagas congênita até um ano e crianças na fase crônica até cinco anos (CERISOLA e cols, 1975; FERREIRA, 1976; ANDRADE e cols, 1996, 1998, 2004).

Passaram-se vinte anos de descrença no tratamento de pacientes na fase crônica devido entre outros fatores à hipótese da existência de fenômenos de auto-imunidade e dos efeitos colaterais oriundos do tratamento, sendo o mesmo recomendado somente para fase aguda da infecção (SOSA-ESTANI e cols, 2006).

Os efeitos colaterais mais frequentes com o uso de nifurtimox são anorexia, perda de peso, alteração psíquica, excitação ou alteração do sono e manifestações digestivas como náusea, vômito, cólicas e diarreia. As reações adversas com o uso de benzonidazol (Tabela-1) podem ser classificadas em três grupos: (i) sintomas de hipersensibilidade, (ii) depressão da medula óssea e (iii) polineuropatia (CASTRO e cols, 1998). Desta forma, ambos, Lampit e Rochagan estão longe de serem drogas consideradas ideais pela medicina para o tratamento da doença de Chagas. No entanto, em crianças é observada maior tolerância ao tratamento com pouca ou nenhuma manifestação de efeitos colaterais (ANDRADE e cols, 1996; SOSA-ESTANI e cols, 1998; SILVEIRA e cols, 2000; ANDRADE e cols, 2004; BAHIA e cols, 2005; GUEDES e cols, 2006).

Além dos efeitos colaterais descritos, alguns pesquisadores relataram a associação do uso de benzonidazol com neoplasma maligno em transplante cardíaco, utilizando camundongo como modelo (BOCHIE cols, 1998; TEIXEIRA e cols, 1994, BESTETTI, 1997).

Bestetti (1997) relatou que a miocardite chagásica aguda é grave, mas a mortalidade é baixa. Após 30 dias de infecção pacientes não-tratados apresentaram

melhora do quadro clínico com RX e ECG normais independentemente de qualquer intervenção, porém mantendo os testes sorológicos positivos.

O composto disponível atualmente no Brasil para o tratamento da doença de Chagas é o benzonidazol, utilizado na dosagem de 5-10 mg/Kg/dia, durante 60 dias. Recomenda-se não ultrapassar a dose diária de 300mg/dia devido à estreita margem de segurança do medicamento em relação à dosagem eficaz e tóxica (URBINA e DOCAMPO, 2003) e, se for necessário calcula-se a dose total do paciente distribuída em mais de 60 dias.

Dentre as drogas também utilizadas para o tratamento da doença de Chagas podem ainda ser mencionadas o alopurinol, que demonstrou efeitos similares ao nirfutimox e ao benzonidazol, e o risedronato que são inibidores da síntese de purinas. Os derivados azólicos como o albaconazol, cetoconazol, itraconazol, posaconazol e ravuconazol o ICI195.739, o D0870 e a TAK187 estão mostrando efeitos promissores tais como o posaconazol e ravuconazol, que apresentam efeitos curativos contra o *T. cruzi*, como demonstrado por alguns autores, em infecções experimentais (GUEDES e cols, 2006; BAHIA e cols, 2005).

1.1.1 Indicações do tratamento

O tratamento da doença de Chagas foi inicialmente indicado no Brasil em 1986, durante a fase aguda de qualquer natureza, forma crônica recente (crianças e adolescentes chagásicos), forma indeterminada e cardíaca incipiente (em caráter de investigação clínica), na forma digestiva com coração normal, e em transplantes de órgãos (Segunda Reunião Anual sobre Pesquisa Aplicada em DCh realizada em 1986; OPS, 1998; WHO, 2002).

Em adultos, embora faltem evidências que garantam o sucesso dessa terapia em diferentes circunstâncias, o tratamento pode ser instituído na forma crônica recente. Para essa finalidade o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005) definiu como “recente” o período de cinco a doze anos após a infecção inicial.

Para a fase crônica de maior duração, o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas indica o tratamento na forma indeterminada e nas formas cardíacas leves e

digestivas. Não há evidências de benefícios, em relação à evolução clínica, do tratamento da doença na forma avançada.

A controvérsia sobre o tratamento na fase crônica deve-se aos diferentes resultados encontrados por diferentes pesquisadores e pela falta de padronização dos critérios de cura e de testes que atestem a eliminação do parasito. A maioria dos estudos incluem pacientes adultos na fase crônica usando diferentes esquemas terapêuticos e testes para avaliar a tolerância e eficácia do tratamento.

O Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005) não recomenda o tratamento com benzonidazol durante a gestação devido à possibilidade de causar insuficiência renal e insuficiência hepática. Nos casos de doença de Chagas congênita, foi demonstrado que o tratamento precoce (até o sexto mês após o nascimento) com nifurtimox ou benzonidazol foi efetivo em 66% a 100% dos casos. O sucesso da terapia, no entanto, irá depender, sobretudo, do diagnóstico e tratamento precoces, como demonstrado por Russomando e *cols* (1998) e Blanco e *cols* (2000). Os estudos usando nifurtimox e benzonidazol demonstram claramente que o diagnóstico e tratamento específico precoces aumentam as chances de se obter cura parasitológica reforçando a necessidade de identificação de mulheres grávidas infectadas que vivem ou emigram de regiões endêmicas, e de diagnóstico e tratamento precoce dos recém-nascidos (SCHIJMAN e *cols* 2003).

Achados recentes têm confirmado que a utilização do tratamento é benéfica para o paciente em todas as fases da doença de Chagas (ANDRADE e *cols*, 2003), uma vez que ele pode prevenir sua evolução clínica, melhorando o prognóstico (HIGUCHI, 1995; ANDRADE e *cols*, 1998; SOSA-ESTANI e *cols*, 1998; BAHIA-OLIVEIRA e *cols*, 2000).

O tratamento em grande escala em áreas endêmicas pode também diminuir a parasitemia de indivíduos infectados na população, como relatado por alguns pesquisadores (SOSA-ESTANI e *cols*, 1998; SOSA-ESTANI e SEGURA 1999; SOSA-ESTANI e SEGURA, 2006 BRAGA e *cols*, 2000; DE CASTRO e *cols*, 2006), reduzindo provavelmente o risco de transmissão como salientado por Ferreira (1976) que relatou a importância da eliminação do *T. cruzi* da corrente sanguínea de pacientes

com doença de Chagas crônica, como uma medida que poderá contribuir para a interrupção da cadeia de transmissão da doença em áreas endêmicas.

1.1.2 Tratamento na fase aguda da doença de Chagas

Na fase aguda, o tratamento deve ser realizado em todos os casos, e o mais rápido possível após confirmação diagnóstica, independente da via de transmissão. Nesse sentido considerando os ensaios clínicos realizados no Brasil e na Argentina demonstrando a eficácia do tratamento na fase crônica recente, considera-se que devem ser tratadas todas as crianças com idade igual ou inferior a 12 anos, com sorologia positiva. A doença de Chagas na fase aguda é de notificação compulsória, segundo o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005) e previamente estabelecido pelo próprio Ministério da Saúde.

Cerisola e cols (1975) foram os pioneiros a encontrar sorologia negativa em 80% dos pacientes tratados na fase aguda da doença de Chagas.

Ferreira (1976) empregando diferentes posologias do benzonidazol em 20 pacientes na fase aguda e crônica da infecção obteve melhores resultados com a dose de 6-10mg/kg/dia durante 60 dias. Neste trabalho os pacientes foram avaliados durante um ano por xenodiagnóstico, reação de imunofluorescência e reação de fixação do complemento. Os pacientes tratados na fase aguda apresentaram melhora após 48 horas de iniciado o tratamento com desaparecimento de todos os sintomas após duas semanas. Foram considerados curados 70% dos pacientes tratados na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. As avaliações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas dos pacientes não revelaram diferenças significativas antes e depois do tratamento pelo Benzonidazol.

Ferreira (1988) relatou cura em sete de 10 (70%) dos pacientes tratados na fase aguda. Andrade (1996) encontrou 55,8% de soro-conversão (positivo para negativo) em crianças tratadas (7,5mg/kg/dia durante 60 dias) com benzonidazol acompanhadas por 3 anos, e 5,5 % de soro-conversão (positivo para negativo) em pacientes que receberam placebo em um total de 130 crianças. Os resultados da avaliação eletrocardiográfica não mostraram diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratado, mas o autor não contra indicou o tratamento com benzonidazol.

Dias e Coura (1997) em um acompanhamento de pacientes com doença de Chagas aguda tratados com benzonidazol por um período de dez a vinte anos, observaram cura em 75% dos casos.

Segundo Brener e cols (1993), o emprego do benzonidazol no tratamento específico durante a fase aguda da doença de Chagas tem alcançado índices de cura de 50-70% dos casos. Esses dados fortalecem ainda mais a importância do diagnóstico e tratamento precoces para o sucesso terapêutico e demonstram melhor atividade anti-tripanosomicida desse medicamento na fase aguda da doença de Chagas.

Andrade e cols (1998) comparando 141 crianças de 7 a 12 anos soropositivas não tratadas com 282 soronegativas encontraram 11,3% de alterações eletrocardiográficas no grupo soropositivo e 3,5% de alterações eletrocardiográficas nos soronegativos.

Brito e cols (2001) realizaram um trabalho com 87 pacientes com infecção por *T. cruzi* tratados, 37 na fase aguda e 48 na fase crônica. Os autores utilizaram 58 pacientes assintomáticos como grupo controle os quais só receberam placebo. Foi obtida negatificação da PCR em 73% dos casos tratados na fase aguda e 65% dos tratados na fase crônica. Os autores sugerem a utilização da PCR como padrão ouro para controle de cura parasitológica, mesmo tendo apresentando resultados negativos em 47% dos pacientes não tratados. Este resultado de baixa sensibilidade da PCR pode refletir a parasitemia intermitente, usualmente encontrada em pacientes com doença de Chagas e até mesmo naqueles que foram tratados e não apresentaram cura parasitológica.

Andrade (2004) encontrou 64% de soro-conversão (positivo para negativo) no grupo tratado e 21% de soroconversão no grupo não-tratado em um acompanhamento de seis anos em crianças de 7-12 anos de idade tratadas com benzonidazol (7,5mg/kg/dia durante 60 dias). Após três anos, foi observada maior diminuição dos anticorpos no grupo tratado, em comparação ao grupo não-tratado e nenhum caso de alteração do ECG nos pacientes tratados.

Os trabalhos sobre tratamento da infecção pelo *T. cruzi* demonstram que, se instituído precocemente, o tratamento promove cura em grande parte dos pacientes infectados que ainda não evoluíram para a fase crônica da infecção. No entanto, o

rápido restabelecimento do quadro clínico do paciente, o grande número de pacientes oligo ou assintomáticos, assim como a breve duração da sintomatologia aguda, quando esta existe (aproximadamente quatro semanas), dificultam o diagnóstico na fase aguda da infecção. Desta forma, a infecção progride para a fase crônica, onde se encontra a maioria das pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e quando o tratamento é menos eficaz e apresenta grande controvérsia de resultados como será descrito a seguir.

1.1.3 Tratamento na fase crônica da doença de Chagas

No final da década de 80, a impressão de que o benzonidazol não tinha ação nem efeito sobre a evolução da doença de Chagas crônica, a qual seria predominantemente imuno-dependente, desestimularam o tratamento da doença de Chagas e até mesmo a publicação de resultados de tratamentos realizados em pacientes na fase crônica (COURA e cols, 1997).

Os estudos revelavam que a indicação do tratamento na fase crônica não trazia segurança devido às dificuldades relacionadas ao tempo prolongado do tratamento com drogas tóxicas potencialmente carcinogênicas (TEIXEIRA e cols, 1989-1990) e às restrições na avaliação do controle de cura devido à baixa parasitemia e a baixa sensibilidade das técnicas em detectar o parasito.

No entanto com os avanços, sobretudo da biologia molecular, e posteriormente a “reabilitação” do parasito como principal responsável pela patogênese da doença, mesmo na fase crônica (HIGUCHI e cols, 1993), somado à melhoria nas técnicas de diagnóstico parasitológico como imunohistoquímica e a PCR, a comprovação de melhor evolução de casos crônicos tratados com benzonidazol em relação a casos não-tratados (VIOTTI e cols, 1994), voltou o interesse pelo uso das drogas até então disponíveis, pela reavaliação e publicação de resultados de casos anteriormente tratados e, talvez, pelo emprego de novos esquemas com doses mais baixas e prolongadas, em tratamentos sucessivos (COURA e cols, 1997).

No entanto uma revisão da literatura revela, na verdade, dados bem contraditórios. Libonatti e cols (1979) em estudo feito na Argentina, não observaram diferenças eletrocardiográficas em pacientes tratados e não-tratados com nifurtimox na fase crônica da doença de Chagas.

Manzullo e cols (1982) relataram que na Argentina não houve diferenças na evolução clínica de pacientes tratados na forma indeterminada da doença de Chagas em relação aos não tratados.

Macedo e cols (1984) acompanharam pacientes durante sete anos e não encontraram alterações estatisticamente significativas no ECG de 180 pacientes tratados comparados com 89 não-tratados, ambos na forma indeterminada da doença.

Macedo e Silveira (1987), no Brasil, não encontraram diferenças estatisticamente significativas na evolução clínica de 171 pacientes na forma indeterminada, tratados e não tratados, quando acompanhados por sete anos. Dos 171, 13 apresentaram alterações eletrocardiográficas, sendo sete (6,7%) no grupo não-tratado e seis (8,8%) no grupo tratado. Este estudo nos coloca diante da necessidade de publicações que considerem as investigações longitudinais sobre a infecção chagásica crônica em pacientes curados e em comparação com grupo de pacientes não-tratados. Tais informações poderão definir a importância da presença do *T. cruzi* e seus produtos antigênicos no processo evolutivo da doença crônica.

Teixeira e cols (1989) avaliaram 38 pacientes tratados (28 com nifurtimox e 12 com benzonidazol), e acompanhados por oito anos, demonstrando que os perfis parasitológico, imunológico e eletrocardiográfico de chagásicos tratados são indistinguíveis daqueles observados nos pacientes não-tratados. Os resultados encontrados demonstraram, ainda, que o tratamento das infecções pelo *T. cruzi* com nitrofuranos tripanocidas não determinou modificações tardias nos perfis das reações imunes específicas nem tampouco na morbidade da doença de Chagas avaliada pelo eletrocardiograma.

No entanto Ferreira (1990) demonstrou cura em 10% (5/50) dos pacientes tratados com benzonidazol que se encontravam na fase crônica indeterminada da doença de Chagas acompanhados por um período médio de sete anos.

Ianni (1993), após nove anos de seguimento de 33 pacientes tratados na forma indeterminada, sendo 18 controles não-tratados, não encontrou diferença entre os grupos tratados e não-tratados. Neste trabalho, foi também relatado que até 1/3 dos pacientes tratados apresentaram sérios efeitos colaterais que levaram a interrupção do tratamento.

Miranda e cols (1994) encontraram maior porcentagem de estabilização do quadro clínico em pacientes tratados (89%) do que nos não-tratados (10,5%) em acompanhamento de 16 anos, mostrando números muito mais promissores que outros semelhantes, com doses usuais. Possivelmente o tempo maior de avaliação pós-tratamento foi importante na obtenção de melhores resultados.

Viotti e cols (1994) em um seguimento de oito anos de 131 pacientes argentinos com idade média de 46 anos tratados com benzonidazol (5- mg/kg/dia duante 30 dias) e 70 não tratados, observou menos alterações ECG no grupo tratado (4,2%) do que no grupo não-tratado (30%), sugerindo estabilização do quadro clínico. O tratamento com benzonidazol ainda diminuiu significativamente os títulos sorológicos, demonstrando cura parasitológica em dois pacientes. Foi encontrado soroconversão em 19,1% dos pacientes tratados e 6% de soroconversão nos não-tratados. A maioria dos pacientes apresentou sorologia positiva após oito anos de acompanhamento.

Em 1996, houve duas reuniões que tiveram como objetivos a coleta de experiências e demarcação das reais capacidades dos compostos conhecidos a propósito do tratamento etiológico específico da doença de Chagas. Estiveram presentes vários profissionais interessados nesse tipo de terapêutica e os encontros foram promovidos pelo Ministério da Saúde e pela Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Neste encontro foram apresentados resultados de cura de crianças até 12 anos de idade por meio de tratamento com Benzonidazol, estando elas na fase crônica da infecção, mostrando a importância de tratar indivíduos cronicamente acometidos (AMATO-NETO, 1998).

Fragata-Filho e cols (1995) acompanhando por sete anos 71 pacientes encontrou deterioração clínica mais freqüente no grupo não-tratado (14%) do que no grupo tratado (7%). O autor relatou, no entanto, grande porcentagem de pacientes com efeitos colaterais.

Coura e cols (1997) acompanharam 77 pacientes com doença de Chagas crônica, não mostrando alterações clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas um ano após o tratamento em relação ao grupo não-tratado. O breve período de acompanhamento pode ter sido responsável pelo fracasso dos resultados.

Ianni e Mady (1997) relataram após análise da literatura, que os resultados terapêuticos de pacientes com doença de Chagas crônica são absolutamente discordantes, não gerando uma indicação segura para sua utilização.

Por outro lado Sosa-Estani e cols, (1998) demonstraram uma significativa diminuição nos títulos de anticorpos medidos por IFI, HAI e ELISA, após quatro anos de acompanhamento, encontrando 62% das crianças tratadas com benzonidazol soronegativas e nenhuma do grupo placebo quando usaram como antígeno uma proteína flagelar (F29). O xenodiagnóstico foi positivo em 4.7% do grupo tratado e 51.2% do grupo controle mostrando a eficácia do benzonidazol em crianças de até 12 anos.

Gontijo e cols (1999) relataram que os estudos clínicos, mostraram a baixa eficácia do benzonidazol em pacientes na fase crônica.

Braga e cols (2000) demonstraram que o tratamento não leva a cura parasitológica em chagásicos crônicos, pois em avaliação de 17 pacientes tratados há 10 anos, 17 não tratados e 17 controles, verificaram que os resultados observados entre os dois grupos de pacientes eram iguais, revelando a necessidade de uma melhor definição para o papel do tratamento em pacientes com doença de Chagas crônica.

Fabro e cols (2000) encontraram, na Argentina, menores alterações cardíacas no grupo tratado (3,2%) do que no grupo não-tratado (7%). Encontraram, também, menor evolução da doença em tratados (5,9%) do que nos não-tratados (13%), após 14 anos de acompanhamento de 198 pacientes com forma crônica da doença de Chagas. Porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar dos pacientes tratados terem apresentado melhor evolução clínica é ainda continuava sendo necessário estabelecer melhores diretrizes, de acordo com princípios étnicos e científicos baseados no risco/benefício do tratamento para o paciente.

Silveira e cols (2000), apesar da administração do tratamento precoce e longo tempo de acompanhamento, encontraram progressão da cardiopatia chagásica ou da esofagopatia em 33% das crianças de 7-12 anos de idade na fase indeterminada (7mg/kg/dia durante 60 dias) e acompanhadas por até 20 anos.

Ianni e cols (2001) relatou que pacientes na forma indeterminada no Brasil, têm uma boa evolução, com pequeno desenvolvimento de alterações eletrocardiográficas,

sem alteração da fração de ejeção do VE, independente de qualquer intervenção terapêutica.

Cançado (2002) apresentou a investigação da taxa de cura após tratamento com benzonidazol em pacientes com doença de Chagas aguda (21 pacientes) e crônica (113 pacientes com formas clínicas diversas) acompanhados por 13 a 21 anos. A cura foi encontrada em 76% dos pacientes na fase aguda e 8% dos pacientes na fase crônica. Mesmo com a baixa porcentagem de cura, o autor justifica o tratamento na fase crônica.

Coura e Castro (2002) relataram que a ocorrência de evolução clínica após tratamento específico é controversa e que os resultados existentes na literatura não são convincentes devido a diferenças na casuística, diferentes métodos de avaliação, tempo de acompanhamento e interpretação dos dados.

Em uma revisão realizada por Villar e cols (2002) de 43 artigos indexados foram encontrados apenas cinco estudos com desenho estatístico, de acordo com a Medicina Baseada na Evidência, com ensaios clínicos prospectivos, randomizados, duplo cego, entre outros. Dois estudos foram realizados em grupos de adolescentes e três em adultos (Andrade e cols, 1996; Sosa-Estani e cols, 1998; Coura e cols, 1997). Em outra publicação de análise retrospectiva de estudos de tratamento apresentada por Coura (2004), foram expostos os resultados de destacados grupos brasileiros que tinham realizado experiências de tratamento na fase crônica, sendo uma característica comum a baixa porcentagem de curados – com uma média de 8%, e um tempo de acompanhamento dos pacientes inferior aos 10 anos. Finalmente, o grupo de Luquetti e Rassi (2002) publicaram preliminarmente, os resultados do acompanhamento sorológico de um dos maiores grupos de pacientes tratados na América Latina, demonstrando que a soroconversão dos pacientes adultos curados só se verificava após 10-15 anos pós-tratamento. Este grupo verificou diferença entre outros estudos nos quais a cura parasitológica foi de 20 a 25% (Luquetti e Rassi, 2002).

Streiger e cols (2004) não encontraram diferença estatisticamente significativa na situação clínica de 95 crianças (1 a 14 anos) com doença de Chagas tratadas (71) e não-tratadas (24) durante acompanhamento médio de 8 a 24 anos. Estes autores apenas relataram que a porcentagem de cura é maior quanto menor for a idade do paciente.

Zulantay e cols (2005) na Argentina, não observaram diferenças entre a melhoria no traçado eletrocardiográfico e a persistência do parasita em 30 pacientes tratados com Alopurinol e Itraconazol acompanhados por sete anos. No entanto a efetividade demonstrada desses dois medicamentos na fase crônica foi inferior ao benzonidazol e nifurtimox.

Reyes e Vallejo (2005) concluíram que não existem evidências suficientes para definir os efeitos do Rochagan e Nifurtimox para tratar pessoas com cardiopatia chagásica crônica concordando assim com as conclusões de Ianni e Mady (1997).

Diversos estudos realizados através de testes sorológicos e parasitológicos demonstraram cerca de 90% de efetividade do tratamento em crianças tratadas na fase aguda e 70% de efetividade do tratamento de crianças na fase crônica recente (ANDRADE e cols, 1996; SOSA-ESTANI e cols, 1998; RUSSOMANDO e cols, 1998 e STREIGER e cols, 2004). Por outro lado, não se conseguiu demonstrar as mesmas taxas de efetividade em pacientes adultos com doença de Chagas crônica (FABRO e cols, 2000 e VIOTTI e cols, 2006).

Os resultados de Viotti e cols (2006) sugerem melhoria, mas não comprovam que o tratamento traga benefícios para os pacientes na fase crônica. Os autores relatam a necessidade da realização de um estudo randomizado, duplo-cego, para confirmar o benefício do tratamento nesses pacientes.

Na realidade, ainda não se sabe a dimensão em que ocorre a cura, podendo variar de 6,0% a 36,0%, dependendo de quem interpreta os resultados e dos critérios de cura empregados (PRATA, 2001).

Embora o impacto dos pacientes com doença de Chagas crônica possa diminuir em longo prazo, se novos pacientes não forem mais infectados, no momento atual ele se torna prioritário. Tais pacientes representam grande sobrecarga para os serviços de saúde, necessitando de cuidados especiais nos diversos níveis de atendimento, uma das atribuições previstas na vigilância epidemiológica da doença (DIAS, 2000). De qualquer modo, na perspectiva de programas de saúde pública, não há indicação de tratamento em larga escala para adultos na fase crônica (Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2005).

Quando o tratamento é usado para pacientes na fase crônica, é observada uma diminuição raramente muito baixa no título de anticorpos. A diminuição dos títulos pode iniciar após cinco ou mais anos, e depende da idade em que o paciente recebeu o tratamento e o período de acompanhamento destes pacientes. Taxa de cura parasitológica muito variada têm sido relatadas em pacientes tratados na fase crônica da infecção por pesquisadores que foram capazes de acompanhar estes pacientes por períodos de 10-20 anos (CANÇADO, 2002; VIOTTI e cols, 2006).

1.1.4 Critério de cura na doença de Chagas

Existem duas categorias de testes para avaliar a cura do tratamento específico anti-*T. cruzi*: os testes parasitológicos, que buscam a demonstração do parasito (hemocultura e xenodiagnóstico), e os testes sorológicos incluindo a sorologia convencional como por exemplo a ELISA, IFI e HAI e a sorologia não-convencional, que pesquisa um anticorpo lítico presente em infecções ativas através das técnicas de Lise Mediada pelo Complemento ou a pesquisa de anticorpo anti-tripomastigota vivo (AATV) pela Citometria de Fluxo (MARTINS-FILHO e cols, 1995, CORDEIRO e cols, 2001). Uma outra alternativa é a utilização de técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) que procuram a detecção de kDNA do parasito (BRITO e cols 2001; CASTRO e cols, 2002; GALVÃO e cols, 2003).

Galvão (1993) demonstrou uma diferença significativa entre o comportamento parasitológico e sorológico dos pacientes tratados. Com este trabalho foi possível classificar os pacientes de acordo com os resultados dos exames parasitológicos, sorologia convencional e não-convencional. Foram considerados curados, aqueles pacientes que apresentaram exames parasitológicos negativos, sorologia convencional e não-convencional negativas (8,5%), não curados aqueles que apresentaram exames parasitológicos positivos e/ou negativos, sorologia convencional e não-convencional positivas (42,5%), oscilantes aqueles em que não foi possível tirar quaisquer conclusões (21,0%) uma vez que os resultados da sorologia convencional e não-convencional eram oscilantes entre positivo/negativo; e dissociados aqueles que apresentaram sorologia convencional positiva e sorologia não-convencional negativa (28%). Se os pacientes considerados dissociados, apesar da sorologia convencional positiva, fossem considerados curados, a porcentagem de cura na infecção chagásica crônica aumentaria para 36,5%.

Uma corrente de pesquisadores só considera como curados os pacientes que apresentam, além da negatificação dos testes parasitológicos, a sorologia convencional também negativa, o que pode acontecer muitos anos após o desaparecimento do parasito. Outra corrente considera curados os pacientes dissociados (Galvão e cols, 1993; Martins-Filho e cols 1995) que apresentam testes de sorologia não-convencional (pesquisa de anticorpo lítico ou anticorpos anti-tripomastigota vivo – AATV pela citometria de fluxo) negativos o que pode ocorrer antes da negatificação da sorologia convencional, desde que acompanhados de exames parasitológicos (xenodiagnóstico e/ou hemocultura) também repetidamente negativos. No entanto, a OPS (1998) e a WHO (2002) só aceitam como critério de cura a negatificação simultânea dos exames parasitológicos e da sorologia convencional.

Cançado e cols (1973) consideram que o prazo de controle parasitológico de um ano poderia ser o bastante para demonstrar o desaparecimento do *T. cruzi*, desde que os pacientes revelem elevada parasitemia antes do tratamento. Os autores julgam indispensável que as reações sorológicas negativem ou caiam a títulos mais baixos que os da fase anterior ao tratamento para que se possa afirmar que houve desaparecimento do *T. cruzi*.

Prata (2001) relatou que os títulos de anticorpos podem diminuir, mas não necessariamente indicam cura uma vez que alguns pacientes acompanhados por longo tempo mostraram evolução da doença.

Castro e cols (2002), avaliando o parasitismo em 60 pacientes, verificaram que 70% deles apresentaram hemocultura positiva e 86,7% apresentaram PCR positiva. Houve concordância entre a positividade da PCR e a hemocultura em 41,1%. Os autores relatam a importância de se estudar a parasitemia do paciente antes de se iniciar o tratamento, sugerindo também a utilização de no mínimo duas amostras de sangue de cada paciente e no mínimo dois testes para se ter um aumento considerável no diagnóstico parasitológico utilizado para avaliação da eficácia terapêutica.

Sosa-Estani e cols em 1998, utilizando o antígeno recombinante F29 como critério de cura em 95 crianças de seis a 12 anos tratadas com Benzonidazol, observou a soroconversão para não-reativo em 62% dos indivíduos comparada com 11,3% encontrados na sorologia com os antígenos convencionais, demonstrando a importância

de se usar antígenos recombinantes no auxílio do critério de cura para pacientes tratados.

Cançado (1999) relata que em acompanhamentos prolongados são obtidos resultados negativos em testes parasitológicos, indicando cura, porém esses resultados podem estar refletindo períodos de ausência ou de baixa parasitemia, pois o autor admite que em alguns casos a parasitemia é reduzida, mas a doença não é curada. No entanto a cura da fase aguda é acompanhada pela negativação completa e persistente dos testes sorológicos quando feitos cerca de um ano após o tratamento. Na verdade é que na fase crônica, por razões não conhecidas, a soro-conversão é baixa, levando anos para negativação dos testes, necessitando de longos períodos de acompanhamento. Para este autor a cura da doença de Chagas é baseada não somente em xenodiagnóstico e hemocultura, mas também na eliminação de anticorpos específicos detectados na sorologia convencional e não-convencional, como demonstrado em um trabalho feito com 134 pacientes com doença de Chagas e tratados na fase aguda (21) e crônica (113) que demonstrou cura de até 76% na fase aguda e de apenas 8% na fase crônica (CANÇADO, 1999).

O critério de cura constitui um aspecto controverso entre os pesquisadores, principalmente pela ocorrência de resultados contraditórios entre os testes de sorologia não-convencional (LMCo e a pesquisa de AATV) e a sorologia convencional (ELISA, IFI, HAI) como mencionado anteriormente. Estes últimos podem continuar positivos por muitos anos após o tratamento (CANÇADO, 1999). Deste modo, o critério de cura em doença de Chagas deve ser um somatório dos resultados de várias técnicas, tais como métodos parasitológicos diretos e indiretos, moleculares, sorológicos, sejam eles da sorologia convencional ou não-convencional, aliados à melhora ou desaparecimento dos sintomas clínicos do paciente (CANÇADO, 1999).

Por consequência, em áreas de campo são poucos os estudos controlados sobre a terapêutica específica, onde o acompanhamento dos pacientes torna-se difícil, por falta de condições laboratoriais e de profissionais capacitados para fazê-lo adequadamente (COURA e cols, 1997).

1.1.5 Doença de Chagas em Berilo

Através do serviço Nacional de Malária, foi realizado no final dos anos 40, o primeiro estudo entomológico do Vale do Jequitinhonha. Em meados da década de 70, um inquérito sorológico no município de Berilo, revelou 35,5% de prevalência para infecção pelo *T. cruzi*. Em 1982, a SUCAM encontrou o *Panstrongylus megistus* em 69,5% das espécies capturadas com 13,1% de triatomíneos infetados com o *T. cruzi*.

Dias e cols (1985), através do Centro Regional de Diamantina e a Fundação Oswaldo Cruz, foram os primeiros a realizar um inquérito de soro-prevalência em Minas Gerais. Analisando uma amostra não selecionada de 3.730 pessoas os autores encontraram 35,1% de prevalência de infecção pelo *T. cruzi* na região do Vale do Jequitinhonha.

Entre os anos de 1985-1986, duas borrifações com BHC (fase de ataque) foram realizadas na cidade de Berilo. Na primeira avaliação realizada em 1987, foram constatadas as conseqüências benéficas destas ações refletidas na diminuição do número de triatomíneos capturados no intradomicílio.

Aguilar (1988), utilizando o teste de imunofluorescência indireta em eluatos de sangue coletado em papel de filtro, examinou 1.150 pacientes habitantes de diferentes localidades do município, e encontrou uma prevalência de 12,7% de pessoas soropositivas em Berilo. Em um estudo feito com 177 pacientes chagásicos e não-chagásicos que fizeram parte de um estudo seccional, foram obtidas informações de ocorrência de morte de 21 pacientes durante o período de os 10 anos de observação. A mortalidade geral entre os soropositivos foi de 1,9% ao ano, 5,6% vezes maior do que no grupo soronegativo. A letalidade da cardiopatia foi de 2,6% ao ano. A morte súbita foi mais freqüente do que a morte por insuficiência cardíaca congestiva. Em dez anos, a doença de Chagas evoluiu progressivamente em 28% dos pacientes soropositivos. A evolução progressiva foi mais freqüente entre os pacientes que já tinham eletrocardiogramas alterados (Aguilar, 1988).

Montoya (1998) realizou um estudo seccional de 1987 a 1997 sobre a morbidade da doença de Chagas no município de Berilo avaliando 2.261 indivíduos encontrando uma prevalência geral de 18% e de 50% para os maiores de 30 anos. Não foi encontrada

soropositividade entre os menores de 10 anos examinados, sugerindo que a transmissão vetorial estava controlada na área.

Em áreas onde os triatomíneos domiciliados foram controlados, o cenário é composto por conseqüente eliminação da infecção chagásica constatada pela sua baixa prevalência em crianças e jovens (MONTTOYA e cols, 2003)

Em Berilo a incidência de cardiopatia chagásica foi de 1,5% ao ano (MONTTOYA, 1998). Incidência semelhante à encontrada no município vizinho, Virgem da Lapa, por Borges-Pereira e cols (1992). Montoya (1998) encontrou no município de Berilo, através de um estudo pareado entre soropositivos e soronegativos para a infecção pelo *T. cruzi*, uma prevalência de alterações eletrocardiográficas de 55,7% entre os pacientes com doença de Chagas e 13,7% nos indivíduos do grupo controle, demonstrando a alta prevalência de cardiopatia neste município entre os indivíduos com doença de Chagas.

Segundo registros do cartório local, a doença cardíaca é a primeira causa de morte na população adulta, cabendo à doença de Chagas um importante lugar como causa de morbidade associada à mortalidade.

Com o intuito de verificar se a vigilância epidemiológica implantada na região de Berilo estava sendo bem conduzida, Borges e cols (2006) realizaram um estudo sobre a soroprevalência da doença de Chagas em escolares de 7-14 anos residentes do município de Berilo e encontraram uma prevalência de 0,53%, sugerindo que a transmissão vetorial estava controlada na região.

Machado de Assis (2006) avaliou o programa de controle da doença de Chagas no município de Berilo encontrando 35 unidades domiciliares positivas e um total de 391 triatomíneos capturados, sendo 72% da espécie *Panstrongylus megistus* e 28% da espécie *Triatoma pseudomaculata*. Esta última espécie, considerada secundária na região Sudeste e também no Vale do Jequitinhonha, apresentou aumento considerável e pela primeira vez foi constatada sua domiciliação em Minas Gerais, aspectos estes que demonstram uma crescente importância deste vetor na região (Machado de Assis, 2006). Nenhum destes triatomíneos apresentou infecção pelo *T. cruzi* e mais uma vez a espécie *Triatoma infestans* não foi encontrada. No entanto, é importante ressaltar que a continuidade predominante da presença do *P. megistus* na região e a crescente

importância de espécies secundárias indicam a necessidade de atualização e aperfeiçoamento da vigilância epidemiológica na região.

2.0 JUSTIFICATIVA

Considerando a existência no município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, de pacientes com diagnóstico prévio da doença de Chagas, tratados especificamente com benzonidazol e nunca avaliados pós-tratamento, os baixos índices de cura obtidos com este composto e a contradição dos resultados das avaliações de resposta ao tratamento encontrado na literatura, particularmente em adultos na fase crônica da doença, o projeto se justifica na tentativa de verificar a eficácia terapêutica deste tratamento e seu impacto na evolução clínica da doença de Chagas após nove anos de sua administração, em um grupo de pacientes de uma região endêmica com transmissão vetorial controlada e sob vigilância epidemiológica efetiva.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de pacientes do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, tratados há nove anos com benzonidazol.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a situação epidemiológica dos pacientes.
- Avaliar a evolução clínica dos pacientes;
- Avaliar o perfil laboratorial empregando o critério de cura atual;
- Comparar os resultados laboratoriais dos pacientes obtidos antes (1997) e nove anos após (2006) o tratamento etiológico considerando a forma clínica do paciente;
- Padronizar e estabelecer critérios de interpretação para um ensaio imunoenzimático semiquantitativo aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas;
- Utilizar a metodologia de ELISA semiquantitativa na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas;
- Estabelecer um método alternativo de análise da metodologia de ELISA semiquantitativa e da pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo (AATV) pela citometria de fluxo na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da Doença de Chagas.

4.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS

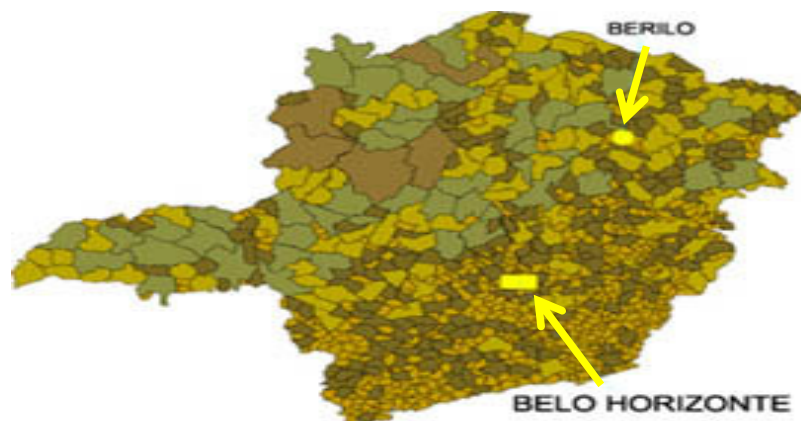
4.1 Área de estudo

Este estudo foi desenvolvido no Município de Berilo, pertencente ao Vale do Jequitinhonha, MG. Como outras cidades da região, Berilo tem suas origens ligadas à exploração de ouro e diamantes. Em 1759, já era mencionada como freguesia de Minas Novas, com 4.132 habitantes e 464 casas. Em meados do século XVIII, com a escassez do ouro e diamantes, a população descobriu nas terras férteis, às margens do rio Araçuaí, a opção pela agricultura plantando principalmente milho e algodão.

Em 1877, passou a se chamar Água Limpa; que só recebeu o nome Berilo em 1923, quando ainda pertencia ao distrito de Minas Novas, de onde se emancipou apenas em 1962. Com área territorial de 586 quilômetros quadrados, o município se localiza no nordeste do estado de Minas Gerais, e limita-se com os municípios de José Gonçalves de Minas, que se emancipou de Berilo em 1997, Francisco Badaró, Virgem da Lapa, Chapada do Norte, Cristália e Grão Mogol.

A sede do município, com infra-estrutura urbana, está a 436 metros de altitude e distância de 660 quilômetros de Belo-Horizonte, a capital do Estado (**Figura - 01**).

Figura – 01 Localização do município de Berilo no Estado de Minas Gerais.



Segundo o censo de 2007, Berilo apresenta uma população de 13.197 habitantes, sendo 23% na zona urbana e 77% na zona rural. O município é dividido em um distrito e 35 comunidades e possui, desde 1998, um hospital de 40 leitos.

4.2 Avaliação dos pacientes.

Inicialmente 34 dos 36 pacientes tratados por Montoya em 1998 foram localizados e convidados pelos agentes de saúde da Secretaria Municipal de Saúde a comparecer no Hospital Municipal de Berilo para serem submetidos a avaliações laboratoriais e clínicas. Foi oferecido ao paciente um esclarecimento dos objetivos do estudo a ser realizado e das avaliações laboratoriais e clínicas a que eles seriam submetidos. Aqueles que concordaram em participar do projeto assinaram após leitura, o Termo de Consentimento aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou - Fiocruz, Proc. 07/2002 (**Anexo I**).

4.3 Informações anteriores ao tratamento

Dos pacientes localizados foram encontradas as informações clínicas e laboratoriais de 25 pacientes obtidas e registradas antes da administração do tratamento, bem como o esquema terapêutico ao qual foram submetidos. Estas informações foram resgatadas dos arquivos do Dr. Roberto Montoya Araújo, enquanto aluno de Doutorado do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, para serem comparadas com os dados obtidos ao longo deste trabalho. Todas as informações estavam anotadas em fichas clínicas e catalogadas no Laboratório de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ. Três dos 34 pacientes nunca foram localizados pelo fato de terem migrado para outro destino não atendendo ao nosso convite nem mesmo após ajuda de seus familiares e amigos.

4.3.1 Diagnóstico laboratorial e clínico

Todos os 31 pacientes apresentaram sorologia reativa nas reações de ELISA e Imunofluorescência Indireta (IFI) com resultados 100% concordantes no ano de 1997, não necessitando de uma terceira técnica para confirmação do diagnóstico. A absorbância (D.O) na reação de ELISA variou de 0,248 a 1,328 e os títulos sorológicos de 40 a 320 na imunofluorescência indireta.

A faixa etária dos pacientes antes do tratamento variou de 6 a 37 anos, três estavam com menos de doze anos de idade e quatro com menos de 20 anos de idade. Dezenove dos 25 pacientes apresentavam a forma indeterminada da doença de Chagas, cinco apresentavam alguma alteração cardíaca e um apresentava sintomatologia digestiva (**Tabela I**). Em seis dos 31 casos não foi possível saber a

forma clínica apresentada anteriormente ao tratamento porque as anotações nas fichas clínicas não estavam legíveis. No entanto, eles também foram avaliados clínica e laboratorialmente, como os demais.

Tabela I – Faixa etária e forma clínica apresentada pelos pacientes portadores da infecção chagásica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, antes do tratamento etiológico.

Faixa etária	Número de pacientes	Forma Clínica (Nº)	Forma clínica não obtida
0-6	1	Indeterminada (1)	—
7-12	2	Indeterminada (2)	—
13-18	3	Indeterminada (2) Cardíaca (1)	—
19-24	5	Indeterminada (3) Cardíaca (2)	—
25-30	11	Indeterminada (6) Cardíaca (1) Digestiva (1)	3
31-36	7	Indeterminada (3) Cardíaca (1)	3
37-42	2	Indeterminada (2)	—
Total	31	25	6

4.3.2 Tratamento dos pacientes

Antes do tratamento, Montoya realizou exames de sangue em todos os pacientes para verificar qualquer tipo de contra-indicação, tais como insuficiência hepática e renal. Para avaliar a insuficiência hepática foram dosadas as enzimas alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase. A insuficiência renal foi avaliada pela dosagem de creatinina. Todos os pacientes se mostraram aptos a iniciar o tratamento.

Os pacientes foram tratados com o nitroderivado benzonidazol (N-benzil-2-nitro-imidazol acetamida) da Roche, nome comercial Rochagan. O esquema terapêutico adotado foi de 5-10mg/kg/dia durante 60 dias. Foram considerados como pacientes que receberam tratamento completo aqueles que tomaram o medicamento na dosagem indicada durante 50 dias ou mais (24 pacientes) e pacientes que receberam tratamento incompleto aqueles (três pacientes) que tomaram a dosagem indicada durante 40-49 dias.

Dos demais (quatro paciente) não foi possível saber exatamente como foi tomada a medicação.

Os pacientes foram submetidos a avaliações clínicas quinzenais ou em decorrência de surgimento de efeitos colaterais sobre os quais os pacientes foram advertidos previamente. Nos casos em que ocorreram efeitos adversos graves foi feita a suspensão do tratamento temporariamente, em função das avaliações clínica e laboratorial. Somente um paciente com 37 anos de idade precisou interromper a medicação durante cinco dias por causa do surgimento de efeito secundário moderado, retomando o tratamento em seguida.

Dentre as reações adversas, foram observadas: perda de apetite (13/31), astenia (11/31), exantema (8/31), dor abdominal (5/31), cefaléia (5/31), náuseas e vômitos (3/31), artralgia e mialgia (2/31). Dos 31 pacientes avaliados, 11 não apresentaram reações adversas.

Cada indivíduo foi avaliado segundo o delineamento experimental apresentado na **Figura 2**.

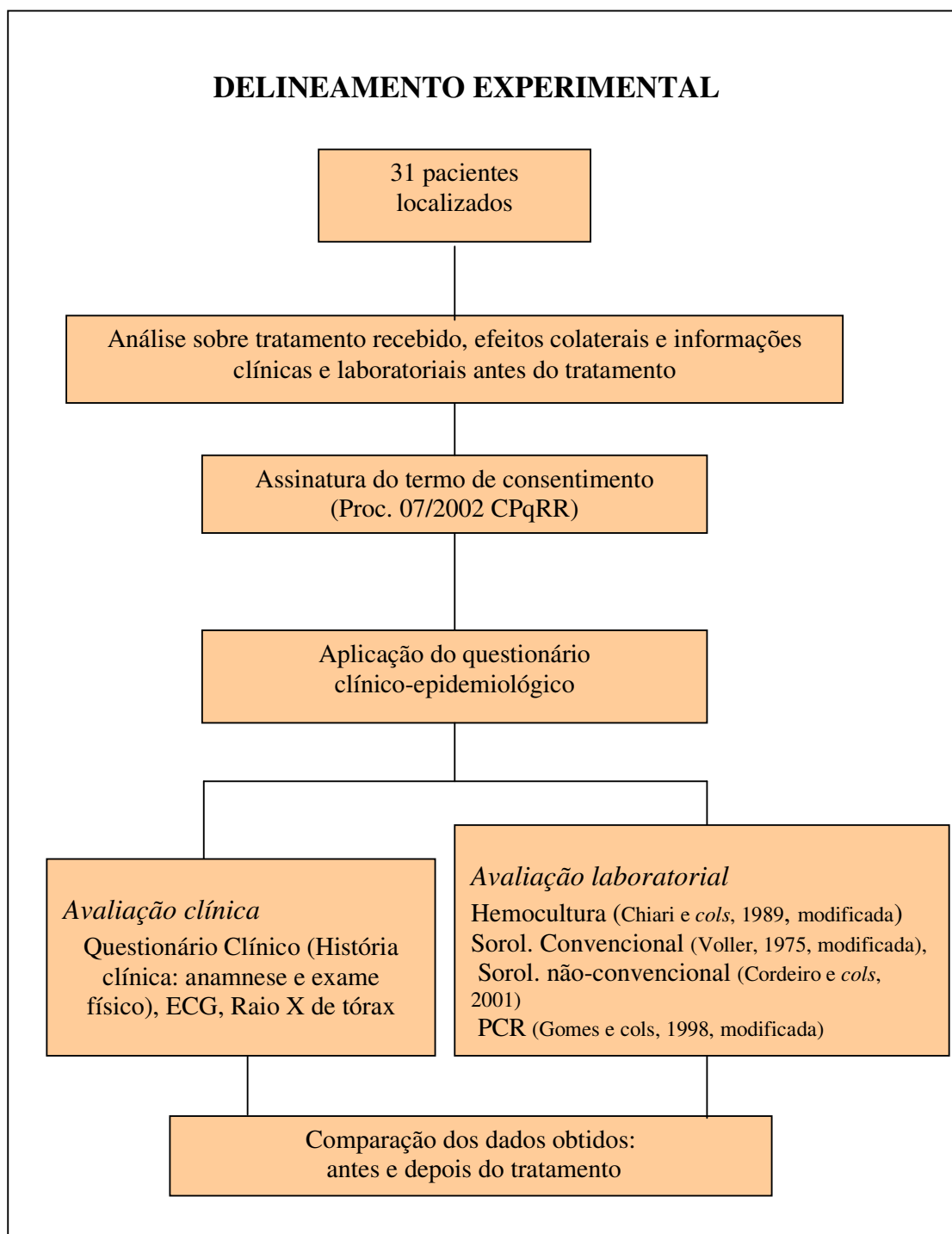


Figura 2 – Delineamento experimental.

4.4 Avaliação pós-tratamento

4.4.1 Avaliação clínica

A avaliação clínica dos pacientes foi feita mediante cuidadoso preenchimento de ficha clínico-epidemiológica (**Anexo II**), anamnese, exame físico, radiografia do tórax (RX) e eletrocardiograma (ECG). Posteriormente foi feita comparação entre os dados obtidos pelo Dr. Roberto Montoya (Montoya, 1998) antes do início do tratamento e os atuais. A classificação clínica dos pacientes foi a mesma utilizada por Montoya (1998) como descrita abaixo:

4.4.2 Estudo eletrocardiográfico

Em cada paciente foram realizados dois eletrocardiogramas, em repouso, com registro das doze derivações clássicas seguindo os mesmos critérios anteriores ao tratamento, da New York Heart Association (NYHA).

Foram considerados normais os seguintes achados eletrocardiográficos:

- (1) valores de frequência cardíaca entre 50 e 120/min,
- (2) arritmia sinusal,
- (3) padrão rr' em V1 se não estavam presentes outros critérios de bloqueio de ramo direito,
- (4) ondas R altas em V5 em indivíduos menores de 35 anos se não estavam associadas a alterações da onda T ou do segmento ST.

Os ECG foram avaliados com base nos critérios usados por Maguire e cols, (1983)

(A) ECG anormal, quando apresenta uma ou mais das seguintes alterações:

- (1) grandes ondas Q ou QS,
- (2) hipertrofia ventricular,
- (3) alterações da onda T e do segmento ST de tipo isquêmico,
- (4) bloqueio atrioventricular,
- (5) defeitos da condução intraventricular,

- (6) taquicardia supra ou ventricular,
- (7) extra-sístoles multiformes ou repetidas,
- (8) ritmo juncional,
- (9) fibrilação ou flutter atrial.

(B) ECG “boderline”, aqueles que não foram classificados como anormais e nos quais registrou-se uma ou mais das seguintes alterações:

- (1) eixo indeterminado,
- (2) intervalo PR curto,
- (3) transtornos inespecíficos da onda T e do seguimento ST,
- (4) extra-sístoles supraventriculares não repetidas,
- (5) extra-sístoles ventriculares monomórficas não repetidas,
- (6) baixa voltagem do QRS e
- (7) ondas P largas.

(C) ECG normais: ausência de qualquer uma das alterações consideradas como “boderline” ou anormal.

Na análise dos resultados eletrocardiográficos foram consideradas mais sugestivas de cardiopatia chagásica crônica as seguintes alterações:

- (1) bloqueio AV (BAV),
- (2) bloqueio de ramo direito (BRDIII),
- (3) hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE),
- (4) extra-sístoles complexas (EVC) e
- (5) zonas eletricamente inativas (ZEI).

Para avaliar os ECG foram utilizadas as duas metodologias anteriormente mencionadas porque foram as mesmas utilizadas por Montoya nove anos atrás e porque permitiam ter comparabilidade com os resultados das avaliações cardiológicas realizadas agora.

4.4.2.1 Grau de Cardiopatia

A classificação do grau de cardiopatia foi estabelecida com base em critérios clínicos e eletrocardiográficos segundo à classificação adotada por peritos da OMS/OPS (OMS/OPS, 1974), que definiu os seguintes graus:

Grau I: infecção chagásica sem indicações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas de lesão cardíaca;

Grau II: infecção chagásica com sintomatologia moderada ou nula, radiologia normal ou indicação de hipertrofia cardíaca leve com alterações eletrocardiográficas do tipo extra-sístoles ventriculares, bloqueio incompleto ou completo do ramo direito do feixe de His, bloqueio incompleto aurículo-ventricular, bloqueio incompleto ou completo do ramo esquerdo do feixe de His e alterações da repolarização ventricular;

Grau III: infecção chagásica com sintomatologia evidente, hipertrofia cardíaca moderada e 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 aurículo-ventricular completo ou fibrilação ou flutter auricular;

GRAU IV: infecção chagásica com sintomatologia muito pronunciada, com insuficiência cardíaca. O estudo radiológico revela cardiomegalia extrema e o eletrocardiograma indica alterações graves e múltiplas (arritmias complexas e graves ou extensas zonas eletricamente inativas).

4.4.3 Estudo radiográfico (RX)

Em cada paciente foi realizado RX do tórax para determinar a ocorrência de aumento do índice cárdio-torácico. Em pacientes que apresentaram alguma sintomatologia digestiva foi realizado radiografia de tórax oblíqua anterior direita contrastada com sulfato de bário para determinar o grau de alteração esofágica de acordo à metodologia de Rezende e cols, (1960).

4.4.3.1 Classificação da forma digestiva (megaesôfago)

A classificação do megaesôfago foi feita segundo Resende e cols (1960):

Grupo I: Esôfagos de calibre aparentemente normal ao exame radiológico, trânsito lento e pequena retenção de contraste;

Grupo II: Esôfagos com pequeno a moderado aumento de calibre, apreciável retenção de contraste, observam-se com frequência ondas terciárias, associadas ou não à hipertonia do esôfago inferior;

Grupo III: Esôfagos com grande aumento de calibre, hipotonia do esôfago inferior, atividade contrátil reduzida ou inaparente e grande retenção de contraste;

Grupo IV: Dolicomegaesôfagos. Esôfagos com grande capacidade de retenção, atônicos, alongados, dobrando-se sobre a cúpula diafragmática.

4.5 Classificação das formas clínicas adotada neste trabalho

Os pacientes foram classificados pelo clínico responsável nas seguintes formas clínicas: indeterminada, cardíaca e digestiva. Os pacientes que apresentaram forma cardíaca foram classificados em cardíaca leve (Grau I e II), moderada (Grau III) e grave (Grau IV). A forma digestiva foi classificada em Digestiva grupo I, grupo II, grupo III e grupo IV segundo Resende e cols, (1960).

4.6 Avaliações dos pacientes nove anos após tratamento

4.6.1 Evolução clínica

Para interpretação da evolução da doença de Chagas após nove anos de tratamento etiológico foram adotados os critérios utilizados por Coura e cols, (1985) e Borges-Pereira e cols, (1985):

- a) inalterada: ausência de mudança da forma clínica ou grau de comprometimento cardíaco e/ou esofágico.
- b) progressiva: mudança da forma clínica de menor para maior nível de gravidade ou mudança de comprometimento cardíaco e/ou esofágico de um grau inferior para outro superior.
- c) regressiva: mudança da forma clínica de maior para menor nível de gravidade ou mudança de comprometimento cardíaco e/ou esofágico de um grau superior para um grau inferior.

- d) para óbito: através de informações obtidas através do cartório ou de familiares, buscaram-se as causas e tipos de morte.

4.6.2 Avaliação epidemiológica

A avaliação epidemiológica foi feita através de um questionário aplicado por um dos membros integrantes da equipe do projeto (**Anexo 2**).

4.6.3 Avaliações laboratoriais

4.6.3.1 Obtenção, coleta e preparo das amostras

A participação dos voluntários neste estudo consistiu na doação de sangue venoso periférico coletado através de sistema a vácuo (Vacuntainer, BD) quando 30mL de sangue foram utilizados para hemocultura, 5mL para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e 5mL para obtenção do soro destinado ao diagnóstico sorológico. Para obtenção do soro as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, divididas em duas alíquotas, conservadas a temperatura de -20°C e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto e Centro de Pesquisa René Rachou-Fiocruz, onde foram realizadas as diversas metodologias de análise utilizadas como critério de cura (exames parasitológicos: hemocultura, PCR), sorologia convencional (HAI e ELISA) e sorologia não convencional (pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo – AATV pela citometria de fluxo). Todos os exames foram realizados em duplicata para cada coleta realizada. Uma coleta de sangue foi realizada no ano de 2004/2005 e outra no ano de 2006.

4.6.4 Avaliação parasitológica

A avaliação parasitológica foi feita pela realização de hemocultura e reação em cadeia da polimerase (PCR). A positividade destes exames é indicativa de fracasso terapêutico.

4.6.4.1 Hemocultura

Foram realizadas duas hemoculturas para cada paciente com intervalo mínimo de seis meses entre as coletas. A técnica foi processada imediatamente após a coleta do sangue segundo a metodologia de Chiari e *cols*, (1989) com as modificações

introduzidas por Luz e cols, (1994). O volume de sangue coletado por paciente foi proporcional ao peso corporal seguindo a proporção de 30mL de sangue para um peso corporal de 60 Kg, coletado em tubo estéril contendo heparina e processado em câmara asséptica. Após imediata centrifugação a 3.000 rpm, durante 10 minutos, o plasma foi descartado. O sedimento celular foi lavado a seguir com meio LIT. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, a camada sobrenadante foi descartada. Em seguida, a camada de leucócitos foi cuidadosamente retirada e semeada em três tubos plásticos de 15 mL contendo cinco mL de LIT. A papa de hemácias foi subdividida em três volumes iguais, e semeada em três tubos de 15 mL contendo cinco mL de LIT.

Os tubos foram mantidos em estufa BOD (General Electric) a 28° C e homogeneizados três vezes por semana. O exame para verificação de flagelados foi realizado no 30°, 60°, 90° e 120° dias após a coleta, ao microscópio óptico, com aumento de 400X.

4.6.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em duas amostras de sangue do paciente, com exceção de apenas um caso. Para a realização da técnica de PCR foi utilizada a metodologia inicialmente padronizada por Britto e cols (1993) e posteriormente modificada por Gomes e cols (1998) com pequenas modificações. Para tal, 5 a 10 mL de sangue foram coletados em igual volume de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M pH8,0 (Sigma Chemical Company, USA) e mantido a temperatura ambiente por sete dias. Após esse período, o sangue foi então fervido por 30 minutos antes de se iniciar a extração do DNA.

Para cada extração de DNA, uma alíquota de sangue de 200 µL foi transferida para um tubo de microcentrifugação e adicionados 100 µL de fenol pH 7,2 (Sigma Chemical Company, USA) e 100 µL de clorofórmio (Sigma Chemical Company, USA). A mistura foi homogeneizada lentamente por dois minutos e centrifugada a 10.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e ao sedimento foi adicionado 100 µL de água milli-Q estéril, seguido de agitação por um minuto e centrifugação a 10.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao sobrenadante anterior. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de clorofórmio gelado (Sigma, Chemical Company, USA) e a mistura foi homogeneizada por um minuto e

centrifugada a 10.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado em gelo na presença de acetato de sódio 3M, pH 5,8 (10% do volume do sobrenadante) e dois volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi homogeneizada lentamente por vinte vezes, e deixada em repouso imersa em gelo por vinte minutos. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada por quinze minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Ao tubo foram adicionados 120µL de etanol 70% e o tubo foi colocado em um banho de gelo por 15 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm durante cinco minutos, a camada líquida foi desprezada e o DNA ressuspenso em 20 µL de água deionizada estéril e estocado a 4°C.

Para amplificação, dois µL de amostra foram colocados em termociclador automático (MinCyclerTM) junto com Tris HCL 10mM (pH 9,0), 75mM de KCl, 3,5 mM de MgCl₂; 0,1% Triton X100; 0,25 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dCTO, dGTP e dTTP), 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Platinum, Invitrogen) e 10pmoles de cada iniciador (S35 e S36), descritos por Ávila e cols (1990) em um volume final de 11 µL. A amplificação foi feita em um termociclador MJ Research (Ramsey, MN, USA), modelo PTC-150, usando o seguinte protocolo: desnaturação inicial 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos consistindo de um minuto de desnaturação a 95°C, um minuto de anelamento a 65°C e um minuto de extensão a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os primers se anelam nas micro-regiões conservadas do minicírculo do kDNA, para amplificação dos fragmentos da região variável, originando um produto de aproximadamente 330 pares de base (pb). A mistura foi então acrescida de 20 µL de óleo mineral para evitar evaporação. A 65°C e 1 minuto de extensão.

O produto amplificado pela PCR foi visualizado através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguido de fixação em solução de etanol 10% e ácido acético 0,5%. A seguir, foi adicionado ao gel uma solução de nitrato de prata 0,2% e posterior revelação com NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M (Santos e cols, 1993)

4.6.5 Avaliação sorológica

Todos os pacientes localizados foram examinados por técnicas de sorologia convencional (SC), Hemaglutinação Indireta (HAI), reação imunoenzimática – ELISA, e por uma técnica não convencional, técnica de pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo (AATV) pela citometria de Fluxo.

4.6.5.1 Sorologia convencional

4.6.5.1.1 Hemaglutinação indireta (HAI)

Foi empregado para esta reação o kit Hemacruzi HAI (bioMérieux, Brasil). Resumidamente, e seguindo as recomendações do fabricante, a técnica consistiu na diluição dos soros a 1:20 e 1:40 no diluente apropriado e sua posterior distribuição em microplacas com cavidades em fundo em “U”. A seguir, adicionou-se ao soro diluído a preparação antigênica constituída de hemácias de galinha sensibilizadas com antígenos citoplasmáticos e de membrana do *T. cruzi*. Após rápida e suave agitação, a microplaca foi incubada durante uma hora, à temperatura ambiente. A leitura foi feita a olho nu, e a imagem de cada poço foi avaliada. A amostra foi considerada reagente quando as hemácias estavam distribuídas de forma homogênea no fundo do poço em forma de “manto” ou “tapete”, cobrindo todo ou parcialmente o fundo da cavidade; não reagente quando as hemácias ficaram acumuladas em sedimento na forma de um botão no fundo do poço; e indeterminada quando ocorreu um padrão diferente dos descritos acima. O limiar de reatividade utilizado para maior sensibilidade foi a diluição do soro a 1:20, e para maior especificidade a diluição utilizada foi a de 1:40, como recomenda o fabricante.

Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles, positivo e negativo.

4.6.5.1.2 Teste imunoenzimático (ELISA)

A reação de ELISA foi realizada com dois objetivos: simplesmente como diagnóstico da infecção por *T. cruzi* – diluição do soro a 1:80 - e como controle de cura. Para controle de cura esta técnica foi realizada paralelamente em soros coletados dos mesmos pacientes aqui estudados antes do início do tratamento por Montoya, (1998) e nos soros coletados pela nossa equipe nove anos pós-tratamento. Estes soros estavam armazenados a -20°C na FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Foram localizadas amostras de soro de 26 dos 31 pacientes em reavaliação. Não foram localizadas as amostras de soro coletadas antes do tratamento de cinco pacientes (N^{os}: 4, 10, 12, 14 e 25).

As amostras avaliadas neste trabalho foram testadas no mesmo dia paralelamente com “mistura” de soros de pacientes também de Berilo não infectados (NIbe) por *T. cruzi*, infectados não tratados (INTbe), infectados tratados não curados

(TNC), e infectados tratados curados (TC), nas diluições sucessivas ao dobro de 1:80 até 1:2560, com o objetivo de comparar o perfil das curvas sorológicas dos pacientes avaliados em nosso estudo com os demais grupos. Os soros de pacientes TNC e TC foram gentilmente cedidos pelo Prof Dr. Olindo Assis Martins Filho, do laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, MG.

A reação de ELISA foi realizada empregando antígeno proveniente de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, mantidas em meio LIT. Os flagelados foram isolados na fase exponencial de crescimento, tratados com solução de NaOH 0,15M, em banho de gelo por 18 horas e o pH neutralizado com HCl 0,15M (Vitor e Chiari, 1987). O antígeno obtido foi dosado pelo método de Lowry e cols (1951) e depois conservado em congelador a -20°C até o uso.

O teste de ELISA foi realizado segundo a metodologia de Voller e cols. (1975) com amostras dos soros nas diluições citadas anteriormente em função dos objetivos da pesquisa, antígeno na concentração de 4,5µg/mL e conjugado anti-IgG humana, marcado com peroxidase na diluição 1:10.000.

Inicialmente, microplacas com 96 cavidades em fundo chato, contendo 100 mL/orifício de antígeno da forma epimastigota de *T. cruzi* diluído em tampão carbonato pH 9,6 foram incubadas por pelo menos 12 horas a 4° C para adsorção do antígeno.

Após a etapa de adsorção o excesso de solução antigênica foi desprezado e as placas lavadas quatro vezes com solução de lavagem (PBS-T). Em seguida as placas foram bloqueadas com 100 mL/orifício de PBS com soro fetal bovino (SFB), incubadas por 30 minutos a 37°C, e novamente submetidas a quatro lavagens com solução de lavagem.

As placas foram postas em contato com os soros previamente diluídos e após suave agitação, incubadas a 37°C por 45 min. Após nova lavagem, realizada, como anteriormente, foi feita nova incubação a 37°C por 45 min na presença de 100mL/orifício do conjugado (imunoglobulina anti-IgG humana conjugada com peroxidase diluída em PBS-T 0,05%). As placas foram novamente lavadas quatro vezes e incubadas com 100mL/orifício de solução de substrato (3mg de Orto-fenileno-diamino (OPD) + 3mL de H₂O₂ vol.30 + 15 mL de tampão citrato-fosfato) durante 15

min a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 32mL/orifício de ácido sulfúrico para interromper a reação.

A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro para microplacas equipado com filtro de 490nm. O ponto de corte para a leitura foi calculado seguindo a seguinte equação: Ponto de corte = média das absorbâncias dos 10 controles negativos + 3 desvios padrões. A zona de indeterminação foi definida pelos valores de densidade ótica compreendidos entre o ponto de corte $\pm 10\%$. A amostra foi considerada reagente quando apresentava uma absorbância maior que o limite superior da zona de indeterminação; não reagente quando apresentava absorbância menor que o limite inferior da zona de indeterminação e indeterminada quando apresentava absorbância dentro da zona de indeterminação. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivo e negativo para doença de Chagas.

O índice de reatividade (IR) das amostras obtidas antes e depois do tratamento foi calculado dividindo-se o valor da densidade ótica encontrada pelo valor determinado do ponto de corte.

O delta da densidade ótica foi obtido subtraindo o valor da densidade ótica antes do tratamento pelo valor obtido após o tratamento e medido pela reação de ELISA.

4.6.5.2 Sorologia não-convencional

4.6.5.2.1 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo

4.6.5.2.1.1 Obtenção do *T. cruzi*

Como antígeno foi utilizada a cepa CL do *T. cruzi*, mantida no Laboratório de Doença de Chagas (Ladoc/CPqRR/FIOCRUZ).

A cepa CL foi escolhida por ser uma cepa cuja manutenção em cultivo celular *in vitro* possibilita a obtenção de uma preparação purificada de tripomastigotas com baixa contaminação com formas amastigotas. Além disso, a cepa CL é sensível a drogas utilizadas clinicamente na doença de Chagas, como o benzonidazol (Filardi e Brener, 1987), o que oferece maior segurança ao operador.

4.6.5.2.1.2 Cultivo e preparações antigênicas

As formas tripomastigotas de cultura de tecido foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células LLC-MK₂ infectadas com *T. cruzi* da cepa CL. As células foram semeadas em frascos de cultura de tecido de 75cm² (Falcon), com meio DMEM (Gibco BRL, USA) - 5% SBF, previamente inativado a 56°C por 30 minutos, 2mM de L-glutamina (Gibco), 40µg/mL de ciprofloxacina (Endoterápica, Brasil). Após a adesão e formação da monocamada, as células foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos de camundongos experimentalmente infectados com a cepa CL de *T. cruzi* na proporção de 10 tripomastigotas/célula. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂, 95% de umidade por 24 horas para favorecer a infecção das células. Após este período, as monocamadas foram lavadas para retirar os parasitos remanescentes, mantidas com meio DMEM-5% SBF a 33°C, 5% CO₂, 95% de umidade (Bertelli e cols., 1977). O meio foi trocado diariamente, e a partir do quarto dia de cultura as tripomastigotas foram coletadas por centrifugação em tubos cônicos de 50mL. Os parasitos foram separados por centrifugação diferencial.

Para a obtenção da massa de parasitos, a suspensão de células foi centrifugada a temperatura ambiente, 200rpm por 10 min. Posteriormente, os tubos foram mantidos a 33°C por 30 minutos para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4°C, 2.200 rpm por 10 minutos. Os parasitos foram lavados em PBS-10% SBF, três vezes, por centrifugação nas condições anteriores. As preparações de tripomastigotas apresentando contaminação com formas amastigotas superior a 5% foram descartadas. A suspensão de parasitos foi então quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para o ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo na concentração de 5 x 10⁶ parasitos/mL

4.6.5.2.1.3 Reação de Imunofluorescência indireta por citometria de fluxo anti-formas tripomastigotas vivas - AATV

Os ensaios de citometria de fluxo para o estudo de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas foram realizados segundo protocolo descrito por Martins-Filho e cols (1995), e adaptado para microplacas por Cordeiro e cols (2001).

Em placas de 96 poços com fundo em “U”, 50mL do soro diluído em PBS-3% SBF (1:128 a 1:16.384) foram incubados a 37°C por 30 minutos e ao abrigo de luz, na

presença de 50mL da suspensão de parasitos (5×10^5 parasitos/mL/poço). Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS-3% SBF, por centrifugação (2.200rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante desprezado. Para análise de IgG total, os parasitos foram novamente incubados (na mesma condição anterior) na presença de 50mL de anticorpo anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína - FITC (Sigma) diluídos em PBS-3% SBF. Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com PBS-3% SBF (2.200rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante desprezado.

Após a incubação os parasitos foram novamente lavados duas vezes e fixados com 200mL de solução fixadora para citometria - MFF (Para 100mL; 5mL de Paraformaldeído 20X e 5mL de Cacodilato 20X e o pH ajustado para 7,2).

As amostras foram mantidas durante pelo menos 30 minutos, a 4°C e ao abrigo de luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickson, San Jose, CA, EUA), empregando-se o software Cell Quest. As leituras das amostras foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos.

Para cada ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo foi feito um controle interno da reação (controle do conjugado) onde os parasitos foram incubados na ausência de soro humano, porém na presença de anticorpo secundário, para monitorar ligações inespecíficas. Em todos os testes foram incluídas amostras controles de soros positivo e negativo para a doença de Chagas.

Por se tratar de parasitos vivos e altamente infectantes, nos ensaios de FC-ALTA as soluções eram mantidas durante os experimentos a 4°C e as placas eram manipuladas sobre gelo com o intuito de evitar a labilidade dos parasitos.

4.6.5.2.1.4 Obtenção dos dados de citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema óptico eletrônico que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios *laser*, incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC - Forward Scatter), granulosidade ou complexidade interna (SSC - Side Scatter) e a emissão de fluorescência.

Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados com FITC que, quando excitados, emitiam sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo

um (FL1 - fluorescência verde). Os ajustes do citômetro de fluxo FACScan empregados para a aquisição dos dados foram escolhidos por se tratar de uma população de pequeno tamanho (cerca de 5-7 μ m) e de pequena complexidade interna (tripanosomátídeos), onde os ganhos de voltagem para FSC e SSC foram ajustados para E00 e 300, ambos na escala LOG, para permitir a identificação do parasito em gráficos bidimensionais do tipo FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). O eliminador de *debris* era posicionado empregando o parâmetro de tamanho, pois esta modalidade é a que oferece maiores chances de interferência durante o processo de leitura. É importante ressaltar que os mesmos ajustes foram empregados para todos os experimentos, o que garante a possibilidade de estudo comparativo isento de variabilidade metodológica.

Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 5.000 parasitos.

A análise da reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse tripomastigota do *T. cruzi* (**Figura 02**). A amostra apresentou uma distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), o que permitiu o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente (janela/gate) à população de interesse (R1). Foram utilizados histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, possibilitando assim analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

Tripomastigota (B)

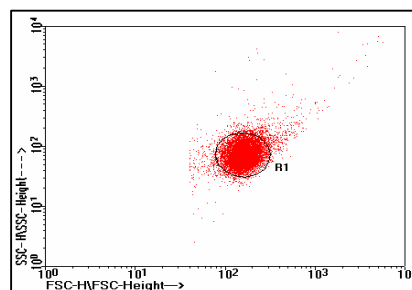


Figura 03 - Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Formas tripomastigotas do *T. cruzi*, utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados, e os respectivos sistemas de reagentes fluorocromos foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

4.6.5.2.1.5 Percentual de parasitos fluorescentes positivos – PPFP

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (**M1, Figura 03 A**). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores de PPFP dos títulos de cada amostra individual (**Figura 03 B e C**). Para cada conjunto de ensaios um novo marcador foi posicionado empregando-se o controle do conjugado daquele experimento.

Esse tipo de parâmetro oferece algumas vantagens, como facilidade e rapidez para obtenção dos resultados e sua reprodutibilidade, no que se refere a dados obtidos em análises interlaboratoriais ou em análises realizadas repetidas vezes. Além disso, a expressão dos resultados sob a forma de PPFP elimina interferências inerentes ao uso de reagentes com diferentes níveis de fluorocromos. Todos os dados desse trabalho foram analisados utilizando o programa Cell Quest da Becton Dickinson.

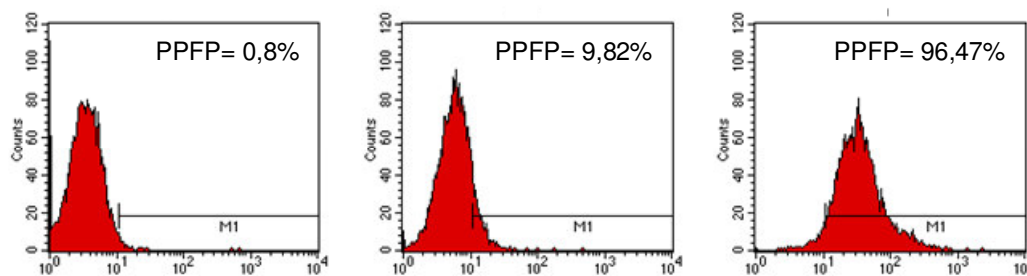


Figura 04 - Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com controle interno da reação (A), após incubação com soro de paciente não infectado

(B) e um soro de paciente chagásico (C). O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PFP para o controle do conjugado.

4.6.5.2.1.6 Definição do ponto de corte

No presente estudo, não está em avaliação a utilização dos testes no diagnóstico da doença de Chagas e sim, na monitoração pós-terapêutica. Foi utilizado um ponto de corte como já descrito em estudo prévio por Martins-Filho e cols (1995).

4.7 Critério de cura

Como critério de cura foram utilizados os resultados de vários métodos de diagnóstico empregados com esta finalidade, tais como: métodos parasitológicos (hemocultura, PCR), sorológicos (sorologia convencional - ELISA e HAI) e um não convencional (pesquisa de anticorpo anti-tripomastigota vivo por citometria de fluxo - AATV).

4.7.1 Interpretação dos resultados:

Pacientes que apresentaram qualquer exame parasitológico positivo foram considerados como apresentadores de falha terapêutica, independentemente de outros resultados.

Pacientes que apresentaram todos os exames parasitológicos e sorológicos negativos foram considerados curados.

Pacientes que apresentaram exames parasitológicos negativos, sorologia convencional positiva e sorologia não-convencional negativa foram considerados dissociados.

Pacientes com reação em cadeia da polimerase (PCR) negativa e pesquisa de anticorpo anti-*T.cruzi* pela citometria de fluxo positivo, e queda expressiva de títulos de anticorpo na sorologia convencional (ELISA) foram considerados pacientes com resultado “inconclusivo” em avaliação.

4.8 Análise estatística

Para analisar estatisticamente a avaliação comparativa de IgG total pela ELISA, antes e pós-tratamento, análise da reação de ELISA semiquantitativa nos pacientes de Berilo, antes (CH) e após (CHt) tratamento com benzonidazol, e suas respectivas situação clínica (IND e SINT), foi utilizado o teste de Wilcoxon.

A Análise do delta de densidade óptica na reação de ELISA semiquantitativa nos pacientes de Berilo e a análise do delta de PPFP através da AATV nos pacientes de Berilo foi realizada através do teste de ANOVA.

5.0 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na sequência dos objetivos específicos propostos neste trabalho.

5.1 Avaliação epidemiológica dos pacientes

Os antecedentes epidemiológicos dos pacientes avaliados depois do tratamento estão representados na **Tabela II**. Foram avaliados a qualidade de moradia, antecedentes familiares da doença de Chagas e a condição sócio-econômica da família entre outros.

Tabela II – Antecedentes epidemiológicos observados depois do tratamento, nos pacientes portadores da infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, tratados há nove anos com Benzonidazol.

Nasceram em casa de adobe	29/31 (93,5%)
Reconhecem o triatomíneo	24/31 (77,4%)
Cão ou gato em casa	24/31 (77,4%)
Viram rato em casa	24/31 (77,4%)
Parentes vivos ou falecidos com doença de Chagas	22/31 (70,9%)
Galinheiro no peridomicílio	20/31 (64,5%)
1º Grau incompleto	19/31 (61,3%)
Presença de gambá (sarué) em casa	17/31 (54,8%)
Agricultores	16/31 (51,6%)
Morte súbita na família	15/31 (48,3%)
Moram em casa de adobe	14/31 (45%)
Não sabe assinar o nome	5/31 (16,1%)

De acordo com a avaliação epidemiológica realizada através da aplicação do questionário (**ANEXO II**) foi possível verificar uma melhoria das habitações em 15/29 (51,7%) dos pacientes levando em consideração o revestimento das paredes.

Foi demonstrado que 77,4% dos pacientes reconhecem o triatomíneo sugerindo uma relação próxima com estes, situação de risco agravada ainda mais por outros fatores como presença de cão ou gato em casa (77,4%), galinheiro no peridomicílio (64,5%) e presença de ratos (77,4%) e gambás na residência (54,8%).

A presença da doença de Chagas foi marcante na região, sendo encontrados 70,9% dos pacientes com algum parente vivo ou que tenha falecido, sendo atribuída a causa de morte a esta doença. Um percentual de 48,3% deles relatou casos de morte súbita na família.

A agricultura tem sido uma das principais atividades econômicas da região, sendo esta atividade realizada por 51,6% dos pacientes avaliados. De todos os pacientes, 61,3% possui o 1º grau do ensino fundamental incompleto e 16,1% não é capaz de assinar o próprio nome.

Do total dos pacientes avaliados, 20 foram do sexo feminino e 11 do sexo masculino. Até o momento desta avaliação, as 20 mulheres desta casuística geraram um total de 79 filhos nascidos vivos com ocorrência de oito abortos cuja causa não foi investigada.

5.2 Avaliação da evolução clínica dos pacientes

No total dos pacientes avaliados clinicamente nove anos após tratamento 17,9% (5/28) evoluiu clinicamente, o que corresponde a um índice médio de 1,98% ao ano (**Tabela III**).

Tabela III - Evolução clínica dos pacientes de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, ao longo dos nove anos após o tratamento com Benzonidazol.

Grupo Clínico	Evolução Clínica	
	Inalterada	Progressiva
Paciente com doença de Chagas - CH	23/28 (82,1%)	5/28 (17,9%)
Forma Indeterminada - IND	21/22 (95,4%)	1/22 (4,6%)
Forma Sintomática - SINT	2/6 (33,3%)	4/6 (66,6%)

CH- Paciente com infecção/doença de Chagas;

IND – Paciente apresentando a forma indeterminada da doença de Chagas;

SINT – Paciente apresentando a forma sintomática da doença de Chagas.

No entanto, quando são considerados apenas os 22 pacientes que apresentavam a forma indeterminada da doença de Chagas antes do tratamento, apenas um evoluiu clinicamente para a forma cardíaca em grau leve (Nº 15). Sendo assim, o índice de evolução clínica da forma indeterminada nesse grupo foi de 4,6% (1/22) após um período de nove anos, o que representa 0,5% de evolução ao ano.

Dos cinco pacientes sintomáticos (SINT) tratados na forma cardíaca leve, dois pacientes (Nºs 12 e 14) evoluíram para uma forma cardíaca grave e um deles faleceu (Nº 12). Dois outros pacientes (Nºs 13 e 27) permaneceram com sua forma clínica inicial e um paciente (Nº 23) evoluiu para a forma cardíaca moderada.

Um paciente (Nº 20) tratado que apresentava a forma digestiva da doença de Chagas com megaesôfago grupo I, evoluiu para megaesôfago grupo III, realizando cirurgia corretiva nove anos após o tratamento.

Dos seis pacientes que não foi possível saber sua situação clínica inicial, três (Nºs 9, 17 e 24) permaneceram na forma clínica indeterminada e três (Nºs 1, 10 e 11) apresentaram a forma cardíaca (dois a forma leve e um a forma moderada) respectivamente.

Na **Tabela IV** pode ser verificado que, com exceção de um único paciente que apresentava a forma indeterminada antes do tratamento, todos os demais (quatro pacientes) que evoluíram clinicamente já apresentavam alguma sintoma antes do tratamento. O paciente com a forma indeterminada que evoluiu para a forma cardíaca leve foi um dos pacientes tratados mais velhos (37 anos).

Dos pacientes que evoluíram clinicamente, com exceção de um, todos estavam com idade superior a 20 anos antes do tratamento. O único menor de 20 anos (14 anos) e que evoluiu clinicamente, já apresentava alterações eletrocardiográficas antes do tratamento (**Tabela IV**).

Tabela IV: Evolução clínica dos pacientes de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, de acordo com a idade apresentada quando tratados com benzonidazol e nove anos após tratamento etiológico.

Nº de Pacientes	Idade antes do tratamento (anos)	Forma clínica antes do tratamento	Forma clínica depois do tratamento	Evolução Clínica
21	6 – 37	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada
2	23-30	Cardíaca leve	Cardíaca leve	Inalterada
1	37	Indeterminada	Cardíaca leve	Progressiva
1	14	Cardíaca discreta	Cardíaca grave	Progressiva
2	22-33	Cardíaca discreta	Cardíaca grave	Progressiva
1	26	Digestiva grupo I	Digestiva grupo III	Progressiva
2	29-34	NI		NA
1	34	NI		NA
31	6 – 37	Total		

NI = Não informado

NA = Não avaliada

No **anexo IV** estão apresentados as formas clínicas de cada um dos pacientes observada antes e após o tratamento.

5.3 Avaliação do perfil laboratorial empregando o critério de cura

5.3.1 Avaliação parasitológica

5.3.1.1 Hemocultura

A positividade da hemocultura ocorreu em três (9,6%) pacientes (N^{os} 1, 13 e 23), os quais apresentaram alguma alteração eletrocardiográfica após tratamento (**Tabela V**). Nenhum dos pacientes com a forma indeterminada apresentou hemocultura positiva. A positividade deste exame foi observada em apenas uma das leituras realizadas, sendo estes casos considerados como indivíduos com evidência definitiva de falha terapêutica.

Tabela V – Utilização dos critérios de cura atuais na avaliação da eficácia do tratamento com benzonidazol em pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, nove anos após tratamento.

Método	Forma Clínica após o tratamento					
	Indeterminada			Sintomática		
	NEG	POS	OSC	NEG	POS	OSC
HC	21/21 (100%)	0/21 (0%)	-	0/10 (0%)	3/10 (30%)	-
PCR	4/20 (20%)	7/20 (35%)	9/2 (45%)	1/10 (10%)	5/10 (50%)	4/10 (40%)
Sorologia	ELISA	0/21 (0%)	21/21 (100%)	-	0/10 (0%)	10/10 (100%)
	CF-AATV	0/21 (0%)	21/21 (100%)	-	0/10 (0%)	10/10 (100%)

NEG – Negativo; POS – Positivo; OSC – Oscilante.

5.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Estes resultados foram alcançados após exame de duas amostras de sangue dos pacientes acima mencionados, com exceção de um deles. As amostras foram coletadas em tempos diferentes e com intervalo mínimo de seis meses entre as duas coletas. Duas reações de PCR foram realizadas a partir da primeira amostra e uma reação a partir da segunda amostra.

A positividade da PCR foi verificada em 25 dos 30 pacientes avaliados, com pelo menos uma reação positiva em duas coletas diferentes. Quatro pacientes (N^{os} 2, 8, 9 e 21) apresentaram resultados negativos em duas coletas diferentes. Em dois pacientes (N^{os} 1 e 15) só foi possível analisar uma amostra de sangue, sendo encontrado um

resultado negativo no primeiro e positivo no segundo respectivamente resultando um total de cinco pacientes negativos.

Considerando a positividade encontrada em uma ou em duas amostras, 25 dos 30 pacientes examinados pós-tratamento apresentaram a presença de bandas de k-DNA do *T. cruzi* de aproximadamente 330pb. A taxa de concordância de resultados positivos entre as duas amostras foi de 40% (12/30) dos casos. A concordância entre os resultados negativos foi de 16,6% (5/30) Os demais 43,4% (13/30) apresentaram resultados discordantes entre as duas amostras analisadas.

Considerando os pacientes em função da forma clínica foi demonstrado que aqueles com a forma indeterminada apresentaram 20% (4/20) de reações negativas, 35% (7/20) de reações positivas e 45% (9/20) de reações oscilantes. Os pacientes que apresentavam alguma alteração eletrocardiográfica ou na radiografia, apresentaram nove anos após o tratamento 10% (1/10) de reações negativas, 50% (5/10) de reações positivas e 40% (4/10) de reações oscilantes. Alguns resultados estão apresentados na (Figura 05).

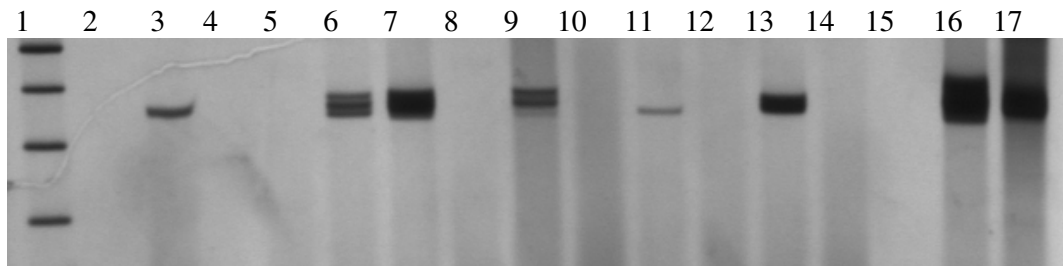


Figura 05 – Gel de poliacrilamida mostrando padrão de bandas eletroforéticas de kDNA de 330 pb, observadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) em eluato de sangue, de pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, tratados com benzonidazol há nove anos. Canaleta: 1 - Padrão de peso molecular de 100pb; Canaleta: 2 – Controle de reagentes; Canaletas: 3, 6, 7, 9, 11 e 13 - Amostras de paciente mostrando o padrão de bandas com resultado positivo; Canaletas: 4, 5, 8, 10, 12 e 14 - Amostras de pacientes mostrando resultado negativo; Canaleta: 15 – Controle negativo; Canaletas: 16 e 17 – Controle positivo da reação.

5.3.2 Avaliação sorológica

5.3.2.1 Sorologia convencional (HAI e ELISA) e não convencional (pesquisa de AATV) pós-tratamento

As técnicas de hemaglutinação indireta (HAI), imunoenzimática (ELISA) e a pesquisa de anticorpo anti-*T. cruzi* através da citometria de fluxo foram reativas em todos os pacientes após nove anos do tratamento (**Tabela IV**).

5.4 Interpretação dos resultados laboratoriais utilizados como critério de cura

De acordo com os critérios de cura estabelecidos na metodologia, todos os pacientes foram considerados como apresentadores de “falha terapêutica” considerando o conjunto de resultados dos exames parasitológicos (HC e PCR), sorologia convencional (HAI e ELISA) e da sorologia não-convencional (pesquisa de AATV).5.5 Comparação dos resultados laboratoriais dos pacientes obtidos antes e nove anos após tratamento

5.5.1 Reação de ELISA

Amostras de soro de oito pacientes positivas quando examinadas por Montoya (1998) e examinadas neste trabalho em 2007, apresentaram resultados negativos não sendo, portanto consideradas na comparação com amostras desses mesmos pacientes coletadas em 2006. Os pacientes não reativos foram os de N^{os} 2, 5, 7, 12, 23, 28, 30 e 31).

Na **Figura 6** estão apresentados os resultados da reação de ELISA (reativas) em amostras de 18 pacientes coletadas antes do tratamento (1997) e após tratamento (2006). No gráfico superior desta figura está apresentado o conjunto dos resultados de todos os pacientes antes (CH) e depois do tratamento (CHt). Nove anos após o tratamento com benzonidazol foi observada em todos os pacientes uma diminuição significativa ($p<0,05$) das médias de absorbância de IgG na reação de ELISA.

Nos gráficos inferiores da **Figura 6** os resultados estão apresentados de acordo com a condição clínica do paciente. Utilizando os mesmos critérios anteriores, foi verificado que ocorreram diminuições significativas ($p<0,05$) das médias de densidade óptica em pacientes (12 pacientes) que apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas. Por outro lado, os pacientes com alguma alteração eletrocardiográfica ou de raio-X (5 pacientes) compatível com doença de Chagas apresentaram discreta diminuição não significativa ($p>0,05$) nos valores médios de absorbância de IgG na reação de ELISA nove anos após tratamento.

Merece destaque especial um paciente (Nº 19) que apresentou a maior queda de anticorpos na avaliação sorológica (55%), o qual se encontra assinalado com um quadrado. Este foi o paciente mais jovem do grupo tratado. Outros dois pacientes (Nºs 17 e 18) apresentaram baixa reatividade antes e pós-tratamento.

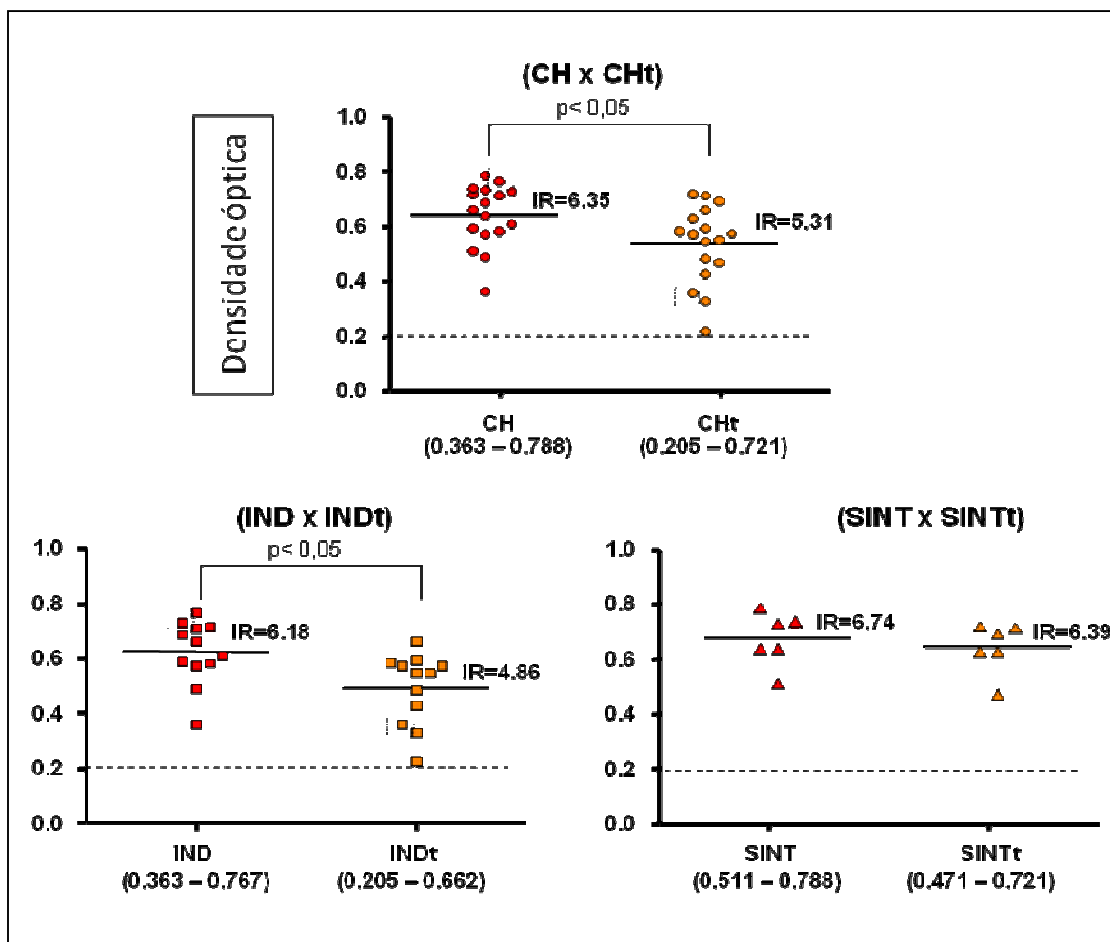


Figura 6- Resultados da reação de ELISA convencional de pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do Município de Berilo, Vale do Jequitinhinha, MG, na diluição do soro a 1:80 antes (CH) e após (CHt) tratamento com benzonidazol e análise dos resultados em função da forma clínica antes (IND e SINT) e após tratamento (INDt e SINTt).

5.5.2 Pesquisa de anticorpos Anti-tripomastigota Vivo (AATV) pela citometria de fluxo

Não foi possível a realização da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo nas amostras de soro coletadas antes do tratamento. As amostras avaliadas por esta técnica foram obtidas apenas em dois momentos (ano 2004 e 2006), ambas após o tratamento, e os resultados estão apresentados na **Figura 7**.

No gráfico superior da **Figura 7** estão representados os resultados de todos os pacientes analisados. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois momentos avaliados (2004 e 2006).

Nos gráficos inferiores da **Figura 7** estão apresentados os resultados de acordo com a condição clínica do paciente. Tanto nos pacientes que apresentam a forma indeterminada (IND), quanto nos pacientes que apresentaram alguma forma clínica (SINT) pós-tratamento, não foi verificada queda significativa nos valores de porcentagem de parasitos fluorescentes vivos (PPFP).

No entanto, após dois anos de acompanhamento, três pacientes (N^{os} 17, 19 e 29) apresentaram diminuição da PPFP e todos eles se encontravam na forma indeterminada antes do tratamento (**Figura 7**). O paciente destacado (N^o 19) neste gráfico é o mesmo que apresentou diminuição significativa das médias dos valores de densidade óptica medidos pela reação de ELISA (**Figura 6**).

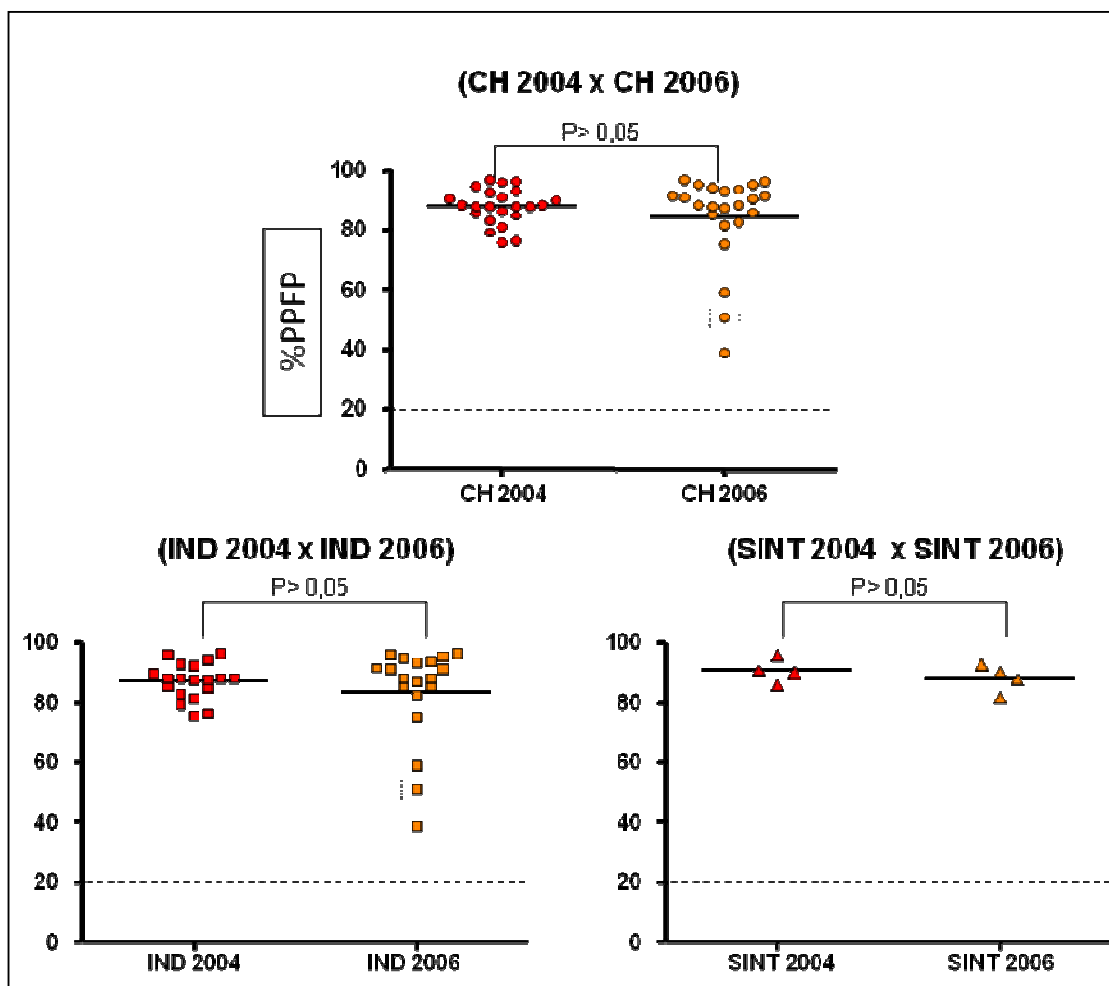


Figura 7 – Resultados em PPFP da pesquisa de anticorpo anti-tripomastigota vivo (AATV) pela citometria de fluxo na diluição de 1:256 em pacientes com doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, em dois momentos (2004 e 2006) em todos os 28 pacientes (CH) e separadamente nos grupos de pacientes apresentadores de forma indeterminada (IND) e naqueles com alguma alteração no eletrocardiograma ou na radiografia (SINT).

5.6 Padronização e estabelecimento dos critérios de interpretação para um ensaio imunoenzimático semiquantitativo aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

A análise de soros de pacientes sabidamente não tratados (NT), pacientes tratados não curados (TNC), pacientes tratados curados (TC) e pacientes não infectados (NI) permitiu padronizar e estabelecer critérios de interpretação para um ensaio

imunoenzimático semiquantitativo aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica da infecção/doença de Chagas (**Figura 8**).

A análise dos resultados permitiu estabelecer as diluições do soro capazes de distinguir dois grupos de pacientes: (Grupos I e II). Fazem parte do Grupo I os pacientes que nunca receberam tratamento (NT) e os pacientes tratados não curados (TNC). O Grupo II é composto pelos pacientes tratados e curados (TC) e pelos pacientes não infectados (NI).

Os resultados encontrados pela ELISA semiquantitativa demonstraram que as amostras dos dois grupos de pacientes apresentavam reatividade paralela nas diluições 1:80; 1:160; 1:320; e 1:640. Dentro dessa faixa de diluição foi possível distinguir os dois grupos, sendo estas diluições adotadas nas análises dos resultados obtidos com os soros dos pacientes estudados neste trabalho. Em amostras de soro mais diluídas (> 1:640) não foi possível distinguir entre os dois grupos.

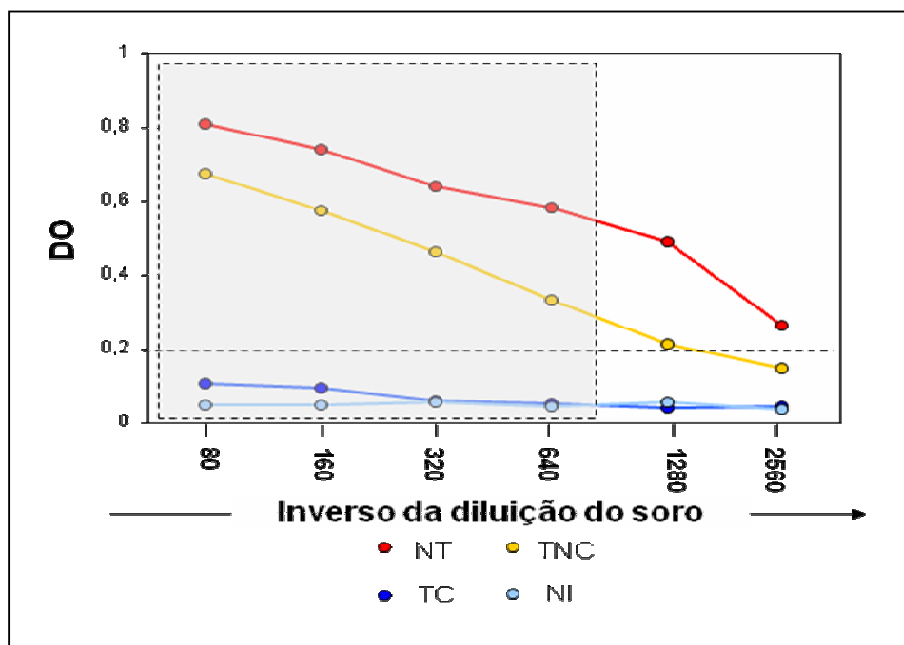


Figura 8 –Diminuição da reatividade do soro (densidade óptica) em função da diluição empregada. Estabelecimento e determinação das diluições do soro que melhor segregam os grupos de pacientes na reação de ELISA semi-quantitativa. NT = Paciente não tratado TC = Paciente tratado e curado TNC = Paciente tratado e não curado NI = Paciente não infectado

5.7 Utilização da metodologia de ELISA semiquantitativa na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas

Uma vez estabelecidos os critérios de interpretação da técnica de ELISA semiquantitativa, essa metodologia foi aplicada na interpretação dos resultados dos pacientes aqui estudados. Nesta análise foram comparados soros de 18 dos 31 pacientes aqui estudados obtidos antes (1997) e depois do tratamento (2006) uma vez que soros de oito pacientes coletados antes do tratamento não apresentaram reatividade.

No gráfico superior da (**Figura 9**) está apresentado o conjunto dos resultados de valores de densidade óptica de todos estes 18 pacientes (amostras de 18 dos 31 pacientes) em diluições seriadas previamente escolhidas de acordo com a padronização estabelecida anteriormente.

Nos gráficos inferiores estão apresentados os resultados dos valores de densidade óptica obtidos separadamente para cada diluição selecionada na **Figura 8**. Foi demonstrado que nas diluições de 1:80 e 1:160 os pacientes foram reativos antes e após o tratamento e que somente um deles apresentou resultado próximo do ponto de corte.

Quando se utilizou a diluição de 1:320 foi demonstrada uma melhor segregação entre os pacientes antes e após tratamento revelando queda significativa ($p < 0,05$) dos níveis de IgG nos pacientes tratados e em três deles (N^{os} : 17, 18 e 19) abaixo do ponto de corte de 0,2 de absorbância. Esta diluição foi, portanto a que melhor evidenciou eficácia terapêutica.

Na diluição de 1:640 não foi possível distinguir os dois grupos de pacientes, antes e após tratamento sendo encontrado pacientes com resultados abaixo do ponto de corte antes do tratamento.

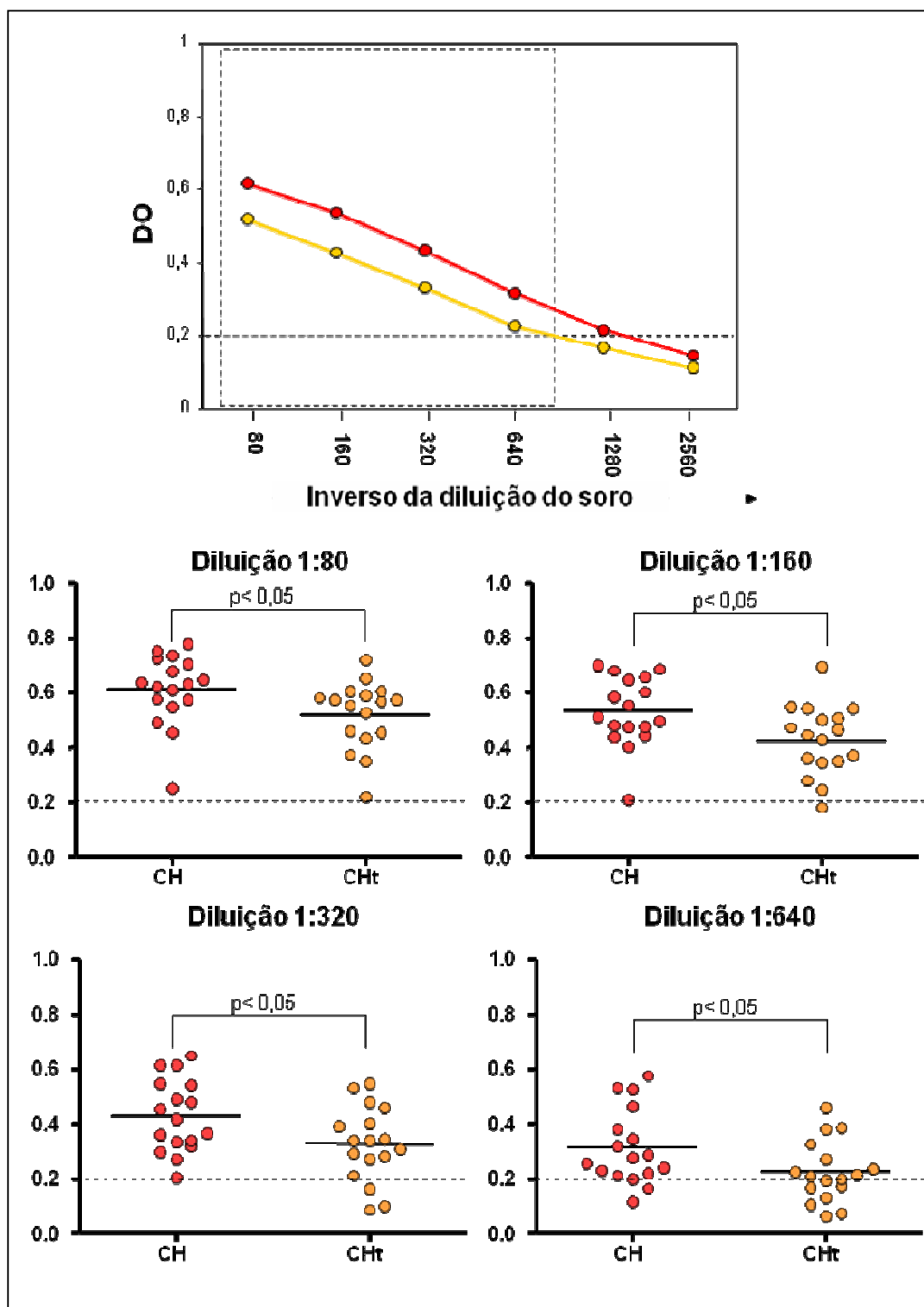


Figura 9 – Resultados de densidade óptica avaliados pela reação de ELISA semiquantitativa dos pacientes de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, antes (CH) e após (CHt) tratamento com benzonidazol nas diluições 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640.

A metodologia de ELISA semiquantitativa foi então utilizada para comparar o perfil sorológico dos pacientes de acordo com a forma clínica apresentada depois do tratamento. Os resultados dos pacientes com forma indeterminada estão apresentados na **Figura 10** (forma indeterminada) e os dos pacientes com forma cardíaca ou digestiva na **Figura 11** (forma sintomática).

O conjunto dos resultados de todos os pacientes, antes e após tratamento, que apresentaram a forma indeterminada da doença de Chagas, encontra-se no gráfico superior da (**Figura 10**).

Foi possível com a metodologia proposta anteriormente, distinguir os pacientes apresentadores da forma indeterminada antes (IND) e pós-tratamento (INDt), apenas na diluição de 1:320, onde três dos pacientes (N^{os} 17, 18 e 19) apresentaram queda sorológica abaixo do ponto de corte estabelecido.

Não foi possível observar segregação dos grupos nas demais diluições.

É importante ressaltar que todas as diluições de soro demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando se avaliou a diminuição dos valores médios de densidade óptica nas amostras de soro de pacientes que apresentaram a forma indeterminada da doença de Chagas antes (IND) e após (INDt) tratamento (**Figura 10**).

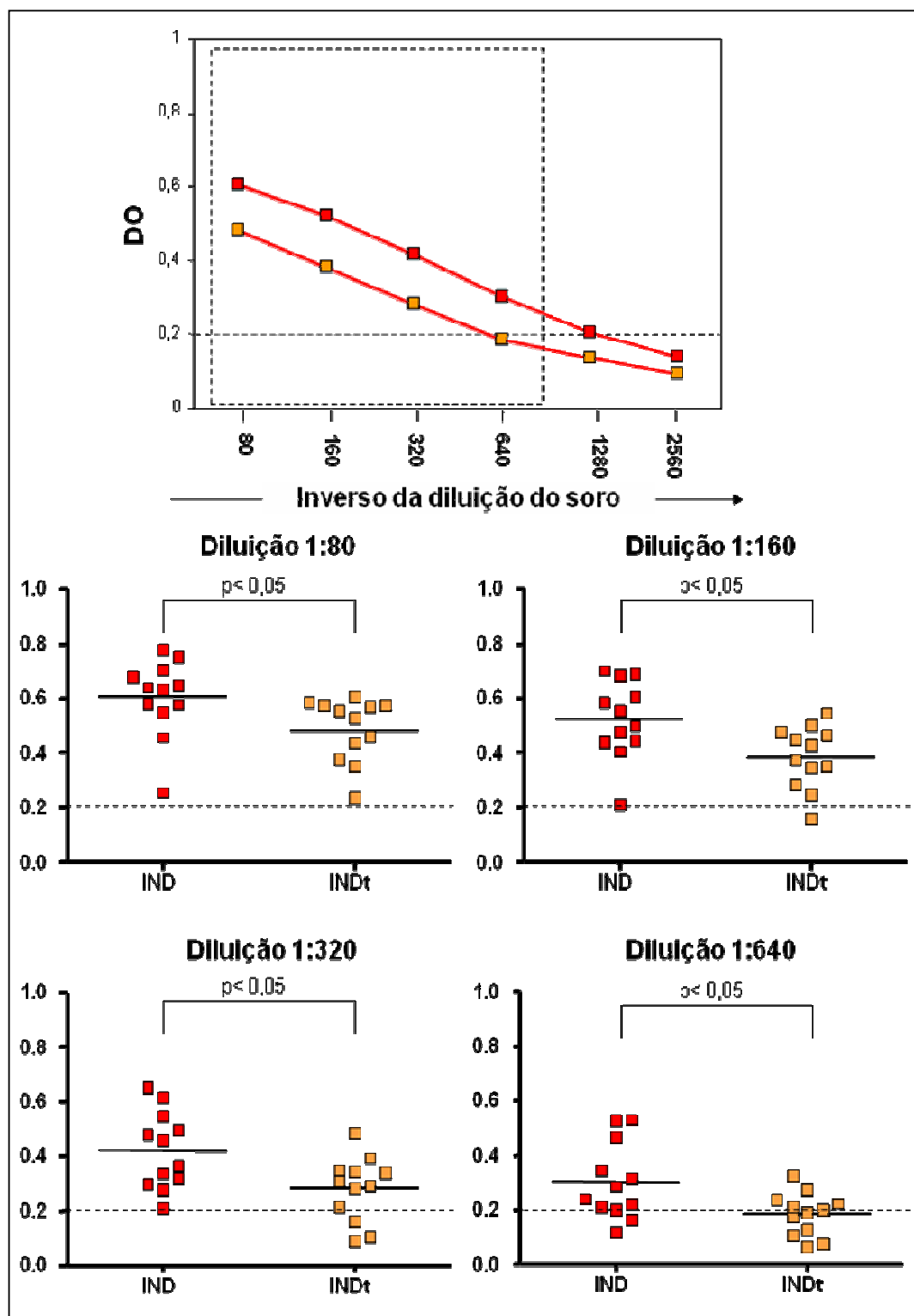


Figura 10 – Resultados de densidade óptica da reação de ELISA semiquantitativa avaliados nos pacientes portadores da infecção chagásica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, portadores de forma indeterminada antes (IND) e após (INDt) tratamento com Benzonidazol.

A mesma análise foi feita com os pacientes com forma cardíaca e/ou digestiva da doença de Chagas e os resultados do conjunto de pacientes encontram-se no gráfico superior da **Figura 11**.

Nos gráficos inferiores desta figura os resultados estão separados de acordo com cada diluição previamente utilizada na avaliação dos pacientes tratados com a forma indeterminada da doença de Chagas.

Não foi observada mudança na reatividade sorológica dos pacientes tratados na forma cardíaca e/ou digestiva da doença de Chagas antes (SINT) e após tratamento (SINTt) com Benzonidazol.

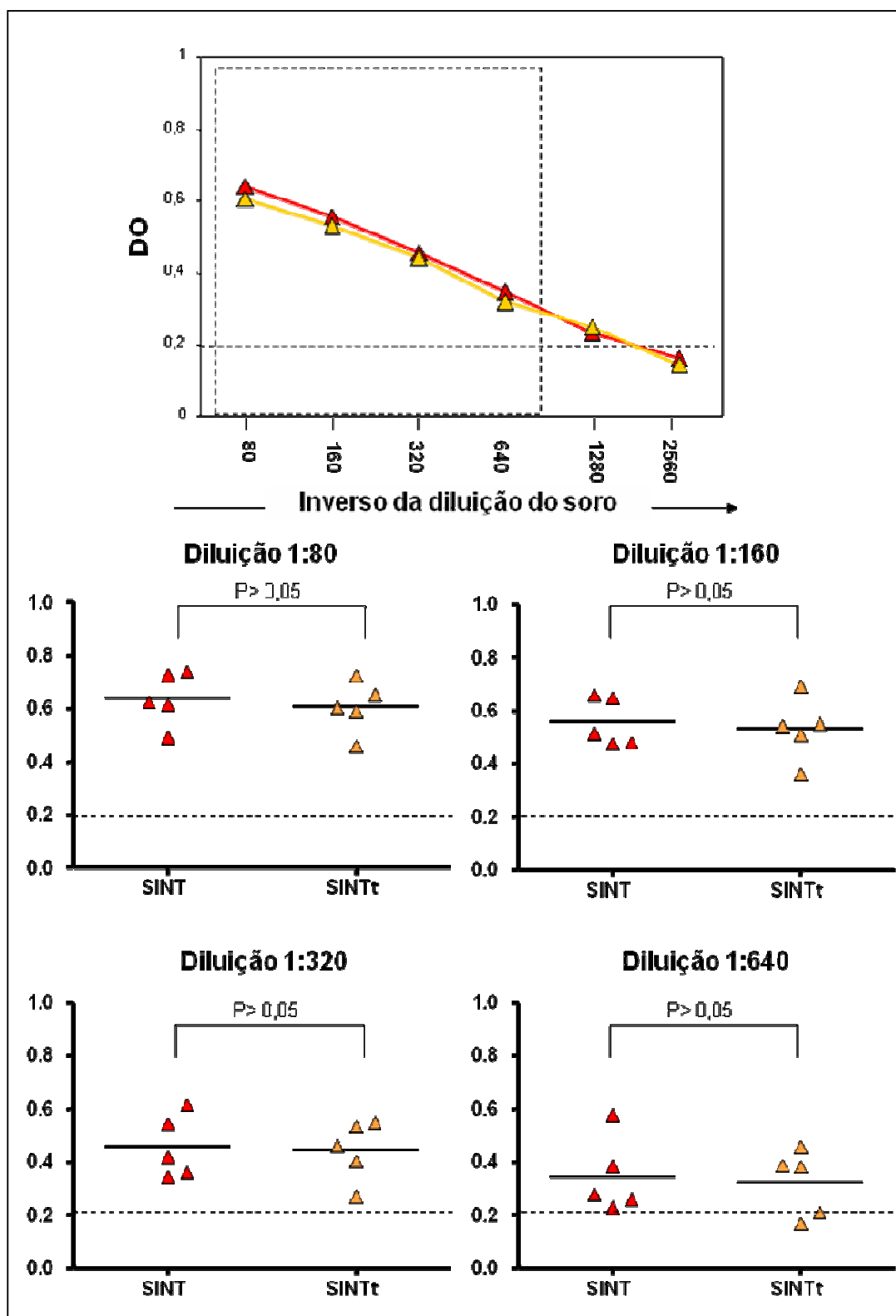


Figura 11 – Resultados de densidade óptica avaliados pela reação de ELISA semiquantitativa nos pacientes portadores da doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhinha, MG, cardíacos /digestivos, antes (SINT) e após (SINTt) tratamento com Benzonidazol.

5.8 Estabelecer um método alternativo de análise da metodologia de ELISA semiquantitativa e da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da Doença de Chagas

Na busca de estabelecer um método alternativo de análise da metodologia de ELISA semiquantitativa (**Figura 12**) e citometria de fluxo (**Figura 13**) na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da infecção chagásica foi utilizado o primeiro quartil como zona cinza para a interpretação dos resultados da reação de ELISA e o segundo quartil no caso da Citometria de Fluxo (pesquisa de AATV).

No gráfico superior da **Figura 12** estão os resultados das variações de absorbância (deltas) de todos os pacientes, antes e depois do tratamento (CHt - CH). Não foi encontrada diferença estatística na análise das variações médias de absorbância medidas pela reação de ELISA em pacientes tratados com benzonidazol e avaliados nove anos pós-tratamento.

Nos gráficos inferiores os pacientes estão separados de acordo com a forma clínica apresentada antes do tratamento, forma indeterminada (INDt - IND) e forma cardíaca/digestiva (SINT - SINT).

Foi possível demonstrar que somente os pacientes tratados na forma indeterminada da infecção chagásica apresentaram diminuição da densidade óptica nas diluições de 1:80 até 1:640. A melhor diluição capaz de detectar uma diminuição significativa nos valores de densidade óptica foi a de 1:320, como anteriormente mencionado, onde dois pacientes (N^{os} 3 e 19) apresentaram queda mais acentuada de anticorpos IgG.

Um paciente (N^o 19) apresentou diminuição da variação de absorbância a partir da diluição de 1:80 até 1:1280, sendo este o mesmo paciente destacado anteriormente na reação de ELISA comparativa semiquantitativa cuja queda sorológica foi de 55%, ou seja, uma diminuição dos índices de reatividade maior que 1,5 sugerindo eficácia terapêutica de acordo com o critério estabelecido por Zauza e Borges-Pereira (2001). Na diluição de 1:640 foi observado que três pacientes apresentaram diminuição acentuada dos valores de densidade óptica para IgG, porém seus valores estão muito próximos do ponto de corte estabelecido.

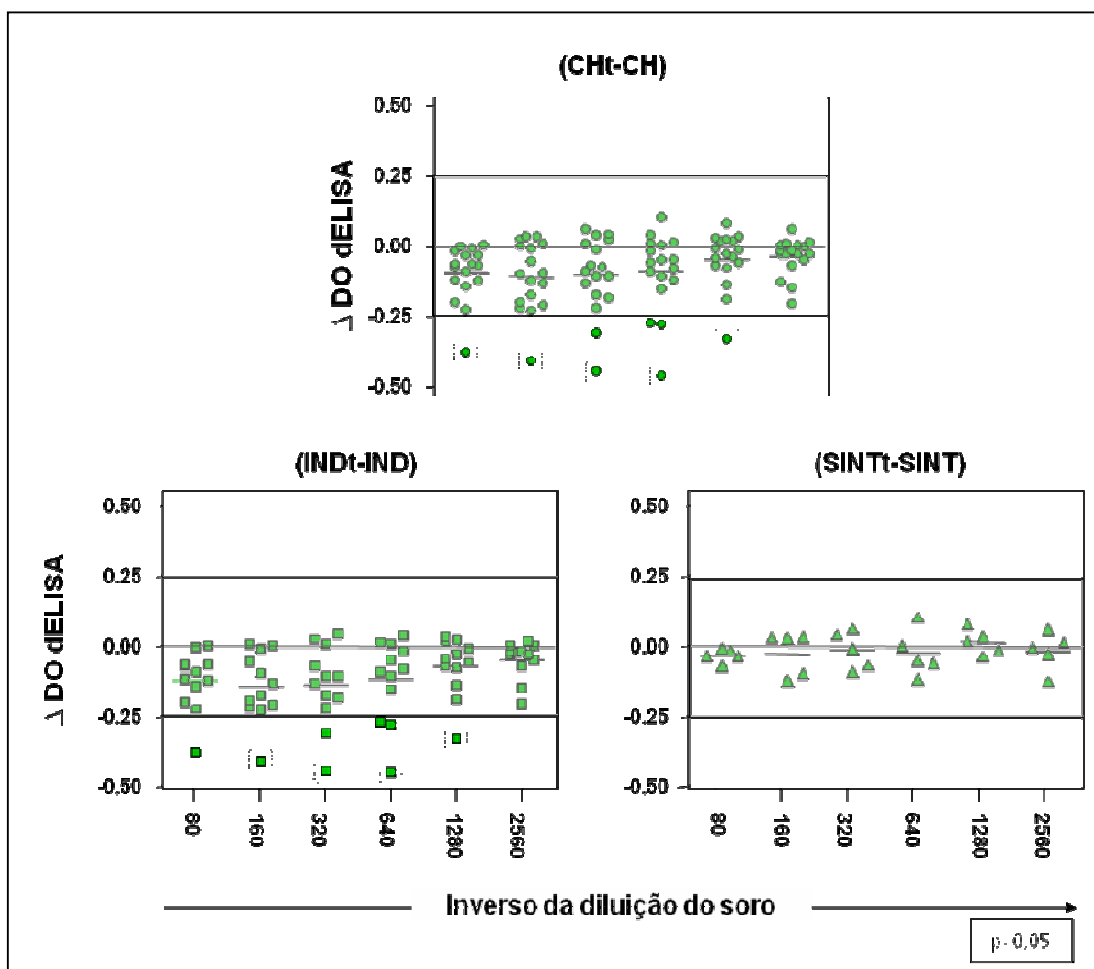


Figura 12 - Resultados da queda de absorvência avaliados pela reação de ELISA semiquantitativa, nos pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, nove anos após o tratamento com Benzonidazol.

A análise da variação de PPFP (delta) da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo apresentada na **Figura 12**, considerando o segundo quartil do gráfico, não demonstrou diferença significativa após dois anos de avaliação (2004 e 2006) tanto nos pacientes com a forma indeterminada como nos sintomáticos.

Através desta análise foi observado que um paciente (Nº 19), marcado com um quadrado, apresentou diminuição mais acentuada da variação de PPFP na diluição 1:512.

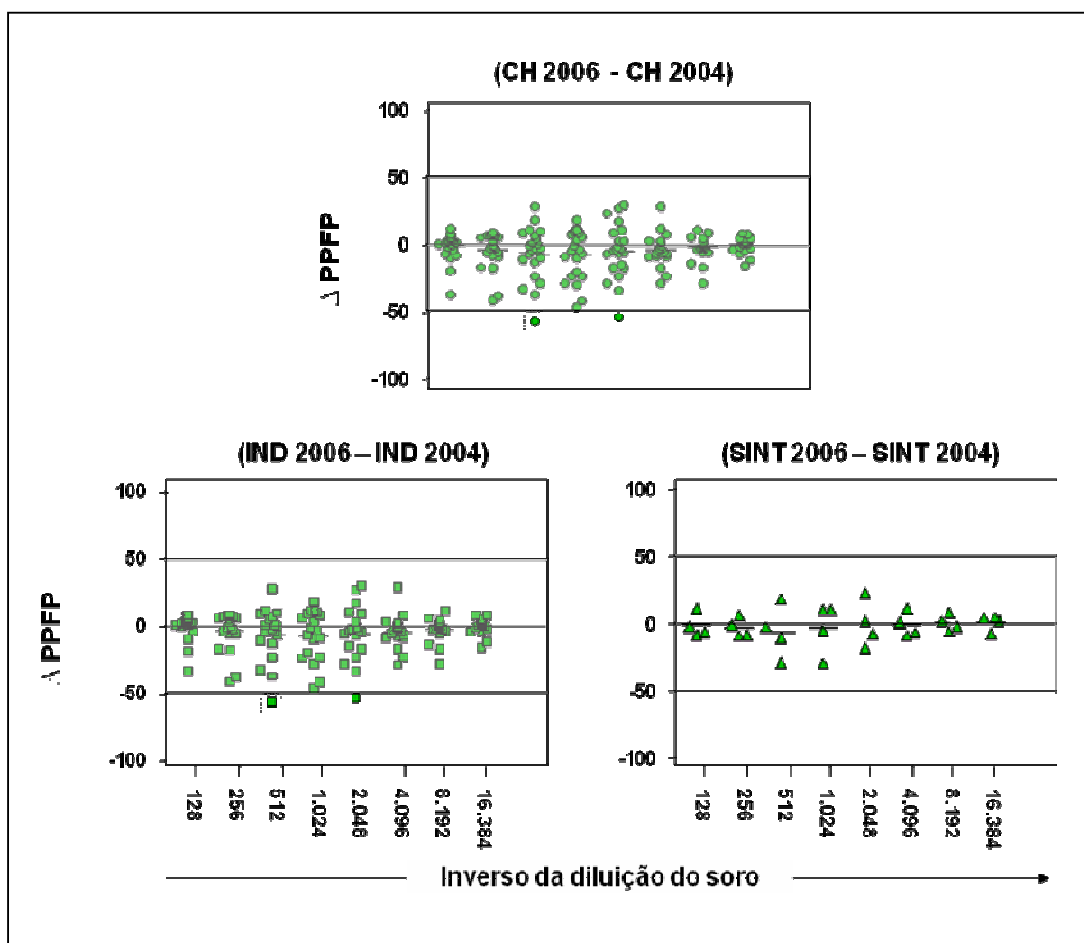


Figura 13 – Resultados da queda de porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) avaliados pela pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivos (AATV) nos pacientes portadores de infecção/doença de Chagas do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, nove anos após tratamento com Benzonidazol.

6.0 DISCUSSÃO

Os trabalhos de campo na área de clínica-epidemiológica da doença de Chagas têm uma grande importância em saúde pública pelos estudos e análises realizadas em nível de diagnóstico, morbi-mortalidade, tratamento específico e manejo clínico adequado do paciente. O conjunto desses fatores oferece uma melhor qualidade de vida a população atingida.

O trabalho envolvendo a Universidade e a realidade sócio-biológica, junto ao seu sistema de saúde nas regiões endêmicas, traz resultados satisfatórios para ambos, configurando para a primeira uma fonte enorme de aprendizado e experiência humanitária técnico-humana. Muitos estudos realizados em diversas áreas endêmicas do Brasil (DIAS, 1982; COURA e cols, 1985; BORGES-PERREIRA e cols, 1985; COURA e BORGES-PEREIRA, 1985 e COURA e cols, 1997), trouxeram expressiva contribuição ao estudo da morbidade e mortalidade da doença de Chagas. Coura e cols (1997) relataram que em zonas endêmicas há carência de condições laboratoriais e de profissionais capacitados para realizar adequadamente trabalhos desta natureza, necessitando, para supri-las da presença constante do pesquisador nas áreas em questão.

Neste trabalho foi realizada inicialmente, uma avaliação dos aspectos epidemiológicos relacionados a um grupo de pacientes com diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* e previamente tratados com benzonidazol em 1997. Após análise das respostas do questionário epidemiológico utilizado, foi possível verificar que 93,5% dos pacientes que nasceram em casa de adobe, atualmente só 45% continuam morando em casa de adobe, o que revela uma melhoria da condição de moradia da população local. Esta melhoria pode ser consequência do programa de vigilância epidemiológica instalado no município desde 1997 sob a supervisão da Gerência Regional e Saúde (GRS) de Diamantina que aparentemente tem apresentado resultados satisfatórios se considerarmos o resultado de inquérito sorológico recentemente realizado em escolares deste município (BORGES e cols, 2006).

Dentre os pacientes avaliados neste trabalho, 70,9% possuem parentes vivos que possuem doença de Chagas ou que morreram por causa da doença de Chagas, desde os primeiros anos da descoberta da doença, Carlos Chagas (1912) já havia relatado que em Lassance (MG), não havia uma família que não tivesse perdido um ou vários membros vitimados pela morte inesperada causada por esta endemia. Carneiro e cols (2001) ao avaliarem os fatores de risco associados à infecção pelo *T. cruzi* em municípios sob

vigilância epidemiológica no estado de Minas Gerais, demonstraram que as crianças positivas apresentavam maior probabilidade de ter mãe ou parente, também positivo para a infecção chagásica.

Foi também revelada por alta porcentagem de pacientes (64,5%) a presença de galinheiro no peridomicílio, cão e/ou gato em casa, bem como a presença de gambá visitando o domicílio. Esses fatores associados sabidamente propiciam a migração e posterior adaptação dos triatomíneos do ambiente silvestre para o ambiente peridoméstico e doméstico, uma vez que estes animais lhes servem de fonte alimentar. Configura-se, com o tempo, uma domicialização progressiva do vetor aumentando assim o risco de transmissão da doença de Chagas para o homem (Dias, 2000).

Foram encontrados ainda, algumas informações que revelam o baixo padrão sócio-econômico dos pacientes, tais como baixo nível de escolaridade, uma vez que 61,3% deles apresentam o 1º grau incompleto e 16,1% são incapazes de assinar o próprio nome. Como atividade econômica foi constatado que mais da metade dos pacientes são agricultores.

O baixo padrão sócio-econômico dos pacientes pode ser um inconveniente por dificultar a ida dos mesmos ao hospital. O nível de conhecimento do paciente facilita o trabalho de acompanhamento desses como demonstrado por Luquetti e Rassi (2002). Esses autores relataram que os pacientes com doença de Chagas estão cada vez mais vivendo nas cidades e buscando esclarecimento sobre a doença. Isso faz com que o paciente priorize sua saúde.

O convívio com o triatomíneo pareceu ter sido quase uma constante, e alguns relataram que os insetos lhes serviam como “brinquedos” quando eram crianças. Do total de pacientes, 77,4% pacientes, houve o reconhecimento dos triatomíneos pela observação direta de exemplares de algumas espécies mostradas na hora da entrevista, enquanto outros pacientes demonstraram este conhecimento em relatos pessoais. Esses dados revelam a íntima relação que existia entre as pessoas e os triatomíneos naquela região, bem como o elevado conhecimento dos vetores pela população local, um possível fruto da vigilância epidemiológica implantada no município em 1997. Aparentemente, os últimos estudos realizados revelam que esta vigilância tem sido bem

conduzida na região (MONTTOYA e cols, 2003; BORGES e cols, 2006 e MACHADO DE ASSIS, 2005).

Os diversos estudos que avaliam a eficácia terapêutica contra o *T. cruzi* têm encontrado resultados discordantes devido às diferenças na população estudada, métodos de avaliação empregados, esquema terapêutico, duração da avaliação pós-tratamento, e critério de cura utilizado (MACEDO e SILVEIRA, 1987; REYES e VALLEJO, 2005). Além disto, a diversidade genética do parasita encontrada em regiões geográficas distintas (MILES e cols, 2003) também pode explicar estas divergências de resultados, em função da resistência natural do parasito aos quimioterápicos disponíveis (SOSA-ESTANI e cols, 1998). Vários estudos experimentais têm demonstrado de maneira incontestável a correlação entre genética do parasito e sua susceptibilidade/resistência a droga (FILARDI E BRENER, 1987; ANDRADE e cols, 1995 e TOLEDO e cols, 2003).

A literatura tem revelado que o efeito da quimioterapia em pacientes com doença de Chagas crônica tem apresentado resultados discordantes (MACEDO e SILVEIRA, 1987; TEIXEIRA e cols, 1989; IANNI, e cols, 1993; IANNI e MADY, 1997; AMATO NETO, 1998; RASSI e cols, 2000; FRAGATA-FILHO e cols, 1995; VIOTTI e cols, 1994; COURA e cols, 1997; VIOTTI e cols, 2006; FABRO e cols, 2007) e que o percentual de cura parasitológica é claramente dependente do tempo de infecção apresentado pelo paciente. Por esta razão, os melhores relatos de cura têm sido encontrados em casos de tratamentos realizados durante a fase aguda da infecção e em crianças recém-nascidas ou até com 12 anos de idade (ANDRADE e cols, 1996; SOSA-ESTANI e cols, 1998; RUSSOMANDO e cols, 1998; SOSA-ESTANI e SEGURA, 2006).

Apesar do tratamento não levar a índices de cura parasitológica elevados em pacientes com doença de Chagas na fase crônica, deve-se levar em consideração o quadro clínico dos pacientes quando foram tratados. Segundo BORGES-PEREIRA e cols (1992), o tratamento deve buscar uma resposta para as seguintes perguntas: “*O tratamento pode levar a cura clínica ou melhorar o prognóstico do paciente em função da diminuição da carga parasitária e conseqüentemente do estímulo antigênico possível indutor dos fenômenos de auto imunidade existentes na doença de Chagas na*

opinião de alguns autores?” (Higuchi e cols, 1993; Tarleton, 2003; Sosa-Estani e SEGURA, 2006)

A avaliação clínica comparada dos pacientes aqui estudados, antes e pós-tratamento, sugere que mesmo não tendo sido definitivamente comprovada a cura, inclusive pelo limitado tempo de acompanhamento, o tratamento manteve em seu estado clínico inicial 82,1% (23/28), e que 17,8% (5/28) evoluíram clinicamente ao longo dos nove anos de observação, o que representa uma evolução média de 1,98% ao ano. Em Virgem da Lapa, município limítrofe com Berilo, em um estudo ao longo de seis anos com 77 pacientes, Borges-Pereira e cols (1985) encontraram uma taxa de 32% de progressão da doença de Chagas nos seis anos, com persistência da forma indeterminada em 62,1%, uma regressão da doença em 5,6% e 8,9% de mortalidade atribuída à doença de Chagas. De forma diferente ao anterior, um estudo retrospectivo de 10 anos realizado em Berilo, Montoya (1998) também demonstrou que a incidência de cardiopatia chagásica foi de 1,5% ao ano.

Considerando apenas os pacientes tratados na forma indeterminada, o índice de evolução clínica foi de 4,6% (1/22) após nove anos, representando 0,5% de evolução clínica média por ano. Analisando comparativamente a situação clínica dos pacientes na forma indeterminada, antes e depois do tratamento, os dados obtidos sugerem fortemente que o tratamento pode ter retardado ou impedido a evolução da doença. Quando se comparam os resultados aqui obtidos com os trabalhos de Macedo (1976); Dias (1982) Macedo e Silveira (1987) e Prata (2001), que relatam 2-3% de evolução por ano da forma indeterminada para uma forma definida clinicamente, nossos resultados ainda mostraram uma evolução clínica mais lenta após nove anos de tratamento, sugerindo que o mesmo pode ter levado a uma estabilização da condição clínica destes pacientes ou melhoria de seu prognóstico.

Foi verificado que o único paciente com a forma indeterminada que evoluiu para a forma cardíaca leve foi um dos dois pacientes mais velhos tratados (37 anos). Dos pacientes que evoluíram clinicamente, com exceção de um deles, todos estavam com idade superior a 20 anos antes do tratamento. O único paciente menor de 20 anos (14 anos) e que evoluiu clinicamente, já apresentava algum sinal de alterações eletrocardiográficas, da doença de Chagas antes do tratamento. Por outro lado, Aguilar (1988) também demonstrou em pacientes não tratados de Berilo, que a forma

indeterminada diminuía a sua prevalência com a idade enquanto a forma cardíaca aumentava. Já as formas digestivas e mistas atingiram o máximo nos pacientes maiores de 60 anos. O achado de formas cardíacas graves, de formas digestivas e mistas somente na população infectada pelo *T. cruzi*, segundo esse autor, confere uma grande correlação entre a presença da infecção e a ocorrência das formas clínicas encontradas.

Também Dias (1982) em seu valioso trabalho evolutivo realizado em Bambuí (MG), mostrou que a forma crônica indeterminada predominou amplamente na primeira década de evolução. Na segunda década, essa forma ainda compreendia 60% dos indivíduos em avaliação, e na terceira década 39,7%. Dias (2006) relata, ainda, uma vida normal dos pacientes e o excelente prognóstico da forma indeterminada durante 10-15 anos e que a maioria dos pacientes com esta forma clínica poderá permanecer assintomático por décadas ou até o fim da vida.

Em um município vizinho a Berilo, Borges-Pereira e cols (1985) avaliaram 110 pacientes infectados pelo *T. cruzi* e 110 pacientes não infectados e acompanhados por seis anos. Os resultados revelaram que 60% dos pacientes na forma indeterminada se mantiveram com seu quadro clínico inicial sugerindo assim um bom prognóstico para esta forma clínica no período de seis anos.

No Brasil, são poucos os grupos que trabalham com acompanhamento de pacientes tratados. Coura e cols. (2004) apresentaram um relato de 11 grupos que têm trabalhado com tratamento de pacientes com infecção/doença de Chagas no Brasil e que fizeram avaliação clínica pós-tratamento, com uma média de acompanhamento de nove anos. Dentre eles, Macedo e Silveira (1987) não encontraram diferenças na evolução clínica de 171 pacientes na forma indeterminada, tratados e não tratados, acompanhados por sete anos. Dos 171, 13 apresentaram alterações no ECG, sendo sete (6,7%) no grupo não-tratado e seis (8,8%) no grupo tratado.

Estes estudos nos colocam diante da necessidade de publicações que considerem as investigações longitudinais sobre a infecção chagásica crônica em pacientes tratados curados em comparação com grupo de pacientes tratados não curados e pacientes não-tratados. Tais informações poderão definir a importância da presença do *T. cruzi* e seus produtos antigênicos no processo evolutivo da doença crônica.

Diante dos nossos resultados e de outros autores que realizaram ensaios terapêuticos na fase crônica da doença de Chagas, fica demonstrado que novas pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de obter medicamentos mais ativos e com menores efeitos colaterais. Outra razão que não deve ser esquecida é o fato de existir 16-18 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e de 120 milhões de indivíduos expostos ao risco de adquirir esta infecção que merecem ser tratados (WHO, 2005).

Neste trabalho, tivemos a oportunidade de empregar vários métodos utilizados como critério de cura, incluindo metodologias sofisticadas, sensíveis e atuais para detectar a cura parasitológica.

Os métodos parasitológicos são os mais indicados para confirmar os casos de falha terapêutica, porém quando negativos não são indicadores de cura devido à relativa baixa sensibilidade (FERREIRA, 1990; GALVÃO e cols, 1993; CHIARI, 1999). A hemocultura apresenta-se como uma técnica trabalhosa, lenta e inadequada ao longo do acompanhamento pós-tratamento. Sua positividade é ainda menor em pacientes que receberam tratamento específico contra o *T. cruzi*, devido à diminuição da parasitemia causada pelo tratamento (FERREIRA, 1976; MACEDO e SILVEIRA, 1987; FERREIRA, 1990) independentemente da erradicação do parasito (MEIRA e cols, 2004). Mesmo com todo trabalho da técnica, a hemocultura como controle de cura é considerada “*Padrão Ouro*” como falha terapêutica (GOMES e cols, 1999; CASTRO e cols, 2006).

Após nove anos do tratamento, foi possível detectar parasitos na corrente circulatória por meio de hemoculturas em três dos 31 pacientes avaliados. Mesmo não sendo a hemocultura uma técnica muito sensível na fase crônica da infecção, (MOURÃO e MELO, 1975; CHIARI e cols, 1989) e mais ainda em pacientes tratados (CASTRO, 1980; CANÇADO, 1999; CASTRO e cols, 2002; CASTRO e cols, 2006), este resultado representa uma evidente falha terapêutica correspondente a 9,6% dos casos.

Curiosamente, todos os pacientes aqui avaliados apresentaram hemocultura positiva apresentavam a forma cardíaca da doença de Chagas. No entanto, correlação entre parasitemia e morbidade da doença não está bem estabelecida (CASTRO, 1980; CASTRO e cols, 2002; CASTRO e cols, 2005; CASTRO e cols, 2006), sendo os

resultados muito contraditórios inclusive na população de Virgem da Lapa, município vizinho de Berilo, que foi avaliada neste aspecto por Borges-Pereira e cols (1985) e Borges-Pereira e cols (1992).

Cançado (1999) relata que em acompanhamentos pós-tratamento prolongados são obtidos resultados negativos em testes parasitológicos, indicando cura. Porém, esses resultados podem estar refletindo apenas períodos de ausência ou de baixa parasitemia que poderá ser detectada mais tardiamente em outras avaliações subseqüentes.

Neste estudo, a PCR tem sido proposta como um método alternativo, mais rápido e seguro que a hemocultura para monitoração de cura, apresentando maior sensibilidade na detecção de fragmentos genômicos ou kDNA do *T. cruzi* (GOMES e cols, 1998; BRITO e cols, 2001).

A positividade da PCR foi verificada em 80% (25/30) dos pacientes avaliados, com pelo menos uma reação positiva em duas coletas diferentes. Quatro pacientes (2; 8; 9 e 21) apresentaram reação de PCR negativa em duas amostras analisadas. O paciente 1 apresentou reação negativa em uma única amostra analisada discordando do resultado da hemocultura que foi positiva para o mesmo. Essa contradição de resultados entre a hemocultura e a PCR já foi observada por outros autores (GOMES e cols, 1998; GALVÃO e cols, 2003 e CASTRO, 2002).

Não foi possível afirmar, apenas com estes exames, se estes pacientes são realmente negativos. Além disto, a indisponibilidade de sonda molecular para a realização de hibridização com os produtos da PCR obtidos, limita a interpretação deste dado, uma vez que a mesma poderia detectar positividade em outros pacientes. Galvão e cols (2003) demonstraram diferentes padrões de bandas, encontrando pacientes aparentemente negativos que se confirmaram positivos após hibridização. Estes pesquisadores encontraram também, PCR positiva e diminuição dos títulos sorológicos e não afirmam categoricamente se os resultados negativos encontrados revelam ausência de parasitemia ou apenas sua diminuição, apesar da alta sensibilidade deste método na detecção de kDNA (Gomes e cols, 1998). Em nosso trabalho encontramos 40% de resultados oscilantes entre as duas amostras de sangue analisados procedentes do mesmo paciente, corroborando os dados de Galvão e cols (2003).

Brito e cols (2001) encontraram parasitemia intermitente em pacientes tratados na fase aguda e crônica da infecção, utilizando a reação em cadeia da polimerase passados 20 anos do tratamento específico. Eles demonstraram que a PCR foi muito mais sensível do que o xenodiagnóstico para determinar falha terapêutica foi capaz de detectar mais precocemente a eficácia do tratamento. Outros autores (Solari e cols, 2001) encontraram discrepâncias nos resultados da avaliação parasitológica de pacientes adultos que apresentaram xenodiagnóstico positivo e PCR negativo. Esses autores demonstraram ainda aumento da sensibilidade da PCR de 69% em coleta de 1mL de sangue, que aumentou para 75% quando a coleta foi de 5 mL. No entanto é importante considerar que em pacientes não tratados a sensibilidade da PCR varia de 59% - 100%, dependendo da área geográfica, idade dos pacientes, tempo de infecção (ÁVILA e cols, 1990; WINCKER e cols, 1994; BRITO e cols, 1993), o que possivelmente está relacionado com a genética do parasito envolvido.

A sorologia convencional (ELISA e HAI) realizada neste estudo apresentou 100% de positividade, fato esse explicado pela longa permanência de anticorpos anti-*T. cruzi* na circulação. Isto acontece mesmo naqueles pacientes considerados como dissociados/curados, que apresentam negatificação dos testes sorológicos não-convencionais, tais como a Lise Mediada pelo Complemento (GALVÃO e cols, 1993) e a pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo pela citometria e fluxo (MARTINS-FILHO e cols, 1995 e CORDEIRO e cols, 2001). Tal resultado é esperado se consideramos que a grande maioria dos pacientes era composta de adultos jovens e que esta avaliação foi feita após nove anos de tratamento, sugerindo a necessidade de novas avaliações por maior período de tempo. Luquetti e Rassi (2002) relataram que os anticorpos são a melhor ferramenta para avaliar a eficácia do tratamento por ser praticamente a única característica constante de todas as pessoas infectadas.

O principal objetivo do tratamento específico é a eliminação do agente etiológico demonstrado pela negatificação pós-terapêutica definitiva dos exames parasitológicos e necessariamente, dos exames sorológicos específicos, cujo processo pode demorar anos de observação, geralmente proporcional ao tempo de infecção (CANÇADO, 1999). No entanto, o que se verifica em avaliações pós-terapêuticas, é a negatificação antecipada e repetida dos exames parasitológicos, tais como xenodiagnóstico, hemocultura, e mais recentemente, da PCR (BRITO e cols, 2001; GALVÃO e cols, 2003), em relação aos métodos sorológicos não convencionais (Lise

Mediada por Complemento ou anticorpos anti-tripomastigota vivo) e principalmente convencionais (ELISA, IFI, HAI e Reação de Fixação de Complemento) (Galvão e cols, 1993).

Quando a terapêutica específica é empregada em pacientes crônicos, a queda de títulos ocorre de forma gradual e lenta, até que verificar a cura parasitológica por esse critério, fato que pode demorar 15 ou mais anos para acontecer. Desta forma, as taxas de cura, ou seja, sorologia convencional persistentemente negativas são da ordem de 8% a 26%, conforme relatos de pesquisadores que acompanharam pacientes tratados por um período médio de 20 anos (CANÇADO, 2002). Se depois de certo tempo, os níveis de anticorpos permanecerem como antes, indica que o parasito não desapareceu (LUQUETTI e RASSI, 2002)

Cançado (2000) e Rassi e cols (2000) comprovaram a cura através da ausência de anticorpos em adultos tratados há 15 a 20 anos. Foi também demonstrado que os níveis de anticorpos no paciente infectado são constantes, na ausência de tratamento, mesmo decorrido décadas após a infecção (LUQUETTI e RASSI, 1998). Estes autores verificaram, ainda, que alguns pacientes tratados apresentavam títulos de anticorpos significativamente mais baixos após o tratamento, podendo apresentar reações negativas anos depois, o que levou a considerar que estes pacientes estariam a caminho da cura. Este autor ainda admite que a queda progressiva de títulos sorológicos após o tratamento é sugestiva de eficácia terapêutica (LUQUETTI e RASSI, 1998).

Neste estudo, a comparação dos títulos sorológicos de IgG total pela ELISA foi realizada em amostras de soro de 18 pacientes coletadas antes e nove anos depois do tratamento. No entanto, em oito deles a reação da amostra coletada antes do tratamento, e conservada até agora em laboratório, foi negativa impossibilitando essa comparação. A análise dos valores de absorbância obtida nos 18 pacientes assim avaliados revelou que o tratamento foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05$) os valores de absorbância após nove anos do tratamento. Foi observado que somente aqueles tratados com a forma indeterminada da doença de Chagas apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores médios de absorbância após nove anos do tratamento. Por outro lado, os pacientes tratados com algum acometimento clínico não apresentaram diferenças estatísticas nos valores médios de absorbância. Dos pacientes que apresentaram maiores diminuições dos valores de absorbância, o paciente (Nº 19) foi o

que apresentou queda mais acentuada, de anticorpos (55%) sendo ele o mais jovem do grupo. Considerando que soros de oito pacientes analisados coletados antes do tratamento perderam reatividade após nove anos de conservação em laboratório, fato este esperado se a conservação não for cuidadosa e segura, podemos admitir que na realidade, a queda de reatividade de anticorpos IgG observada entre as amostras de soros obtidas antes e nove anos pós-tratamento tenha sido muito mais elevada.

Nossos resultados revelaram que na avaliação da sorologia não-convencional para pesquisa de anticorpo anti-tripomastigota vivo (AATV), empregada como um importante controle de cura por ser este anticorpo testemunha de infecção ativa (MARTINS-FILHO e *cols*, 1995; CORDEIRO e *cols*, 2001), 100% dos pacientes foram positivos, indicando que nenhum caso de cura parasitológica foi observado.

Avaliando-se a reação de citometria de fluxo em dois momentos diferentes após o tratamento (2004 e 2006), correspondente a sete e nove anos pós-tratamento, não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre as porcentagens de parasitos fluorescentes vivos (PPFP) nos períodos avaliados. Apesar do curto espaço de tempo entre as duas avaliações, três pacientes apresentaram diminuição dos valores de PPFP. Dentre eles o paciente N° 19, o mesmo que apresentou diminuição dos valores de absorbância após o tratamento. Novas avaliações são necessárias para verificar se a queda desses anticorpos revelará mais precocemente a cura desses pacientes segundo o demonstrado por Galvão e *cols* (1993) em avaliação prolongada de pacientes pós-tratamento.

Foi proposto neste trabalho um método alternativo de análise dos valores de absorbância de IgG pela reação de ELISA. Através da análise comparativa dos soros de pacientes não tratados (NT), pacientes tratados não curados (TNC), pacientes tratados curados (TC) e pacientes não infectados (NI) foi possível padronizar e estabelecer critérios de interpretação para um ensaio imunoenzimático semiquantitativo aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

A proposta foi utilizar uma diluição de soro altamente sensível para diagnóstico e uma diluição menos sensível, mas que fosse capaz de demonstrar precocemente uma diminuição dos valores de densidade óptica após o tratamento. Assim, quando se utilizou a diluição de 1:320, foi demonstrada uma maior distinção entre os pacientes que

apresentaram queda sorológica. A proposta de usar ELISA semiquantitativa é análoga à recentemente adotada por Wendling (2006) ao trabalhar com pesquisa de anticorpo anti-tripomastigota vivo (AATV) como um dos métodos de avaliação de cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas.

Quando os pacientes foram agrupados em função da sua forma clínica, foi demonstrado claramente que os três pacientes que haviam apresentado reação negativa na diluição de 1:320 após nove anos do tratamento, apresentavam a forma indeterminada da doença de Chagas quando tratados. Todos os demais pacientes apresentaram resultados positivos.

Não foi encontrada diferença estatística quando se avaliou o delta ou queda de densidade óptica (DO depois do tratamento menos DO antes do tratamento) na reação de ELISA semiquantitativa. Porém se confirmou que a melhor diluição para verificar queda sorológica foi a de 1:320. Somente os pacientes que receberam tratamento durante a forma indeterminada, com exceção de um, apresentaram alguma mudança no perfil sorológico após nove anos de realização do tratamento com benzonidazol. O mesmo paciente (19) que apresentou diminuição dos valores de absorbância e de PPFP, também apresentou aumento do delta de absorbância, medido pela reação de ELISA e de PPFP pela citometria de fluxo. Ficou assim estabelecido um método alternativo de análise da metodologia de ELISA semiquantitativa e da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da Doença de Chagas. Na ELISA a diluição que melhor discriminou os pacientes com queda sorológica pós-tratamento foi a de 1:320 enquanto que na pesquisa de AATV pela citometria de fluxo foi a diluição 1:512.

Ao contrário e mais uma vez, não foi observada nenhuma mudança nos perfis sorológicos dos pacientes tratados na forma cardíaca e/ou digestiva da doença de Chagas.

Através dos resultados encontrados, foi confirmado que a melhor diluição para realizar diagnóstico da doença pela ELISA foi a de 1:80, devido à maior sensibilidade. Nesta diluição, porém, não foi possível verificar queda sorológica nos pacientes em estudo. Por outro lado, o uso da diluição de 1:320 tornou possível visualizar mais precocemente esta queda de anticorpos sendo a mesma recomendada para melhor avaliação de eficácia terapêutica.

O paciente Nº 19. que apresentou diminuição dos valores de absorbância, medida pela reação de ELISA, e dos valores de PFP, medido na reação de citometria de fluxo, foi exatamente o que era mais jovem quando recebeu o tratamento.

Esses resultados mostram a dificuldade em se obter cura parasitológica após o tratamento de pacientes com doença de Chagas crônica, em qualquer uma de suas formas clínicas, mesmo naqueles que foram tratados na fase crônica inicial da doença. Em nosso trabalho, três dos 31 pacientes avaliados foram tratados com idade inferior a 12 anos, idade considerada como fase crônica recente pelo Consenso Brasileiro sobre Doença de Chagas (2005), na qual a resposta terapêutica é mais precoce e favorável (ANDRADE e cols; 1996; ANDRADE e cols 1998; RUSOMANDO e cols, 1998; BLANCO e cols, 2000; ANDRADE e cols 2004). Mesmo assim, nove anos após o tratamento, não evidenciamos ainda nenhum caso de cura da infecção.

A constatação da cura em pacientes com doença de Chagas crônica é bastante controversa, sendo encontrados diferentes resultados, tais como 8% (CANÇADO, 1999) 10% (FERREIRA, 1990), 19,1% (VIOTTI e cols, 1994). Prata (2001) relatou que o tratamento na fase crônica é desacreditado devido às diferentes taxas de cura encontradas, freqüentemente devido ao emprego de diferentes critérios de cura.

Apesar de não ter sido demonstrada a cura parasitológica dos pacientes, pode-se sugerir que o tratamento anti-*T.cruzi* utilizando benzonidazol reduziu, atrasou ou preveniu a progressão da doença em pacientes tratados na forma indeterminada da doença de Chagas. Por outro lado, novas avaliações serão necessárias, ao longo dos próximos anos, para verificar se as mudanças laboratoriais ocorridas em alguns pacientes tais como: queda de titulações de IgG, queda da porcentagem de parasitos fluorescentes vivos e negatificação repetida ou resultados oscilantes da PCR evoluirão para persistentemente negativos. Segundo Luquetti e Rassi (2002) a proporção de pacientes tratados com doença de Chagas crônica de longa duração, e que apresentaram cura depois de 20 anos de acompanhamento é de aproximadamente 25%, tempo consideravelmente maior do que o empregado neste trabalho.

Ainda temos que considerar que a OPS (1998) e a WHO (2002) só aceitam como critério de cura a negatificação simultânea dos exames parasitológicos e da sorologia convencional. Isto realmente tem sentido se considerarmos que a sorologia em

pacientes chagásicos pode ser negativa, mesmo na ausência de tratamento etiológico. Nestes sentido, o emprego da PCR, um método parasitológico de maior sensibilidade e cujo papel como critério alternativo de cura não está ainda bem estabelecido, certamente demonstrará mais dificuldades para evidenciar eficácia terapêutica na doença de Chagas.

7.0 CONCLUSÕES

1 – As avaliações epidemiológicas após o período de nove anos, evidenciaram de aspecto positivo apenas melhoria nas condições de moradia dos pacientes, possível fruto do programa de controle e da vigilância epidemiológica da doença de Chagas na região;

2 – Os pacientes tratados na forma indeterminada da doença de Chagas apresentaram menor índice de evolução clínica quando comparado aos dados existentes na literatura;

3 – A hemocultura foi positiva em três pacientes, dos quais todos apresentavam a forma cardíaca da doença de Chagas antes do tratamento e também em nossa avaliação, indicando claramente fracasso terapêutico;

4 – Considerando o critério de cura aqui estabelecido foi constatado até o momento atual, que nenhum dos pacientes apresentaram evidência de cura parasitológica;

5 – O tratamento foi capaz de reduzir significativamente os títulos da sorologia convencional de alguns pacientes após nove anos do tratamento, especialmente naqueles que apresentavam antes do mesmo, a forma indeterminada da doença de Chagas.

6 – Não foi observada mudança no perfil sorológico dos pacientes que apresentavam a forma cardíaca e/ou digestiva da doença de Chagas antes do tratamento;

7 - A ELISA semiquantitativa foi uma metodologia importante na monitorização da eficácia terapêutica sendo a diluição de 1:320 do soro a que melhor evidenciou a queda sorológica.

8 – A pesquisa de anticorpos anti-tripomastigota vivo pela citometria de fluxo não apresentou diferença significativa no intervalo de dois anos de avaliação, aos sete e nove anos depois do tratamento, indicando a permanência de infecção ativa;

9 - Foi estabelecido um método alternativo de análise da metodologia de ELISA semiquantitativa e da pesquisa de AATV pela citometria de fluxo na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da Doença de Chagas.

10 – Apesar de não ter sido demonstrada cura parasitológica nos pacientes tratados, os resultados sugerem que o benzonidazol reduziu, atrasou ou preveniu a progressão da doença em pacientes tratados na forma indeterminada da doença de Chagas;

11 - Novas avaliações serão necessárias ao longo dos próximos anos, para verificar definitivamente se ocorrerá ou não cura parasitológica nos pacientes tratados com benzonidazol aqui estudados.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, H.M (1988). Epidemiologia da doença de Chagas: Aspectos históricos, sociais e morbidade em duas áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil, Dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

AMATO-NETO, V (1998). Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, **70**: 63-64.

ANDRADE, S.G; FREITAS, L; PEYROL, S; PIMENTEL, A. E SADIGURSKY (1991). Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bulletin of the World Health Organization*, **69**: 191-197.

ANDRADE, S.G; MESQUITA, I.M.O; JAMBEIRO, J.F; SANTOS, I.F.M; PORTELLA, R.S (2003). Treatment with benzonidazol in association with *Trypanosoma cruzi*: investigation into the possible development of neoplasias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **36**: 441-447.

ANDRADE, A.L.S.S; ZICKER, F; OLIVEIRA, R.M; SILVA, A.S; LUQUETTI, A.O; TRAVASSOS, L.R; ALMEIDA, I.C; ANDRADE, S.S; ANDRADE, J.G; MARTELLI, C.M (1996). Randomized trial of efficacy of benzonidazol in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet*, **348**: 1407-1413.

ANDRADE, A.L.S.S; ZICKER, F; RASSI, A; RASSI, A.G; OLIVEIRA, R.M; SILVA, S.A; DE ANDRADE, S.S; MARTELLI, C.M.T (1998). Early eletrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi*-seropositive children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 530-534.

ANDRADE, A.L.S.S; MARTELLI, C.M; OLIVEIRA, R.M; SILVA, S.A; AIRES, A.I; SOUSSUMI, L.M; COVAS, D.T; SILVA, L.S; ANDRADE, J.G; TRAVASSOS, L.R; ALMEIDA, I.C (2004). Short report: Benzonidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**: 594-597.

ARAÚJO, S.M; ANDÓ, M.H; CASSAROTTI, D.J; CRISTINA, D; MOTA, G.A; BORGES, S.M.R; GOMES, M.L (2000). Programa ACHEI: Atenção ao Chagásico com educação integral no município de Maringá e região noroeste do Paraná, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **33**: 565-572.

ARAÚJO, M.S.S; MARTINS-FILHO, O.A; PEREIRA, M.E.S; BRENER, Z (2000). A combination of benzonidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **45**: 819-824.

ÁVILA, H. A; BORGES-PEREIRA, J; THIEMANN, O; PAIVA, E; DEGRAVE, W; MOREL, C; SIMPSON, L (1990). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparasion with serology and xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **31**: 2421-2426.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G; GOMES, J.A.S; CANÇADO, J.R; FERRARI, T.C; LEMOS, E.M; MOREIRA, M.C; GAZZINELL, G E CORREA-OLIVEIRA, R (2000). Immunological and clinical evaluation of chagas patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanossoma cruzi* infection 14-30 years ago. *The Journal of Infectious Disease*. **182**: 634-638.

BAHIA, M.T; GUEDES, P.M.M; FIETTO, J.L.R; LANA, M; TOLEDO, M.J.O (2005). Current advance in human and experimental Chagas disease chemotherapy. *Research Advance in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **5**: 99-121.

BERTELLI, M.S; GOLGHER, R.R; BRENER, Z (1977). Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. *Journal of Parasitology*, **63**: 434-437.

BESTETTI, R.B (1997). Should benzonidazol be used in chronic Chagas' disease? *Lancet*, **349**: 653.

BLANCO, S.B; SEGURA, E.L; CURA, E.N; CHUIT, R; TULIAN, L; FLORES, I; GARBARINO, G; VILLALONGA, J.F; and GURTLER, E (2000). Congenital transmission of *T. cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected

infants in north-western Argentina. *Tropical and Medicine International Health*, **5**: 293-301.

BOCCHI, E.A; HIGUCHI, M.L; VIEIRA, M.L; STOLF, N; BELLOTTI, G; FIORELLI, A; UIP, D; JATENE, A; PILEGGI, F (1998). Higher incidence of malignant neoplasms after heart transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease. *Journal of Heart and Lung Transplant*, **17**: 399-405.

BORGES, J.D; MACHADO DE ASSIS, G.F; GOMES, L.V; DIAS, J.C.P; PINTO, I.D.M; MARTINS-FILHO, O.A; TORRES, R.M; VIÑAS, P.A; BAHIA, M.T; MACHADO-COELHO, G.L.L; LANA, M (2006). Seroprevalence of Chagas disease in school children from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, six years following the onset of epidemiological surveillance. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **48**: 81-86.

BORGES-PEREIRA, J; WILCOX, H.P.F; COURA, J.R (1985). Morbidade da doença de Chagas. Estudo longitudinal de seis anos, Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**: 63-72.

BORGES-PEREIRA, J; WILCOX, H.P.F; COURA, J.R (1992). Evolução da cardiopatia chagásica crônica I – Influência da parasitemia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **25**: 101-108.

BRAGA, M.S; LAURIA-PIRES, L; ARGANARAZ, E.R; NASCIMENTO, R.J; TEIXEIRA, A.R.L (2000). Persistent infection in chronic Chagas disease patient treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Revista do Instituto de Medicina. Tropical de São Paulo*, **42**: 157-161.

BRENER, Z (1984). Recent advances in the Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **79**: 149-155.

BRENER Z; CANCADO J.R; GALVAO L.M; DA LUZ Z.M; FILARDI L.S; PEREIRA M.E; SANTOS L.M; CANCADO C.B (1993); An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **88**: 149-153.

BRITO, C; CARDOSO, M.A; VANNI, C.M.M; HASSLOCHER-MORENO, A; XAVIER, S.S; OELEMANN, W; SANTORO, A; PIRMEZ, C; MOREL, C.M; WINCKER, P (1993). Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, **110**: 241-247.

BRITO, C; SILVEIRA, C; CARDOSO, M.A; MARQUES, P; LUQUETTI, A; MACEDO, V; FERNANDES, O (2001). Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis in polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **6**: 823-826.

CAMARGO, M.E; DA SILVA, G.R; DE CASTILHO, E.A; SILVEIRA, A. C (1984). Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **26**: 192-204.

CANÇADO, J.R; MARRA, U.D; MOURÃO, O.G; ALVARES, J.M; OLIVEIRA, J.P.M; MACHADO, J.R; SALGADO (1973). Bases para a avaliação do tratamento específico da doença de Chagas humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **7**: 155-166.

CANÇADO, J.R (1997). Terapêutica Específica. In: Dias, J.C.P E Coura, J.R (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, pp. 323-351.

CANÇADO, J.R (1999). Criteria of Chagas Disease Cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**: 331-335.

CANÇADO, J.R (2000). Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **79**: 101-124. In: Brener, Z; Andrade, Z.A; Barral-Neto, M. (eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ª ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 19, pp: 389-405.

CANCADO J.R. (2002) Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benzonidazol. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **44**: 29-37.

CASTRO, C.N. (1980). Influência da parasitemia no quadro clínico da Doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical*, **9**:73-136.

- CASTRO, C.N; PRATA, A; MACEDO, V (2005). Influência da parasitemia na evolução da doença de Chagas crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **38**: 1-6.
- CASTRO, A. M; LUQUETTI, A.O; RASSI, A; RASSI, G.G; CHIARI, E; GALVÃO, L.M.C (2002). Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, **88**: 894-900.
- CASTRO, A.M; LUQUETTI, A.O; RASSI, A (2006). Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, **29**.
- CASTRO, J.A; DIAZ DE TORANZO, E.G (1998). Toxic effects of nifurtimox and benzonidazol, two drugs used against American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Biomedicine Environmental Science*, **1**: 19-33.
- CHAGAS, C (1911). Nova entidade mórbida do homem: Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **3**: 219-275.
- CHAGAS, C (1912). O Mal de Chagas. *Arquivo da Sociedade de Medicina de São Paulo*, **3**: 34-66.
- CERISOLA, J.A; BARCLAY C.A; LUGONES H; LEDESMA O (1975). Results of the anti-*T. cruzi* activity of RO 7-1051 in man. *Chemotherapy*, **6**: 79-85.
- CERISOLA, J.A (1977). Chemotherapy of Chagas' infection in man. Scientific Publication, *PAHO*, **347**.
- CHIARI, E; DIAS, J.C.P; LANA, M; CHIARI, C.A (1989). Hemoculture for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **22**: 19-23.
- CHIARI, E (1999). Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**: 229-300.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **38**: 5-26

CORDEIRO, F.D; MARTINS-FILHO, O.A; DA COSTA ROCHA, M.O; ADAD, S.J; CORREA-OLIVEIRA,R; ROMANHA, A.J (2001) Anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology*, **8**: 112-118.

COURA, J.R; ABREU, L.L; BORGES-PEREIRA, J; WILLCOX, H.P (1985). Morbidade da doença de Chagas. IV. Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**: 73-80.

COURA, J.R; BORGES-PEREIRA, J (1985). A follow-up on Chagas disease in two endemic áreas in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **79**: 107-112.

COURA, J. R; ABREU, L. L; WILCOX, F; PETANA (1997). Estudo comparativo com emprego de benzonidazol, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em área de campo com transmissão interrompida. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **30**: 139-144.

COURA, JR e CASTRO, SL (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**: 3-24.

COURA, J.R (2003). Tripanosomose, Doença de Chagas. *Ciência e Cultura*, **55**: 30-33.

COURA, J.R (2004). Brazilian experience on the treatment of Chagas disease with benzonidazol. Abstract, *IX European Multicolloquium of Parasitology*. Valencia Spain 18-23 July.

DIAS, J.C.P (1982). Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir de fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DIAS, J.C.P (1985). Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today*, **3**: 336-341.

DIAS, J.C.P (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **22**: 147-156.

DIAS, J.C.P; COURA, J.R (1997). Controle da doença de Chagas. In: Dias, J.C.P; Coura, J.R (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem para o clínico geral. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ pp: 453-468.

DIAS, J.C.P; COURA, J.R (1997). Epidemiologia. In: DIAS, J.C.P; COURA, J.R (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem para o clínico geral. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ pp: 33-65.

DIAS, J.C.P (1998). Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na iniciativa do cone sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **31**: 373-383.

DIAS, J.C.P (2000). Vigilância Epidemiológica em doença de Chagas. *Caderno de Saúde Pública*, **16**: 43-59.

DIAS, J.C.P (2002). O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Antônio Carlos da Silveira (ed). O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América. Ed. Faculdade de Medicina de Triângulo Mineiro, pp: 145-239.

DIAS J.C.P (2006). Chagas disease: successes and challenges. *Caderno de Saude Publica* **22**: 2020-2021.

FABRO, D.S; ARIAS, E; STREIGER, M; PIACENZA, M; INGARAMO, M; DEL BARCO, M; AMICONE, N (2000). Evolutive behavior toward cardiomyopathy of treated (nirfutimox or benzonidazol) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto de Medicina. Tropical de São Paulo*, **42**: 99-109.

FABRO, D.L; STREIGER, M.L; ARIAS, H.D; BIZAI, M.L; BARCO, M.D; AMICONE, N.A (2007). Tripanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fé (Argentina), over a mean of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **40**: 1-10.

FERREIRA, H.D. (1976) Clinical-therapeutic trial with benzonidazole in Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **18**: 357-364.

- FERREIRA, H. (1988) Tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas. In *Jornal de Pediatria*. Anonymous pp. 126-128.
- FERREIRA, H. O (1990). Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimoz e benzonidazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **23**: 209-211.
- FILARDI, L. E BRENER, Z (1987). 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*, **81**: 755-759.
- FRAGATA FILHO, A.A; DA SILVA, M.A; BOAINAIN, E (1995). Ethologic treatment of acute and chronic Chagas' Disease. *Sao Paulo Medicine Journal*, **113**: 867-872.
- GALVÃO, L.M.C; NUNES, R.M.B; CANÇADO, J.R; BRENER, Z e KRETTLI, A.U (1993). Lytic antibody as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**: 220-223.
- GALVÃO, L.M.C; CHIARI, E; MACEDO, A.M; LUQUETTI, A.O; SILVA, A.S; ANDRADE, A. L. S (2003). PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 5066-5070.
- GOMES, M.L; MACEDO, A.M; VAGO, A.R; PENA, S.D.J; GALVÃO, L.M.C; CHIARI, E (1998). *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Experimental Parasitology*, **88**: 28-33.
- GOMES, M.L; GALVÃO, L.M.C; MACEDO, A.M; PENA, S.D.J; CHIARI, E (1999). Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**: 205-210.
- GONTIJO, E.D; GALVAO, L.M; ELOI-SANTOS, S (1999). Chagas disease: criteria of cure and prognosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**: 357-362.

GUEDES, P.M.M; FIETTO, J.L.R; LANA, M; BAHIA, M.T (2006). Advance in Chagas disease Chemotherapy. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. **5**.

HIGUCHI, M.L; DE BRITTO, T; REIS, M.M; BARBOSA, C; BELLOTI, G; PEREIRA-BARRETO, A.C. e PILLEGI, F (1993). Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism e myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy e immunohistochemical findings. *Cardiovascular Pathology*, **2**: 101–106.

HIGUCHI, M.L (1995). Chagas disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, **64**: 251-254.

IANNI, B.M; ARTEAGA, E; MADY, C (1993). Uso do benzonidazol em chagásicos na forma indeterminada: resultados a longo prazo. *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*, **61**: 130.

IANNI, B.M. e MADY, C (1997). The indeterminate form of Chagas's disease. Myths vs facts. *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*, **68**: 147-148.

IANNI, B.M; ARTEAGA, E; FRIMM, C.C; PEREIRA BARRETTO, A.C; MADY, C (2001). Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. **77**: 59-62.

LIBONATTI, E. J; MANZULLO, E. C; DARRAIDOU, M. A; QUIÑONEZ, G; MORALES, S; LIBONATTI, O. V (1979). Seguimiento longitudinal de 4.441 chagásicos crônicos em nueve años Prêmio “Humberto Ruggero”. Asociación Médica Argentina. Buenos Aires.

LUQUETTI, A; RASSI, A (1998). Tratamiento de la enfermedad de Chagas en fase crônica: Critérios de cura convencionales: xenodiagnóstico, hemocultivo y serologia. *Revista de Patologia Tropical*, **27**: 37-51.

LUQUETTI, A E RASSI, A (2002). CONFERÊNCIA: Perspectiva del uso de la serología (Ag naturales y otros) en la evaluación de la eficacia del tratamiento etiológico. Disponível em: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c003/luque.htm>).

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.J (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, **193**: 265-275.

LUZ, Z.M.P; COUTINHO, M.G; CANÇADO, J.R; KRETTLI, A.U (1994). 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.

MACEDO, V. (1976) Influência da exposição à reinfecção na evolução da doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical*, **5** (1,2,3,4), 33-116.

MACEDO, V; SILVEIRA, C.A.N; MAUES, W.R (1984). Influência da terapêutica específica na evolução da forma indeterminada da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **17**: 34

MACEDO, V; SILVEIRA, C.A (1987). Perspectivas da terapêutica específica na doença de Chagas. Experiências na forma indeterminada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **20**: M-24.

MACHADO DE ASSIS (2005). Avaliação do programa de controle da doença de Chagas no município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil oito anos após a implementação da vigilância epidemiológica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

MAGUIRE, J.H; MOTT, K.E; HOFF, R; GUIMARAES, A; FRANCA, J.T; SOUZA, J.A.A; RAMOS, W.B; SHERLOCK, L.A (1982). A three-years follow-up study of infection with *Trypanosoma cruzi* and eletrocardiographic abnormalities in a rural community in Northeast Brazil. *American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene*, **31**: 42-47.

MANZULLO, E.C; DANAIDON, M.A; LIBONATTI, O; ROZLOSNIK, J (1982). Estudio Longitudinal de la Cardiopatía Chagásica Crônica. *Faculdade de Ciência Médicas*, Buenos Aires, **144**.

MARTINS-FILHO, O.A; PEREIRA, M.E; CARVALHO, J.F; CANÇADO, J.R e BRENER, Z (1995). Flow cytometry, a new approach to detect anti-live tripomastigote

antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas disease. *Clinical Diagnosis Laboratorial Immunology*, **2**: 569-573.

MEIRA, W.S.F; GALVÃO, L.M.C; GONTIJO, E.D; MACHADO-COELHO, G.L.L; NORRIS, K.A; CHIARI, E (2004). Use of Trypanosoma cruzi recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 707-712.

MIRANDA, L; MIRANDA, L; CAMPOS G (1994). História natural da forma crônica da doença de Chagas x tratamento específico. *Revista do centro oeste de cardiologia*, **1**: 25-29.

MONTOYA, R.A (1998). Morbidade da doença de Chagas no município de Berilo, Minas Gerais, Brasil. Estudos seccional e longitudinal da cardiopatia chagásica crônica (1987-1997). Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 153pp.

MONTOYA, R.A; DIAS, J.C.P; COURA, J.R (2003). Chagas disease in a community in southeast Brazil I. A serologic follow-up study on a vector controlled area. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **45**: 269-274.

MOURÃO, O.G; MELLO, O.C (1975). Hemocultura para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **9**: 183-188.

NEW YORK HEART ASSOCIATION – NYHA (1973), Nomenclature and criteria for diagnosis of disease of the heart and great vessels. 7th. Ed. Little and Brow Company, Boston.

OMS/OPS (1974). Aspectos clínicos de La enfermedad de Chagas. Informe de una reunión conjunta OMS/OPS de investigadores. *Bolletín Oficial Sanitaria Panamerica*, **76**: 141-158.

OPS/HCP/HCT/140/99 (1998). Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica.

PRATA, A (1990). Classificação da infecção chagásica no homem. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **23**: 109-113.

PRATA, A (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet*, **1**: 92-100.

RASSI A., Jr., RASSI A. & LITTLE W.C. (2000) Chagas' heart disease. *Clinical Cardiology*. **23**: 883-889.

RASSI, A; RASSI JUNIOR, A; GABRIEL RASSI, G (2000). Fase Aguda. In: Brener, Z; Andrade, Z.A; Barral-Neta, M (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp: 231-245.

RASSI, A; AMATO-NETO, V; GABRIEL-RASSI, G; FERRIOLI-FILHO; AMATO, V.S (2000). Tentativa de tratamento específico por meio da ticlopidina de pacientes com doença de Chagas em fase crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **33**: 225-226.

REZENDE, J.M; LAUAR, K.L; OLIVEIRA, A.R (1960). Aspectos clínicos e radiológicos da aperistalsis do esôfago. *Revista Brasileira de Gastroenterologia*, **12**: 247-262.

REYES, P. A; VALLEJO, M (2005). Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **4**.

RUSSOMANDO, G; TOMASSONE, M. M. C de; GUILLEN, de. I; ACOSTA, N; VERA, N; ALMIRON, M; CANDIA, N; CALCENA, M, F; and FIGUEREDO, A. (1998) Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 487-491.

SANTOS, F.R; PENA, S.D.J; EPPLEN, J.T (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Humam Genetic*, **90**: 655-656.

SCHIJMAN, A. G; ALTCHER, J; BURGOS, J. M; BIANCARDI, M; BISIO, M; LEVIN, M; FREILICH, H (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 441-449.

SCHMUNIS, G (1994). American Trypanosomiasis as a public health. In: Chagas' disease and the nervous system. Washington. *PAHO Scientific Publication*, **54**: 3-29.

SEGURA, M; MOLLINA DE RASPI, E; BASOMBRIA, M. A (1994). Reversibility of muscle and heart lesions in chronic *Trypanosoma cruzi* infected mice after late tripanosomicidal treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**: 213 – 216.

SILVEIRA, C.A.N; CASTILLO, E; CASTRO, C (2000). Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **33**: 191-196.

SOLARI, A; CAMPILAY, R; ORTIZ, S; WALLACE, A (2001). Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Experimental Parasitology*, **97**, 226-233.

SOSA-ESTANI, S; SEGURA, E. E; RUIZ, A.M; VELASQUEZ, E; PORCEL, B. M; e YAMPOTIS, C (1998). Efficacy of chemotherapy with Benzonidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 526-529.

SOSA-ESTANI, S; SEGURA, E (1999). Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, **59**: 166-170.

SOSA-ESTANI, S; SEGURA, E.L (2006). Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. *Current Opinion in Infectious Disease*, **19**: 583-587.

STREIGER, M.L; DEL BARCO, M.L; FABBRO, D.L; ARIAS, E.D; AMICONE N.A (2004). Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas'

disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **37**: 365-375.

TAFURI, W.L (1987). Patogenia da doença de Chagas. *Revista do Instituto de medicina Tropical de São Paulo*, **29**: 194-199.

TARLETON, R.L (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity. *Trends in parasitology*, **113**: 28-29.

TEIXEIRA, A; MANETA, D.T.L; SALES, L; BARCELOS, G; MAURMO, M; PIRES, L (1989). Os perfis parasitológicos, imunológico e eletrocardiográfico de chagásicos crônicos tratados com nitroarenos são indistinguíveis daqueles observados nos chagásicos não-tratados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **22**: 110

TEIXEIRA, A.R.L; CÓRDOBA, J.C; SOUTO-MAIOR, I; SOLÓRZANO, E (1990). Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benzonidazol. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**: 146-158.

TEIXEIRA, M.G.M; BORGES-PEREIRA, J; COURA, J.R; PERALTA, J.M (1994). Avaliação de testes sorológicos aplicados na detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, **30**: 133-139.

URBINA, J. A. e DOCAMPO, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, **19**: 495-501.

VILLAR, J.C; VILLAR, L.A; MARIN-NETO, J.A; EBRAHIM, S. YUSUF, S (2002). Trypanocidal drugs for asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection (Cochrane Review). In: The Cochrane Library. Oxford.

VINHAES, M. e DIAS, J.C.P. (2000). Chagas disease in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*. **16**: 7-12.

VIOTTI, R; VIGLIANO, C; ARMENTI, H; SEGURA, E (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benzonidazol: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal*, **127**: 151-162.

VIOTTI, R; VIGLIANO, C; LOCOCO, B; BERTOCCHI, G; PETTI, M; ALVAREZ, M.G; POSTAN, M; ARMENTI, A (2006). Long-term cardiac outcomes of treating

chronic Chagas disease with benzonidazol versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann.Intern.Med*, **144**: 724-734.

VITOR, R.W; CHIARI, E (1987). Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. I different antigenic extract. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **29**: 178-182.

VOLLER, A; DRAPER, C; BIDWELL, DE; BARTLETT, A.A (1975). Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. *Lancet* **305**: 426-428.

WENDLING, A.P.B (2006). Desempenho da sorologia convencional e não-convencional na monitoração de cura pós-terapêutica e etiológica da doença de Chagas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.

WINCKER, P; BOSSENO, M.F; BRITTO, C; YAKSIC, N; CARDOSO, M.A; MOREL, C.M; BRENIERE, S.F (1994). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiology Letters*, **124**: 419-424

WHO (1998). Chagas Disease, interruption of transmission in Uruguay. *Weekly Epidemiological Record*, **2**: 1-4.

WHO (1999). Chagas Disease, interruption of transmission in Chile. *Weekly Epidemiological Record*, **2**: 9-11.

WHO (2000). Chagas Disease, interruption of transmission in Brazil. *Weekly Epidemiological Record*, **19**: 153-155.

WHO (2002). *Control of Chagas Disease*. WHO Technical Report Series 905, World Health Organization, Geneva.

WHO (2005). Report of the scientific working group on Chagas disease Chagas Disease. Buenos Aires, Argentina 17-20 abril. Disponível em: http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.htm.

ZAUZA, P.L; BORGES-PEREIRA, J (2001). Níveis Séricos de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* na evolução da cardiopatia chagásica crônica, no período de 10 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **34**: 399-405.

ZULANTAY, I; ARRIBADA, A; HONORES, P; SANCHEZ, G; SOLARI, A; ORTIZ, S; OSUNA, A; RODRIGUEZ, J; APT, W (2005). No association between persistence of the parasite and electrocardiographic evolution in treated patients with Chagas disease. *Revista Medica Chilena*, **133**: 1153-1160.

9.0 ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Termo de Consentimento

Eu,, ou meu responsável..... tem conhecimento de minha participação como voluntário no projeto de pesquisa “Doença de Chagas nos Municípios Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG: epidemiologia, terapêutica e controle” desenvolvido sob a responsabilidade da Pesquisadora Dra. Marta de Lana da Universidade Federal de Ouro Preto, do médico coordenador do projeto e dos médicos atendentes no Serviço Único de Saúde (SUS) que tem como objetivo o diagnóstico e tratamento da doença de Chagas nestes municípios e o isolamento do parasita para estudos genéticos. A doença de Chagas é uma doença crônico degenerativa que atinge especialmente o coração (aumento da área cardíaca, insuficiência cardíaca, risco de morte súbita) e o trato intestinal (megaesôfago e megacólon) evolui lentamente, podendo atingir, principalmente, o coração, o esôfago e intestino. O tratamento específico será feito com o Rochagan® (benzonidazol), em esquema prolongado, 5-10 mg/kg/dia, via oral durante 60 dias consecutivos, sob supervisão médica e controle de leucometria. A minha participação é voluntária e será restrita a doação de sangue e recebimento de tratamento com benzonidazol. O sangue será coletado por picada na polpa digital (inquérito sorológico), por via endovenosa (confirmação do diagnóstico da doença de Chagas) ou para a realização de hemocultura (diagnóstico parasitológico, isolamento do parasita antes do tratamento e controle do tratamento) utilizando seringa e agulhe estéreis e descartáveis, ou seja, de uso individual e seguro. O volume de sangue a ser coletado poderá variar de 3mL e no caso da hemocultura, 30mL. Fui informado que caso se confirme o meu diagnóstico para doença de Chagas me será oferecido tratamento específico se houver indicação clínica, o qual acarretará ou não a cura da doença. Estou também informado que o tratamento causa efeitos colaterais que devem ser comunicados ao meu médico para o devido controle do mesmo ou mesmo interrupção do tratamento, se necessário. Tenho consciência que a minha participação como voluntário não me trará benefício financeiro. Os exames de procedimentos aplicados serão gratuitos e receberei atenção médica adequada pelo serviço de saúde local para o controle dos efeitos adversos do tratamento. Isso não implica na interrupção de meu atendimento pelo SUS municipal no tocante à doença de Chagas. Tal procedimento também não acarretará em prejuízos a outros pacientes ou membros de minha família que estejam participando do projeto. Estou ciente de que um eventual corte de recursos do projeto não acarretará interrupção de meu tratamento e nem de meu atendimento pelo SUS no tocante à doença de Chagas.

Local e data:

Assinatura do voluntário:

Assinatura do pesquisador responsável:

Assinatura do médico responsável:

Assinatura do Secretário de Saúde municipal:

Anexo II

Primeira parte

FICHA EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA

Município de Berilo e José Gonçalves de Minas - MG

Nº de Registro no SUS: _____ Código projeto: _____
Médico responsável: Dr/a. _____ Data: ____ / ____ / ____

DADOS PESSOAIS

Nome (completo): _____ Apelido: _____
Idade: _____ Data de Nascimento: ____ / ____ / ____ Sexo: (1) Masculino
(2) Feminino

Nome do pai: _____

Nome da mãe: _____

Endereço/comunidade: _____

Alguma referência perto do endereço: _____

Profissão: _____

Estudos: (1) analfabeto (2) 1º grau incompleto (3) 1º grau completo
(4) 2º grau incompleto (5) 2º grau completo (6) estudos superiores

Você fuma? (1) sim (2) não Quanto por semana? _____

Você toma bebidas com álcool? (1) de alto teor (cachaça, conhaque...) (2) de baixo teor (cerveja, vinho...) (3) nada

Quanto por semana? _____

Você faz exercício físico? (1) Leve (andar a pé distâncias curtas sem carregar peso) (2) Moderado
(intermédio entre 1 e 3)

(3) Intenso (carregar pedras, trabalhar no machado...)

RESIDÊNCIAS ANTERIORES

Lugar de residência	Anos de residência	Piso	Parede	Teto
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

Códigos da tabela: **Piso:** (1) alvenaria/cimento; (2) barro/adobe; (3) madeira. **Parede:** (1) alvenaria/cimento; (2) barro/adobe; (3) madeira.

Teto: (4) laje; (5) telha; (6) sapé; (7) madeira/amianto/PVC

RESIDÊNCIA ATUAL

Anos de residência: _____
se

Casa própria: (1) sim (2) não (3) não

Alugada: (1) sim (2) não (3) não sei
(3) não sei

Emprestada/cedida: (1) sim (2) não

Piso: (1) alvenaria; (2) barro/adobe; (3) madeira
(3) madeira

Parede: (1) alvenaria; (2) barro/adobe;

Teto: (4) laje; (5) telha; (6) sapé; (7) madeira/amianto/PVC

DIVERSOS

Água encanada (dentro ou fora de casa): (1) sim (2) não

Água de córrego/rio: (1) sim (2) não

Dejetos (cocô...) **vão para esgoto?** (1) sim (2) não

Dejetos (cocô...) **ficam ao ar livre?** (1) sim (2) não

Eletricidade: (1) sim (2) não

Rádio: (1) sim (2) não

Você tem horta no quintal? (1) sim (2) não

Você tem cão? (1) sim (2) não

Você viu gambá na sua casa? (1) sim (2) não

Você viu ratos na sua casa? (1) sim (2) não

Água de poço: (1) sim (2) não

Caminhão pipa: (1) sim (2) não

Dejetos (cocô...) **vão para fossa?** (1) sim

Geladeira: (1) sim (2) não

TV: (1) sim (2) não

Galinheiro: (1) sim (2) não

Você tem gato? (1) sim (2) não

Você viu saruê na sua casa? (1) sim

BARBEIRO (Realizar teste de reconhecimento com caixinha)

Reconheceu o barbeiro? (1) sim (2) não (3) não sei

Reconheceu a espécie? (1) *P. megistus* (2) *P. geniculatus* (3) *T. sordida* (4) *T. pseudomaculata*

(5) *R. neglectus* (6) não sei

Onde o viu? (1) dentro de casa (2) peridomicílio (ao redor de casa) (3) longe de casa (roça, outros...)

Já foi picado por ele alguma vez? (1) sim (2) não (3) não sei

Quantos anos faz que Como o viu? _____ **Quando o viu?** _____

HISTÓRIA CLÍNICA

ANTECEDENTES TRANSFUSIONAIS

Você já doou sangue? (1) sim (2) não

Você recebeu sangue? (1) sim (2) não (3) não sei **Quantas vezes?** _____ **Quando** (em que ano)?

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

Nº de gravidezes: _____ **Nº de abortos** (perdas com menos de 20 semanas): _____ **Nº de partos:**

Nº cesárias: _____ **Nº de filhos nascidos vivos:** _____

Nº de prematuros (entre 20 e 38 semanas): _____ **Nº de filhos com baixo peso** (< 2.500g):

Problemas ou doenças durante a gestação (sangramento, pressão alta, açúcar alto, infecções...):

Observação: Perguntar quantas consultas pré-natal fez nas gestações ou partos complicados.

ANTECEDENTES PESSOAIS RELATIVOS À DOENÇA DE CHAGAS

Você tem “doença de Chagas”? (1) sim (2) não (3) não sei

Você tem algum problema no coração? (1) sim (2) não (3) não sei

Você tem algum problema no esôfago (entalo/engasgo) **ou no intestino grosso?** (1) sim (2) não (3) não sei

Como você descobriu que tinha “doença de Chagas”?

(1) na consulta com o médico

(2) com exame que confirmou a doença (anexar resultados) Quais? _____

(3) não sei

Há quanto tempo você sabe que tem “doença de Chagas”? _____ anos

Você está em tratamento de “doença de Chagas”? (1) sim (2) não (3) não sei

Quais os medicamentos que você usa no momento para “doença de Chagas”?

(0) nenhum (1) Rochagan® (2) Lampit® (3) outro
(8) não sabe

Se outro, cite o medicamento:

HISTÓRIA FAMILIAR DE DOENÇA DE CHAGAS

Atualmente há alguém com problema no coração na sua família? (1) sim (2) não (3) não sei

Qual é o grau de parentesco? (1) pai (2) mãe (3) irmão (4) filho (5) tio (6) primo carnal (7) sobrinho

(8) avô paterno (9) avó paterna (10) avô materno (11) avó materna (12) outros:

Há alguém com problema no esôfago (entalo) ou intestino grosso na família? (1) sim (2) não (3) não sei

Qual é o grau de parentesco? (1) pai (2) mãe (3) irmão (4) filho (5) tio (6) primo carnal (7) sobrinho

(8) avô paterno (9) avó paterna (10) avô materno (11) avó materna (12) outros:

Atualmente há alguém com outras doenças na sua família:

Atualmente você tem parentes com doença de Chagas? (1) sim (2) não (3) não sei

Qual é o grau de parentesco? (1) pai (2) mãe (3) irmão (4) filho (5) tio (6) primo carnal (7) sobrinho

(8) avô paterno (9) avó paterna (10) avô materno (11) avó materna (12) outros:

Você tem parentes falecidos com doença de Chagas? (1) sim (2) não (3) não sei

Quantos? _____ Há quanto tempo faleceram? _____ anos

Qual é o grau de parentesco? (1) pai (2) mãe (3) irmão (4) filho (5) tio (6) primo carnal (7) sobrinho

(8) avô paterno (9) avó paterna (10) avô materno (11) avó materna (12) outros:

Você tem parentes que morreram de repente? (1) sim (2) não (8) não sei

Qual é o grau de parentesco? (1) pai (2) mãe (3) irmão (4) filho (5) tio (6) primo carnal (7) sobrinho

(8) avô paterno (9) avó paterna (10) avô materno (11) avó materna (12) outros:

HISTÓRIA DE INTERNAÇÃO, TRATAMENTO E APOSENTADORIA

Você já foi internado por causa da doença de Chagas? (1) sim (2) não (8) não sei

Há quanto tempo? _____ Em que hospital ou cidade?

Você consultou com cardiologista devido à doença de Chagas? (1) sim (2) não (8) não sei

Em que hospital ou cidade?

Você já usou: (1) Rochagan® (2) Lampit® (3) nenhum (4) não sei **Quantas vezes? _____**
Quando? _____

Você tem receitas do tratamento? (citar/anexar) (1) sim (2) não (3) não sei

Quantos comprimidos ao dia? _____ Quantos vidros? _____ Por quanto tempo?

Em qual município você foi tratado?

Você apresentou alguma reação de mal estar durante o tratamento? (1) sim (2) não (3) não sei

Qual/quais?	Quando?

Foi preciso parar o tratamento? (1) sim (2) não (3) não sei **Quando?** _____

Foi feita mudança na forma de tratamento? (1) sim (2) não (3) não sei **Quando?** _____

Você já é aposentado por Doença de Chagas? (1) sim (2) não **Há quanto tempo?** _____ anos

HISTÓRIA DOS EXAMES LABORATORIAIS

Quais os exames (com seus resultados) que você fez durante o tratamento?

Você tem algum dos exames com você? (citar/anexar) (1) sim (2) não (3) não sei

DÚVIDAS SOBRE A DOENÇA E O TRATAMENTO

Você tem alguma dúvida sobre a Doença de Chagas?

Você tem alguma dúvida sobre o tratamento com Rochagan®?

Segunda parte

FICHA MÉDICA

Município de Berilo e José Gonçalves de Minas - MG

Nº de Registro no SUS: _____ Código projeto: _____

Médico responsável: Dr/a. _____ Data: ____ / ____ / ____

ANAMNESE**Queixa principal:****Doenças atuais:** (1) Diabete (2) Hipertensão Outras (citar): _____**Sintomatologia respiratória** (dispnéia, quase sempre aos esforços, ortopnéia, etc.): _____**Sintomatologia cardiovascular** (fadiga aos esforços, astenia, palpitações, tonturas, vertigens, lipotímia, síncope, escurecimento da vista, confusão mental, dor precordial de características anginosas ou não, edema de membros inferiores, manifestações tromboembólicas pulmonares ou sistêmicas, etc.): _____**Disfagia com comida fria?** (1) sim (2) não
(2) não**Disfagia com comida seca?** (1) sim**Precisa água para engolir alimentos?** (1) sim (2) não**Regurgitação?** (1) sim (2) não**Odinofagia** (durante a ingestão de alimentos)? (1) sim (2) não**Pirose** (ardor, queimação...)? (1) sim (2) não**Dor esofágica retroesternal** (independente das refeições, espontânea, urente, constritiva...)? (1) sim (2) não**Singulto** (solução)? (1) sim (2) não**Tosse?** (1) sim (2) não**Náuseas?** (1) sim (2) não**Sialose** (hipersalivação)? (1) sim (2) não**Obstipação intestinal?** (1) sim (2) não**Nº evacuações por mês:** ____**Meteorismo?** (1) sim (2) não**Distensão abdominal?** (1) sim (2) não**Disquezia** (dificuldade para evacuar)? (1) sim (2) não**Sensação de peso no hipocôndrio direito?** (1) sim (2) não**Dores no hipocôndrio direito?** (1) sim (2) não**Sensação de peso na região epigástrica?** (1) sim (2) não**Dores epigástricas?** (1) sim (2) não**Sintomatologia urinária** (disúria, polaquiúria, tenesmo, hematúria, oligúria): _____**DUM:** ____ / ____ / ____EXAME FÍSICO**Peso:** _____**Altura:** _____**IMC** [Kg/(altura em metros)²]:**Temperatura axial:** (1) <37° (2) 37-38° (3) >38°**Pulso:** _____ bpm (1) regular (2)

irregular

PA sistólica: _____ mm Hg**PA diastólica:** _____ mm Hg**Estado Geral** (astenia, anorexia, desnutrição, obnubilação com sudorese e pele fria...):

Coloração mucocutânea: (1) Normal (2) Palidez (3) Cianose (4) Outra:

Hidratação mucocutânea: (1) Normal (2) Desidratação

Sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral elástico, indolor, de coloração róseo-violácea, com adenopatias pré-auriculares, parotídeas ou submaxilares...) ? (1) sim (2) não

Chagoma (lesão em partes descobertas, sobrelevada, eritematosa, dura, pouco dolorosa, com linfonodos satélites, etc.)? (1) sim (2) não

Edema subcutâneo (localizado ou generalizado, com ou sem insuf. Cardíaca)? (1) sim (2) não

Características:

Adenopatias? (1) sim (2) não **Características** (hipertrofia leve ou moderada, não aderentes aos planos contíguos, isoladas, indolores...):

Hipertrofia parótidas: (1) sim (2) não

Ictus cordis: (1) desviado (2) normal **Características do desvio:**

Ingurgitação jugular (a 45°...)? (1) sim (2) não

Bulhas: (1) normofonéticas (2) hipofonéticas
sim (2) não

Desdobramento B2 (foco pulmonar): (1)

Nº de extrasístoles por minuto: _____ **Sopro:** (1) sim (2) não

Características do sopro (proto, meso, tele ou pan-sistólico, diastólico, focalidade mitral, tricúspide, aórtica ou pulmonar, etc.): _____

Sinais respiratórios (estertores finos e crepitantes nas bases, ortopnéia, etc.):

Distensão abdominal (abdome globoso, assimétrico...)? (1)sim (2)não

Timpanismo na percussão abdominal (presença de gases na alça dilatada, no hipocôndrio esquerdo se houver retenção de gases no ângulo esplênico do colo, etc.)? (1)sim (2)não

Palpação de fecaloma (tumor inelástico, que cede à compressão sem retornar à sua forma primitiva...)? (1)sim (2)não

Hepatomegalia? (1) sim (2) não
direita? ____

Quantos cm abaixo da reborda costal

Consistência alterada? (1) sim (2) não

Superfície lisa? (1) sim (2) não

Esplenomegalia? (1) sim (2) não
esquerda? ____

Quantos cm abaixo da reborda costal

Consistência alterada? (1) sim (2) não

Superfície lisa? (1) sim (2) não

Alteração do SNC? (1) sim (2) não
focalidade neurológica, etc.):

Qual/Quais (rigidez de nuca, convulsões generalizadas,

Alteração dos reflexos osteotendinosos? (1) sim (2) não

Alteração da sensibilidade superficial? (1) sim (2) não

Alterações do sistema neurovegetativo (obnubilação com sudorese e pele fria...)? (1) sim (2) não

Outros:

—

Terceira parte

FICHA DE EXAMES COMPLEMENTARES

Município de Berilo e José Gonçalves de Minas - MG

Nº de Registro no SUS: _____ Código projeto: _____

Médico responsável: Dr/a. _____

	Exame	Data	Resultado	Observações
1	RX tórax		(1) N (2) AN	
2	ECG*		(1) N (2) AN	
3	Ecocardiograma		(1) N (2) AN	
4	Prova de esforço		(1) N (2) AN	
5	Esofagograma		(1) N (2) AN	
6	Colonoscopia		(1) N (2) AN	
7	Hemaglutinação		(1) N (2) AN	
8	ELISA		(1) N (2) AN	
9	Imunofluorescência (IFI)		(1) N (2) AN	
10	AATV (citometria de fluxo)		(1) N (2) AN	
11	Hemocultura		(1) N (2) AN	
12	PCR		(1) N (2) AN	
13	Xenodiagnóstico		(1) N (2) AN	
14	Perfil de citocinas		(1) N (2) AN	
15	EPF		(1) N (2) AN	
16	Hemograma		(1) N (2) AN	
17	Leucograma		(1) N (2) AN	
18	GOT/GPT		(1) N (2) AN	
19	Bilirrubina T/C		(1) N (2) AN	
20	Uréia/Creatinina		(1) N (2) AN	
21			(1) N (2) AN	
22			(1) N (2) AN	
23			(1) N (2) AN	
24			(1) N (2) AN	
25			(1) N (2) AN	
26			(1) N (2) AN	
27			(1) N (2) AN	
28			(1) N (2) AN	
29			(1) N (2) AN	
30			(1) N (2) AN	
31			(1) N (2) AN	
32			(1) N (2) AN	
33			(1) N (2) AN	
34			(1) N (2) AN	

Código da tabela: N = resultado normal; AN = resultado anormal

Cepa Isolada: (1) sim (2) não Data: ____ / ____ / ____

* Alterações eletrocardiográficas sugestivas de cardiopatia chagásica são: bloqueio de ramo direito, hemi-bloqueio anterior esquerdo (ou bloqueio da divisão antero-superior do ramo esquerdo), bloqueio atrioventricular, bradicardia sinusal e batimentos ventriculares prematuros superiores a três por minuto e quando acompanhados de bradicardia.

CONCLUSÕES

Infecção chagásica: (1) sim (2) não

Forma Indeterminada (I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas - 1985): (1) sim (2) não

(1) Positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos; ausência de sintomas e/ou sinais de doença; eletrocardiograma convencional normal; coração, esôfago e cólon radiologicamente normais.

Forma Cardíaca (Classificação da OMS 1971): (1) (2) (3) (4)

(1) infecção sem evidência clínica, radiológica ou eletrocardiográfica.

(2) sintomatologia ausente ou discreta, área cardíaca normal ou levemente aumentada no RX, alterações no ECG: bloqueio completo de ramo direito, distúrbios da repolarização ventricular, extrasístoles ventriculares.

(3) sintomatologia evidente, cardiomegalia moderada e alterações no ECG: bloqueio completo de ramo direito com desvio do eixo elétrico para a esquerda, zonas eletricamente inativas.

(4) insuficiência cardíaca, cardiomegalia nítida no RX e severas e numerosas alterações no ECG: arritmias complexas e graves, extensas zonas eletricamente inativas.

Forma Digestiva – Esofagopatia (Classificação de Rezende et al. 1960): (0) (1) (2) (3) (4)

(0) Normalidade.

(1) Grupo I há retardo no esvaziamento esofágico, sem dilatação

(2) Grupo II, se além do retardo no esvaziamento há dilatação leve a moderada (até 5cm).

(3) Grupo III, se dilatação é grande (> 5cm), com hipotonia no esôfago inferior.

(4) Grupo IV ou dólico-megaesôfago, se além do mais o esôfago alongado, dobrado sobre si mesmo no terço inferior.

Colonopatia: (1) (2)

(1) Dentro da normalidade.

(2) Dilatação colonoscópica no adulto > a 7cm.

Comprometimento do SNC (meningoencefalite): (1) sim (2) não

Outra(s) doença(s) concomitantes: (1) sim (2) não Citar:

ENCAMINHAMENTOS REALIZADOS

Data: ____ / ____ / ____ Obs:

Data: ____ / ____ / ____ Obs:

Data: ____ / ____ / ____ Obs:

Data: ____ / ____ / ____ Obs:

Data: ____ / ____ / ____ Obs:

Data: ____ / ____ / ____ Obs:

Anexo IV:

Identificação, idade na época do tratamento, formas clínicas antes (FCAT) e após (FCPT) o tratamento, tipo de evolução, exame parasitológico (HC e PCR), índice de reatividade IR (ELISA) e porcentagem de parasito fluorescente vivo (PPFP) na diluição de 1:256 pela citometria de fluxo em pacientes de município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG.

Nome	Idade	FCAT	FCPT	Evolução	Hc	PCR	Diminuição da absorvância (%)	AATV (PPFV/2006)	Classificação
A.A.R (1)	34	N.I*	Cardíaca leve	NA	P	1N	2,25	67,5	NC
A.F.R (2)	24	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3N		96,14	NC
F.N.S (3)	24	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	1P/2N	43	93,99	NC
I.C.S (4)	25	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P	1,1	82,57	NC
I.P.G (5)	10	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	1P/1N		88,14	NC
I.S.L (6)	30	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	1P 1N		88,29	NC
J.A.P (7)	26	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P		95,05	NC
J.G.P (8)	28	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	2N	10,5	90,53	NC
J.M.D (9)	31	N.I	Indeterminada	Inalterada	N	2N	18,5	90,8	NC
J.N.C.J (10)	29	N.I	Cardíaca leve	NA	N	2P		80,48	NC
J.S.G (11)	34	N.I	Cardíaca moderada	NA	N	3P	-26,5	90,47	NC
J.T.A (12)	33	Cardíaca leve	Cardíaca grave*	Para óbito	N	2P		82,35	NC
L.F.S (13)	23	Cardíaca leve	Cardíaca leve	Inalterada	P	2P/1N	5,05	81,77	NC
M.A.M.D.C (14)	22	Cardíaca leve	Cardíaca grave	Progressiva	N	2P/1N		92,96	NC

M.C.A.M (15)	37	Indeterminada	Cardíaca leve	Progressiva	N	1P	9,45	90,42	NC
M.C.M (16)	34	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P	9,55	85,62	NC
M.L.L.T (17)	30	N.I	Indeterminada	Inalterada	N	1P/1N	36	59,01	NC
M.N.A (18)	29	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	1P/1N	37	87,29	NC
M.S.P (19)	6	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	1P/1N	55	51,04	NC
M.V.G.S (20)	26	Digestiva grau I	Digestiva grau III	Progressiva	N	2P/1N	8	87,76	NC
N.A.G (21)	29	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3N	10	91,29	NC
N.F.S.P (22)	16	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	1N/2P		75,39	NC
N.S.R (23)	14	Cardíaca leve	Cardíaca moderada	Progressiva	P	3P		92,93	NC
O.A.F (24)	25	N.I	Indeterminada	Inalterada	N	2P/1N	16	96,51	NC
R.R.S (25)	11	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	NR		86,63	NC
S.A.C (26)	31	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P	1,25	91,09	NC
S.L.C.A (27)	30	Cardíaca leve	Cardíaca leve	Inalterada	N	1P/2N	1,45	93,58	NC
S.S.S (28)	33	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P		91,54	NC
T.M.A (29)	37	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	2P/1N	26	41,87	NC
V.M.N (30)	21	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P		85,31	NC
V.F.S (31)	14	Indeterminada	Indeterminada	Inalterada	N	3P		74,15	NC

NI= Não informadoNR= Não reagenteHc= hemoculturaFCAT= Forma clínica antes do tratamento FCPT= Forma clínica pós-tratamentoOs soros dos pacientes em negrito foram examinados em 1997 e em 2006. Os demais só foram avaliados em 2006* = morte súbita P – Positivo N – Negativo NC – Não curado