

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

**INOVAÇÕES NO DIAGNÓSTICO E NA MONITORAÇÃO DA
CURA PARASITOLÓGICA DA DOENÇA DE CHAGAS: USO DA
METODOLOGIA DE FC-ATE-TRIPLEX PARA ANÁLISE
SIMULTÂNEA DE IgG1 ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI***

AUTOR: GLAUCIA DINIZ ALESSIO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARTA DE LANA

CO-ORIENTADOR: DR. OLINDO ASSIS MARTINS-FILHO

OURO PRETO, MG, 2013

GLAUCIA DINIZ ALESSIO

**INOVAÇÕES NO DIAGNÓSTICO E NA MONITORAÇÃO DA
CURA PARASITOLÓGICA DA DOENÇA DE CHAGAS: USO DA
METODOLOGIA DE FC-ATE-TRIPLEX PARA ANÁLISE
SIMULTÂNEA DE IgG1 ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas 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.

Orientadora: Profa. Dra. Marta de Lana

Co-orientador: Dr. Olindo Assis Martins-Filho

OURO PRETO, MG, 2013

A372i Alessio, Glaucia Diniz.

Inovações no diagnóstico e na monitoração da cura parasitológica da doença de Chagas [manuscrito]: uso da metodologia de FC-ATE-Triplex para análise simultânea de IgG1 anti-Trypanosoma cruzi / Glaucia Diniz Alessio. – 2013.

xxiii, 103f.: il., color; graf., tabs., mapas.

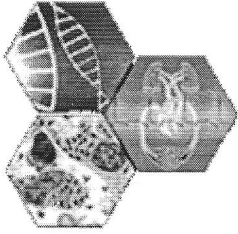
Orientadora: Profa. Dra. Marta de Lana.

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 - Teses. 2. Citometria de fluxo - Teses.
3. Diagnóstico - Teses. I. Lana, Marta de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.937



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

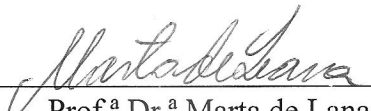


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:


“Inovações na monitoração da cura parasitológica da doença de Chagas: Uso da metodologia FC-ATE-Triplex para análise simultânea de IgG1 anti-*Trypanosoma-cruzi*”

Aos cinco dias do mês de Abril de 2013, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Gláucia Diniz Alessio**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por *aprovada*..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

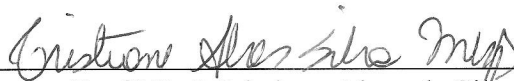
Membros da Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Presidente



Prof.ª Dr.ª Daniella Castanheira Bartholomeu
Examinadora (UFMG)



Prof.ª Dr.ª Cristiane Alves da Silva Menezes
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: **05/04/2013**

"O que chamamos de inspiração é a capacidade de reter e ampliar, com um toque próprio e único, um flash ou insight, uma coisinha de nada que atravessa o nosso pensamento e pode fugir. Porém, boa parte dessa inspiração é fruto da nossa capacidade de concentração, de disciplina, de esforço mental e até de teimosia. Precisamos não de um dia bonito de céu azul, mas de uma boa dose de paciência para produzir alguma coisa interessante, para organizar raciocínios, transformar barro em tijolos e tijolos em casas."

Freitas, 2002.

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Carmem, ao meu irmão Marcelo, e a todos os meus amigos por me incentivarem em todos os momentos, e pelo amor, carinho, amizade, paciência e força ao longo dessa caminhada. Vocês foram fundamentais para que esse trabalho se concretizasse!

Agradeço imensamente à Deus por me dar luz, força, sabedoria, coragem e por me ajudar sempre a enfrentar todos os obstáculos dessa caminhada.

À Professora Marta de Lana pela oportunidade, pela orientação e apoio ao longo de todos esses anos de convivência. Agradeço por todos os seus ensinamentos, que com certeza são fundamentais para a minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço principalmente pela sua confiança e por acreditar em mim. Muito obrigado!

Ao Dr. Olindo Assis Martins-Filho por me aceitar como sua aluna e por ter me recebido de portas abertas no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, possibilitando que eu desenvolvesse a minha dissertação. Agradeço por todas as idéias brilhantes em relação ao meu projeto, pela sua persistência, ajuda, apoio e envolvimento em todas as etapas desse trabalho. Agradeço, sobretudo pela sua confiança em mim e por todos os seus ensinamentos. Com certeza você é um exemplo de dedicação e compromisso!

Ao Auffy pela oportunidade e por ter me iniciado nos caminhos da Ciência. Agradeço pelos seus ensinamentos, apoio, incentivo, paciência e amizade. Obrigado por sempre estar disposto e empenhado a me ajudar nos momentos que eu mais precisei.

À Camila pela ajuda, empenho e envolvimento nessa primeira etapa desse trabalho. Agradeço pela sua persistência com o meu projeto e pela sua amizade.

À Denise Cortes pelo seu envolvimento com o meu projeto, por estar sempre me acompanhando, me auxiliando, e pela sua preocupação com o meu trabalho. Com certeza você foi fundamental para a realização dessa dissertação.

Ao Márcio Sobreira e a Fernanda Freire pelos ensinamentos, apoio, incentivo e ajuda nos momentos que eu mais precisei.

Ao Policarpo pelo empenho e dedicação no cultivo dos parasitos. Sem o seu trabalho, certamente esse projeto não seria realizado.

À Simone e à Tiza por me ensinarem e me auxiliarem na utilização do citômetro de fluxo.

Aos demais colaboradores desse projeto, Dra. Silvana Eloi, Dra. Eloisa Amália Silveira Ferro, Dra. Andréia Teixeira, Dra. Célia Gontijo, Dr. Alejandro Luquetti, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Centro de Pesquisas René Rachou por me proporcionarem todo o suporte tecnológico e material para que eu desenvolvesse a minha dissertação.

À todos os amigos do LBDM, em especial, Marcela, Camila, Bruno, Tati, Tatiane, Maysa, Cristiane, Marquito, Damarys, Simone, Cristiano, Arthur, por me receberem de portas abertas no laboratório. Obrigado pelos ensinamentos, pela ajuda, pela ótima convivência e amizade de todos vocês.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Doença de Chagas, em especial, Jack, Maykon, Bruna, Auffy e Fejuada, pela força e incentivo que vocês sempre me deram, pelos ensinamentos e apoio. Agradeço imensamente pela ótima convivência, e principalmente pela amizade ao longo de todos esses anos.

Aos professores Evandro Menezes, André Talvani e Maria Terezinha Bahia pela boa convivência, ensinamentos e pelos bons momentos ao longo desses anos.

À toda turma do mestrado do NUPEB de 2011, em especial, Jamille, Bruna, Levi, Fernando, Flávia, Gleise e Maurício, pela força, ajuda e por tornarem as disciplinas do mestrado muito mais agradáveis.

À todos os professores do NUPEB pelo apoio e ensinamentos.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão de todo o financiamento do projeto.

Aos meus amigos-irmãos de Ouro Preto, Jamille, Bruna, Dani, Mari e Levi por tornarem esses dois anos muito mais agradáveis. Agradeço pelo carinho, amizade, força, pela ajuda, pelo incentivo, pela dedicação, companheirismo, pelas boas risadas, e por estarem comigo em todos os momentos dessa caminhada. Vocês foram mais do que amigos, foram verdadeiros irmãos. Obrigado por tudo!

À todas as moradoras e ex-alunas da República Koxixo por todos os bons momentos vividos, pela amizade, força, amor, carinho e incentivo. Obrigado por tornarem meus anos de Ouro Preto muito mais agradáveis!

Finalmente, agradeço a todos os meus amigos de Belo Horizonte e a minha família, mãe, pai e Marcelo, pelo apoio incondicional, pela paciência, confiança, amor, carinho, força e amizade. Vocês são essenciais na minha vida e foram a minha fonte de inspiração e a minha força motriz para que eu conseguisse realizar este trabalho. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Um dos desafios em relação ao tratamento na fase crônica da doença de Chagas (DCh) são as limitações dos métodos disponíveis para detectar a cura parasitológica nessa fase da infecção. Sendo assim, esse trabalho visa estabelecer uma inovação metodológica na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da DCh, por meio da técnica de FC-ATE-Triplex, analisando IgG1 anti-*T. cruzi*. Como metodologia desse trabalho, foi proposto um modelo de pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas evolutivas vivas do *T. cruzi* (amastigota (AMA), tripomastigota (TRIPO) e epimastigota (EPI) fixada) por citometria de fluxo, empregando um modelo de segregação fluorescente diferencial (fluorescência 1- isotiacianto de fluoresceína) e um sistema de revelação fluorescente complementar (fluorescência 2- estreptoavidina-ficoeritrina). Avaliando a reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI em amostras de soros dos grupos tratado curado (TC) e tratado não curado (TNC), as amostras do grupo TC apresentaram uma baixa reatividade e as dos grupo TNC uma alta reatividade com as três formas evolutivas do *T. cruzi*. Após análise de desempenho dessa nova metodologia, os critérios de interpretação foram: diluição 1:000 e ponto de corte de 40% para AMA e diluição 1:250 e ponto de corte de 20% para TRIPO e EPI. Avaliando a reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI pela técnica proposta, em amostras de soros dos grupos não tratado (NT) e não infectado (NI), as amostras do grupo NT apresentaram valores de reatividade positivo e as do grupo NI valores de reatividade negativos com as três formas evolutivas. A reatividade de 28 amostras de soro do grupo tratado em avaliação (TEA) pela técnica de FC-ATE-Triplex revelou que 15 (53,6%) foram negativas com AMA, 11 (39,3%) com TRIPO e 8 (28,6%) com EPI. Avaliando a reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI, em amostras de soros dos grupos TC e TNC em novas amostragens populacionais, todas as amostras do grupo TNC foram positivas com as três formas evolutivas, enquanto todas as amostras do grupo TC foram negativas com AMA, 5 das 7 amostras foram negativas com TRIPO e 6 das 7 foram negativas com EPI. Das 24 amostras do grupo TEA de uma nova amostragem populacional testadas pela FC-ATE-Triplex, 7 (29,2%) foram negativas com AMA, 1 foi negativa com TRIPO (4,2%) e 7 foram negativas com EPI (29,2%). A reatividade da FC-ATE-Triplex com o soro de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar americana (LTA) revelou que das 10 amostras de pacientes com LV, uma (10%) foi positiva com AMA, uma (10%) com TRIPO e duas (20%) com EPI, enquanto que dos 20 pacientes com LTA, 4 (20%) foram positivas com AMA, 6 (30%) com TRIPO e 10 (50%) com EPI. Sendo assim, a técnica de FC-ATE-Triplex apresentou um excelente desempenho na monitoração de cura parasitológica pós-tratamento etiológico, no diagnóstico e no controle de cura parasitológica precoce da doença de Chagas, mesmo quando testada em novas amostragens populacionais. Além do mais, essa nova metodologia, mesmo apresentando resultados falso-positivos, mostrou ser útil na segregação sorológica de pacientes chagásicos e de pacientes portadores de LV e de LTA. A reatividade diferencial observada em AMA, TRIPO e EPI sugere que na técnica de FC-ATE-Triplex existe a segregação de anticorpos pela afinidade pelo antígeno. As formas amastigotas do *T. cruzi* apresentaram uma maior reatividade, especificidade e mostraram ser boas fontes antigênicas na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico e no controle de cura parasitológica precoce da doença de Chagas.

One of the challenges regarding treatment in the chronic phase of Chagas disease (DCH) are the limitations of methods available to detect the parasitological cure at this stage of infection. In the present study, we have developed an innovative method to monitoring the parasitological cure after Chagas' disease etiologic treatment. This method, named FC-ATE-Triplex, is based in simultaneous detection of IgG1 anti-*T. cruzi* by flow cytometry. It was proposed a model of antibody IgG1 anti-live *T. cruzi* evolutive forms (live amastigotes (AMA) + live trypomastigotes (TRYPO) + fixed epimastigotes (EPI) fixed, using a model of differential segregation fluorescent (Fluorescence 1 - isotiacianto fluorescein) and a system of complementary fluorescence revelation (fluorescence 2 - streptavidin-phycoerythrin). The patients used in this study were divided in five groups: uninfected (NI), untreated (NT), treated cured (TC), treated not-cured (TNC) and treated under evaluation (TUE). The TC group samples showed a low reactivity and the TNC group a high reactivity with the three evolutive forms of *T. cruzi*. After performance analysis of this new approach, the interpretation criteria established were: 1:000 dilution and cutoff of 40% for AMA and 1:250 dilution and cutoff of 20% for EPI and TRYPO. The NT group samples showed values of positive reactivity and the NI group values of negative reactivity with the three evolutive forms of *T. cruzi*. The reactivity of 28 sera samples from the group TUE through the technique FC-ATE-Triplex revealed that 15 (53.6%) were negative with AMA, 11 (39.3%) with TRYPO and 8 (28.6%) with EPI. Assessing the reactivity of IgG1 anti-AMA, TRYPO and EPI in sera samples of groups TC and TNC in new population samples, all samples of TNC group were positive with the three *T. cruzi* evolutive forms, while all samples of TC group were negative with AMA, 5 of 7 samples were negative with TRYPO and 6 of 7 were negative with EPI. Of the 24 samples of TUE group of a new population tested by FC-ATE-Triplex, 7 (29.2%) were negative with AMA, 1 was negative with TRYPO (4.2%) and 7 were negative with EPI (29.2%).). The reactivity of FC-ATE-Triplex with sera from patients with visceral leishmaniasis (VL) and american cutaneous leishmaniasis (ACL) revealed that of the 10 samples from patients with VL one (10%) was positive with AMA, one (10%) with TRYPO and two (20%) with EPI, while from 20 patients with ACL tested, 4 (20%) were positive with AMA, 6 (30%) with TRYPO and 10 (50%) with EPI. Thus, these results showed that FC-ATE-Triplex presented an excellent performance in monitoring of the parasitological cure after etiological treatment, in diagnosis and control of early parasitological cure of Chagas disease, even when tested on new sampling population. Moreover, this new methodology, even with false-positive results, proved to be useful in serological segregation of chagasic patients and patients with VL and ACL. The differential reactivity observed in AMA, TRYPO and EPI suggests that in the technique of FC-ATE-Triplex there is segregation of antibodies by antigenic affinity. The amastigotes of *T. cruzi* showed greater reactivity, specificity and to be good antigenic sources in monitoring parasitological cure after etiological treatment and control of early parasitological cure of Chagas disease.

Tabela I – Ajustes no citômetro de fluxo FACScalibur para a avaliação de anticorpos anti-*T. cruzi*.....34

Tabela II - Valores obtidos pela curva ROC da reatividade sorológica de pacientes tratados curados e tratados não curados com a forma amastigota na técnica de FC-ATE-Triplex.....50

Tabela III - Valores obtidos pela curva ROC da reatividade sorológica de pacientes tratados curados e tratados não curados com a forma tripomastigota na técnica de FC-ATE-Triplex.....50

Tabela IV - Valores obtidos pela curva ROC da reatividade sorológica de pacientes tratados curados e tratados não curados com a forma epimastigota na técnica de FC-ATE-Triplex.....50

Figura 1- Representação esquemática dos grupos avaliados na População 1.....	27
Figura 2- Representação esquemática dos grupos avaliados na População 2.....	29
Figura 3- Representação esquemática dos grupos avaliados na População 3.....	29
Figura 4- Perfil morfométrico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) das formas amastigotas e tripomastigotas (AMA + TRIPO), das formas epimastigotas (EPI) e das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas (AMA + TRIPO + EPI).....	38
Figura 5- Perfil morfométrico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) das formas epimastigotas (EPI) e das formas amastigotas e tripomastigotas (AMA + TRIPO) e perfil das formas EPI e AMA + TRIPO após a marcação com 200 µg/mL de isotiacianato de fluoresceína (FITC), incubação das formas EPI a 4°C por 24h e das formas AMA + TRIPO a 37°C por 1h, em gráficos de fluorescência 1(FL1) por tamanho (FSC). As formas EPI foram denominadas de HIGH e as formas AMA + TRIPO de LOW, INT em gráficos de FL1xFSC.....	39
Figura 6- Representação em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC) e em gráficos de histogramas do perfil obtido antes e após o “ <i>sorting</i> ” das formas amastigotas e tripomastigotas (AMA + TRIPO) fluorescentes e fotografias obtidas através de microscopia de fluorescência, das populações denominadas de FITC ^{LOW} e FITC ^{INT} após o “ <i>sorting</i> ”. O <i>sorting</i> dos parasitos foi realizado utilizando o citômetro de fluxo FACSarea.....	40
Figura 7- Fotografias obtidas através da microscopia eletrônica das populações denominadas FIT ^{LOW} , as formas amastigotas vivas, FITC ^{INT} , as formas tripomastigotas vivas, e FITC ^{HIGH} , as formas epimastigotas fixadas.....	41
Figura 8- Representação em gráficos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) e em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC) do perfil obtido após a mistura das formas amastigotas (AMA), tripomastigotas (TRIPO) e epimastigotas (EPI) fluorescentes. As formas AMA foram denominada de “LOW” fluorescência, as formas	

TRIPO de “*INT*” fluorescência e as formas EPI de “*HIGH*” fluorescência, em gráficos de FL1xFSC.....42

Figura 9- Representação em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC) do perfil obtido das formas AMA + TRIPO + EPI fluorescentes e representação em gráficos de histograma da reatividade do conjugado e dos controles positivo e negativo, em percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), com AMA, TRIPO e EPI. Foi realizado um “*gate*” em cada forma evolutiva do *T. cruzi* em separado, em gráficos de FL1xFSC. Foi estabelecido um limiar de positividade de 2% de PPFP com AMA, TRIPO e EPI no controle do conjugado.....43

Figura 10- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* para a técnica de FC-ATE-Triplex, expresso em PPFP, presentes em soros de indivíduos chagásicos do grupo tratado curado (TC) com as formas amastigotas vivas (AMA) (A), tripomastigotas vivas (TRIPO) (B) e epimastigotas fixadas (EPI) (C), e em soros dos indivíduos chagásicos do grupo tratado não curado (TNC) com as formas amastigotas vivas (AMA) (D), tripomastigotas vivas (TRIPO) (E), e epimastigotas fixadas (EPI) (F). Curvas de titulação de reatividade média, expresso em PPFP, pela técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos chagásicos dos grupos TC e TNC, com AMA (G), TRIPO (H) e EPI (I). As amostras individuais de soros foram testadas como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PPFP e como média e respectivos desvios-padrão dos valores de PPFP. Foi possível observar diferença estatística em todas as diluições testadas, com $p \leq 0,05$ (*)......45

Figura 11- Curvas ROC da técnica de FC-ATE-Triplex construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e especificidade dos grupos de pacientes chagásicos TC e TNC nas diluições do soro 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000 ao reagirem com as formas AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C). Os resultados estão expressos pelos pontos do gráfico que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC indicam o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a técnica de FC-ATE-Triplex

- com as três formas evolutivas do *T. cruzi*.....46
- Figura 12- Curvas de titulação da reatividade média dos grupos de pacientes chagásicos TC com AMA (A), TC com TRIPO (B), TC com EPI (C), TNC com AMA (A), TNC com TRIPO (B) e TNC com EPI (C). O retângulo pontilhado indica as diluições que melhor segregaram os grupos de pacientes TC e TNC de acordo com os valores de amplitude expressos em PFP (Δ). O círculo vermelho indica as diluições que apresentaram melhor desempenho na discriminação entre os grupos de pacientes TC e TNC. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como média dos valores de PFP.....47
- Figura 13- Análise da reatividade sorológica na técnica de FC-ATE-Triplex dos grupos de pacientes chagásicos TC e TNC nas diluições 1:250, 1:500 e 1:1000 com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C) através do perfil de dispersão individual em diferentes pontos de corte sugeridos pela curva ROC. As linhas horizontais indicam o ponto de corte sugerido pela curva ROC para cada diluição. Os retângulos vermelhos indicam as diluições e pontos de corte que apresentaram melhor desempenho na segregação entre os grupos de pacientes TC e TNC. O resultado da reatividade de IgG1 para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.....49
- Figura 14- Análise da reatividade de IgG1, anti-AMA, TRIPO e EPI na técnica FC-ATE-Triplex, expressa em PFP, presente nos soros individuais de pacientes chagásicos dos grupos TC com a forma AMA (A), TC com a forma TRIPO (B), TC com a forma EPI (C), TNC com a forma AMA (A), TNC com a forma TRIPO (B), e TNC com a forma EPI (C), nas diluições 1:1000 com ponto de corte de 40% com AMA (A), 1:250 com ponto de corte de 20% com TRIPO (B) e 1:250 com ponto de corte de 20% com EPI (C).....51
- Figura 15- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TC com TRIPO na técnica de FC-ALTA, TC com EPI na técnica de FC-AFEA e TC com AMA, TC com TRIPO e TC com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20%, na técnica de FC-AFEA: 60% e na técnica

de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.....52

Figura 16- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TNC com TRIPO na técnica de FC-ALTA, TNC com EPI na técnica de FC-AFEA e TNC com AMA, TNC com TRIPO e TNC com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20%, na técnica de FC-AFEA: 60% e na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.....53

Figura 17- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos chagásicos do grupo não tratado (NT) com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C), e em soros de indivíduos do grupo não infectado (NI) com AMA (D), TRIPO (E) e EPI (F). Gráficos de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico NT (G) e do grupo NI (H) com AMA, TRIPO e EPI. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex; 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os retângulos cinzas indicam as respectivas diluições padronizadas na técnica de FC-ATE-Triplex, 1:1000 para AMA, 1:250 para TRIPO e 1:250 para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PFPF.....54

Figura 18- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico NT com TRIPO na técnica de FC-ALTA, NT com EPI na técnica de FC-AFEA e NT com AMA, NT com TRIPO e NT com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20%, na técnica de FC-AFEA: 60% e na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.....56

Figura 19- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos com leishmaniose visceral (LV) com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C), e em soros de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana (LTA) com AMA (D), TRIPO (E) e EPI (F). Gráficos de

dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos com LV (G) e com LTA (H) com AMA, TRIPO e EPI. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os retângulos cinzas indicam as respectivas diluições padronizadas na técnica de FC-ATE-Triplex: 1:1000 para AMA, 1:250 para TRIPO e 1:250 para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PFPF.....58

Figura 20- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de pacientes do grupo chagásico tratado em avaliação (TEA) com as formas amastigotas vivas (A), tripomastigotas vivas (B) e epimastigotas fixadas (C). As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PFPF.....60

Figura 21- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico tratado em avaliação (TEA) com TRIPO na técnica de FC-ALTA, TEA com AMA, TEA com TRIPO e TEA com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.....61

Figura 22- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos chagásicos do grupo tratado curado (TC) com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C), e em soros de indivíduos do grupo tratado não curado (TNC) com AMA (D), TRIPO (E) e EPI (F). Gráficos de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TC (G) e do grupo TNC (H) com AMA, TRIPO e EPI. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os retângulos cinzas indicam as respectivas diluições padronizadas na técnica de FC-ATE-Triplex: 1:1000 para AMA, 1:250 para TRIPO e 1:250 para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PFPF.....63

Figura 23- Gráfico de dispersão da reatividade das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico tratado em avaliação (TEA) com as formas amastigotas vivas (A), tripomastigotas vivas (B) e epimastigotas fixadas (C). As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. O círculo vermelho indica os pacientes que tiveram índices de reatividade em AMA próximos ao ponto de corte de 40%. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PFP.....65

AMA – Amastigota

ASC – Área sob a curva

CARD – Cardíaca

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

CRP – Proteína regulatória do complemento

CRP gp160 – Proteína regulatória do complemento de 160 kDa

Curva ROC - “Receiver Operating Characteristic curve”

DCh – Doença de Chagas

DISC – Discordantes

DIG – Digestiva

DIG/Mis – Digestiva/Mista

ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”

EPI – Epimastigota

FC-AFEA – Pesquisa de anticorpos IgG anti-formas epimastigotas fixadas pela citometria de fluxo

FC-AFPA-IgG – Pesquisa de anticorpos IgG anti formas promastigotas fixadas de *Leishmania sp* pela citometria de fluxo

FC-ALTA – Pesquisa de anticorpos IgG anti-formas tripomastigotas vivas pela citometria de fluxo

FC-ATE-Triplex – Pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas amastigotas vivas, tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas pela citometria de fluxo

FC-Triplex-IgG1 – Pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas epimastigotas fixadas do *T.*

cruzi e promastigotas fixadas da *L. brasiliensis* e *L. chagasi* pela citometria de fluxo

FITC – Isotiacianato de fluoresceína

FL1 – Fluorescência 1

FL2-PE – Fluorescência 2-estreptoavidina-ficoeritrina

FSC – Tamanho

HAI – Hemaglutinação indireta

HC/UFMG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

IFI – Imunofluorescência indireta

IND – Indeterminada

LMC^o – Lise mediada pelo complemento

LBDM – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

LIT – “Liver Infusion Tryptose”

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LT – Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

MBP – Anticorpo policlonal de ligação à maltose

MFF – Solução fixadora para citometria

MIS – Mista

NC – Não chagásicos

NUPEB – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

NI – Não infectados

NT – Não tratados

PBS – Solução salina tamponada

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPFP – Percentual de parasitos fluorescentes positivos

SFB – Soro fetal bovino

SSC – Granulosidade

TC – Tratados curados

TEA – Tratados em avaliação

TNC – Tratados não curados

TRIPO – Tripomastigota

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

WHO – “World Health Organization”

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Aspectos gerais da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2- Tratamento da doença de Chagas.....	4
1.3- Controle de cura da doença de Chagas.....	6
1.3.1 – Testes parasitológicos.....	6
1.3.2 – Teste molecular.....	8
1.3.3 – Testes sorológicos convencionais.....	8
1.3.4 – Testes sorológicos não convencionais.....	10
1.3.4.1 – Anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas.....	10
1.3.4.2 – Anticorpos anti-formas amastigotas.....	13
1.3.4.3 – Citometria de fluxo no diagnóstico e controle da cura parasitológica da doença de Chagas.....	16
2- JUSTIFICATIVA.....	22
3- OBJETIVOS.....	24
3.1 - Objetivo geral.....	25
3.2 - Objetivos específicos	25
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 – Populações do estudo.....	27
4.1.1– População 1.....	27
4.1.2 – População 2.....	28
4.1.3 – População 3.....	29
4.2- Preservação e processamento das amostras.....	30
4.3- Procedimento experimental.....	30
4.3.1– Cultivo das formas tripomastigotas e amastigotas do <i>T. cruzi</i>	30
4.3.2 – Cultivo das formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>	30

4.3.3 – Preparação das formas epimastigotas fixadas do <i>T. cruzi</i>	31
4.3.4 – Preparação das formas tripomastigotas e amastigotas do <i>T. cruzi</i>	32
4.4- Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo.....	32
4.5- Aquisição dos dados no citômetro de fluxo.....	33
4.6- Análises estatísticas.....	34
4.6.1- Análise de desempenho da FC-ATE-Triplex.....	34
4.6.2- Teste t Student.....	35
5- RESULTADOS.....	36
5.1- Desenvolvimento da técnica de FC-ATE-Triplex.....	37
5.1.1- Marcação diferencial das formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas do <i>T. cruzi</i> com isotiacianato de fluoresceína (FITC).....	38
5.1.2- “ <i>Sorting</i> ” das populações fluorescentes.....	38
5.1.3- Misturas das formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> fluorescentes.....	41
5.1.4- Análise da reatividade IgG1 anti- <i>T. cruzi</i>	42
5.1.4.1- Percentual de parasitos fluorescentes positivos.....	42
5.2- Desenvolvimento de uma nova metodologia para análise da reatividade sorológica simultânea anti-formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> aplicável em estudos laboratoriais da doença de Chagas.....	43
5.2.1- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-formas amastigotas e tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas (FC-ATE-Triplex), presentes em soros individuais, nos grupos TNC e TC.....	43
5.3- Avaliação de desempenho da FC-ATE-Triplex na monitoração da cura pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, empregando índices expressos em porcentagem.....	45
5.3.1- Construção da Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>) para definição do ponto de corte e da diluição do soro ideal, capazes de segregar os pacientes dos grupos TC e TNC, ao realizar a técnica de FC-ATE-Triplex, feita com as três formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	45

5.3.2- Análise da diferença entre as curvas de reatividade média dos grupos de pacientes TC e TNC com AMA, TRIPO e EPI, para definição da diluição ideal para sua segregação.....	47
5.3.3- Análise do perfil de dispersão da reatividade das amostras individuais de pacientes TC e TNC, na técnica de FC-ATE-Triplex, com as três formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> para avaliar o seu desempenho na segregação entre os grupos.....	48
5.3.4- Análise comparativa da reatividade das amostras de soro dos pacientes dos grupos TC e TNC pelas técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex.....	51
5.4- Aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico da doença de Chagas.....	53
5.4.1- Análise da reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 anti-formas amastigotas e tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas (FC-ATE-Triplex), presentes em soros individuais dos grupos de pacientes NT e NI.....	53
5.4.2- Análise comparativa da reatividade das amostras de soro dos pacientes do grupo NT pelas técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex.....	55
5.5- Aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das Leishmanioses.....	56
5.5.1- Análise da reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (FC-ATE-Triplex) em soros individuais de pacientes com LV e LTA.....	56
5.6- Aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, utilizando amostras de soros de pacientes tratados em avaliação.....	58
5.6.1- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-formas amastigotas e tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas (FC-ATE-Triplex), presentes em soros individuais do grupos de pacientes TEA.....	59
5.6.2- Análise comparativa da reatividade das amostras de soro dos pacientes do grupo TEA pelas técnicas de FC-ALTA e FC-ATE-Triplex.....	60
5.7- Avaliação da aplicabilidade da FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas em novas amostragens populacionais.....	61
5.7.1- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (FC-ATE-Triplex) presentes em soros individuais, nos grupos de pacientes TC e TNC em novas	

amostragens populacionais.....	62
5.7.2- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (FC-ATE-Triplex) presentes em soros individuais, nos grupos de pacientes TEA em uma nova amostragem populacional.....	63
6- DISCUSSÃO.....	66
7- CONCLUSÕES.....	82
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1- INTRODUÇÃO

1.1-Aspectos gerais da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (DCh) ou Tripanossomíase americana foi descoberta em 1909, pelo médico cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, quando trabalhava no município de Lassance, MG, durante a construção da estrada de ferro Central do Brasil. Chagas descreveu o agente etiológico da doença e seus sintomas no hospedeiro humano, o vetor e seu reservatório silvestre (CHAGAS, 1909, 1911). A doença de Chagas apresenta como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A transmissão ocorre principalmente, através das fezes e urina dos triatomíneos vetores contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes do *T. cruzi* (DIAS, 2000; REVISADO POR SCHUMNIS, 2000). No entanto, outras formas alternativas de transmissão da infecção vêm se destacando principalmente nos países não endêmicos, como a transmissão por transfusão sanguínea, vertical (congênita), transplante de órgãos contaminados, transmissão oral, dentre outros mecanismos (DIAS, 2000; REVISADO POR SCHUMNIS, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia-se quando o triatomíneo ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, elimina em suas fezes e urina as formas tripomastigotas metacíclicas. Essas formas penetram em mucosas ou ferimentos na pele e infectam células do hospedeiro vertebrado. Tal penetração do *T. cruzi* dentro das células hospedeiras é facilitada por glicoproteínas na superfície do parasito, como a gp82-kDa (YOSHIDA, 2006), e pelo ácido siálico, também presente nas células hospedeiras. A via de transdução de sinal de internalização é ativada tanto no parasito quanto na célula hospedeira, e leva a mobilização de Ca^{2+} (TAN e ANDREWS, 2002).

As formas tripomastigotas penetram nas células hospedeiras por dois mecanismos, ambos envolvendo a interação com lisossomos. O primeiro mecanismo é mediado pela fusão direta dos lisossomos com a membrana plasmática no sítio de penetração do parasito, levando a produção do vacúolo parasitóforo (ANDRADE e ANDREWS, 2004). Já o segundo mecanismo é a invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira. Nesse caso, o vacúolo parasitóforo contém marcadores da membrana plasmática que se maturam pela fusão com lisossomos. A fusão inicial do vacúolo com os lisossomos é crítica para manter as formas tripomastigotas no interior das células hospedeiras. Uma vez dentro das células hospedeiras, as formas tripomastigotas secretam a proteína Tc-Tox, que diminui o PH e destrói a membrana do

vacúolo parasitóforo, levando a liberação dos parasitos no citoplasma. No citoplasma da célula hospedeira, as formas tripomastigotas se transformam nas formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária simples longitudinal. Após sucessivas divisões das formas amastigotas, elas se diferenciam nas formas tripomastigotas, que com a ruptura da célula hospedeira, disseminam-se pela corrente sanguínea, sendo capazes de infectar novas células de outros tecidos e órgãos. Quando o triatomíneo alimenta-se de sangue do hospedeiro vertebrado infectado, os tripomastigotas sanguíneos, presentes na corrente circulatória, são transmitidos ao inseto. No intestino desses, se transformam em formas esferomastigotas, que a seguir se transformam no estômago dos triatomíneos em epimastigotas, onde se multiplicam. Na ampola retal do triatomíneo, as formas epimastigotas se transformam em formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas junto com as fezes e urina do inseto, fechando assim o ciclo biológico (BRENER, 1973; DIAS, 2000).

Atualmente, cerca de 10 milhões de pessoas distribuídas em 21 países na América Latina estão infectadas pelo *T. cruzi*, sendo observada uma incidência anual de 40.000 novos casos por ano (MONCAYO e SILVEIRA, 2009; WHO, 2010). A doença de Chagas não é mais uma enfermidade restrita ao continente americano. Devido ao intenso fluxo migratório, a falta de controle de bancos de sangue e a transmissão congênita, a doença tem sido registrada em diversos países não endêmicos da região oeste do Pacífico e da Europa, tornando-se um problema de saúde global (SCHUMUNIS, 1999). Na Europa, têm sido registrados aproximadamente 59.000-108.000 casos de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*. Somente na Espanha, em 2009, entre 40.000 e 65.000 pessoas apresentavam a doença de Chagas (WHO, 2010).

Em 1991, seis países latino-americanos (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) criaram a “*Iniciativa Intergubernamental Del Cono Sur*” visando a erradicação do principal vetor domiciliar, o *Triatoma infestans*, e a interrupção da transmissão da DCh pela via transfusional (SCHOFIELD e DIAS, 1999; MONCAYO e SILVEIRA, 1999). A partir dessa iniciativa, vários programas de combate ao vetor, utilizando inseticidas, e melhorias no controle dos bancos de sangues têm sido realizados.

A doença de Chagas apresenta duas fases características: a aguda e a crônica. A fase aguda geralmente apresenta uma curta duração (cerca de um a quatro meses). Essa fase é assintomática ou apresenta uma sintomatologia inespecífica. Os sinais e/ou sintomas inespecíficos são: febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite e

cardiomegalia (RASSI *et al.*, 2010). Essa fase é caracterizada por uma parasitemia patente e por elevados níveis de anticorpos IgM, que desaparecem ao longo da fase crônica da infecção. Os anticorpos IgG também estão presentes na fase aguda, porém eles permanecem em níveis elevados ao longo da fase crônica da doença. Alguns pacientes apresentam os sinais de porta de entrada: sinal de Romana (ROMAÑA, 1935) e/ou chagoma de inoculação (MAZZA e FREIRE, 1940). Após a infecção inicial, cerca de 60 a 70% dos pacientes não desenvolvem doença clínica aparente, caracterizando a forma crônica indeterminada (IND) da doença de Chagas (DIAS, 1995; RASSI *et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2011). Nessa forma, o paciente apresenta exames sorológicos positivos e parasitológicos positivos ou negativos, ausência de sintomas e/ou sinais clínicos da doença, eletrocardiograma convencional normal e coração, esôfago e cólon radiologicamente normais (DIAS, 1995; RASSI *et al.*, 2010). Entretanto, mesmo após um longo período assintomático, aproximadamente 30 a 40% dos pacientes chagásicos desenvolvem a forma determinada ou sintomática da doença de Chagas: cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou mista (MIS), cerca de 10 a 30 anos após a infecção inicial (PRATA, 1990; DIAS, 1995; RASSI *et al.*, 2010). A forma cardíaca é caracterizada por alterações anatomo-histopatológicas e funcionais do coração, como: miocardite, cardiomegalia, fibrose, lesão vorticilar, insuficiência cardíaca, arritmias, alterações eletrocardiográficas, congestão e edema. Já na forma digestiva, ocorrem alterações funcionais e anatomo-histopatológicas do esôfago e cólon (megaesôfago e megacólon). Na forma mista, ocorre o acometimento tanto do coração quanto do esôfago e/ou cólon. A fase crônica é caracterizada por uma parasitemia subpatente e por elevados níveis de anticorpos IgG.

1.2-Tratamento da doença de Chagas

Para o tratamento da doença de Chagas humana, atualmente, estão disponíveis dois fármacos: o Benzonidazol (Rochagan®, LAFEPE) e o Nifurtimox (Lampit®, Bayer). De acordo com o CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005) o tratamento é indicado na fase aguda, em infecções recentes, na forma indeterminada, em formas cardíacas e digestivas leves, em transplantados e imunossuprimidos. Outra corrente defende que o tratamento deve ser realizado na fase crônica tardia da DCh, uma vez que sua administração é capaz de promover a cura parasitológica e/ou retardo na evolução clínica da doença (VIOTTI *et al.*, 1994;

FABBRO *et al.*, 2000; LANA *et al.*, 2009). A eficácia do tratamento para a doença de Chagas é variável: na infecção congênita, quando o tratamento é realizado entre 0-6 meses, os índices de cura variam de 93,8-100% (RUSSOMANDO *et al.*, 1998; BLANCO *et al.*, 2000; SCHIJMAN *et al.*, 2003; BURGOS *et al.*, 2009), na fase aguda de 66,7-76,2% (SCHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1990; ANDRADE *et al.*, 1992; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; CANÇADO, 2002), na fase crônica recente de 8,3-93,9% (ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA ESTANI *et al.*, 1998; SOSA ESTANI e SEGURA, 1999; SILVEIRA, 2000; STREIGER *et al.*, 2004; ESCRIBA *et al.*, 2009) e na fase crônica tardia de 0-19,1% (VIOTTI *et al.*, 1994; BRAGA *et al.*, 2000; FABBRO *et al.*, 2000; LAURIA-PIRES *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2009; LANA *et al.*, 2009; MACHADO-DE-ASSIS *et al.*, 2012).

Estudos longitudinais com Benzonidazol, desenvolvidos na década de 90, no Brasil, Argentina e Chile, têm demonstrado que o tratamento é eficaz em crianças e adolescentes na fase crônica recente, com índices de cura parasitológica maiores que 60% (ANDRADE *et al.*, 1996, 2004; GALLERANO e SOUZA, 2000).

Já o efeito do tratamento na fase crônica tardia é controverso e difícil de ser demonstrado, devido às limitações dos métodos sorológicos e parasitológicos disponíveis para detectar a cura parasitológica (GUEDES *et al.*, 2011). Trabalhos como o de BRAGA *et al.* (2000), LAURIA-PIRES *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento com Benzonidazol e Nifurtimox não foi capaz de promover a cura parasitológica dos pacientes chagásicos crônicos tratados e estes apresentaram persistência parasitária e progressivas alterações eletrocardiográficas similares ao controle não tratado. Em contraste, outros trabalhos demonstram que pacientes chagásicos crônicos tratados com Benzonidazol tiveram uma menor evolução clínica e eletrocardiográfica, justificando o tratamento em algumas situações (VIOTTI *et al.*, 1994; FABBRO *et al.*, 2000; LANA *et al.*, 2009). Ainda, um índice de cura parasitológica de 8% foi detectado em pacientes tratados na fase crônica da doença de Chagas, sendo a média de tempo de reversão sorológica de 6 anos (CANÇADO, 2002). VIOTTI *et al.* (1994) avaliaram clinicamente e pela sorologia convencional, 131 pacientes chagásicos tratados com Benzonidazol e 70 não tratados, em uma média de acompanhamento de 8 anos. Dentre os pacientes tratados, 19,1% apresentaram resultados negativos na sorologia convencional, enquanto 6% dos não tratados foram soronegativos. FERNANDES *et al.* (2009) demonstraram pela sorologia convencional, um índice de 5% de cura parasitológica em pacientes chagásicos crônicos tratados.

MACHADO-DE-ASSIS *et al.* (2012) avaliaram pacientes chagásicos crônicos tratados a mais de 10 anos e demonstraram cura parasitológica em 10,6% desses indivíduos pelo critério de cura clássico, considerando os resultados negativos de dois testes sorológicos convencionais, e de 8,5% pelo critério de cura rigoroso, considerando os resultados negativos de três testes sorológicos convencionais.

Esses trabalhos demonstram o real benefício do tratamento em pacientes chagásicos crônicos, apesar do longo período de acompanhamento pela sorologia convencional. A comprovação da cura parasitológica na DCh depende do tempo de acompanhamento do paciente e de quais exames e metodologias são utilizados. O tratamento etiológico foi capaz de promover ausência do parasitismo, ou diminuição da carga parasitária e menor evolução clínica dos pacientes tratados na fase crônica tardia (FABBRO *et al.*, 2007; LANA *et al.*, 2009).

1.3-Controle de cura da doença de Chagas

Para avaliar a resposta à quimioterapia específica da doença de Chagas na fase crônica, alguns métodos laboratoriais estão disponíveis. Como critério de cura clássico tem sido utilizados os testes parasitológicos, os moleculares e os sorológicos convencionais. Os métodos parasitológicos são baseados na demonstração do parasito por hemocultura ou xenodiagnóstico. Os moleculares pela presença do DNA do parasito demonstrado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou PCR em tempo real (PIRON *et al.*, 2007; DUFFY *et al.*, 2009; HIDRON *et al.*, 2010; SCHIJMAN *et al.*, 2011). Os testes sorológicos convencionais detectam anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, sendo os principais: o “*enzyme-linked immunosorbent assay*” (ELISA), a hemaglutinação indireta (HAI) e a imunofluorescência indireta (IFI).

A avaliação clínica dos pacientes tratados na fase crônica consiste principalmente na anamnese, exame físico, eletrocardiograma, raio-X de tórax e esôfago com enema opaco contrastado e ecocardiograma. A cura clínica é de avaliação ainda mais complexa e difícil de ser demonstrada (VIOTTI *et al.*, 2006; FABBRO *et al.*, 2007; LANA *et al.*, 2009; RASSI *et al.*, 2010).

1.3.1-Testes parasitológicos

Os testes parasitológicos clássicos (xenodiagnóstico, hemocultura) são utilizados no controle da cura parasitológica da DCh, sendo mais importantes nos casos sorológicos inconclusivos e na avaliação da falha terapêutica (PARIS *et al.*, 2009). Estes testes são específicos e quando positivos indicam falha terapêutica dos pacientes tratados. No entanto, quando negativos nem sempre indicam a cura parasitológica dos pacientes, devido à baixa sensibilidade destas metodologias (SCHENONE *et al.*, 1968, 1974; CHIARI *et al.*, 1989; PEREIRA *et al.*, 1989; GALVÃO *et al.*, 1993; FABBRO *et al.*, 2007; ZULANTAY *et al.*, 2011). Esses testes não devem ser utilizados como único critério de cura da DCh, pois na fase crônica, quando negativos, podem refletir períodos de parasitemia não detectável (BRENER, 1973; CANÇADO, 1985). Para obter o perfil parasitológico de um paciente chagásico é necessário repetir o teste em diferentes períodos pós-tratamento etiológico. Além do mais, quanto maior o número de exames realizados maiores as chances de o resultado ser positivo (SCHENONE, 1998; CASTRO *et al.*, 2005).

A hemocultura é utilizada desde a década de 50, com resultados inicialmente inferiores ao xenodiagnóstico (PIFANO, 1954; CHIARI e BRENER, 1966). A sensibilidade dessa técnica, em uma única amostra, varia de 0 a 55% em pacientes não tratados (CHIARI e BRENER, 1966; CHIARI *et al.*, 1989; BRENER *et al.*, 1993). Modificações implementadas, como a retirada do plasma contendo anticorpos, coleta de um volume maior de sangue (30 mL) e o processamento das amostras a 4°C, contribuíram para aumentar a sensibilidade dessa metodologia, até mesmo em um percentual de 94% (CHIARI *et al.*, 1989; LUZ *et al.*, 1994). A realização de pelo menos duas ou três hemoculturas do mesmo paciente após o tratamento contribui para aumentar a positividade (CHIARI *et al.*, 1989; LUZ *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 2002). A técnica de hemocultura, além de apresentar uma baixa sensibilidade, é um método laborioso e que consome um grande tempo (até 120 dias de exame).

O xenodiagnóstico foi descrito inicialmente por BRUMPT em 1914, sofrendo modificações para otimizar os resultados (SCHENONE *et al.*, 1968; CERISOLA *et al.*, 1974). A sensibilidade dessa técnica varia de 13 a 50%, dependendo da região, da quantidade de ninfas utilizadas e da espécie do triatomíneo aplicado (CERISOLA *et al.*, 1974; BORGES e COURA, 1987; PEREIRA *et al.*, 1996; MOREIRA e PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1997; SCHENONE *et al.*, 2000). Algumas desvantagens em relação à utilização do xenodiagnóstico no controle da cura parasitológica da doença de Chagas são a baixa sensibilidade, as reações alérgicas de

alguns indivíduos ao contato com os triatomíneos, o alto custo operacional na manutenção das colônias, a dificuldade de padronização dessa metodologia e a necessidade de espécies de triatomíneos adequadas para a realização do exame (SCHENONE *et al.*, 1974; MOTT *et al.*, 1980; BRONFEN e ALVARENGA, 1991).

1.3.2-Teste molecular

A PCR vem sendo amplamente utilizada no controle da cura parasitológica de pacientes tratados, por apresentar uma alta sensibilidade e detectar falhas terapêuticas mais precocemente (BRITTO *et al.*, 1995; SOLARI *et al.*, 2001; GALVÃO *et al.*, 2003; ZULANTAY *et al.*, 2004; BRITTO, 2009; MURCIA *et al.*, 2010). Essa técnica quando positiva indica fracasso terapêutico, porém quando negativa nem sempre indica cura parasitológica devido à oscilação dos níveis de parasitemia em pacientes chagásicos crônicos. A sensibilidade da PCR pode variar de 45 a 86% no sangue de pacientes chagásicos crônicos quando comparados aos testes sorológicos, hemocultura ou xenodiagnóstico (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1998; BRITTO, 2009). Portanto, os resultados negativos da PCR não confirmam seguramente a cura pós-tratamento etiológico. Além do mais, essa técnica vem apresentando resultados discordantes com outras metodologias, sendo que sua sensibilidade depende dos níveis parasitêmicos, do volume de sangue coletado, dos iniciadores utilizados e das características genéticas de cepas do *T. cruzi* envolvidas (CASTRO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2008; MYAMOTO *et al.*, 2008; MILES *et al.*, 2009; RAMIRÉZ *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012).

1.3.3-Testes sorológicos convencionais

Os testes sorológicos convencionais são baseados na detecção de anticorpos, principalmente contra antígenos brutos das formas epimastigotas do *T. cruzi* provenientes de diferentes processos de obtenção, ou antígenos recombinantes (MENDES *et al.*, 1997; UMEZAWA *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2001; LUQUETTI e RASSI, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2001; UMEZAWA *et al.*, 2004).

A técnica de HAI foi descrita por CERISOLA *et al.* (1962) e otimizada por CAMARGO *et al.* (1971) para o diagnóstico da doença de Chagas. Essa técnica apresenta como vantagens a sua facilidade de execução, não necessitando de equipamentos especializados, e pela rapidez da leitura (1 a 2h). No entanto, ela

apresenta uma menor sensibilidade em relação ao teste de ELISA e de IFI. A leitura do teste depende de um examinador bem treinado. Podem ocorrer reações cruzadas que são comuns com outras espécies da família Trypanosomatidae (GADELHA *et al.*, 2003).

O teste de IFI foi introduzido por CAMARGO *et al.* (1966) para o diagnóstico da doença de Chagas. Esse teste apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade. No entanto, a leitura depende de um observador bem treinado, podendo levar a erros de interpretação.

A técnica de ELISA, para o diagnóstico da doença de Chagas, foi padronizada por VOLLER (1975). Essa técnica apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, além de uma leitura passível de automação (FERREIRA e ÁVILA, 2001). OELEMAN *et al.* (1998) avaliaram diferentes “Kits” de ELISA e encontraram uma especificidade de 93,3 a 100% e uma sensibilidade de 97,7 a 100%. Apesar da alta especificidade da técnica de ELISA, essa metodologia ainda apresenta uma elevada reatividade cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae (CHILLER *et al.*, 1990; VEXENAT *et al.*, 1996; GADELHA *et al.*, 2003; AMATO-NETO *et al.*, 2005). VEXENAT *et al.* (1996) observaram pela técnica de ELISA a presença de determinantes antigênicos comuns entre o *T. cruzi*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*.

De acordo com LUQUETTI (1997), CANÇADO (2002), COURA e CASTRO (2002), WHO (2002) e o CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005) o único critério de cura até então aceito pela comunidade científica é a soroconversão dos testes sorológicos convencionais. Vários trabalhos demonstram que pacientes com baixos títulos sorológicos em relação ao início do tratamento, se avaliados posteriormente por técnicas sorológicas se tornam negativos, indicando a ocorrência da cura parasitológica (ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA-ESTANI e SEGURA, 1999). Os métodos sorológicos convencionais apresentam uma alta sensibilidade, além de serem rápidos, baratos e de fácil utilização (CANÇADO, 1999). Apesar desses fatores favoráveis, os pacientes quando tratados na fase crônica da DCh, necessitam ser acompanhados por um longo período para verificar a cura parasitológica, devido à persistente reatividade da sorologia convencional.

As razões pelas quais a sorologia convencional permanece positiva por um longo período pós-tratamento são ainda discutíveis. De acordo com ANDRADE *et al.* (1988) antígenos do *T. cruzi* foram detectados em células dendríticas do baço de camundongos tratados, vários meses após a cura. Esse fenômeno pode também ocorrer em humanos tratados, mantendo dessa forma anticorpos anti-*T. cruzi* na ausência de parasitos

viáveis. Os antígenos parasitários podem ser mantidos além das células dendríticas em células cardíacas (ANDRADE *et al.*, 1991). De acordo com GARCIA (2005) proteínas do coração podem apresentar uma reatividade cruzada com moléculas da superfície do parasito, um fenômeno conhecido como mimetismo molecular. Dessa forma, os anticorpos anti-*T. cruzi* são mantidos por antígenos do hospedeiro. Observou-se também que moléculas de carboidratos presentes em microorganismos da microflora intestinal e pulmonar (como Galactosil- α -Galactose) podem estimular linfócitos previamente estimulados pelos antígenos do *T. cruzi*, mantendo assim a sorologia positiva em pacientes tratados curados (GAZZINELLI, 1988). Outros fatores, tais como: memória imunológica, integração do DNA do parasito ao genoma da célula hospedeira (HECHT *et al.*, 2010) e permanência do kDNA do parasito nos tecidos dos hospedeiros, (MARTINS *et al.*, 2008) contribuem para a manutenção da reatividade da sorologia convencional em pacientes tratados curados.

Por estas razões, na transmissão congênita o acompanhamento pós-tratamento deve ser feito até um ano pós-tratamento; em crianças de 1 a 5 anos, até 5 anos pós-tratamento; pacientes na fase crônica recente, de 5 a 10 anos pós-tratamento; e na fase crônica tardia de 10 até 25 anos pós-tratamento (VIOTTI, 1994; CANÇADO, 1999; CANÇADO, 2002; COURA e CASTRO, 2002).

1.3.4-Testes sorológicos não convencionais

Até o presente momento, não se dispõe de um método que possa ser usado como “método referência” para o controle da cura parasitológica da infecção crônica pelo *T. cruzi*, sendo necessária a associação de vários elementos relacionados aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da doença. Diversos trabalhos buscam superar as limitações de desempenho dos testes sorológicos através da busca da preparação antigênica ideal para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* (GOMES, 1997). A escolha da preparação antigênica ideal apresenta uma grande relevância no controle pós-terapêutico, no diagnóstico e na avaliação prognóstica da infecção pelo *T. cruzi*.

1.3.4.1-Anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas

A infecção ativa pelo *T. cruzi* resulta no desenvolvimento de duas classes de anticorpos com diferentes atividades funcionais. A primeira classe são os anticorpos da

sorologia convencional, eles são utilizados em testes diagnósticos para a doença de Chagas, não são protetores, não se ligam a parasitos vivos e reconhecem antígenos de preparações diversas do *T. cruzi* originários em geral de formas epimastigotas ou tripomastigotas. A segunda classe são os anticorpos que se ligam as formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi*, denominados inicialmente anticorpos líticos (KRETTLI e BRENER, 1982; KRETTLI *et al.*, 1982).

KRETTLI (1979) demonstrou que as formas tripomastigotas sanguíneas obtidas de camundongos na fase aguda da doença de Chagas são lisadas pelo complemento humano. Esse processo é cepa dependente e a lise ocorre porque as formas tripomastigotas apresentam anticorpos ligados a sua membrana, que quando reconhecidos pelo complemento causam a lise do parasito. No laboratório, o fenômeno de lise é reproduzido quando formas tripomastigotas sensibilizadas com soro do paciente, contendo anticorpos anti-*T. cruzi* e inativado a 56°C são incubadas a 37°C em contato com complemento humano. Os anticorpos que se ligam às formas tripomastigotas sanguíneas vivas estão relacionados com a resistência do hospedeiro à infecção. Camundongos quando sensibilizados com formas de cultura mortas ou mesmo tripomastigotas sanguíneas fixados em gluteraldeído, apresentam parasitemia e taxas de mortalidade semelhantes ao grupo controle não infectado. O mesmo não ocorre quando esses animais são sensibilizados com formas tripomastigotas sanguíneas vivas do *T. cruzi*, quando a parasitemia e as taxas de mortalidade diminuem consideravelmente. Dessa forma, apenas os anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície das formas tripomastigotas vivas em camundongos infectados cronicamente, são capazes de induzir a lise na presença do complemento (KRETTLI *et al.*, 1982).

Além de marcadores de resistência à infecção pelo *T. cruzi*, os anticorpos que se ligam às formas tripomastigotas sanguíneas vivas podem ser utilizados para monitorar a cura parasitológica da doença de Chagas. Camundongos infectados pelo *T. cruzi* na fase crônica tratados e curados, quando avaliados 4 meses após o tratamento, apresentaram anticorpos líticos ausentes, enquanto os anticorpos da sorologia convencional ainda permanecem reativos, negativando somente 6 meses após o tratamento (KRETTLI e BRENER, 1982), o que demonstra uma discordância inicial de resultados da sorologia convencional e da lise mediada pelo complemento (LMC^o) neste modelo animal assim como analogamente, em outros hospedeiros vertebrados, inclusive no homem (GALVÃO *et al.*, 1993; NORRIS *et al.*, 1994).

Em humanos, os anticorpos líticos quando avaliados pelo teste de lise mediada pelo complemento foram detectados em 100% dos pacientes chagásicos não tratados, com sorologia convencional positiva e xenodiagnóstico positivo, 94% dos pacientes chagásicos tratados com sorologia convencional positiva e xenodiagnóstico positivo ou negativo, 0% do grupo controle não infectado e permaneceu ausente em cinco pacientes do grupo curado com sorologia convencional e xenodiagnóstico negativos (KRETTLI *et al.*, 1982). Dessa forma, os anticorpos que se ligam às formas tripomastigotas sanguíneas vivas podem ser utilizados para a monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas. Alguns pacientes chagásicos tratados podem apresentar discordância de resultados entre a lise mediada pelo complemento e a sorologia convencional. Estudos de avaliação da eficácia terapêutica têm demonstrado que aproximadamente 30% dos pacientes tratados mantêm a sorologia positiva, enquanto os testes de LMC^o e parasitológicos são repetidamente negativos. Esses pacientes são denominados dissociados e podem ser considerados curados apesar dos resultados positivos residuais obtidos com a sorologia convencional (KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI *et al.*, 1984; GALVÃO *et al.*, 1993). Nos soros de pacientes dissociados, a perda ou a diminuição da capacidade de precipitar a proteína regulatória do complemento (CRP) se correlaciona com o teste de LMC^o negativo e hemocultura negativos, mesmo quando a sorologia convencional ainda permanece positiva (NORRIS *et al.*, 1994).

Os anticorpos que se ligam às formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi* reconhecem antígenos específicos em sua superfície. O soro de pacientes chagásicos tratados, com LMC^o negativa, mostrou uma ausência seletiva de anticorpos reagindo com polipeptídeos de alto peso molecular (105, 120, 145 e 160 kDa), o que não ocorre com polipeptídeos de peso molecular menor. Já o soro de pacientes chagásicos com LMC^o positiva, ou camundongos experimentalmente infectados na fase crônica da infecção, reconhecem os polipeptídeos de superfície específicos de 70 a 160 kDa. Já o soro de camundongos imunizados com tripomastigotas fixados em formaldeído reagiu com os mesmos polipeptídios com exceção daquele de 160 kDa. Assim, o polipeptídeo de 160 kDa é um dos alvos para os anticorpos líticos e pode ser importante na proteção do hospedeiro contra a infecção (MARTINS *et al.*, 1985; NORRIS *et al.*, 1989). Essa proteína é expressa apenas nas formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas, e não está presente nas formas epimastigotas e amastigotas do *T. cruzi* (NORRIS *et al.*, 1989). A proteína regulatória do complemento de 160 kDa (CRP gp160) contém uma ancora

de GPI que é ativamente liberada pelo parasito dentro do meio de cultura, levando a produção de anticorpos anti-gp160 que convertem as formas tripomastigotas resistentes a lise pelo complemento, em células susceptíveis. Essa glicoproteína apresenta afinidade de ligação a C3b e C4b e pode inibir a formação da C3 convertase, uma vez que C3b não interage com o fator B. Na presença de anticorpos anti-gp160, a ligação da CRP gp160 é bloqueada, a C3 convertase é formada e a lise do parasito ocorre como resultado da cascata do complemento (NORRIS *et al.*, 1989; NORRIS *et al.*, 1991; NORRIS *et al.*, 1994; KRAUTZ *et al.*, 2000). Outras glicoproteínas específicas das formas tripomastigotas com atividade regulatória do complemento e capazes de induzir anticorpos líticos são a T-DAF 87-93 kDa e a gp58/68 (TAMBOURGI *et al.*, 1993; FISCHER *et al.*, 1988; KRAUTZ *et al.*, 2000).

Vários antígenos alvos para os anticorpos líticos têm sido utilizados em testes sorológicos, reproduzindo a LMC^o para monitorar a cura de pacientes chagásicos tratados (NORRIS *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 1993; KRAUTZ *et al.*, 1995; MEIRA *et al.*, 2002; MEIRA *et al.*, 2004). A ELISA recombinante utilizando a CRP do *T. cruzi* mostrou ser um teste altamente específico e sensível para o diagnóstico da doença de Chagas (MEIRA *et al.*, 2002). Além do mais, essa técnica apresentou resultados concordantes com a LMC^o e foi capaz de detectar sucesso terapêutico inicial ou falha terapêutica 6 a 12 meses pós-tratamento, podendo ser uma ferramenta útil na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas (MEIRA *et al.*, 2004).

Uma limitação metodológica do teste de LMC^o é o uso das formas tripomastigotas infectivas, podendo ser um risco para o operador. Além do mais, a leitura do método é cansativa uma vez que é realizada em câmara de Neubauer e microscópio óptico, o que pode ser causa de erros nos resultados.

1.3.4.2-Anticorpos anti-formas amastigotas

As formas amastigotas do *T. cruzi* ativam a via alternativa do complemento eficientemente, porém não são destruídas porque os complexos C5b-C9 que se ligam a superfície do parasito não se inserem na membrana plasmática (IIDA *et al.*, 1989).

Os anticorpos que se ligam aos antígenos de superfície das formas amastigotas reconhecem polipeptídios de 61, 78, 88, 105 kDa em soro de pacientes chagásicos com LMC^o positiva. O soro de alguns pacientes chagásicos tratados com LMC^o negativa

reagem com os mesmos polipeptídios, exceto com o de 61 kDa, podendo esse polipeptídeo ser um antígeno-alvo dessas formas evolutivas do *T. cruzi* (MARTINS *et al.*, 1985).

As formas amastigotas podem ser utilizadas como fontes antigênicas em testes sorológicos convencionais (CERISOLA *et al.*, 1971; GAM e NEVA, 1977; NEVA e GAM, 1977; UMEZAWA *et al.*, 1980; ARAÚJO e GUPTILL, 1984; COSSIO *et al.*, 1985; PRIMAVERA *et al.*, 1990; MATSUMOTO *et al.*, 1993).

PRIMAVERA *et al.* (1990) avaliaram diferentes antígenos de tripanosomídeos para a proposta de diagnóstico e verificaram que os antígenos de epimastigotas têm sido amplamente utilizados (84%) em relação aos de tripomastigotas (9%) e amastigotas (7%). Apesar disso, tripomastigotas e amastigotas são mais adequados, uma vez que eles são as formas de desenvolvimento predominantes nos hospedeiros vertebrados.

Embora antígenos de amastigotas de diferentes fontes “*in vitro*” (CERISOLA *et al.*, 1971; GAM e NEVA, 1977; NEVA e GAM, 1977; UMEZAWA *et al.*, 1980; ARAÚJO e GUPTILL, 1984) e “*in vivo*” (COSSIO *et al.*, 1985; PRIMAVERA *et al.*, 1990) tem sido relatados serem mais confiáveis para o diagnóstico da doença de Chagas, eles apresentam resultados controversos. Esses resultados discrepantes podem ser evidenciados, em parte, devido às diferenças antigênicas entre amastigotas “*in vivo*” e “*in vitro*” (OLIVEIRA DA SILVA *et al.*, 1991). Anticorpos específicos contra antígenos das formas amastigotas de cultura de tecido têm exibido maior reatividade no sorodiagnóstico da doença de Chagas do que os anticorpos contra antígenos de epimastigotas (CERISOLA *et al.*, 1971; UMEZAWA *et al.*, 1980; ARAÚJO e GUPTILL, 1984; MATSUMOTO *et al.*, 1993).

MATSUMOTO *et al.* (1993) avaliaram a reatividade de anticorpos IgG, IgM e IgA contra antígenos de amastigotas e epimastigotas no sorodiagnóstico da doença de Chagas em testes de IFI. Os autores observaram uma maior reatividade de IgG com as formas amastigotas do que com as epimastigotas, pois 97% dos anticorpos anti-amastigota, apresentaram 2 a 32 vezes maiores títulos do que os anticorpos anti-epimastigota. Os anticorpos IgG anti-amastigota estavam presentes em todos os soros de pacientes chagásicos, enquanto dentre as amostras de pacientes não chagásicos (NC) apenas 4,6% foram positivas na IFI com amastigota, relacionada aos indivíduos com leishmaniose visceral (LV). Na IFI com as formas epimastigotas, 10,2% das amostras de pacientes NC foram positivas, relacionada aos pacientes com LV, malária e artrite reumatoide (MATSUMOTO *et al.*, 1993). Além da maior reatividade de anticorpos IgG

para as formas amastigotas no teste de IFI, essas formas apresentaram uma maior antigênicidade devido a uma maior fluorescência da membrana (ARAÚJO e GUPTIL, 1984; MATSUMOTO *et al.*, 1993).

Outro achado importante é que GAM e NEVA (1977) avaliaram antígenos de amastigota e tripomastigota de culturas de células infectadas, e antígenos de epimastigota em testes de fixação do complemento e difusão em gel, e observaram que os antígenos de amastigota e tripomastigota são usualmente mais sensíveis ou reativos do que os de epimastigota, no teste de fixação do complemento, além de apresentarem pouca reatividade com os soros de pacientes NC.

PRIMAVERA *et al.* (1988) buscaram encontrar um marcador imunológico para o diagnóstico da forma digestiva da doença de Chagas e compararam a reatividade de anticorpos IgA com antígenos de amastigota, tripomastigota e epimastigota em 255 amostras de soros de pacientes chagásicos na fase aguda e crônica da infecção (IND, CARD, DIG) e em pacientes NC. Os antígenos de amastigota foram os mais adequados para essa proposta, uma vez que IgA pode ser detectado em 23 das 25 amostras de soro de pacientes com as formas digestivas, com altos índices de sensibilidade e especificidade. O teste de IFI IgA com tripomastigota e epimastigota, apresentou títulos menores e nenhuma diferença foi observada entre soros de indivíduos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e indivíduos não chagásicos (PRIMAVERA *et al.*, 1988).

PRIMAVERA *et al.* (1990) avaliaram ainda a reatividade de anticorpos IgG, IgM e IgA contra antígenos de amastigota e tripomastigota obtidos de camundongos infectados e antígenos de epimastigota cultivados em meio acelular, em 506 amostras de soros de pacientes chagásicos na fase aguda e crônica (IND, CARD e DIG) e de indivíduos NC. Os autores observaram que os antígenos de amastigota apresentaram maior reatividade com as três subclasses de anticorpos. Os anticorpos IgG anti-AMA foram encontrados em pacientes com todas as formas clínicas da doença de Chagas. IgA foi detectada em pacientes com a forma digestiva e na fase aguda, e IgM na fase aguda da infecção (PRIMAVERA *et al.*, 1990).

As formas amastigotas intra e extracelulares expressam a maior glicoproteína de superfície SSP4, que é encontrada na membrana plasmática ligado pela âncora de GPI, sendo o maior antígeno específico das formas amastigotas. Essa glicoproteína é reconhecida por anticorpos no soro de pacientes chagásicos (ANDREWS *et al.*, 1987,

1989). Análises ultra-estruturais mostraram a distribuição da proteína TcSSP4 na superfície da membrana em amastigotas.

A proteína amastigota-específica TcSSP4 tem sido utilizada como candidata ao desenvolvimento de vacinas de DNA contra a infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos imunizados com plasmídeos de expressão eucariótica contendo cDNA TcSSP4 foram capazes de controlar a fase aguda da infecção, apresentaram menor dano tecidual em relação aos controles e foram detectados em seus soros IFN- γ (ARCE-FONSECA *et al.*, 2011). RAMOS-LIGONIO *et al.* (2004) demonstraram que rMBR::SSP4 é um modulador da resposta imune humoral e celular, induzindo baixos níveis de IgA, IgM e IgG3, mas altos níveis de IgG1, IgG2a e IgG2b. Trabalhos como o de CORDEIRO *et al.* (2001) demonstraram que os anticorpos IgG1 anti-tripomastigota estão presentes em baixos níveis em pacientes chagásicos crônicos com a forma CARD, e em altos níveis em pacientes chagásicos crônicos IND, podendo ser um marcador de dano cardíaco na doença de Chagas e evidenciando o papel protetor dessa imunoglobulina. A proteína recombinante rMBR::SSP4 também induziu a produção de iNOS e de NO por macrófagos e foi capaz de induzir a expressão de mRNA para IL-1 α , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α em camundongos controle e IL-10 em camundongos imunizados, sugerindo que TcSSP4 pode exercer uma influência regulatória em macrófagos durante a resposta imune contra o *T. cruzi* (RAMOS-LIGONIO *et al.*, 2004). FLORES GARCIA *et al.* (2011) avaliaram a proteína recombinante rMBR::SSP4 do *T. cruzi* derivado do antígeno ancorado em GPI, SSP4, como uma molécula imunomodulatória, e observaram que ela foi capaz de induzir altas concentrações de IL-10 e IFN- γ “*in vivo*” e “*in vitro*”, sendo que “*in vitro*” ambas as citocinas foram produzidas por células T CD4+.

1.3.4.3- Citometria de fluxo no diagnóstico e controle da cura parasitológica da doença de Chagas

Devido às limitações dos testes parasitológicos, moleculares e sorológicos convencionais, e principalmente o longo tempo necessário para a negativação da sorologia convencional, considerada como critério clássico de cura parasitológica da doença de Chagas (VIOTTI, 1994; CANÇADO, 2002; COURA e CASTRO, 2002), os testes sorológicos não-convencionais baseados na citometria de fluxo, vem sendo cada vez mais utilizados no diagnóstico e na monitoração da cura parasitológica pós-

tratamento etiológico desta infecção (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; CORDEIRO *et al.*, 2001; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011).

A citometria de fluxo é uma técnica automatizada bem estabelecida, para identificar e caracterizar física e bioquimicamente populações celulares e sub-grupos em uma ampla variedade de fluidos biológicos. A caracterização inclui tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Os parâmetros podem ser detectados simultaneamente na citometria de fluxo, além de medidos, armazenados e analisados em programas de computador. Essa ferramenta vem sendo utilizada na investigação dos anticorpos que se ligam a membrana das formas tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; CORDEIRO *et al.*, 2001; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011). Uma das vantagens da citometria de fluxo é a possibilidade de detectar 10000 parasitos fluorescentes por metodologia e de utilizar parasitos inteiros como fontes de antígeno ao invés de antígenos solúveis (CORDEIRO *et al.*, 2001). Avaliando a reatividade de anticorpos IgG anti-TRIPO vivo pela citometria de fluxo (FC-ALTA) em 54 amostras de soros de pacientes chagásicos não tratados (NT), tratados não curados (TNC), tratados curados (TC), discordantes (DISC) e de pacientes não infectados (NI), os soros dos pacientes NT e TNC apresentaram valores de reatividade positivos (acima de 20%) e os soros dos pacientes TC, NI e DISC apresentaram valores de reatividade negativos (abaixo de 20%) (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995). Comparando a reatividade da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas tripomastigotas vivas pela citometria de fluxo (FC-ALTA) com a LMC°, a FC-ALTA apresentou uma maior sensibilidade, uma vez que a diluição estabelecida para esta metodologia foi de 1:256, em contraste com a diluição 1:4 para a LMC°. Com esses resultados a citometria de fluxo demonstrou ser uma técnica eficaz na avaliação dos anticorpos que se ligam as formas tripomastigotas vivas, podendo ser utilizada na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002).

Avaliando a reatividade de anticorpos para diferentes preparações antigênicas do *T. cruzi* pela citometria de fluxo no soro de 76 amostras de pacientes chagásicos crônicos e 20 NC, observou-se que os valores de reatividade foram maiores nos chagásicos do que nos NC, independente da preparação antigênica utilizada. No entanto, as preparações com as formas EPI e TRIPO fixadas apresentaram maiores valores de percentual de parasitos fluorescentes parasitos (PPFP), incluindo os NC, em relação às

formas TRIPO vivas. Quase nenhuma ligação de subclasse de IgG em TRIPO vivo foi observada no “pool” de soros de NC. A reatividade de IgGs é diferente em TRIPO fixados e em TRIPO vivos (CORDEIRO *et al.*, 2001). Isso ocorre porque é possível que o processo de fixação leve a mudanças conformacionais nos antígenos de membrana do parasito, o que pode causar seu reconhecimento por outras imunoglobulinas. Várias moléculas de membrana presentes em TRIPO vivos são perdidas ou desnaturadas pela fixação, como a proteína de 160 kDa, o principal alvo dos anticorpos líticos (MARTINS *et al.*, 1985; UMEKITA *et al.*, 1996). A observação de que após a fixação os parasitos tornam-se mais reativos com IgG de NC sugere que epitopos responsáveis pela reatividade cruzada são também expostos após a fixação. Apesar do risco de infecção durante a manipulação, a grande vantagem da utilização de TRIPO vivos como fontes antigênicas para testes sorológicos é que apenas epitopos do lado de fora da membrana estão disponíveis para ligação de IgGs (CORDEIRO *et al.*, 2001). Essa propriedade dos parasitos vivos, evita a ligação de IgG a componentes intracelulares, amplamente distribuídos em outros tripanosomatídeos, que respondem pela reatividade cruzada quando se utiliza parasitos fixados (ANDRADE *et al.*, 1988; CHIARAMONTE *et al.*, 1996; MALCHIODI *et al.*, 1994). CORDEIRO *et al.* (2001) também observaram a reatividade de diferentes subclasses de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas, e constatou que em EPI fixado os níveis de IgG2 foram menores em pacientes com a forma DIG do que os que apresentam as formas CARD e IND. Já em TRIPO vivo, os níveis de IgG1 e IgG3 foram menores em pacientes chagásicos com a forma CARD, e IgG1 maior nos pacientes com a forma IND. Dessa maneira, a citometria de fluxo além de ser uma ferramenta útil no diagnóstico da doença de Chagas, foi capaz de revelar o uso da subclasse IgG1 como um possível marcador de prognóstico da infecção pelo *T. cruzi* (CORDEIRO *et al.*, 2001). Em desacordo com esse trabalho SANTOS *et al.* (2012) avaliaram a reatividade de IgG total e de IgG1, IgG2 e IgG3 pela técnica de ELISA “in-house” no soro de pacientes chagásicos crônicos IND, CARD e digestivos/mistos (DIG/Mis). Os autores demonstraram maior reatividade de IgG3 em IND, maiores níveis de IgG total em DIG/Mis se comparado com IND e CARD e menor reatividade de IgG1 em IND se comparado aos CARD. Esses resultados discrepantes em relação à subclasse de anticorpos IgG1 pode ser atribuída à variações metodológicas e aos distintos antígenos utilizados nas diferentes técnicas.

Visando otimizar a técnica de FC-ALTA e avaliar a sua performance em estudos clínicos, MARTINS-FILHO *et al.* (2002) validaram a metodologia, reenfatizando a sua aplicabilidade para monitorar a cura pós-terapêutica da doença de Chagas. A utilização do anticorpo anti-IgG humano conjugado com isotiacianato de fluoresceína (FITC) a 37°C por 30 min, aumentou a sensibilidade da técnica para as amostras de pacientes chagásicos NT e TNC, não interferindo na habilidade de discriminar as amostras negativas (com PFP < ou igual a 20%). Todos os pacientes NT e TNC apresentaram valores de reatividade alto positivos (PFP >50%), exceto dois pacientes TNC, que foram baixo positivos (20% <PFP< ou igual a 50%). Todos os pacientes TC apresentaram valores de reatividade negativos, exceto um paciente. Já os pacientes tratados em avaliação (TEA) apresentaram um amplo grau de reatividade das amostras, sendo 12 alto positivas, 9 baixo positivas e 7 negativas (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002). As 7 amostras negativas podem ser classificadas como dissociadas de acordo com KRETTILI e BRENER (1982) e os indivíduos podem ser considerados curados (KRETTILI e BRENER, 1982; GALVÃO *et al.*, 1993; MARTINS-FILHO *et al.*, 1995), uma vez que apresentam resultados negativos na FC-ALTA e no xenodiagnóstico. Dessa maneira a FC-ALTA além de ser uma ferramenta útil na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, pode ser utilizada para confirmar a cura no caso de indivíduos com testes parasitológicos negativos e sorologia convencional positiva ou oscilante (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002).

Outro teste sorológico não convencional baseado na citometria de fluxo é a técnica de pesquisa de anticorpos IgG anti-formas epimastigotas fixadas (FC-AFEA). Essa técnica utiliza como fonte antigênica as formas epimastigotas do *T. cruzi* fixadas e surge como uma metodologia não convencional para o diagnóstico, prognóstico e critério de cura da doença de Chagas (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011). Utilizando um ponto de corte de 60% de PFP na diluição 1.024, o teste foi capaz de discriminar os pacientes chagásicos dos NI, sendo que 82% dos chagásicos apresentaram valores de reatividade alto positivos e todos os NI apresentaram valores baixo positivos. A sensibilidade do teste foi de 82% e a especificidade de 100%, sendo útil no diagnóstico da doença de Chagas (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007). Utilizando a diluição 1:2048 e o ponto de corte de 60% de PFP, todos os pacientes NT e TNC foram alto positivos, e os TC foram negativos, ou baixo positivo. A sensibilidade do teste foi de 100% e a especificidade de 100%, sendo portanto, uma ferramenta útil na

monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007).

MATOS *et al.* (2011) implementaram mudanças metodológicas na técnica de FC-AFEA (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007) para aumentar a sensibilidade na avaliação da cura parasitológica pós-tratamento etiológico de pacientes chagásicos tratados e no diagnóstico da doença de Chagas. As mudanças metodológicas implementadas foram a utilização do anticorpo anti-IgG (Fc específico) que é mais confiável no diagnóstico da doença de Chagas, considerando a positividade em títulos maiores, e a marcação com azul de “Evan’s”, que garante a pureza do “gating” de epimastigotas e a exclusão de “debris” da população de parasitos selecionada (MATOS *et al.*, 2011). Na diluição 1:2048 e no ponto de corte de 60% de PFP, a FC-AFEA modificada apresentou uma alta sensibilidade na discriminação de pacientes chagásicos e de NI, de pacientes TNC e de TC e uma alta especificidade, com apenas 4,6% de resultados falso-positivos (MATOS *et al.*, 2011).

Diante do bom desempenho da citometria de fluxo no diagnóstico e na monitoração da cura parasitológica da DCh, nos anos de 2008 e 2009, o Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM)/Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) em parceria com a Universidade Federal do Espírito Santo, desenvolveram a metodologia de pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *Leishmania sp* pela citometria de fluxo (FC-AFPA-IgG) aplicada ao diagnóstico sorológico das Leishmanioses Tegumentar (LT) e Visceral. Essa nova metodologia empregou primeiramente como fonte antigênica as formas promastigotas fixadas de *Leishmania amazonensis*, e apresentou sensibilidade de 99% e especificidade de 61% no diagnóstico sorológico da LT. No entanto, esse novo teste apresentou elevada reatividade cruzada com amostras de soros de pacientes com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral (PISSINATI *et al.*, 2008). Posteriormente, foi avaliado o desempenho da FC-AFPA-IgG, empregando como fonte antigênica formas promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* que apresentou sensibilidade e especificidade de 100% no diagnóstico sorológico da LV (GARCIA *et al.*, 2009). Visando solucionar os desafios de especificidade observados na FC-AFEA-IgG e na FC-AFPA-IgG para o diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das leishmanioses tegumentar e visceral, foi desenvolvida recentemente no LBDM/CPqRR a metodologia de TRIPLEX, pesquisa de anticorpos IgG anti-formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* e promastigotas fixadas da *L. braziliensis* e da *L. chagasi* pela citometria de fluxo (FC-

TRIPLEX-IgG1), como um método que emprega formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* e promastigotas fixadas de *L. braziliensis* e de *L. chagasi*. Essa nova metodologia apresenta um sistema de revelação mais específico (anti-IgG1) e sensível (conjugação biotina/avidina/ficoeritrina).

Baseado nesse contexto, e buscando uma preparação antigênica ideal para um melhor desempenho dos métodos sorológicos, foi desenvolvida neste trabalho, uma inovação metodológica através da técnica de pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas amastigotas vivas, tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas pela citometria de fluxo (FC-ATE-Triplex), propondo otimizar a pesquisa de anticorpos aplicado à monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico e ao diagnóstico da doença de Chagas.

2-JUSTIFICATIVA

Os métodos disponíveis para o diagnóstico e avaliação da eficácia do tratamento na fase crônica tardia da doença de Chagas apresentam limitações metodológicas e índices de sensibilidade e especificidade variáveis. Com isso, a falta de métodos confiáveis tem comprometido eventuais melhorias no tratamento da doença de Chagas, causando um impacto na indústria farmacêutica. Além do mais, a sorologia convencional utilizada como critério de cura clássico, apresenta uma reatividade prolongada em pacientes na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, após o tratamento etiológico. Buscando superar tais limitações, esse estudo visa estabelecer uma inovação metodológica mais sensível, específica e prática, propondo otimizar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* aplicada a monitoração pós-tratamento etiológico e ao diagnóstico da doença de Chagas.

3-OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Estabelecer uma inovação metodológica no diagnóstico e na monitoração da cura parasitológica pós-terapêutica da doença de Chagas através da técnica de FC-ATE-Triplex para análise simultânea de IgG1 anti-*Trypanosoma cruzi*.

3.2- Objetivos Específicos

3.2.1- Desenvolver uma nova metodologia para análise da reatividade sorológica simultânea anti-formas evolutivas do *T. cruzi* (FC-ATE-Triplex) aplicável em estudos laboratoriais da doença de Chagas.

3.2.2- Verificar a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico da doença de Chagas

3.2.3- Avaliar a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Populações do estudo

4.1.1- População 1

Para a padronização da técnica de FC-ATE-Triplex, análise de desempenho no controle da cura parasitológica da doença de Chagas, diagnóstico e monitoração da cura parasitológica precoce da infecção pelo *T. cruzi*, foram selecionadas amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR de pacientes chagásicos e de pacientes não infectados. No total foram selecionadas 81 amostras, sendo 71 de pacientes chagásicos e 10 de pacientes não infectados.

Os 71 pacientes chagásicos apresentam idade variando entre 6 meses e 66 anos, e foram acompanhados pelo Dr. Anis Rassi, da Universidade Federal de Goiás. Esses pacientes foram avaliados por testes sorológicos convencionais (ELISA, HAI e IFI) e parasitológico (xenodiagnóstico), em estudos de acompanhamento clínico e laboratorial que variaram de 3 a 26 anos após o tratamento etiológico. De acordo com essas metodologias esses pacientes foram classificados em diferentes categorias: Pacientes Não Tratados (NT, n= 12); Pacientes Tratados Não Curados (TNC, n=10), Pacientes Tratados Curados (TC, n=21), e Pacientes Tratados Em Avaliação (TEA, n=28), conforme demonstrado na Figura 1.

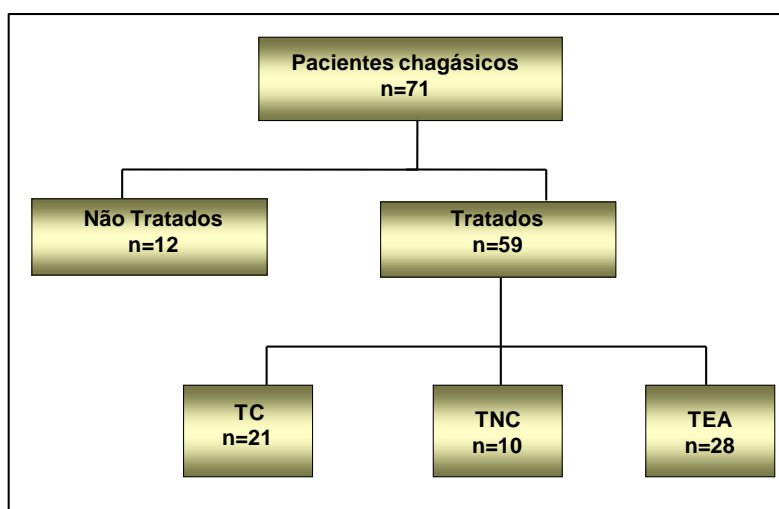


Figura 1: Representação esquemática dos grupos avaliados na População 1

O tratamento foi realizado na fase aguda, sub-aguda e crônica. O critério de cura utilizado para a classificação dos grupos baseou-se na negatificação do xenodiagnóstico e dos testes sorológicos convencionais (ELISA, HAI e IFI) (CANÇADO, 2002). De acordo com esse critério, os pacientes dos grupos NT e TNC apresentaram resultados

positivos em ambos os testes, os pacientes TC apresentaram resultados negativos tanto nos testes sorológicos convencionais, quanto no xenodiagnóstico, repetidamente (pelo menos 8 exames negativos), e os do grupo TEA apresentaram sorologia convencional positiva ou oscilante, e xenodiagnóstico negativo.

Os 10 pacientes não chagásicos são pacientes não infectados atendidos no Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, MG.

4.1.2-População 2

Para avaliar a aplicabilidade da técnica no controle da cura parasitológica da doença de Chagas e na monitoração da cura parasitológica precoce da infecção pelo *T. cruzi* em novas amostragens populacionais, foram selecionadas 47 amostras de pacientes chagásicos crônicos da soroteca do Laboratório de Doença de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e 3 amostras de pacientes chagásicos do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG).

Os 47 pacientes chagásicos crônicos tratados residem no município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, no passado considerada uma área endêmica para a doença de Chagas e atualmente em Vigilância Epidemiológica. Todos esses pacientes foram tratados com Benzonidazol a mais de 10 anos, e avaliados clínica e laboratorialmente em estudos de avaliação pós-tratamento etiológico. De acordo com essas avaliações esses pacientes foram classificados em diferentes categorias: Tratados Não Curados (TNC, n=16), Tratados Curados (TC, n=7) e Tratados Em Avaliação (TEA, n=24), conforme demonstrado na Figura 2.

Os 3 pacientes chagásicos tratados são voluntários de demanda espontânea atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, desde o ano de 1997 até os dias atuais. Eles são provenientes de Belo Horizonte/MG e de outras cidades endêmicas ou não. Esses indivíduos foram classificados como Tratados Não Curados (TNC, n=3).

O critério de cura utilizado para classificar esses pacientes foi: os pacientes TNC (n=19) apresentaram métodos sorológicos convencionais (ELISA, HAI e IFI) e hemocultura positivos; os pacientes TC (n=7) apresentaram métodos sorológicos convencionais (ELISA, HAI e IFI) e hemocultura negativos; e os pacientes TEA (n=24)

apresentaram métodos sorológicos convencionais (ELISA, HAI e IFI) positivos ou oscilantes e hemocultura negativa (Figura 2).

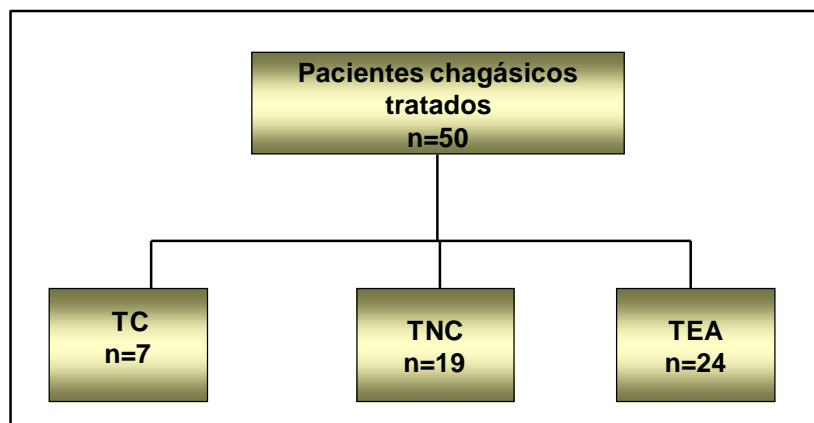


Figura 2: Representação esquemática dos grupos avaliados na População 2

4.1.3- População 3

Para avaliar a especificidade do método foram testadas 30 amostras de pacientes não chagásicos portadores de leishmaniose visceral (LV, n=10) e de leishmaniose tegumentar americana (LTA, n=20) (Figura 3). As amostras de pacientes com LV foram selecionadas da soroteca do LBDM/CPqRR e as amostras de pacientes com LTA são provenientes da soroteca do Laboratório de Leishmaniose/CPqRR. Os pacientes com LV são pacientes da cidade de Montes Claros, MG, e os pacientes com LTA são indivíduos que residem na aldeia de Xacriabá, MG (n=10) ou indivíduos que residem na cidade de Belo Horizonte, MG (n=10) (Figura 3). Cada amostra foi diagnosticada por exames sorológicos e/ou parasitológicos.

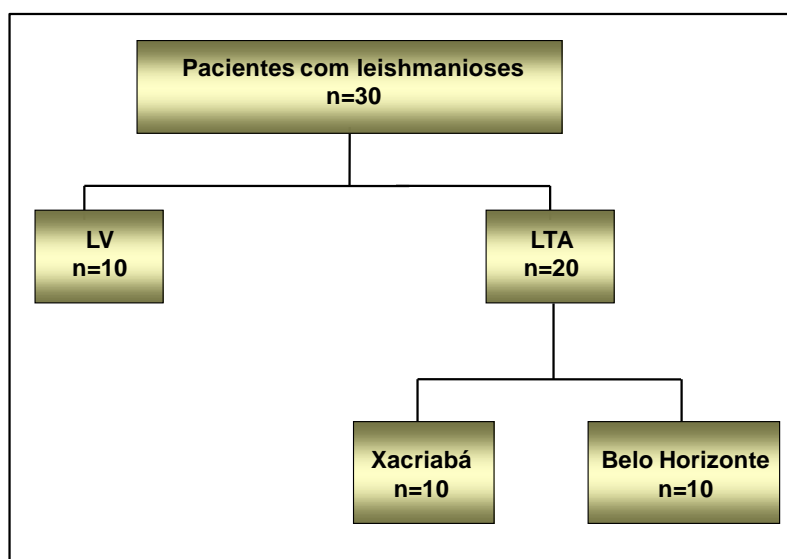


Figura 3: Representação esquemática dos grupos avaliados na População 3

4.2- Preservação e processamento das amostras

Todas as amostras de soros utilizadas nesse estudo foram mantidas a -20°C . Antes da realização dos testes sorológicos, elas foram descongeladas e inativadas a 56°C por 30 min. Todos os soros foram diluídos em solução salina tamponada (PBS) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e filtrados em filtro para seringa $0,22\ \mu\text{m}$ (MILIPORE) para remoção de “*debris*” e plaquetas. As amostras de soro diluídas e filtradas foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos.

4.3- Procedimento experimental

4.3.1- Cultivo das formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*

Nesse estudo foi utilizada a cepa CL do *T. cruzi*. As formas tripomastigotas (TRIPO) e amastigotas (AMA) foram cultivadas em cultura de células da linhagem NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo. O meio utilizado para manutenção das células foi o RPMI 1640, com vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e 2mM de glutamina. As células foram semeadas em garrafas de culturas de tecido de 25cm^2 (150.000 células), ou garrafas de 75cm^2 (450.000 células).

Após um período de aproximadamente 24h as células foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos de camundongos experimentalmente infectados com a cepa CL do *T. cruzi* na proporção de 20 tripomastigotas/célula. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C , 5% gás carbônico, 95% de umidade por 24 horas, para favorecer a infecção das células. Após este período, as monocamadas foram lavadas para retirar os parasitos remanescentes e mantidas com meio RPMI suplementado a 33°C , 5% CO_2 , 95% de umidade (BERTELLI *et al.*, 1977). O meio foi trocado diariamente, e a partir do 4º dia de cultura, os tripomastigotas foram coletados por centrifugação em tubos falcon de 50mL. Para a obtenção das formas amastigotas, algumas garrafas foram mantidas em estufa 37°C , 5% CO_2 , 95% de umidade sem a troca do meio.

4.3.2- Cultivo das formas epimastigotas do *T. cruzi*

Foi utilizado nesse estudo a cepa CL do *T. cruzi*. As formas epimastigotas (EPI) foram cultivadas em meio acelular, “*Liver Infusion Tryptose*” (LIT) (CAMARGO, 1964). Este meio consiste em solução a 10% em água de infuso de fígado (DiFCO), 50,0g de triptose (DIFCO), 40,0g de cloreto de sódio (SYNTH), 4,0g de cloreto de potássio (SYNTH), 80,0g de fosfato de sódio (SYNTH), 5mL de trietanolamina, 250,0mg de hemina (SIGMA), pH do meio ajustado para 7,2 com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, solução a 40% em água de Glicose (SIGMA), 50mL de soro fetal bovino (CAMARGO, 1964) mantida no LBDM.

Para iniciar o cultivo das formas epimastigotas, foi realizado um inóculo de 1×10^7 parasitos/mL em uma garrafa de cultura de células contendo 3mL de LIT. As culturas foram diariamente homogeneizadas para oferecer uma maior aeração e observadas em microscópio óptico para verificar a ausência de contaminação. A cada 7 dias, as culturas eram repicadas por passagens sucessivas em meio LIT. Este procedimento foi repetido a cada 7 dias para manutenção das culturas em fase de crescimento exponencial e para evitar a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3.3- Preparação das formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi*

Os parasitos coletados na fase exponencial tardia de crescimento foram transferidos para tubos falcon estéreis de 50mL e homogeneizados em vórtex a baixa velocidade para desfazer os grumos celulares. A suspensão de parasitos foi centrifugada a 200 rpm, 10 min, 18°C , para remoção de partículas e grumos de parasitos do sedimento. Os tubos falcon foram mantidos em estufa B.O.D $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 10 min, para que as formas epimastigotas se deslocassem do sedimento para o sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon de 50mL e o sedimento desprezado. Os parasitos foram então lavados duas vezes com PBS com 3% de SBF por centrifugação a 2.200 rpm, 10 min, 18°C . O “*pellet*” foi homogeneizado e ressuspendido em igual volume com PBS e solução fixadora para citometria (Max FacsFix- MFF) e mantidos por 12h a 4°C . No dia seguinte, os parasitos foram centrifugados a 2.200 rpm, 10 min, 18°C e ressuspendidos em PBS. A suspensão de parasitos foi quantificada e ajustada para 1×10^7 parasitos/mL em câmara de Neubauer e monitoradas em citômetro de fluxo, para

verificar a qualidade da população. As formas epimastigotas fixadas foram mantidas a 4°C.

4.3.4- Preparação das formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*

As formas TRIPO e AMA foram coletadas da garrafa de cultura de células e transferidas para tubos falcon de 50mL. A suspensão de parasitos foi centrifugada a 400 rpm, 10 min, 25°C para a remoção das células remanescentes. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e o “*pellet*” foi descartado. Para lavar os parasitos foi adicionado à suspensão de TRIPO e AMA, PBS 10% SFB. A suspensão de parasitos foi centrifugada a 2.200 rpm, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1ml de “*pellet*” foi ressuspenso. As formas AMA e TRIPO foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração de parasitos ajustada para 1×10^7 parasitos/mL.

4.4-Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo

Em placas de 96 poços com fundo em “U”, 50µL do soro teste diluído em PBS 10% SBF (1:250 a 1:8.000) foram incubados a 37°C por 30 minutos e ao abrigo da luz, na presença de 50 µL da mistura de AMA, TRIPO e EPI fluorescentes (300.000 parasitos/poço). Após a incubação, os parasitos foram lavados uma vez com 100 µL de PBS 10% SBF, por centrifugação (2.500 rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante desprezado, e mais uma vez lavados com 200 µL de PBS 10% SBF, por centrifugação (2.500 rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante novamente desprezado. Para análise de IgG1, os parasitos foram incubados a 37°C por 30 min, na presença de 50µL do anticorpo humano anti-IgG1 biotilado, diluído em PBS 10% SBF (1:6400), e com 20µL da estreptoavidina conjugada com a ficoeritrina (SAPE), também diluída em PBS 10% SBF (1:400). Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes como descrito acima, fixados com 200µL de solução fixadora para citometria (MFF) (Para 100mL; 5mL de Paraformaldeído 20X e 5mL de Cacodilato 20X. O pH foi ajustado para 7,2) e os parasitos incubados por 30 min a 4°C ao abrigo da luz. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo (FACScalibur), e as análises feitas no software “*Flow Jo*”. Todas as leituras das amostras foram realizadas no mesmo dia do experimento.

Em todos os experimentos foi realizado um controle interno da reação (controle do conjugado), em que os parasitos foram incubados na ausência do soro humano e na presença do anticorpo secundário, a fim de monitorar ligações inespecíficas. Foram

incluídos também um controle positivo proveniente de “*pool*” de soros de pacientes chagásicos e um controle negativo de soros de pacientes não infectados.

Nos ensaios da FC-ATE-Triplex, todas as soluções utilizadas foram filtradas e mantidas a 4°C durante a realização do experimento. A manipulação dos parasitos foi realizada em fluxo laminar, a fim de garantir uma maior segurança do operador e uma melhor qualidade dos experimentos.

4.5-Aquisição dos dados no citômetro de fluxo

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

Nesse estudo, foram empregados parasitos marcados com FITC e anticorpos marcados pelo sistema biotina/SAPE, que quando excitados, emitem sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1 - fluorescência verde) e do tipo 2 (FL2 - fluorescência laranja), respectivamente. Os ganhos de voltagem para FSC (tamanho) e SSC (granulosidade) foram ajustados para E00 e 427, ambos na escala LOG, para permitir a identificação dos parasitos em gráficos bidimensionais do tipo FSCxSSC. Os mesmos ajustes foram empregados em todos os experimentos. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros: tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 10.000 parasitos. Os ganhos e as compensações utilizadas no citômetro de fluxo estão descritos na Tabela I.

TABELA I: Ajustes no citômetro de fluxo FACScalibur para a avaliação de anticorpos anti- *T. cruzi*

Ganho			Compensação
Canal	Escala	Nível	
FSC	LOG	E00	FL1 - 0,8% FL2
SSC	LOG	427	FL2 - 35,0% FL1
FL1	LOG	620	FL2 - 0,0% FL3
FL2	LOG	500	FL3 - 9,5% FL2
FL3	LOG	704	FL3 - 2,2% FL4
FL4	LOG	780	FL4 - 23,6% FL3

FSC (*ForwardScatter*)= tamanho; SSC (*SideScatter*)=granulosidade; FL1=fluorescência 1; FL2=fluorescência 2; FL3=fluorescência 3; FL4=fluorescência 4; LOG=logaritmo

4.6- Análises Estatísticas

4.6.1- Análise de desempenho da FC-ATE-Triplex

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da FC-ATE-Triplex na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, tornou-se essencial definir qual o melhor ponto de corte capaz de segregar os pacientes tratados curados dos pacientes tratados não curados.

Dentre os diversos critérios para definir um ponto de corte um contrabalanço entre sensibilidade e especificidade é desejável. Para isto, foi construída a “*Receiver Operating Characteristic curve*” (curva ROC) para definição do ponto de corte.

A curva ROC é uma ferramenta estatística capaz de indicar a diluição do soro que possui maior distanciamento entre o ponto de corte sugerido pela curva e seus valores adjacente e subjacente, além de fornecer a área sob a curva (BROWNER *et al.*, 1998; SWETS, 1988; SACKETT *et al.*, 1991) e a razão de verossimilhança (JAESCHEKE *et al.*, 1994) do teste avaliado, indicando a acurácia global, e quantas vezes é mais provável (ou menos provável) encontrar um dado resultado na população infectada (em nosso caso, porque nem todo indivíduo infectado com *T. cruzi* é doente) em relação à população não infectada, respectivamente. Para a obtenção das curvas ROC, foi utilizado o programa estatístico “*Med Calc Statistical*”. As curvas consistiam na representação gráfica da reatividade do grupo TNC em relação ao grupo TC. Estes

índices geraram a sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e a especificidade (falso-positivo) no eixo horizontal (GREINER *et al.*, 1981; ZWEIG e CAMPBELL, 1993; GREINER *et al.*, 2000).

Cada ponto na curva ROC representa os valores dos referidos índices em diferentes pontos de corte, determinando a área sob a curva (ASC) que indica a acurácia global do teste. Quanto mais próximo a ASC de 1, melhor é o desempenho do teste avaliado. Um teste diagnóstico pode ser classificado como: sem valor ($ASC=0,5$), de baixa acurácia ($0,5 < ASC \leq 0,7$), de moderada acurácia ($0,7 < ASC \leq 0,9$), de elevada acurácia ($0,9 < ASC < 1,0$) e como teste perfeito ($ASC=1$) (SWETS, 1988). O valor referente ao ponto situado mais próximo do ângulo superior esquerdo da curva ROC, indica o ponto de corte com menor número de resultados falso-positivos e falso-negativos (BROWNER *et al.*, 1998; SACKETT *et al.*, 1991).

Para realizar a análise de desempenho do teste, foram empregados índices expressos em porcentagem. Os índices expressos em porcentagem incluíram a sensibilidade $= (\text{verdadeiros positivos} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falso negativos})) \times 100$ e especificidade $= (\text{verdadeiros negativos} / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falso negativos})) \times 100$.

4.6.2- Teste t de Student

Para realizar a análise comparativa da reatividade média de IgG1 anti-*T. cruzi* dos grupos TC e TNC foi realizado o teste t utilizando o programa “*Graph Pad Prism*” 5.0.

5. RESULTADOS

Os resultados desse trabalho serão apresentados em três partes correspondentes aos objetivos específicos propostos.

A primeira parte corresponde ao desenvolvimento de uma nova metodologia para análise da reatividade sorológica simultânea anti-formas evolutivas do *T. cruzi* aplicável em estudos laboratoriais da doença de Chagas e na análise de desempenho dessa nova técnica no controle da cura parasitológica da infecção pelo *T. cruzi*. Para isso, foram utilizadas 31 amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR de pacientes chagásicos tratados curados (TC) e tratados não curados (TNC).

A segunda parte corresponde à avaliação da aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico da doença de Chagas. Para isso, foram utilizadas 22 amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR de pacientes chagásicos não tratados (NT) e de pacientes não infectados (NI). Foram também utilizadas 30 amostras de soros de pacientes não chagásicos portadores de leishmaniose visceral (LV, n=10) e de leishmaniose tegumentar americana (LTA, n=20), para o diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das Leishmanioses.

A terceira parte avaliou a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas. Para isso, foram utilizadas 28 amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR de pacientes chagásicos classificados como tratados em avaliação (TEA). Foram também utilizadas 47 amostras de conveniência provenientes do Laboratório de Doença de Chagas, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Ouro Preto, de pacientes chagásicos tratados não curados (TNC), tratados curados (TC) e tratados em avaliação (TEA); e três amostras de pacientes chagásicos tratados não curados (TNC) provenientes do Ambulatório de Doença de Chagas, do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Parte I- Referente ao objetivo I

5.1- Desenvolvimento da técnica de FC-ATE-Triplex

5.1.1-Marcação diferencial das formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas do *T. cruzi* com isotiacianato de fluoresceína (FITC)

Uma vez que na citometria de fluxo as formas TRIPO, AMA e EPI apresentaram perfil morfométrico de tamanho (FSC) por granulidade (SSC) semelhante em gráficos de distribuição pontual, o primeiro desafio foi desenvolver um sistema de marcação fluorescente diferencial para as três formas evolutivas do *T. cruzi*. A Figura 4 demonstra o perfil das formas AMA, TRIPO e EPI em gráficos de FSCxSSC.

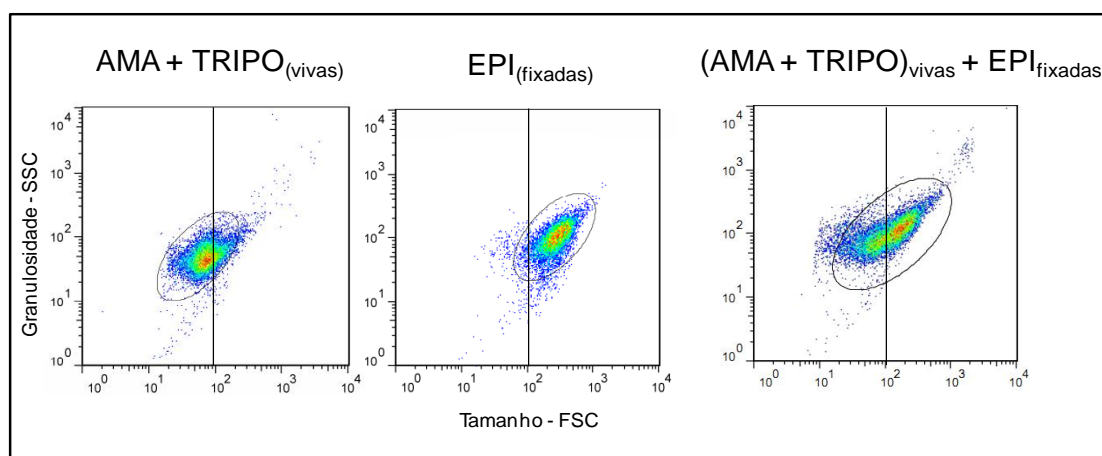


Figura 4: Perfil morfométrico de tamanho (FSC) por granulidade (SSC) das formas amastigotas e tripomastigotas (AMA + TRIPO), das formas epimastigotas (EPI) e das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas (AMA + TRIPO + EPI).

Foi realizada a marcação diferencial das formas TRIPO, AMA e EPI com isotiacianato de fluoresceína (FITC). As formas TRIPO e AMA foram marcadas na mesma suspensão de parasitos com FITC na concentração de 200 µg/mL. As formas EPI foram marcadas em separado com FITC, também na concentração de 200 µg/mL. Após a marcação, as suspensões de parasitos foram incubadas em estufa a 37°C por 30 min. Em seguida, elas foram lavadas três vezes com PBS 10% SFB (centrifugação a 2.200 rpm, 10 min, 18°C) e ressuspendidas no volume ajustado de parasitos. Após a marcação com FITC e lavagem, as formas TRIPO e AMA foram incubadas em estufa 37°C por 60 min, e as formas EPI foram incubadas a 4°C por 24h. Após as incubações, foi realizada uma leitura no citômetro de fluxo para verificar a marcação dos parasitos e o percentual de cada forma evolutiva. Após esse período de incubação, observou-se que as formas TRIPO e AMA apresentaram um fenômeno de marcação diferencial.

5.1.2- “Sorting” das populações fluorescentes

As formas TRIPO e AMA apresentaram um fenômeno de marcação diferencial. Uma das formas evolutivas apresentou menor fluorescência em gráficos de fluorescência 1 (FL1-FITC) por tamanho (FSC) e foi denominada “*LOW*” e a outra forma evolutiva apresentou uma maior fluorescência em relação à anterior em gráficos de FL1xFSC, sendo denominada “*INT*”. A Figura 5 demonstra o perfil das formas EPI e AMA + TRIPO em gráficos de FL1xFSC.

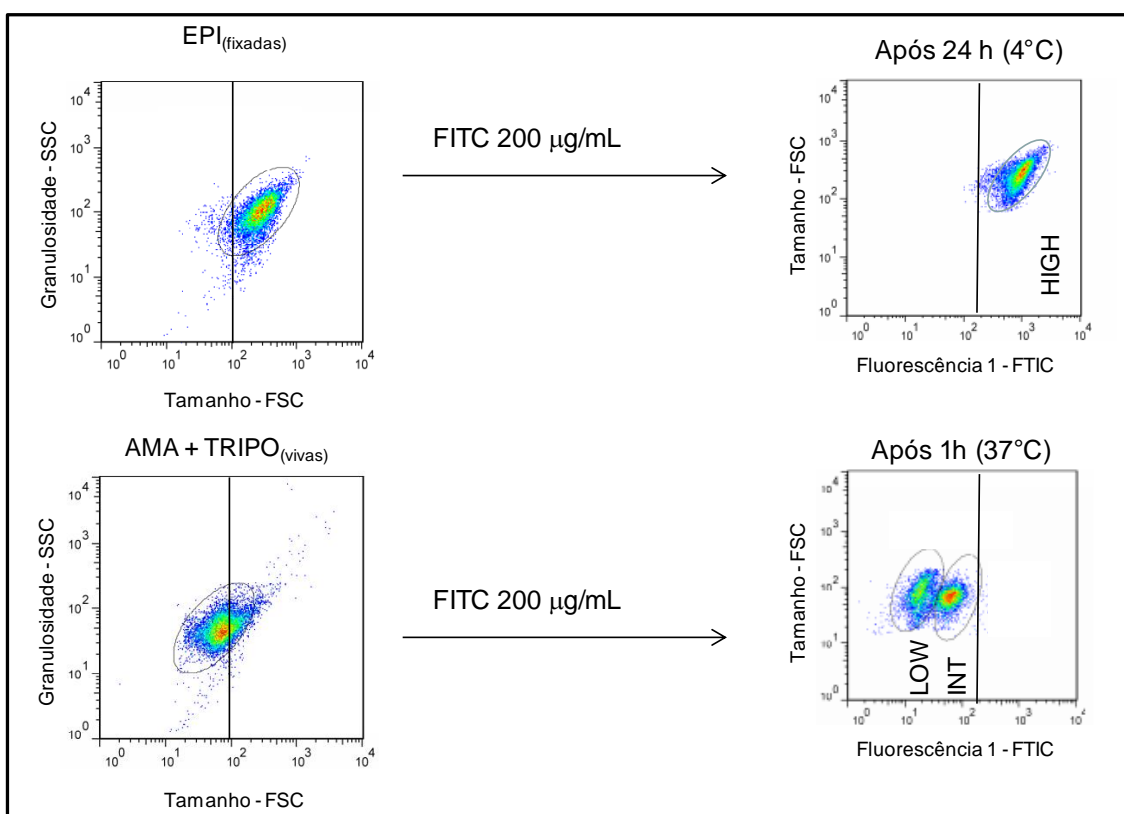


Figura 5: Perfil morfométrico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) das formas epimastigotas (EPI) e das formas amastigotas e tripomastigotas (AMA + TRIPO) e perfil das formas EPI e AMA + TRIPO após a marcação com 200 µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC), incubação das formas EPI a 4°C por 24h e das formas AMA + TRIPO a 37°C por 1h, em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC). As formas EPI foram denominadas de HIGH e as formas AMA + TRIPO de LOW, INT em gráficos de FL1xFSC

Com o intuito de verificar quais foram as formas evolutivas denominadas “*LOW*” e “*INT*” fluorescência, foi realizado um “*sorting*” das duas populações de parasitos, utilizando o citômetro de fluxo FACSarea. Após o “*sorting*”, as duas populações de parasitos separadas foram examinadas em microscópio de fluorescência e microscópio eletrônico. Constatou-se então, que a população de maior fluorescência, denominada de “*INT*”, representavam as formas tripomastigotas vivas, e a população de menor

fluorescência, denominada de “LOW”, representavam as formas amastigotas vivas. A Figura 6 demonstra o “*sorting*” das populações de “LOW” e “INT” fluorescência.

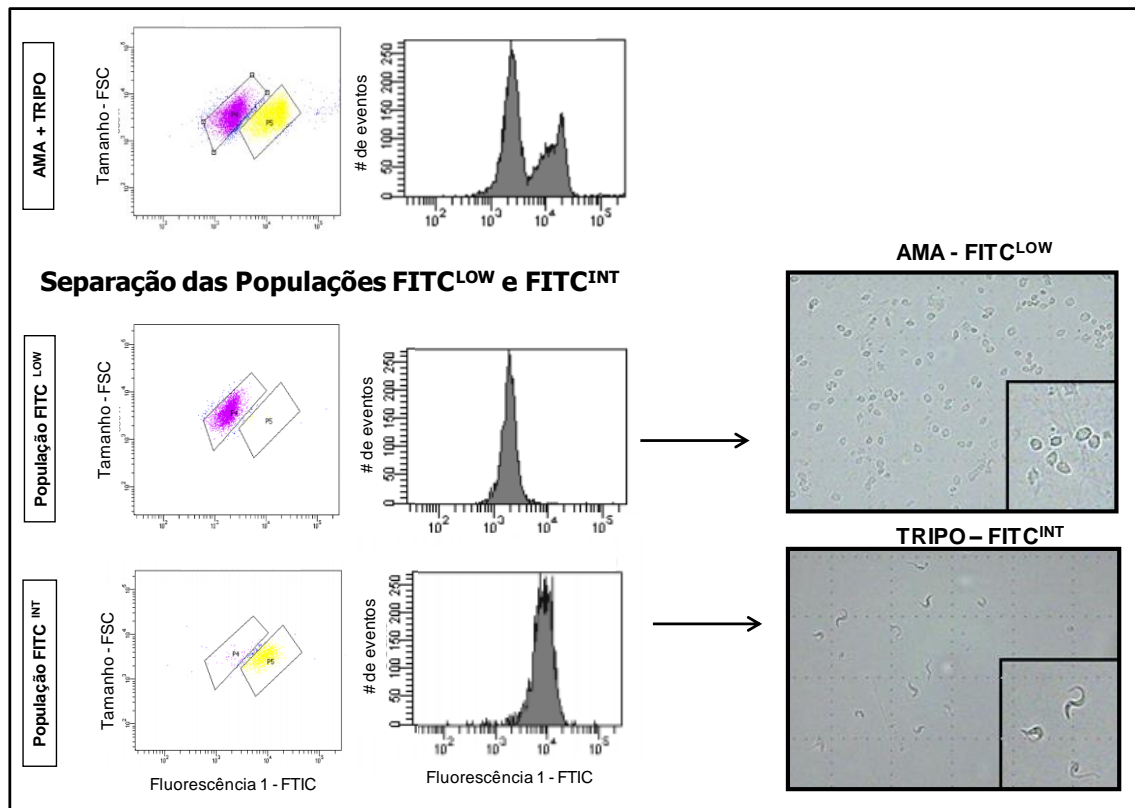


Figura 6: Representação em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC) e em gráficos de histogramas do perfil obtido antes e após o “*sorting*” das formas amastigotas e tripomastigotas (AMA + TRIPO) fluorescentes e fotografias obtidas através de microscopia de fluorescência, das populações denominadas de FITC^{LOW} e FITC^{INT} após o “*sorting*”. O *sorting* dos parasitos foi realizado utilizando o citômetro de fluxo FACSarea.

A Figura 7 demonstra as fotografias obtidas através da microscopia eletrônica das populações de “LOW” (formas amastigotas vivas), “INT” (formas tripomastigotas vivas) e “HIGH” (formas epimastigotas fixadas) fluorescência. As fotografias das populações de “LOW” e “INT” fluorescência foram realizadas após o “*sorting*” dos parasitos.

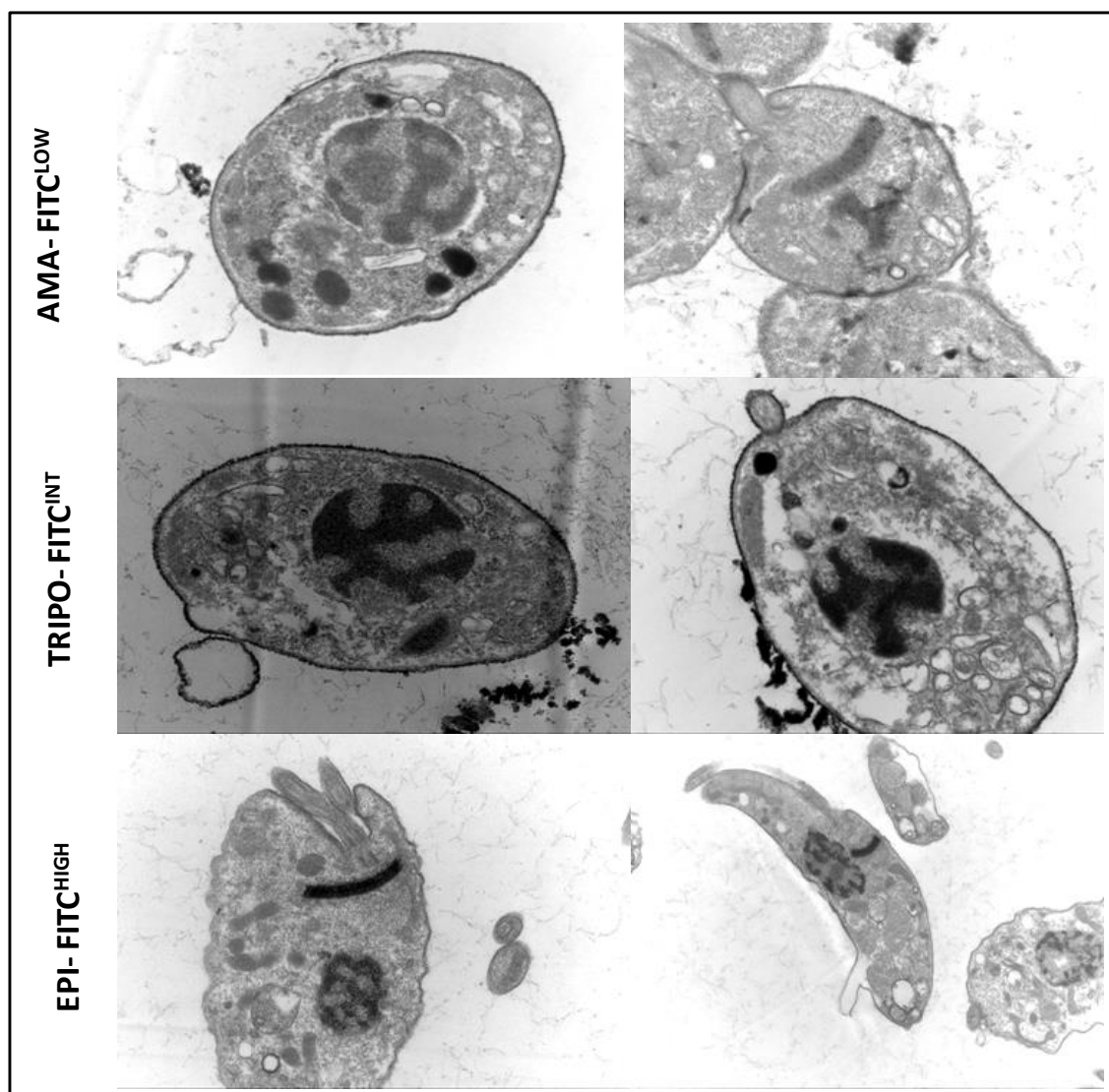


Figura 7: Fotografias obtidas através da microscopia eletrônica das populações denominadas de FITC^{LOW}, as formas amastigotas vivas, FITC^{INT}, as formas tripomastigotas vivas, e FITC^{HIGH} as formas epimastigotas fixadas.

5.1.3- Mistura das formas evolutivas do *T. cruzi* fluorescentes

Após a realização do “*sorting*” dos parasitos e verificação das populações denominadas “*LOW*” e “*INT*” fluorescência, foi realizada uma mistura das três formas evolutivas do *T. cruzi* fluorescentes (AMA + TRIPO e EPI) em proporções semelhantes. Foi realizada uma leitura no citômetro de fluxo para verificação e ajuste das proporções de cada forma evolutiva do *T. cruzi*.

Propôs-se então, um novo modelo de pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas evolutivas do *T. cruzi* (AMA + TRIPO + EPI) por citometria de fluxo, empregando um modelo de segregação fluorescente diferencial (FL1-FITC) e um sistema de revelação fluorescente complementar, fluorescência 2-estreptoavidina-ficoeritrina (FL2-PE),

denominado FC-ATE-Triplex. A Figura 8 demonstra um gráfico de FL1xFSC da mistura de AMA, TRIPO e EPI fluorescentes.

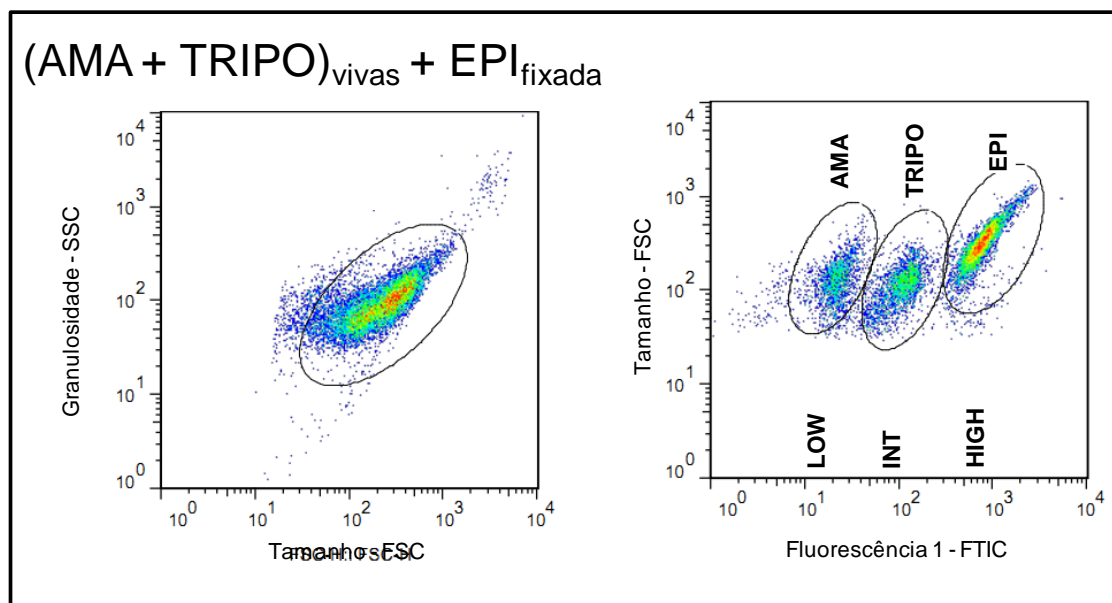


Figura 8: Representação em gráficos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) e em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC) do perfil obtido após a mistura das formas amastigotas (AMA), tripomastigotas (TRIPO) e epimastigotas (EPI) fluorescentes. As formas AMA foram denominadas de “LOW” fluorescência, as formas TRIPO de “INT” fluorescência e as formas EPI de “HIGH” fluorescência, em gráficos de FL1xFSC.

5.1.4- Análise da reatividade IgG1 anti-*T. cruzi*

Em gráficos de FL1xFSC foi feita a seleção (“Gate”) da população celular de interesse. Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência, em função do número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

5.1.4.1- Percentual de Parasitos Fluorescentes Positivos

A reatividade dos anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi* foi expressa sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observadas para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de positividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado. Para cada experimento, foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2% de PPFP no controle do conjugado. Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores de PPFP de cada amostra individual. Todos os dados desse trabalho foram analisados utilizando o programa

“*FLOW JO*”. A Figura 9 demonstra o “*gate*” feito em AMA, TRIPO ou EPI em gráficos de FSCxFL1, o estabelecimento do limiar de positividade de 2% de PFP no controle do conjugado para cada forma evolutiva do *T. cruzi* em gráficos de histograma, e a análise subsequente da reatividade do controle positivo e negativo em AMA, TRIPO ou EPI também em gráficos de histograma.

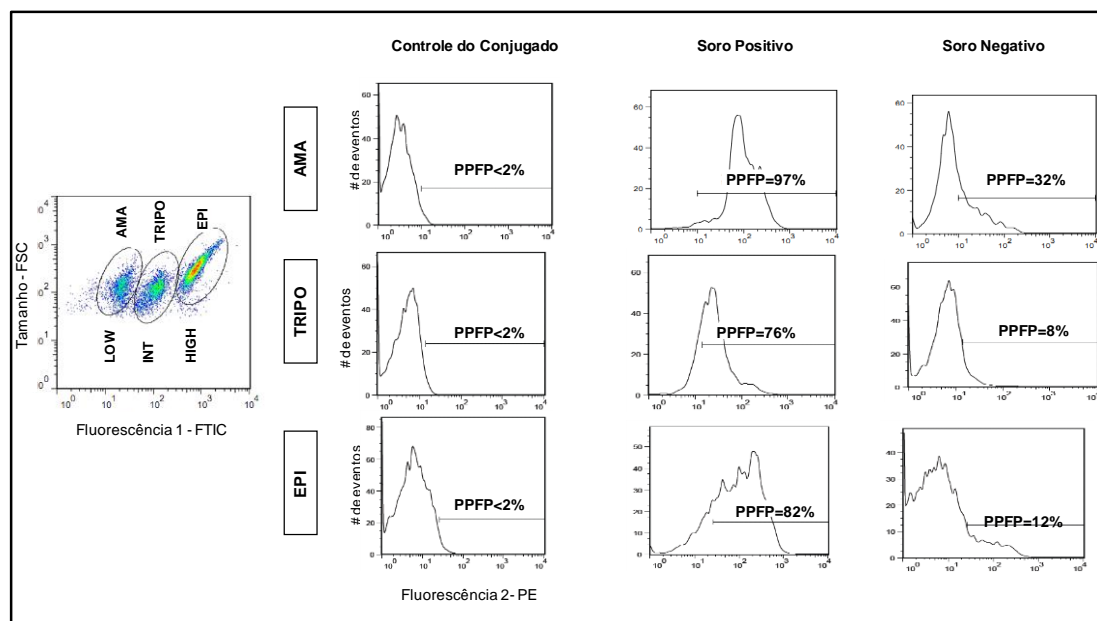


Figura 9: Representação em gráficos de fluorescência 1 (FL1) por tamanho (FSC) do perfil obtido das formas AMA + TRIPO + EPI fluorescentes. Foi realizado um “*gate*” em cada forma evolutiva do *T. cruzi* em separado, em gráficos de FL1xFSC. Representação em gráficos de histograma da reatividade do controle do conjugado e estabelecimento do limiar de positividade de 2% de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PFP) com AMA, TRIPO e EPI. Análise subsequente da reatividade dos controles positivo e negativo em PFP, com AMA, TRIPO e EPI, em gráficos de histograma.

5.2- Desenvolvimento de uma nova metodologia para análise da reatividade sorológica simultânea anti-formas evolutivas do *T. cruzi* aplicável em estudos laboratoriais da doença de Chagas

Com o objetivo de desenvolver uma nova metodologia para análise da reatividade sorológica de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI, aplicável em estudos laboratoriais da doença de Chagas, utilizou-se 31 amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR (População 1).

5.2.1- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-formas amastigotas e tripomastigotas vivas, e epimastigotas fixadas (FC-ATE-Triplex), presentes em soros individuais, nos grupos de pacientes TC e TNC.

A Figura 10 mostra a reatividade da técnica de FC-ATE-Triplex em percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), das amostras de soros de pacientes chagásicos distribuídos nos grupos TC (n=21) e TNC (n=10), com as formas amastigotas vivas (Figuras 10A e 10D), tripomastigotas vivas (Figuras 10B e 10E) e epimastigotas fixadas (Figura 10C e 10F).

Analisando os gráficos, percebemos que nas amostras de soro do grupo TC colocadas para reagir com as formas amastigotas (Figura 10A) a reatividade começou a diminuir a partir da diluição 1:1000. Todas as amostras de soro dos indivíduos do grupo TC em contato com as formas tripomastigotas (Figura 10B) e epimastigotas (Figura 10C) apresentaram uma baixa reatividade nas seis diluições do soro testadas (1:250 a 1:8000).

Todas as amostras de soros dos indivíduos do grupo TNC apresentaram uma alta reatividade nas diluições iniciais e com as três formas evolutivas do *T. cruzi*. Os soros do grupo TNC em contato com a forma amastigota (Figura 10D) apresentaram queda da reatividade a partir da diluição 1:1000 e os soros do grupo TNC em contato com as formas tripomastigotas (Figura 10E) e epimastigotas (Figura 10F) apresentaram queda da reatividade a partir da diluição 1:250.

Na busca de um novo parâmetro de interpretação dos resultados da técnica de FC-ATE-Triplex, e com o intuito de descobrir qual a diluição do soro e o ponto de corte ideais que apresentassem melhor desempenho na segregação entre os grupos de pacientes TC e TNC, foram traçadas curvas de titulação das médias de reatividade sorológica (PPFP) de cada grupo com as três formas evolutivas do *T. cruzi* (Figuras 10G, H, I).

Analisando as curvas de reatividade média dos valores de PPFP na técnica de FC-ATE-Triplex, foi possível observar diferença estatística significativa entre a reatividade sorológica dos grupos de pacientes TC e TNC, em todas as diluições do soro testadas (1:250 a 1:800) e com as três formas evolutivas do *T. cruzi* (Figuras 10G, H, I). O grupo TNC apresentou em todas as diluições, valores de reatividade média superiores ao grupo TC tanto com AMA, quanto com TRIPO e EPI. Os desenhos das curvas foram semelhantes, variando na intensidade da reatividade média, e em AMA (Figura 10G) os desvios-padrão variaram de maneira oposta ao longo da curva, sendo maiores nas diluições finais do grupo TNC e maiores nas diluições iniciais do grupo TC. A reatividade média dos soros do grupo TNC com as formas AMA (Figura 10G), em todas as diluições, foi superior à reatividade média do grupo TNC com TRIPO (Figura

10H) e com EPI (Figura 10I). A reatividade média do grupo TNC com EPI (Figura 10I) nas diluições 1:250 e 1:500 foi superior às do grupo TNC com TRIPO (Figura 10H), nessas mesmas diluições. A reatividade média do grupo TC com AMA (Figura 10G) nas diluições 1:250 e 1:500 foi superior às do grupo TC com TRIPO (Figura 10H) e com EPI (Figura 10I) nessas mesmas diluições.

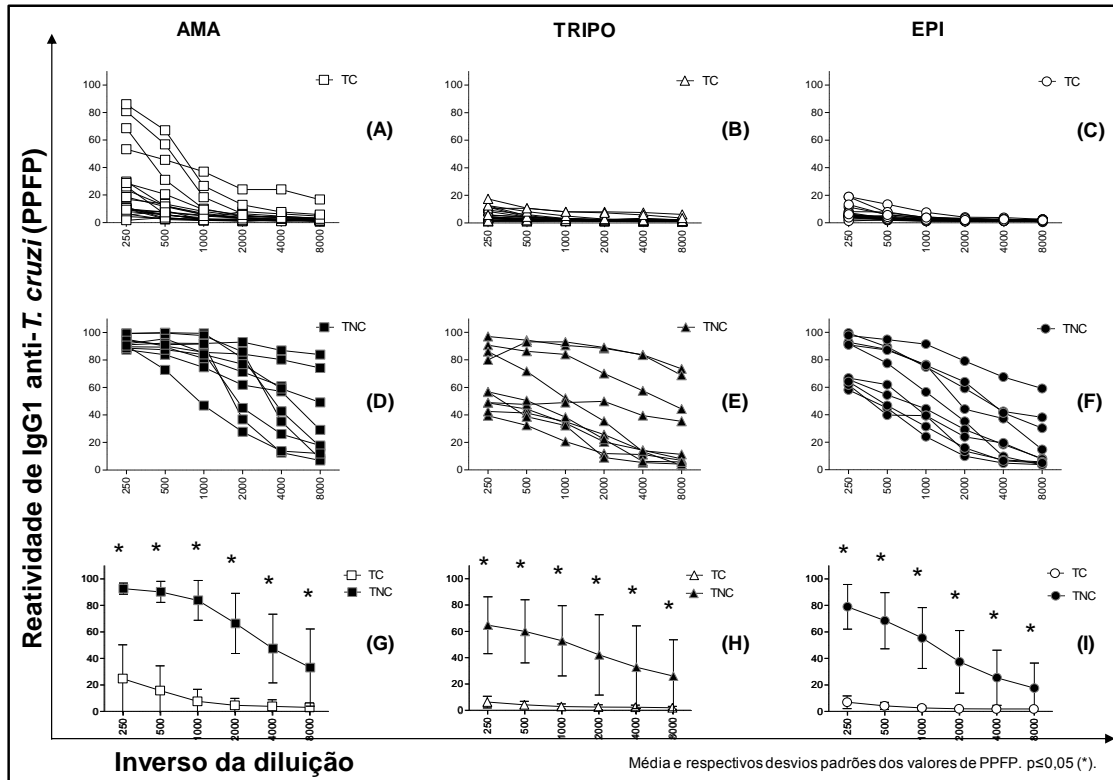


Figura 10- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* para a técnica de FC-ATE-Triplex, expresso em PPFP, presentes em soros de indivíduos chagásicos do grupo tratado curado (TC) com as formas amastigotas vivas (AMA) (A), tripomastigotas vivas (TRIPO) (B) e epimastigotas fixadas (EPI) (C), e em soros dos indivíduos chagásicos do grupo tratado não curado (TNC) com as formas amastigotas vivas (AMA) (D), tripomastigotas vivas (TRIPO) (E), e epimastigotas fixadas (EPI) (F). Curvas de titulação de reatividade média, expresso em PPFP, pela técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos chagásicos dos grupos TC e TNC, com AMA (G), TRIPO (H), e EPI (I). As amostras individuais de soros foram testadas como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PPFP e como média e respectivos desvios-padrão dos valores de PPFP. Foi possível observar diferença estatística em todas as diluições testadas, com $p \leq 0,05$ (*).

5.3-Avaliação de desempenho da FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, empregando índices expressos em porcentagem

5.3.1- Construção da Curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) para definição do ponto de corte e da diluição do soro ideais, capazes de segregar os pacientes dos grupos TC e TNC, ao realizar a técnica FC-ATE-Triplex, feita com as três formas evolutivas do *T. cruzi*.

Considerando que as curvas de reatividade média entre os grupos de pacientes TC e TNC, na técnica FC-ATE-Triplex, apresentaram diferença estatística significativa em todas as diluições do soro testadas com as formas AMA, TRIPO e EPI, utilizamos outra estratégia para selecionar a melhor diluição e o ponto de corte capazes de discriminar pacientes TC de pacientes TNC. Para tal, foram construídas curvas ROC com os valores de PFP da reatividade das amostras individuais de soros dos pacientes TC e TNC, com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, utilizando o programa estatístico “Med Calc Statistical”, conforme descrito em Materiais e Métodos.

De acordo com as curvas ROC, foi constatado um excelente desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex em todas as diluições do soro testadas (1:250 a 1:8000) e com as três formas evolutivas do *T. cruzi*. O teste apresentou uma acurácia global perfeita nas seis diluições, uma vez que os valores da área sob a curva (ASC) foram iguais a 1,0, ou bem próximos a 1,0, além de valores de sensibilidade e especificidade iguais a 100%. De acordo com a classificação sugerida por SWEETS (1988), o valor de ASC 1,0 indica uma elevada acurácia do teste. Isso significa que nessas seis diluições e nos referidos pontos de corte indicados pela curva ROC, há total discriminação pela técnica de FC-ATE-Triplex, entre os grupos de pacientes TC e TNC (Figura 11).

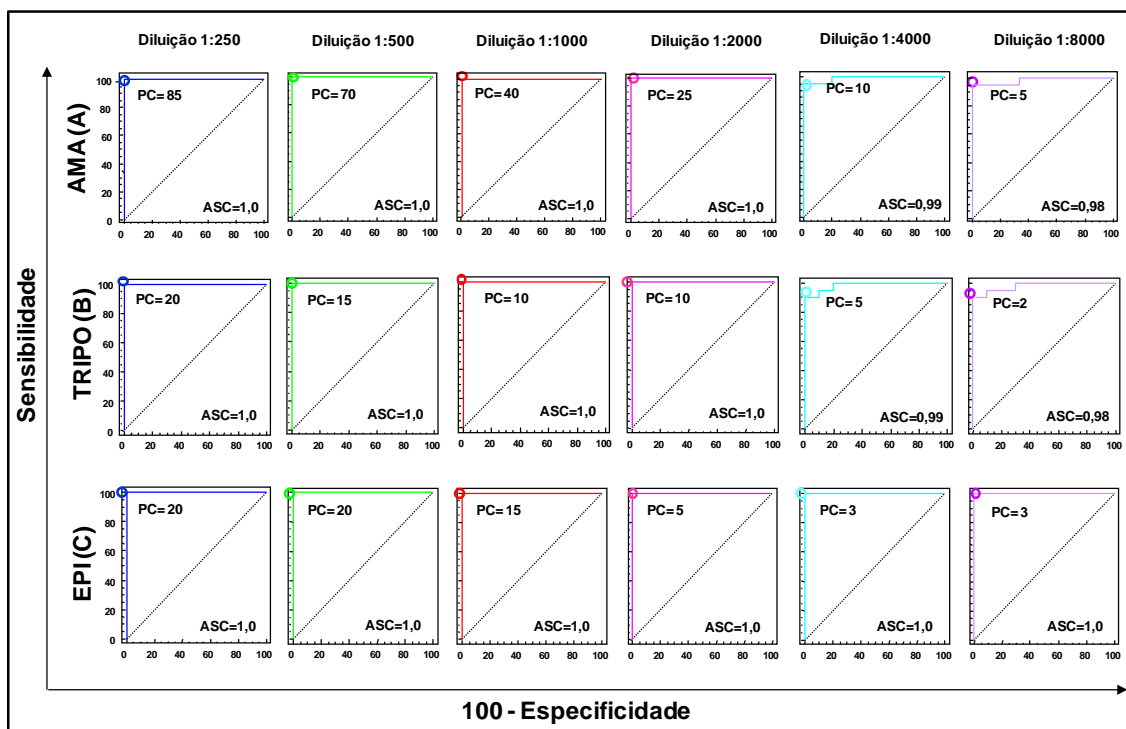


Figura 11- Curvas ROC da técnica de FC-ATE-Triplex construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e especificidade dos grupos de pacientes chagásicos TC e TNC nas diluições do soro 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000 ao reagirem com as formas AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C). Os resultados estão expressos pelos pontos do gráfico que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando a área sob a curva (ASC).

Os círculos coloridos dentro das curvas ROC indicam o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a técnica de FC-ATE-Triplex com as três formas evolutivas do *T. cruzi*.

5.3.2- Análise da diferença entre as curvas de reatividade média dos grupos de pacientes TC e TNC com AMA, TRIPO e EPI para definição da diluição ideal para sua segregação

Uma vez que, de acordo com a curva ROC, todas as diluições do soro testadas apresentaram excelente desempenho na segregação entre os grupos de pacientes TC e TNC com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, na técnica FC-ATE-Triplex, utilizamos outra estratégia para selecionar a melhor diluição a ser utilizada com as formas AMA, TRIPO e EPI. Foi verificado nas curvas de reatividade média expressas em PFPF, qual a diluição que apresentaria maior amplitude de segregação (Δ PFPF) entre os grupos de pacientes TC e TNC, quando seus soros foram colocados a reagir com as três formas evolutivas do *T. cruzi* (Figura 12).

Esta figura mostra que dentre as seis diluições utilizadas (1:250 a 1:8000), as diluições do soro 1:250, 1:500 e 1:1000 em contato com AMA (Figura 12A), TRIPO (Figura 12B) e EPI (Figura 12C) foram aquelas que melhor segregaram os grupos de pacientes TC e TNC, conforme demonstrado no retângulo pontilhado (Figura 12). No entanto, a diluição 1:1000 com AMA (Figura 12A), 1:250 com TRIPO (Figura 12B) e 1:250 com EPI (Figura 12C) foram as que apresentaram melhor desempenho na discriminação entre os grupos de pacientes TC e TNC, conforme demonstrado no círculo vermelho (Figura 12). Essas diluições apresentaram maior amplitude de distanciamento entre as curvas, com valores de Δ PFPF de 76,1% para AMA (Figura 12A), 58,4% para TRIPO (Figura 12B) e 72% para EPI (Figura 12C).

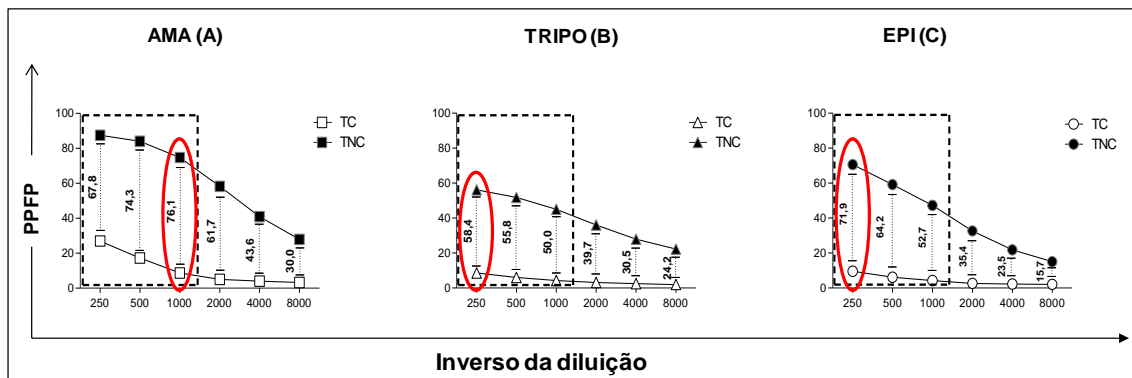


Figura 12- Curvas de titulação da reatividade média dos grupos de pacientes chagásicos TC com AMA (A), TC com TRIPO (B), TC com EPI (C), TNC com AMA (A), TNC com TRIPO (B) e TNC com EPI (C). O retângulo pontilhado indica as diluições que melhor segregaram os grupos de pacientes TC e TNC de acordo com os valores de amplitude expressos em PFPF (Δ). O círculo vermelho indica as diluições que apresentaram melhor desempenho na

discriminação entre os grupos de pacientes TC e TNC. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como média dos valores de PFP.

5.3.3- Análise do perfil de dispersão da reatividade das amostras individuais de pacientes TC e TNC, na técnica FC-ATE-Triplex, com as três formas evolutivas do *T. cruzi* para avaliar o seu desempenho na segregação entre os grupos

Uma vez que as diluições 1:250, 1:500 e 1:1000 com AMA, TRIPO e EPI foram as que melhor segregaram os grupos de pacientes TC e TNC, foi analisado o perfil de dispersão da reatividade das amostras individuais de pacientes desses dois grupos, nessas três diluições, para avaliar o seu desempenho na discriminação entre TC e TNC.

A Figura 13 mostra os gráficos de dispersão das diluições selecionadas. Todas as três diluições (1:250, 1:500 e 1:1000) apresentaram um bom desempenho na segregação entre os grupos quando foram considerados os diferentes pontos de corte sugeridos pela análise estatística da curva ROC, tanto com AMA, quanto com EPI e TRIPO. Nessas três diluições e nos respectivos pontos de corte, os valores de co-positividade e co-negatividade foram iguais a 100,00 (Figura 13). Isso significa que as três diluições, nesses respectivos pontos de corte, poderiam ser utilizados na técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas. No entanto, as diluições 1:1000 com ponto de corte 40% para AMA (Figura 13A), 1:250 com ponto de corte de 20% para TRIPO (Figura 13B) e 1:250 com ponto de corte de 20% para EPI (Figura 13C) foram as que apresentaram um menor perfil de dispersão entre os valores de reatividade em cada grupo. Foram assim determinados os critérios para a interpretação dos resultados da FC-ATE-Triplex na segregação entre os grupos de pacientes TC e TNC, a saber: AMA diluição 1:1000 e ponto de corte de 40%; TRIPO diluição 1:250 e ponto de corte de 20% e EPI diluição 1:250 e ponto de corte de 20%.

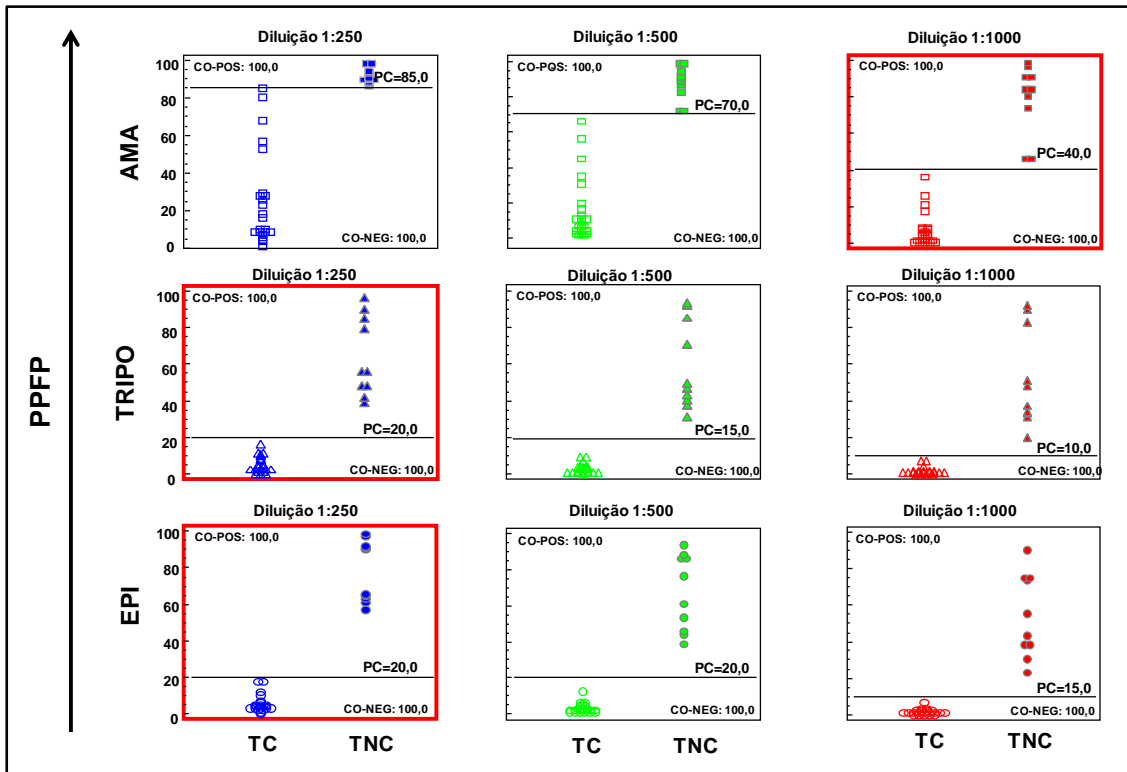


Figura 13- Análise da reatividade sorológica na técnica de FC-ATE-Triplex dos grupos de pacientes chagásicos TC e TNC nas diluições 1:250, 1:500 e 1:1000 com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C) através do perfil de dispersão individual em diferentes pontos de corte sugeridos pela curva ROC. As linhas horizontais indicam o ponto de corte sugerido pela curva ROC para cada diluição. Os retângulos vermelhos indicam as diluições e pontos de corte que apresentaram melhor desempenho na segregação entre os grupos de pacientes TC e TNC. O resultado da reatividade de IgG1 para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.

As Tabelas II, III e IV abaixo indicam os pontos de corte, a área sob a curva (ASC), a co-positividade e a co-negatividade fornecidos pela curva ROC, para cada diluição do soro reagente com as formas AMA, TRIPO e EPI, respectivamente.

Tabela II: Valores obtidos pela curva ROC da reatividade sorológica de pacientes TC e TNC com a forma AMA na técnica FC-ATE-Triplex

Diluição	Ponto de corte sugerido	ASC	Co-Positividade	Co-Negatividade
1:250	86%	1,0	100%	100%
1:500	70%	1,0	100%	100%
1:1000	40%	1,0	100%	100%
1:2000	25%	1,0	100%	100%
1:4000	8%	0,990	95,2%	100%
1:8000	6%	0,984	95,2%	100%

Tabela III: Valores obtidos pela curva ROC da reatividade sorológica de pacientes TC e TNC com a forma TRIPO na técnica FC-ATE-Triplex

Diluição	Ponto de corte sugerido	ASC	Co-Positividade	Co-Negatividade
1:250	20%	1,0	100%	100%
1:500	15%	1,0	100%	100%
1:1000	10%	1,0	100%	90,5%
1:2000	10%	1,0	100%	100%
1:4000	5%	0,99	90,5%	100%
1:8000	2%	0,98	90,5%	100%

Tabela IV: Valores obtidos pela curva ROC da reatividade sorológica de pacientes TC e TNC com a forma EPI na técnica FC-ATE-Triplex

Diluição	Ponto de corte sugerido	ASC	Co-Positividade	Co-Negatividade
1:250	20%	1,0	100%	100%
1:500	20%	1,0	100%	100%
1:1000	15%	1,0	100%	100%
1:2000	5%	1,0	100%	100%
1:4000	3%	1,0	100%	100%
1:8000	3%	1,0	100%	100%

A Figura 14 mostra a dispersão dos resultados de reatividade sorológica, expressa em PFP, dos soros dos pacientes TC e TNC, quando a técnica de FC-ATE-Triplex foi realizada na diluição 1:1000 com AMA, 1:250 com TRIPO e 1:250 com EPI.

Valores maiores que 40%, 20% e 20% de PFP, respectivamente, foram considerados positivos, enquanto valores menores que 40%, 20% e 20% de PFP, respectivamente, foram considerados negativos quando a técnica FC-ATE-Triplex foi realizada com as formas AMA, TRIPO e EPI, respectivamente.

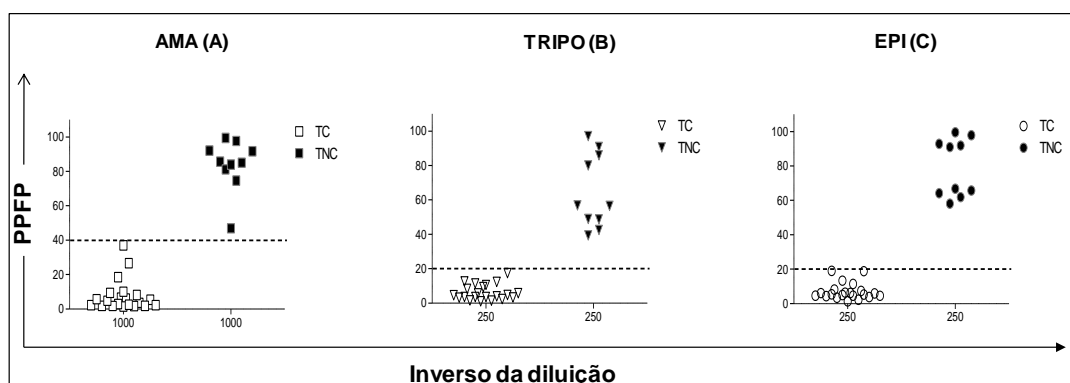


Figura 14- Análise da reatividade de IgG1, anti-AMA, TRIPO e EPI na técnica FC-ATE-Triplex, expressa em PFP, presente nos soros individuais de pacientes chagásicos dos grupos TC com a forma AMA (A), TC com a forma TRIPO (B), TC com a forma EPI (C), TNC com a forma AMA (A), TNC com a forma TRIPO (B), e TNC com a forma EPI (C), nas diluições 1:1000 com ponto de corte de 40% com AMA (A), 1:250 com ponto de corte de 20% com TRIPO (B) e 1:250 com ponto de corte de 20% com EPI (C).

5.3.4- Análise comparativa da reatividade das amostras de soro de pacientes dos grupos TC e TNC pelas técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex

Uma vez que a reatividade das amostras de soro de pacientes dos grupos TC e TNC já foram avaliadas pelas técnicas de FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002) e FC-AFEA (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011), foi estabelecida uma análise comparativa entre a reatividade de IgG anti-TRIPO vivo (FC-ALTA), IgG anti-EPI fixado (FC-AFEA) e IgG1 anti-AMA vivo, TRIPO vivo e EPI fixado (FC-ATE-Triplex), nas mesmas amostras de soros de indivíduos dos grupos TC e TNC (Figuras 15 e 16).

Para isso, foi considerada a diluição 1:256 e o ponto de corte de 20% estabelecidos para a técnica de FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995) para avaliar a reatividade de IgG anti-TRIPO, e a diluição 1:2048 e o ponto de corte de 60% estabelecidos para a técnica de FC-AFEA (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007), para avaliar a reatividade de IgG anti-EPI fixado. Já para a técnica de FC-ATE-Triplex foram consideradas as

diluições 1:1000 com ponto de corte de 40% para AMA, 1:250 com ponto de corte de 20% para TRIPO e 1:250 com ponto de corte de 20% para EPI, para avaliar a reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (Figuras 15 e 16).

Analisando os gráficos da reatividade das amostras de soro dos pacientes do grupo TC, observou-se que todas as amostras foram negativas com as três técnicas, considerando as respectivas diluições e pontos de corte estabelecidos para essas metodologias (Figura 15). Uma amostra na FC-ALTA, apresentou reatividade próximo ao ponto de corte de 20% (IR=20,2). Todas as amostras de soro na FC-ALTA, 90% das amostras em contato com AMA, e todas em contato com TRIPO e EPI na FC-ATE-Triplex apresentaram índices de reatividade abaixo de 20% (Figura 15). 57% das amostras na FC-AFEA foram baixo positivas ($20\% < \text{PPFP} \leq 60\%$) (Figura 15).

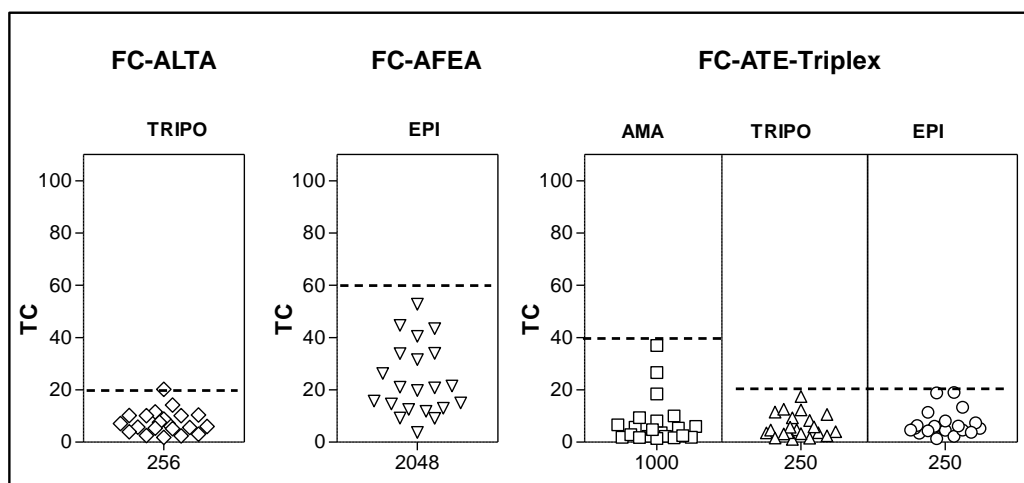


Figura 15- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TC com TRIPO na técnica de FC-ALTA, TC com EPI na técnica de FC-AFEA e TC com AMA, TC com TRIPO e TC com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20%, na técnica de FC-AFEA: 60% e na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.

Analisando os gráficos da reatividade das amostras de soro dos pacientes do grupo TNC, observou-se que todas as amostras foram positivas com as três técnicas, considerando as respectivas diluições e pontos de corte estabelecidos para essas metodologias (Figura 16). Todas as amostras de soro na FC-AFEA, 90% das amostras na FC-ALTA, 90% das amostras em contato com AMA e EPI na FC-ATE-Triplex e 40% com TRIPO na FC-ATE-Triplex, foram alto positivas ($\text{PPFP} > 60\%$) (Figura 16). Todas as amostras de soro na FC-AFEA, 90% na FC-ALTA, 80% com AMA e 50% com EPI na FC-ATE-Triplex apresentaram índices de reatividade acima de 80% (Figura 16).

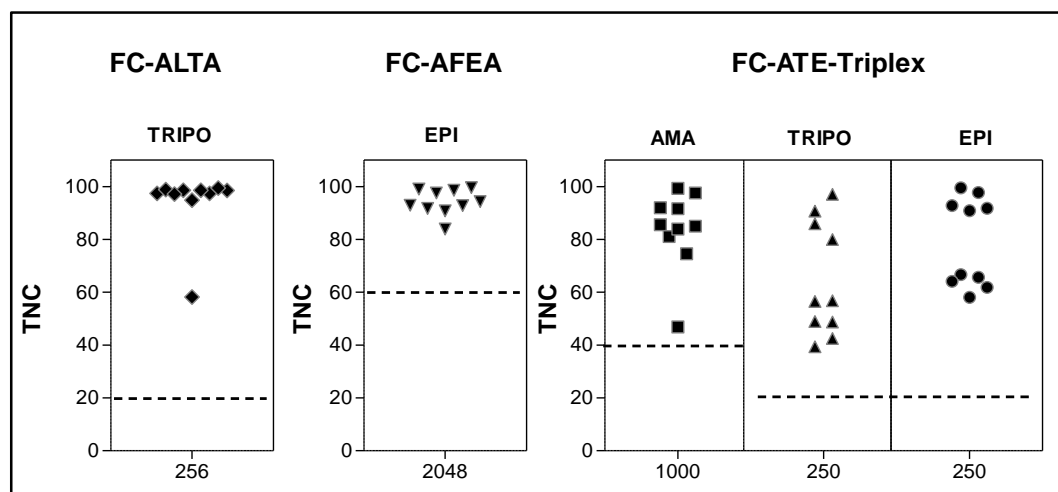


Figura 16- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TNC com TRIPO na técnica de FC-ALTA, TNC com EPI na técnica de FC-AFEA e TNC com AMA, TNC com TRIPO e TNC com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20%, na técnica de FC-AFEA: 60% e na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.

Parte II- Referente ao objetivo II

5.4- Aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico da doença de Chagas

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico da doença de Chagas, utilizou-se 22 amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR (População 1). Os 12 pacientes chagásicos não tratados (NT, n=12) são provenientes do estado de Goiás e os 10 pacientes não infectados (NI, n=10) são voluntários do Hospital Felício Rocho, conforme categorizados em Materiais e Métodos na População 1.

5.4.1- Análise da reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 anti-formas amastigotas e tripomastigotas vivas, e epimastigotas fixadas (FC-ATE-Triplex) presentes em soros individuais dos grupos de pacientes NT e NI

A Figura 17 mostra a reatividade expressa em PFP, das amostras de soros de pacientes chagásicos não tratados (NT, n=12) e de pacientes não infectados (NI, n=10), com as formas amastigotas vivas (Figuras 17A e 17D), tripomastigotas vivas (Figuras 17B e 17E) e epimastigotas fixadas (Figuras 17C e 17F), na técnica FC-ATE-Triplex.

Analisando os gráficos citados, e considerando as respectivas diluições e pontos de corte estabelecidos pela análise de desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex, percebemos que todas as amostras de soros de indivíduos do grupo NT apresentaram valores de reatividade positivos com as formas AMA (Figura 17A), TRIPO (Figura 17B) e EPI (Figura 17C). A reatividade das amostras de soro de pacientes NT com AMA (Figura 17A) foi maior do que com TRIPO (Figura 17B) e com EPI (Figura 17C), uma vez que a queda na reatividade ocorreu somente a partir da diluição 1:1000.

Em contraste, as amostras de soro de pacientes do grupo NI foram negativas com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, considerando a diluição 1:1000 e PFP de 40% para AMA (Figura 17D), 1:250 e PFP de 20% para TRIPO (Figura 17E) e 1:250 e PFP de 20% para EPI (Figura 17F). A reatividade do soro de alguns pacientes NI com AMA apresentou uma queda somente a partir da diluição 1:1000 (Figura 17D), já com TRIPO (Figura 17E) e com EPI (Figura 17F) ela manteve-se baixa nas 6 diluições testadas (1:250 a 1:8000).

A técnica de FC-ATE-Triplex mostrou assim, um bom desempenho no diagnóstico da doença de Chagas, uma vez que foi capaz de segregar os grupos de pacientes chagásicos não tratados (NT), do grupo de pacientes não infectados (NI).

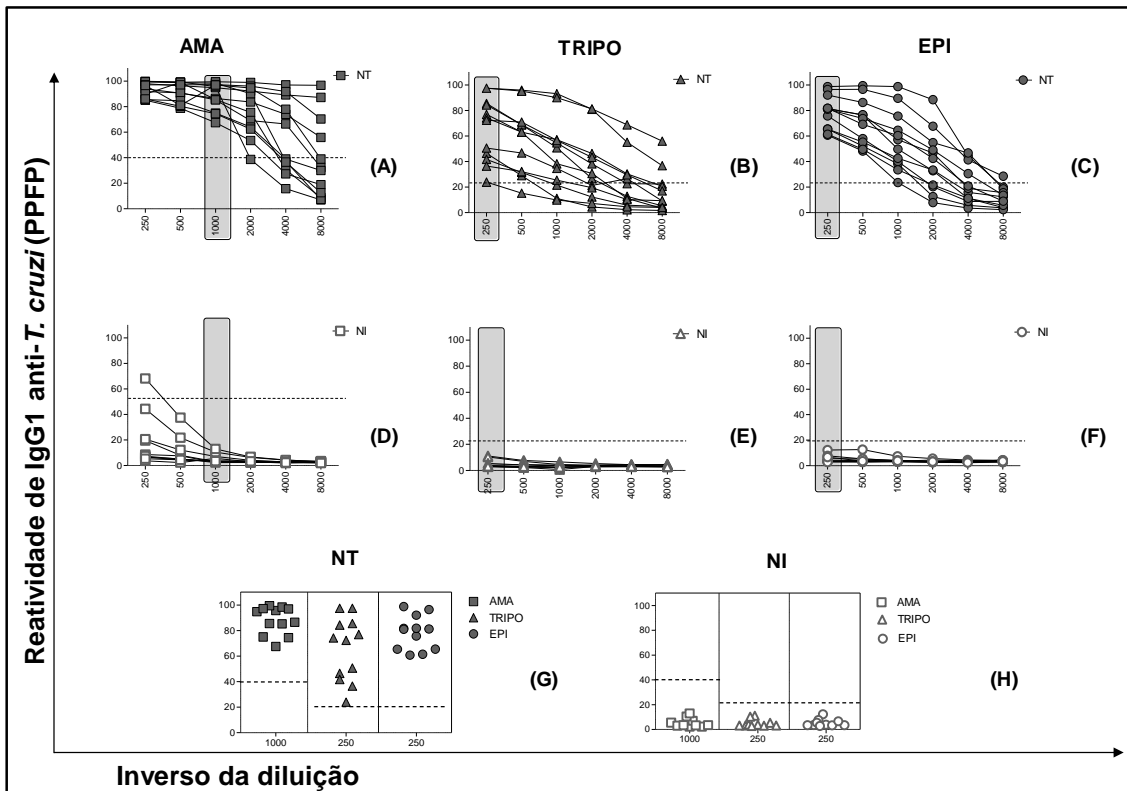


Figura 17- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos chagásicos do grupo não tratado (NT) com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C), e em soros de indivíduos do grupo não infectado (NI) com AMA (D), TRIPO (E) e EPI (F). Gráficos de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico NT (G) e do grupo NI (H) com AMA, TRIPO e

EPI. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex; 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os retângulos cinzas indicam as respectivas diluições padronizadas na técnica de FC-ATE-Triplex, 1:1000 para AMA, 1:250 para TRIPO e 1:250 para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PFP.

5.4.2- Análise comparativa da reatividade das amostras de soro de pacientes do grupo NT pelas técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex

Tendo em vista que a reatividade das amostras de soro de pacientes do grupo NT também já foi avaliada pelas técnicas de FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002) e FC-AFEA (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011), novamente foi estabelecida uma análise comparativa entre a reatividade de IgG anti-TRIPO vivo (FC-ALTA), IgG anti-EPI fixado (FC-AFEA) e IgG1 anti-AMA vivo, TRIPO vivo e EPI fixado (FC-ATE-Triplex), nas mesmas amostras de soros de indivíduos do grupo NT (Figura 18).

Também foram consideradas as mesmas diluições e pontos de corte estabelecidos para a técnica de FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995), FC-AFEA (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007) e FC-ATE-Triplex (Figura 18).

Analisando os gráficos da reatividade das amostras de soro dos pacientes do grupo NT, observou-se que todas as amostras foram positivas com as três técnicas. Todas as amostras de soro na FC-ALTA, FC-AFEA e em contato com AMA e EPI na FC-ATE-Triplex apresentaram índices de reatividade alto positivos, ou seja, acima de 60% (Figura 18). Já com TRIPO na FC-ATE-Triplex, 58% das amostras foram alto positivas (Figura 18). Todas as amostras de soros na FC-ALTA, FC-AFEA e 75% das amostras em contato com AMA na FC-ATE-Triplex, apresentaram índices de reatividade acima de 80% (Figura 18).

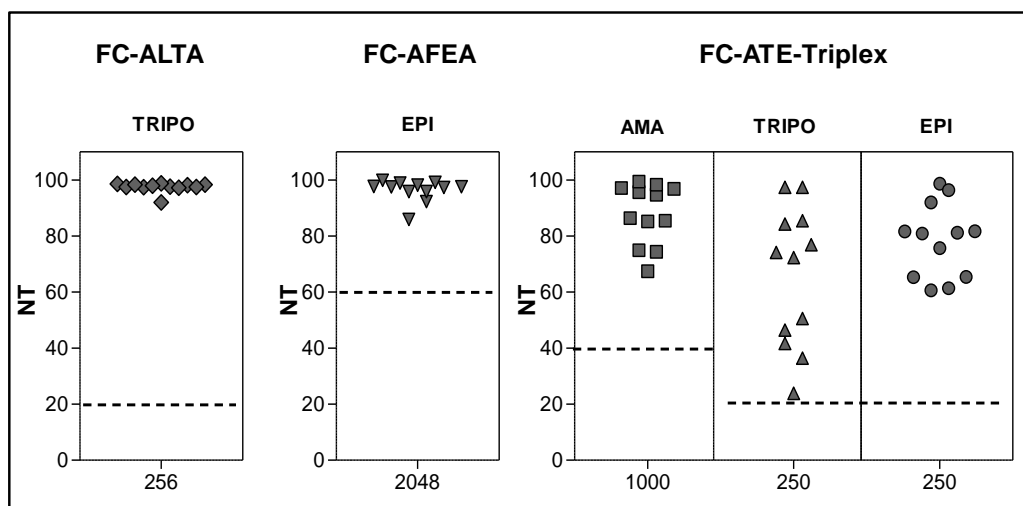


Figura 18- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico NT com TRIPO na técnica de FC-ALTA, NT com EPI na técnica de FC-AFEA e NT com AMA, NT com TRIPO e NT com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20%, na técnica de FC-AFEA: 60% e na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.

5.5- Aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das Leishmanioses

Com o objetivo de avaliar o desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das Leishmanioses, utilizou-se 30 amostras de soros de pacientes não chagásicos, sendo 10 de indivíduos com leishmaniose visceral e 20 de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana (População 3). As amostras de pacientes com leishmaniose visceral são provenientes da soroteca do LBDM/CPqRR e as amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana da soroteca do Laboratório de Leishmaniose/CPqRR. Os pacientes com LV (n=10) são oriundos da cidade de Montes Claros/MG e os com LTA residem na cidade de Belo Horizonte/MG (n=10) ou na aldeia de Xacriabá/MG (n=10), e todos foram diagnosticados por exames sorológicos e/ou parasitológicos.

5.5.1- Análise da reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (FC-ATE-Triplex) em soros individuais de pacientes com LV e LTA.

A Figura 19 mostra a reatividade expressa em PPFP de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI em soros de pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana com as formas amastigotas vivas (Figuras 19A e 19D), tripomastigotas vivas (Figuras 19B e 19E) e epimastigotas fixadas (Figura 19C e 19E).

Após a padronização e análise de desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex, foi considerado para AMA a diluição 1:1000 e o ponto de corte de 40% de PFP, para TRIPO a diluição 1:250 e o ponto de corte de 20% de PFP e para EPI a diluição 1:250 e o ponto de corte de 20% de PFP.

Analisando os gráficos, observou-se que dentre as amostras de soro de pacientes com LV (n=10), uma amostra (10%) foi positiva com AMA (Figura 19A), uma amostra (10%) foi positiva com TRIPO (Figura 19B) e duas amostras foram positivas (20%) com EPI (Figura 19C), representando assim os resultados falso-positivos. A mesma amostra do paciente com LV foi reativa com AMA, TRIPO e EPI. As amostras de soros de indivíduos com LV que foram positivas com TRIPO (Figura 19B) e com EPI (Figura 19C) apresentaram um perfil de reatividade próximo ao ponto de corte de 20% de PFP.

Mesmo havendo um pequeno percentual de resultados falso-positivos, os resultados confirmam um desempenho satisfatório da técnica de FC-ATE-Triplex na discriminação de pacientes não chagásicos portadores de LV. Além da maioria dos pacientes apresentarem resultados negativos (90% com AMA, 90% com TRIPO e 80% com EPI), esse pequeno percentual de resultados falso-positivos pode ser explicado devido ao compartilhamento antigênico e concomitantemente a reatividade cruzada existente entre os tripanosomatídeos.

Dentre as amostras de soros de pacientes com LTA (n=20), 4 amostras (20%) foram positivas com AMA (Figura 19D), 6 amostras (30%) foram positivas com TRIPO (Figura 19E) e 10 amostras (50%) foram positivas com EPI (Figura 19F), representando assim resultados falso-positivos. As amostras de soros dos 4 pacientes que foram reativos com AMA, também foram reativas com TRIPO e com EPI. Além das 4 amostras de soro que foram reativas em comum com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, as outras duas amostras que foram positivas com TRIPO também o foram com EPI. Uma das amostras de soro que foi positiva apenas com EPI apresentou um perfil de reatividade próximo ao ponto de corte de 20% (PFP=22,05). Os resultados dos pacientes com LTA também demonstram um bom desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex na discriminação entre pacientes chagásicos e pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, principalmente com as formas amastigotas vivas.

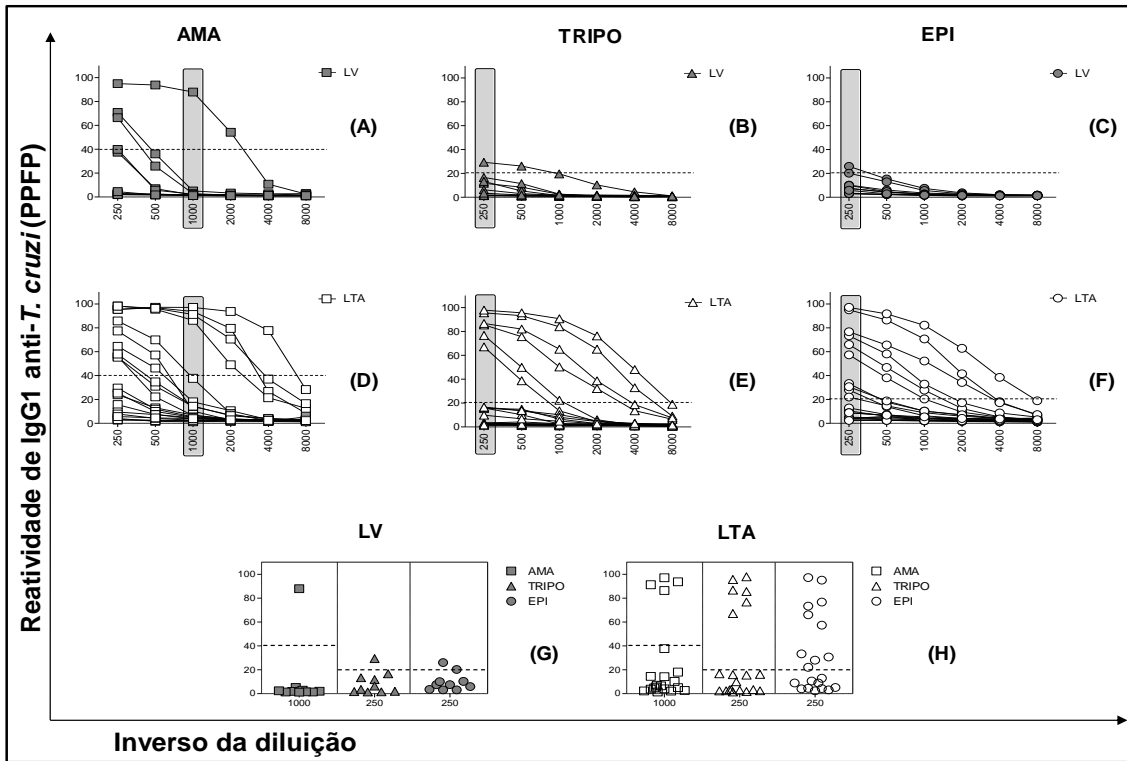


Figura 19- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos com leishmaniose visceral (LV) com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C), e em soros de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana (LTA) com AMA (D), TRIPO (E) e EPI (F). Gráficos de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos com LV (G) e com LTA (H) com AMA, TRIPO e EPI. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os retângulos cinzas indicam as respectivas diluições padronizadas na técnica de FC-ATE-Triplex: 1:1000 para AMA, 1:250 para TRIPO e 1:250 para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PPFP

Parte III- Referente ao objetivo III

5.6- Aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, utilizando amostras de soros de pacientes tratados em avaliação.

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, utilizou-se 28 amostras de conveniência da soroteca do LBDM/CPqRR (População 1). Esses 28 pacientes chagásicos são provenientes do estado de Goiás e foram classificados como tratados em avaliação (TEA, n=28), uma vez que apresentam sorologia convencional positiva ou oscilante e xenodiagnóstico negativo, conforme categorizados em Materiais e Métodos na População 1.

5.6.1- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-formas amastigotas e tripomastigotas vivas, e epimastigotas fixadas (FC-ATE-Triplex) presentes em soros individuais do grupo de pacientes TEA.

Analisando os gráficos, e considerando as diluições e pontos de corte estabelecidos para técnica de FC-ATE-Triplex, diluição 1:1000 e PFP de 40% para AMA, diluição 1:250 e PFP de 20% para TRIPO e diluição 1:250 e PFP de 20% para EPI, observou-se que: com AMA, 13 amostras de soro de pacientes TEA foram positivas (46,4%) (Figura 20A) e 15 amostras foram negativas (53,6%) (Figura 20A); com TRIPO 17 amostras de soro de pacientes TEA foram positivas (60,7%) (Figura 20B) e 11 amostras foram negativas (39,3%) (Figura 20B); e com EPI 20 amostras de soro de pacientes TEA foram positivas (71,4%) (Figura 20C) e 8 amostras negativas (28,6%) (Figura 20C).

Considerando as 15 amostras de soros de pacientes TEA que foram negativas com AMA (Figura 20A), 7 amostras também foram negativas com TRIPO e EPI (Figuras 20B e 20C), 2 amostras também foram negativas com TRIPO (Figura 20B), 1 amostra também foi negativa com EPI (Figura 20C) e 5 foram negativas apenas com AMA (Figura 20A). Duas amostras de pacientes TEA foram negativas apenas com TRIPO (Figura 20B).

Os resultados da técnica de FC-ATE-Triplex, sugerem que as 7 amostras de soro de pacientes que foram negativos com AMA, TRIPO e EPI podem estar em processo de cura, por não serem reativas com as três formas evolutivas do *T. cruzi* e também por apresentarem resultados de xenodiagnóstico negativos. A não reatividade com as formas amastigotas pode ser indicadora de cura parasitológica precoce na doença de Chagas, uma vez que um maior percentual de amostras de pacientes do grupo TEA foram negativas (53,6%) com AMA, em relação ao observado com TRIPO (39,3%) e EPI (28,6%).

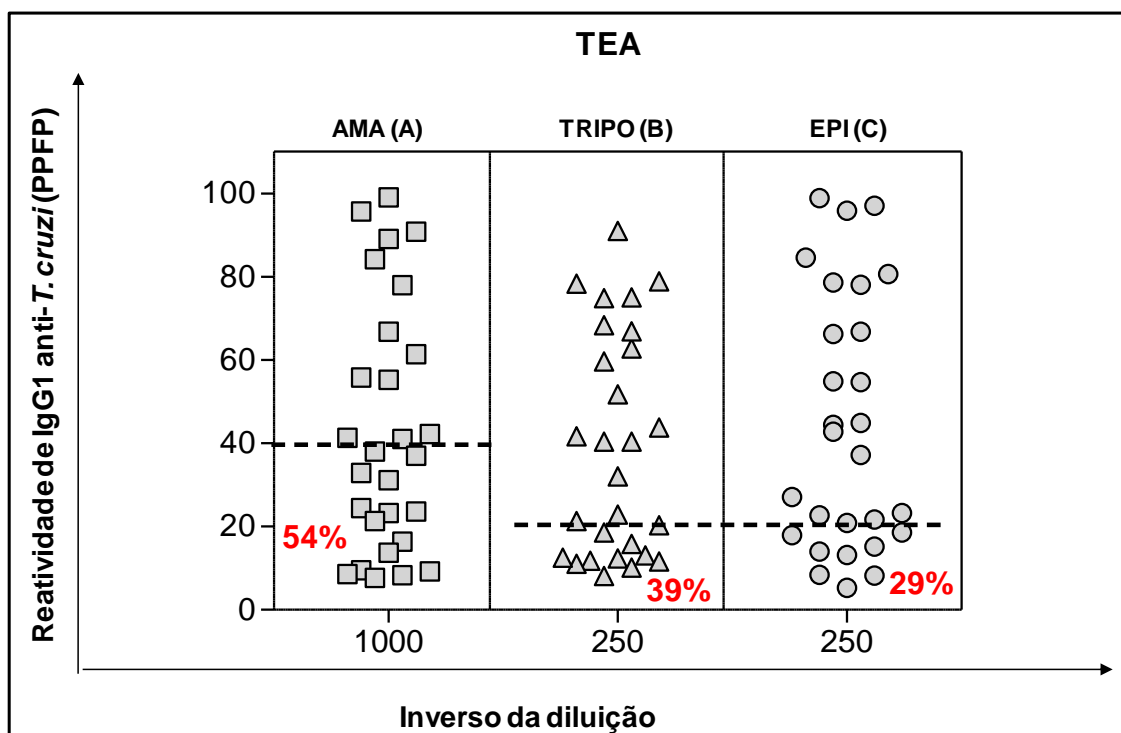


Figura 20- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de pacientes do grupo chagásico tratado em avaliação (TEA) com as formas amastigotas vivas (A), tripomastigotas vivas (B) e epimastigotas fixadas (C). As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PPFP.

5.6.2- Análise comparativa da reatividade das amostras de soro de pacientes do grupo TEA pelas técnicas de FC-ALTA e FC-ATE-Triplex

Tendo em vista que a reatividade das amostras de soro de pacientes do grupo TEA já foi avaliada pela técnica de FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002), novamente foi estabelecida uma análise comparativa entre a reatividade de IgG anti-TRIPO vivo (FC-ALTA) e a reatividade de IgG1 anti-AMA vivo, TRIPO vivo e EPI fixado (FC-ATE-Triplex) nas mesmas amostras de soro de indivíduos do grupo TEA (Figura 21).

Para isso, foi considerada a diluição 1:256 e o ponto de corte de 20% estabelecidos para a técnica de FC-ALTA para avaliar a reatividade de IgG anti-TRIPO, e as diluições 1:1000 com ponto de corte de 40% para AMA, 1:250 com ponto de corte de 20% para TRIPO e 1:250 com ponto de corte de 20% para EPI, estabelecidos na técnica de FC-ATE-Triplex, para avaliar a reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (Figura 21).

Das 28 amostras de soro de pacientes TEA, 21 (75%) foram positivas (reatividade acima do ponto de corte de 20%) e 7 (25%) foram negativas (reatividade abaixo do

ponto de corte de 20%) pela técnica de FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002) (Figura 21).

Comparando a reatividade das amostras do grupo TEA pela técnica de FC-ALTA, com a reatividade pela técnica de FC-ATE-Triplex, observou-se que das 7 amostras que foram negativas na técnica de FC-ALTA, 6 foram também negativas com AMA, 5 com TRIPO e 3 com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. Três amostras foram negativas em comum na técnica de FC-ALTA e com AMA, TRIPO e EPI na técnica de FC-ATE-Triplex e 4 foram negativas em comum na técnica de FC-ALTA e com AMA e TRIPO na técnica de FC-ATE-Triplex.

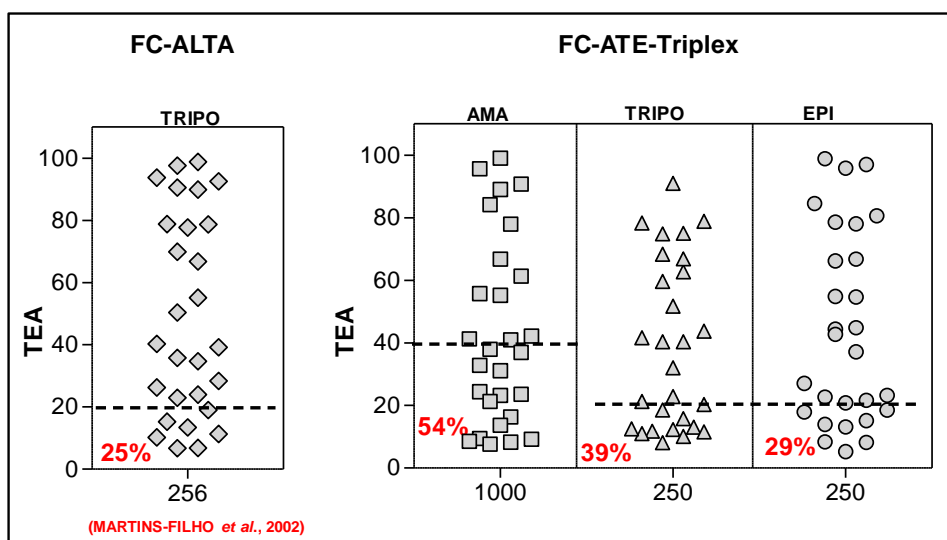


Figura 21- Gráfico de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TEA com TRIPO na técnica de FC-ALTA, TEA com AMA, TEA com TRIPO e TEA com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ALTA: 20% e na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI.

5.7- Avaliação da aplicabilidade da FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas em novas amostragens populacionais

Com o objetivo de consolidar o desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, foram utilizadas 47 amostras de soros de pacientes chagásicos crônicos tratados provenientes da soroteca do Laboratório de Doença de Chagas/NUPEB/UFOP (População 2) e 3 amostras de pacientes chagásicos tratados do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (População 2).

Os 47 pacientes chagásicos crônicos residem no município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, anteriormente tratados com Benzonidazol a mais de 10 anos, e

classificados em Tratados Curados (TC, n=7), Tratados Não Curados (TNC, n=16) e Tratados Em Avaliação (TEA, n=24), conforme categorizados em Materiais e Métodos (População 2). Os três pacientes chagásicos tratados são voluntários de demanda espontânea atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas, do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais e foram classificados como Tratados Não Curados (TNC, n=3), conforme categorizados em Materiais e Métodos (População 2).

5.7.1- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (FC-ATE-Triplex) presentes em soros individuais, nos grupos de pacientes TC e TNC em novas amostragens populacionais.

A Figura 22 mostra a reatividade da técnica de FC-ATE-Triplex, expressa em PFP, dos pacientes chagásicos distribuídos nos grupos de pacientes TC (n=7) e TNC (n=19) com as formas amastigotas vivas (Figuras 22A e 22D), tripomastigotas vivas (Figuras 22B e 22E) e epimastigotas fixadas (Figura 22C e 22F). Foram consideradas para as formas AMA a diluição 1:1000 e o ponto de corte de 40% de PFP, para as formas TRIPO a diluição 1:250 e o ponto de corte de 20% de PFP e para as formas EPI a diluição 1:250 e o ponto de corte de 20% de PFP.

Analisando os gráficos, observou-se que todos os soros dos pacientes do grupo TC com AMA (Figura 22A) foram negativos, 5/7 soros de pacientes do grupo TC com TRIPO (Figura 22B) foram negativos e 6/7 soros de pacientes do grupo TC com EPI (Figura 22C) foram negativos, considerando as respectivas diluições e pontos de corte. Podemos observar discordância de resultados de 2/7 (29%) soros de pacientes do grupo TC com TRIPO (Figura 22B) que apresentaram alta reatividade e de 1/7 (14%) soro de paciente do grupo TC com EPI (Figura 22C), que apresentou uma reatividade próxima ao ponto de corte. A mesma amostra de soro do paciente do grupo TC foi positiva com TRIPO e com EPI.

Todos os soros de pacientes do grupo TNC (n=19) com AMA (Figura 19D), TRIPO (Figura 22E) e EPI (Figura 22F) foram positivos, considerando as respectivas diluições e pontos de corte.

Os resultados novamente confirmam a excelente performance da técnica de FC-ATE-Triplex para a monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, com todos os soros dos pacientes do grupo TNC sendo positivos

com as três formas evolutivas do *T. cruzi* e com todos os do grupo TC sendo negativos, exceto um paciente com EPI e dois com TRIPO.

As formas amastigotas além de serem mais reativas, foram capazes de discriminar totalmente os soros dos pacientes TC e TNC, demonstrando serem boas fontes antigênicas no controle da cura parasitológica da doença de Chagas.

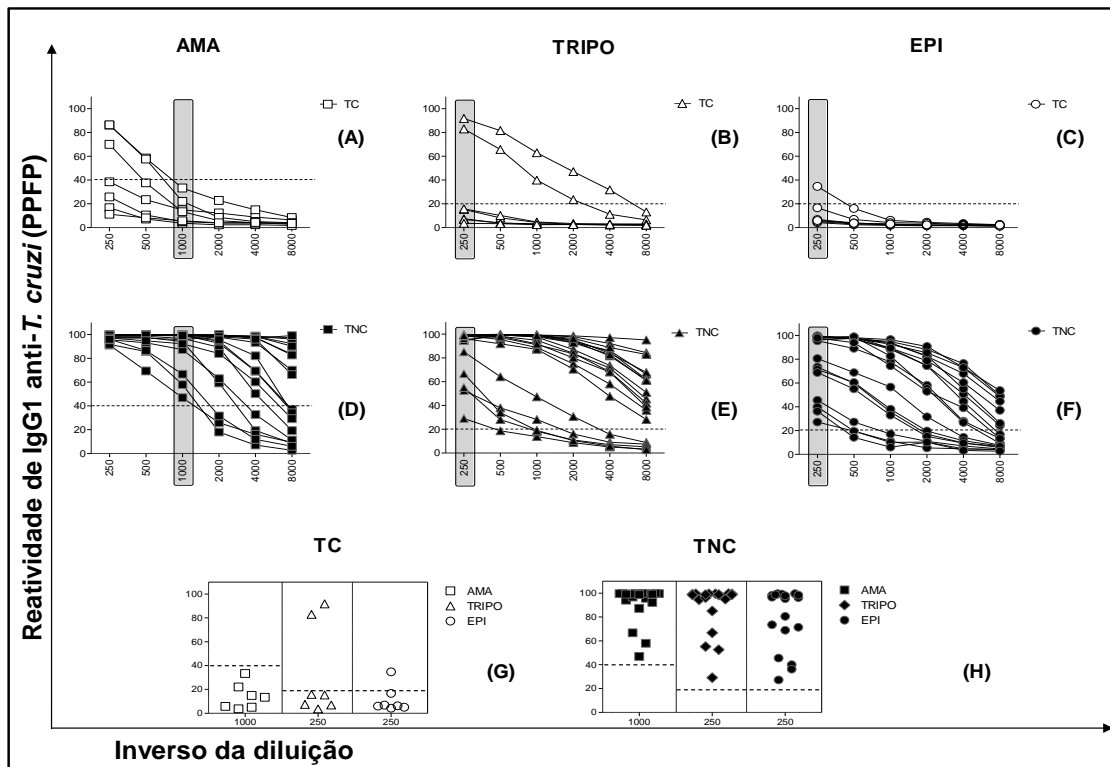


Figura 22- Curvas de titulação da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na técnica de FC-ATE-Triplex, presentes em soros de indivíduos chagásicos do grupo tratado curado (TC) com AMA (A), TRIPO (B) e EPI (C), e em soros de indivíduos do grupo tratado não curado (TNC) com AMA (D), TRIPO (E) e EPI (F). Gráficos de dispersão da reatividade individual das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico TC (G) e do grupo TNC (H) com AMA, TRIPO e EPI. As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. Os retângulos cinzas indicam as respectivas diluições padronizadas na técnica de FC-ATE-Triplex: 1:1000 para AMA, 1:250 para TRIPO e 1:250 para EPI. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PPFP.

5.7.2- Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI (FC-ATE-Triplex) presentes em soros individuais, nos grupos de pacientes TEA em uma nova amostragem populacional.

Para consolidar o desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, avaliou-se a reatividade de 24 amostras de soro de pacientes do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG classificados como Tratados em Avaliação (TEA, n=24) (População 2), uma vez que apresentam sorologia convencional positiva ou oscilante e hemocultura negativa. Foram

consideradas as diluições e pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex para cada forma evolutiva do *T. cruzi*: 1:1000 e PFP de 40% para AMA, 1:250 e PFP de 20% para TRIPO e 1:250 e PFP de 20% para EPI.

Analisando os gráficos, observou-se que das 24 amostras de soros de pacientes TEA, 7 (29,2%) foram negativas com AMA (Figura 23A), 1 (4,2%) foi negativa com TRIPO (Figura 23B) e 7 (29,2%) foram negativas com EPI (Figura 23C). Duas amostras de soro de pacientes TEA apresentaram índices de reatividade próximos ao ponto de corte (IR=40,30 e IR=40,70) com AMA (Figura 23A). A amostra de soro do paciente que foi negativa com TRIPO também foi negativa com AMA e EPI. Das 7 amostras de soros de pacientes que foram negativos com AMA e EPI, três foram em comum.

Mais uma vez os dados reforçam que, de acordo com o critério estabelecido por KRETTLI *et al.* (1982), KRETTLI *et al.* (1984), GALVÃO *et al.* (1993), MARTINS-FILHO *et al.* (2002) as amostras de soros de pacientes TEA que apresentaram resultados negativos com AMA, TRIPO e EPI podem ser classificadas como dissociadas, e esses indivíduos podem estar em processo de cura parasitológica, uma vez que apresentam resultados negativos na técnica de FC-ATE-Triplex e na hemocultura, apesar da sorologia convencional positiva ou oscilante.

Ainda, os resultados demonstram que as formas amastigotas podem ser boas indicadoras da cura parasitológica precoce na doença de Chagas, uma vez que 7 amostras de soro de pacientes do grupo TEA apresentaram resultados negativos e 2 amostras apresentaram valores de reatividade próximos ao ponto de corte estabelecido. Novamente a técnica de FC-ATE-Triplex, mesmo quando testada em uma nova amostragem populacional, demonstrou um bom desempenho na monitoração da cura parasitológica precoce na doença de Chagas.

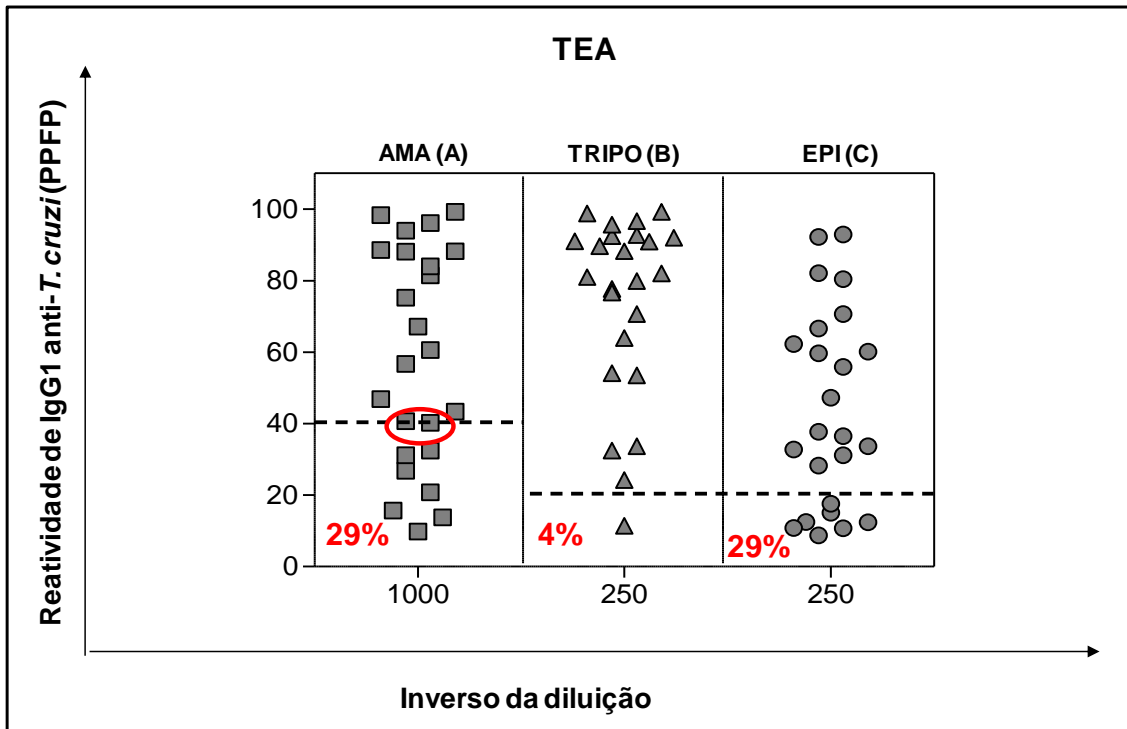


Figura 23- Gráfico de dispersão da reatividade das amostras de soros de indivíduos do grupo chagásico tratado em avaliação (TEA) com as formas amastigotas vivas (A), tripomastigotas vivas (B) e epimastigotas fixadas (C). As linhas pontilhadas indicam os respectivos pontos de corte padronizados na técnica de FC-ATE-Triplex: 40% para AMA, 20% para TRIPO e 20% para EPI. O círculo vermelha indica os pacientes que tiveram índices de reatividade em AMA próximos ao ponto de corte de 40%. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos em PPFP.

6 - DISCUSSÃO

Um dos maiores desafios em relação à avaliação da eficácia do tratamento na DCh é a falta de métodos laboratoriais disponíveis para detectar a cura parasitológica. A falta de métodos confiáveis tem comprometido a constatação de eventuais melhorias no resultado do tratamento, particularmente na fase crônica da DCh (COURA e CASTRO, 2002). As diferentes técnicas que são utilizadas, tanto para o diagnóstico, quanto para a monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença, apresentam diversas limitações metodológicas e índices de sensibilidade e especificidade variáveis (PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003; GOMES *et al.*, 2009; GUEDES *et al.*, 2011). Sendo assim, para avaliação da resposta ao tratamento etiológico, de pacientes tratados na fase crônica da DCh, são utilizados em geral os testes parasitológicos (xenodiagnóstico, hemocultura) (CHIARI *et al.*, 1989; BRONFEN e ALVARENGA, 1991; SCHENONE *et al.*, 2000; PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003; GOMES *et al.*, 2009), moleculares (PCR) (WINCKER *et al.*, 1994; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1998; GALVÃO *et al.*, 2003; BRITTO, 2009; MURCIA *et al.*, 2010), sorológicos convencionais (ELISA, HAI e IFI) (LUQUETTI, 1997; CANÇADO, 1999; CANÇADO, 2002; COURA e CASTRO, 2002) e sorológicos não convencionais (lise mediada pelo complemento-LMC^o e pesquisa de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas-FC-ALTA e anti-formas epimastigotas fixados pela citometria de fluxo-FC-AFEA) (KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI e BRENER, 1982; GALVÃO *et al.*, 1993; MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011).

Os métodos parasitológicos são baseados na detecção direta do parasito. Esses métodos apresentam um valor fundamental quando positivos, pois indicam incontestavelmente a presença da infecção pelo *T. cruzi* ou falha terapêutica dos pacientes chagásicos tratados. No entanto, apresentam baixa sensibilidade e são muito trabalhosos, além de resultados tardios, e alguns indivíduos podem apresentar reações alérgicas aos triatomíneos (MOTT *et al.*, 1980; CHIARI *et al.*, 1989; PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é outro método que vem sendo muito utilizado na avaliação pós-tratamento etiológico e apresenta bons resultados, maior sensibilidade e especificidade (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; BRITTO, 1999; GOMES *et al.*, 1998; CASTRO, 2002; BRITTO, 2009). As principais limitações desta metodologia são o fato de que resultados negativos encontrados na PCR não confirmam a cura parasitológica devido à intermitência da parasitemia com conseqüente ocorrência de

resultados falso negativos, além do alto custo operacional, e a discordância de resultados com exames sorológicos e mesmo parasitológicos (GOMES *et al.*, 1998; BRITTO, 1999; CASTRO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2008; MYAMOTO *et al.*, 2008; RAMIRÉZ *et al.*, 2009).

Os testes sorológicos podem ser agrupados em convencionais e não convencionais. Os sorológicos convencionais mais utilizados no controle da cura parasitológica e diagnóstico da DCh são “*enzyme-linked immunosorbent assay*” (ELISA), hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI). Estas metodologias apresentam uma alta sensibilidade e especificidade, são rápidas, baratas e de fácil utilização (CANÇADO, 1999; GOMES *et al.*, 2009). LUQUETTI (1997), CANÇADO (2002), COURA e CASTRO (2002), WHO (2002) e o CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DOENÇA EM CHAGAS (2005), recomendam a utilização a utilização de dois testes sorológicos convencionais de princípios distintos para o diagnóstico da doença de Chagas. No entanto, estes testes permanecem positivos durante muitos anos pós-tratamento etiológico, sendo necessário longo período de acompanhamento para a verificação da cura parasitológica (VIOTTI *et al.*, 1994; CANÇADO, 2002; COURA e CASTRO, 2002; MACHADO-DE-ASSIS *et al.*, 2012), particularmente quando o tratamento foi instituído na fase crônica da infecção. Outra desvantagem desses testes é a constante reatividade cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae (CARVALHO *et al.*, 1993; VEXENAT *et al.*, 1996; AMATO NETO *et al.*, 2005).

A lise mediada pelo complemento (LMC^o) é um teste sorológico não convencional, também utilizado no controle da cura parasitológica da DCh e se baseia na detecção de anticorpos líticos, os anticorpos que se ligam à glicoproteínas na membrana das formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi* (KRETTLI, 1979; KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI e BRENER, 1982). A presença desses anticorpos no soro de pacientes é um indicador de infecção ativa (KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI e BRENER, 1982; KRETTLI *et al.*, 1984). Diversos trabalhos têm demonstrado que o teste de LMC^o pode negativar antes da sorologia convencional em alguns pacientes chagásicos crônicos tratados, em concordância com os resultados negativos dos testes parasitológicos, sucessivamente repetidos em paralelo (KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI *et al.*, 1984; GALVÃO *et al.*, 1993, NORRIS *et al.*, 1994). A LMC^o apresenta como limitação a utilização das formas tripomastigotas infectantes, além de uma leitura ao microscópio óptico cansativa, que leva ao erro de interpretação.

A citometria de fluxo vem sendo cada vez mais utilizada na investigação dos anticorpos que se ligam a membrana das formas tripomastigotas vivas e epimastigotas fixadas, apresentando um bom desempenho tanto no diagnóstico, quanto no controle da cura parasitológica da DCh, através das técnicas de FC-ALTA e FC-AFEA (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; CORDEIRO *et al.*, 2001; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011). Estes resultados foram concordantes com a queda ou negatificação da sorologia convencional e com os resultados dos testes parasitológicos, tanto em humanos (WENDLING *et al.*, 2011) como em modelos murino e canino (SHADOMY *et al.*, 2004; GUEDES *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2008). Essas técnicas vêm sofrendo cada vez mais modificações metodológicas no intuito de aumentar a sua praticidade, sensibilidade e especificidade (MATOS *et al.*, 2011).

Baseado nesse contexto, e buscando uma preparação antigênica ideal para um melhor desempenho dos testes sorológicos no diagnóstico e controle da cura parasitológica da doença de Chagas, foi desenvolvida neste trabalho uma nova técnica baseada na pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas evolutivas do *T. cruzi* (AMA + TRIPO + EPI) por citometria de fluxo, empregando um modelo de segregação fluorescente diferencial (FL1-FITC) e um sistema de revelação fluorescente complementar (FL2-PE), denominada FC-ATE-Triplex.

Na primeira parte desse trabalho, no desenvolvimento da técnica de FC-ATE-Triplex, constatou-se a marcação diferencial com FITC das formas tripomastigotas vivas e amastigotas vivas. As formas tripomastigotas apresentam uma maior fluorescência em relação às formas amastigotas, em gráficos de FL1XFSC (Figuras 5, 6 e 8). Esse fato pode ser devido à maior densidade de proteínas ancoradas em GPI, e a maior quantidade de membrana das formas tripomastigotas em relação às formas amastigotas.

Outro dado dessa primeira parte do trabalho, é que avaliando a reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI em amostras de soros individuais dos grupos TC e TNC da População 1 (Figura 10), foi constatado que as amostras de soros dos indivíduos do grupo TC apresentaram uma baixa reatividade com as três formas evolutivas do *T. cruzi*. Com as formas amastigotas, a queda na reatividade ocorreu a partir da diluição 1:1000, enquanto com as formas tripomastigotas e epimastigotas a reatividade se

manteve baixa em todas as diluições testadas (1:250 a 1:8000). Em contraste ao observado com o grupo TC, todas as amostras de soros do grupo TNC apresentaram uma alta reatividade, com as três formas evolutivas do *T. cruzi*. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de MARTINS-FILHO *et al.* (1995), MARTINS-FILHO *et al.* (2002), que avaliando a reatividade de IgG anti-TRIPO vivo em amostras de soros de pacientes NT, TNC, DIS, NC e TC, as amostras de soro dos pacientes TC apresentaram valores de reatividade negativo e as dos TNC apresentaram valores de reatividade positivo. No entanto, uma amostra de paciente TC apresentou reatividade positiva (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002) e duas amostras de pacientes TNC apresentaram valores de reatividade negativos (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995), o que está em desacordo com esse trabalho, na qual todos os pacientes TC apresentaram baixos valores de reatividade e todos os TNC altos valores de reatividade, independente da fonte antigênica avaliada. Ainda de acordo com os trabalhos de VITTELI-AVELAR *et al.* (2007), MATOS *et al.* (2011), que avaliaram a reatividade de IgG anti-EPI fixado em amostras de soros de pacientes TC e TNC, todos os pacientes TC foram negativos, ou baixo positivo e todos os TNC foram alto positivos. Os resultados encontrados na técnica de FC-ATE-Triplex também corroboram os achados de KRETTLI *et al.* (1982), GALVÃO *et al.* (1993), NORRIS *et al.* (1994), nos quais através da LMC^o ou da imunoprecipitação da proteína regulatória do complemento, cerca de 90% dos pacientes TNC apresentaram LMC^o e imunoprecipitação da CRP positivas, enquanto todos os pacientes TC tiveram LMC^o e imunoprecipitação da CRP negativas.

Na busca de um novo parâmetro de interpretação da técnica de FC-ATE-Triplex, e visando a sua utilização na monitoração da cura parasitológica da doença de Chagas, foram traçadas curvas de titulação das médias de PFP dos grupos TC e TNC, com as três formas evolutivas do *T. cruzi* (Figura 10), para definir qual a melhor diluição capaz de segregar tais grupos. Os resultados encontrados revelaram que em todas as diluições testadas (1:250 a 1:8000), tanto com AMA, quanto com TRIPO e EPI, houve uma diferença estatística significativa entre os grupos TC e TNC. Dessa forma, ficou comprovado que a técnica de FC-ATE-Triplex apresentou um bom desempenho na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, e foi capaz de segregar os grupos de pacientes TC e TNC.

Com o intuito de estabelecer qual a melhor diluição e o ponto de corte capazes de segregar os pacientes TC e TNC, foram construídas curvas ROC dos valores de PFP das amostras individuais de soros dos pacientes desses dois grupos, com AMA,

TRIPO e EPI (Figura 11). Através das curvas ROC, foi possível constatar um excelente desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex em todas as diluições testadas (1:250 a 1:8000) e com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, uma vez que os valores de ASC foram iguais a 1, ou próximos a 1. De acordo com SWEETS (1988), o valor de ASC igual a 1 indica uma elevada acurácia do teste. Isso significa que nessas seis diluições e nos referidos pontos de corte indicados pela curva ROC, há total discriminação entre os grupos TC e TNC. Com essa mesma proposta, VITTELI-AVELAR *et al.* (2007) na análise de desempenho da técnica de FC-AFEA, para a diluição 1:2048 e PFPF de 60%, também encontraram um valor de ASC igual a 1. Ainda, MATOS *et al.* (2011) na análise de desempenho da técnica de FC-AFEA modificada, e para as diluições 1:2048, 1:4096 e 1:8192, também encontraram valores de ASC próximos a 1.

Nos gráficos de reatividade média dos valores de PFPF dos grupos TC e TNC (Figura 12), as diluições 1:250, 1:500 e 1:1000 com AMA, TRIPO e EPI foram as que apresentaram uma maior amplitude de distanciamento entre as curvas, ou seja, uma melhor amplitude de segregação entre os grupos TC e TNC, e por isso, foram as diluições-candidatas na análise de desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex, para a monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas.

Esses dados foram confirmados em gráficos de dispersão das amostras individuais de pacientes desses dois grupos (Figura 13). As três diluições-candidatas, 1:250, 1:500 e 1:1000 com AMA, TRIPO e EPI, apresentaram um bom desempenho na segregação entre os grupos TC e TNC. Nessas três diluições, e nos respectivos pontos de corte, foram observados valores de co-positividade e de co-negatividade iguais a 100,00, o que significa um excelente desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas. Adicionalmente, a técnica de FC-ATE-Triplex apresentou valores de sensibilidade superiores aos métodos parasitológicos hemocultura, de 0 a 55% (CHIARI e BRENER, 1966; CHIARI *et al.*, 1989; BRENER *et al.*, 1993) xenodiagnóstico, de 13 a 50% (CERISOLA *et al.*, 1974; BORGES e COURA, 1987; PEREIRA *et al.*, 1996; MOREIRA e PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1997; SCHENONE *et al.*, 2000) e molecular, PCR, de 45 a 86% (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1998; BRITTO, 1999; BRITTO, 2009).

A técnica de FC-ATE-Triplex apresentou uma sensibilidade e uma especificidade superiores em relação à técnica de FC-AFEA, uma vez que na FC-AFEA a sensibilidade foi moderada (82%) (VITTELI-AVELAR *et al.*, 2007), e na diluição 1:2048 esta técnica quando modificada, apresentou sensibilidade de 97,1% e

especificidade de 95,4%, com 2,9% de resultados falso-negativos e 4,6% de resultados falso-positivos (MATOS *et al.*, 2011). Ainda que a técnica de FC-ATE-Triplex nas diluições 1:250, 1:500 e 1:1000 das amostras, a reatividade com as três formas evolutivas do *T. cruzi* tenham apresentado um bom desempenho na segregação entre os grupos TC e TNC, a diluição 1:1000 com ponto de corte de 40% de PFP com AMA, 1:250 com ponto de corte de 20% de PFP com TRIPO e 1:250 com ponto de corte de PFP de 20% com EPI, foram as que apresentaram um maior agrupamento ou segregação entre a reatividade dos indivíduos do grupo TC e do grupo TNC. Isso garante uma maior homogeneidade do teste quando aplicado numa nova amostragem populacional. Dessa maneira, os critérios de interpretação para a técnica de FC-ATE-Triplex foram: diluição 1:1000 e ponto de corte de 40% para as formas amastigotas, e diluição 1:250 e ponto de corte de 20% para as formas tripomastigotas e epimastigotas. Na técnica de FC-ATE-Triplex, as formas amastigotas reagiram até uma diluição maior do soro (1:1000), o que sugere que no ensaio Triplex poderia estar havendo uma maior afinidade de anticorpos por AMA. As formas epimastigotas e tripomastigotas apresentaram melhor reatividade na mesma diluição, 1:250. Esse fato foi curioso, pois nos ensaios Simplex, as formas EPI sempre reagiram mais que as formas TRIPO, até nas diluições superiores da amostra tais como: 1:2000 ou 1:4000. Na técnica de (FC-ALTA) pesquisa de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas, a diluição da amostra e o ponto de corte estabelecidos foram diluição 1:256 e ponto de corte de 20% (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; CORDEIRO *et al.*, 2001; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002). Já na técnica de FC-AFEA, pesquisa de anticorpos anti-formas epimastigotas fixadas, as diluições estabelecidas foram 1:2048 ou 1:4096, com ponto de corte de 60% (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011). Os dados obtidos pela técnica de FC-ATE-Triplex sugerem a existência de competição entre antígenos, e isto é um fator relevante uma vez que as formas amastigotas foram as mais reativas.

As formas amastigotas do *T. cruzi* já foram utilizadas como fontes antigênicas em testes sorológicos e apresentaram uma reatividade superior no sorodiagnóstico da doença de Chagas, em relação a antígenos com as formas epimastigotas (CERISOLA *et al.*, 1971; UMEZAWA *et al.*, 1980; ARAÚJO e GUPTILL, 1984; PRIMAVERA *et al.*, 1990; MATSUMOTO *et al.*, 1993). MATSUMOTO *et al.* (1993), em testes de IFI no sorodiagnóstico da doença de Chagas, observaram que 97% dos anticorpos IgG anti-AMA, apresentaram 2 a 32 vezes maiores títulos do que os anticorpos anti-EPI. PRIMAVERA *et al.* (1990) avaliaram a reatividade de anticorpos IgG, IgM e IgA

contra antígenos de AMA, TRIPO e EPI, no de soros de pacientes chagásicos e de NC, e observaram que os antígenos de AMA apresentaram maior reatividade com as três subclasses de anticorpos, no soro dos pacientes chagásicos.

Outro dado interessante dessa primeira parte desse estudo foi que após o estabelecimento de uma análise comparativa da reatividade das amostras de soro dos pacientes TC e TNC pelas técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex, observou-se uma concordância de resultados entre essas três metodologias (Figuras 15 e 16). Em relação às amostras de soros de pacientes TC, houve uma maior concordância entre as técnicas de FC-ALTA e FC-ATE-Triplex, uma vez que a maioria delas apresentou índices de reatividade abaixo de 20% de PFP. Já com a técnica de FC-AFEA, apenas 43% das amostras apresentaram reatividade abaixo de 20% (Figura 15). Esse fato demonstra um desempenho superior da técnica de FC-ATE-Triplex com as formas epimastigotas fixadas. Em relação às amostras de soros de pacientes TNC, houve concordância de resultados principalmente entre as técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex com AMA, uma vez que a maioria das amostras apresentou índices de reatividade acima de 80% (Figura 16). Esses resultados demonstram novamente o bom desempenho da FC-ATE-Triplex na discriminação entre pacientes TC e TNC, principalmente com as formas amastigotas vivas no caso dos TNC. O tratamento ainda que não tivesse promovido a cura parasitológica, poderia estar contribuindo para uma diminuição dos níveis parasitêmicos, o que justificaria o fato de uma amostra de paciente TNC com AMA, 6 com TRIPO e 5 com EPI, na FC-ATE-Triplex, apresentassem uma queda na reatividade, mesmo que positivos.

Nessa primeira parte desse trabalho, foi demonstrado então, que a análise da reatividade diferencial de IgG1 contra as formas evolutivas do *T. cruzi* apresentou diferenças significativas entre os grupos TC e TNC, sugerindo a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas. As análises dos índices de desempenho expressas em percentual corroboram o excelente desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex para a monitoração pós-terapêutica da doença de Chagas. Além do mais, a reatividade diferencial observada em AMA, TRIPO e EPI sugere que na técnica de FC-ATE-Triplex existe a segregação de anticorpos pela afinidade pelo antígeno.

Na segunda parte desse trabalho, foi observado que as amostras de soros de pacientes chagásicos NT apresentaram valores de reatividade positivos, enquanto as amostras de soros de pacientes NI apresentaram valores de reatividade negativos, com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, e considerando as respectivas diluições e pontos de corte estabelecidos na análise de desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex (Figura 17). Em algumas amostras de pacientes NI, a reatividade com as formas amastigotas começou a diminuir a partir da diluição 1:1000. Nossos dados corroboram os achados de MARTINS-FILHO *et al.* (1995), em que pela técnica de FC-ALTA as amostras de soros de pacientes NT apresentaram valores de reatividade positivos, enquanto as de NI valores de reatividade negativos na diluição 1:256 e no ponto de corte de 20%. CORDEIRO *et al.* (2001) também encontraram valores de reatividade do soro dos pacientes NT superiores aos dos NI, independente da preparação antigênica utilizada. No entanto, nossos dados estão em desacordo com esse trabalho em relação à reatividade do soro dos NI com as formas epimastigotas fixadas. CORDEIRO *et al.* (2001) demonstraram que a reatividade do soro dos indivíduos NI com as formas fixadas (tripomastigotas fixadas e epimastigotas fixadas) é superior a reatividade do soro desses mesmos indivíduos NI com as formas tripomastigotas vivas. Por outro lado, na técnica de FC-ATE-Triplex, todas as três formas evolutivas do *T. cruzi* (AMA viva, TRIPO viva e EPI fixada) apresentaram uma baixa reatividade com as amostras de soros de pacientes NI. Nossos dados também estão de acordo com os resultados encontrados na técnica de FC-AFEA, em que na diluição 1:1024 e ponto de corte de 60%, ou na diluição 1:2048 com ponto de corte de 60% (FC-AFEA modificada) o teste foi capaz de discriminar os pacientes CH dos NI. Apenas na técnica de FC-AFEA modificada houve um pequeno percentual de resultados falso-positivos e falso-negativos (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2011). Diante desses dados, foi estabelecida uma análise comparativa com as mesmas amostras de soros dos pacientes NT, com as técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex, sendo observada novamente uma concordância de resultados entre essas três metodologias (Figura 18). Houve uma maior concordância entre as técnicas de FC-ALTA, FC-AFEA e FC-ATE-Triplex com AMA, uma vez que a maioria das amostras apresentou índices de reatividade acima de 80% de PFP. Esse resultado demonstra novamente que na FC-ATE-Triplex pode estar ocorrendo a segregação de anticorpos pela afinidade pelo antígeno, com maior afinidade pelas formas amastigotas vivas.

As vantagens de se utilizar a citometria de fluxo no diagnóstico da doença de Chagas é a possibilidade de detectar 10000 parasitos fluorescentes por metodologia e de se utilizar parasitos inteiros como fontes de antígeno ao invés de antígenos solúveis (CORDEIRO *et al.*, 2001). Além disso, é uma técnica bem estabelecida, automatizada em que os parâmetros podem ser medidos, armazenados e analisados em programas de computador simultaneamente ao citômetro de fluxo. Nessa segunda parte desse trabalho, foi efetivamente demonstrado o bom desempenho da técnica de FC-ATE-Triplex no diagnóstico da doença de Chagas, sendo capaz de segregar os pacientes NT dos NI.

Ainda na segunda parte deste trabalho, a técnica de FC-ATE-Triplex foi empregada na avaliação da reatividade do soro de amostras de pacientes portadores de leishmaniose visceral e de leishmaniose tegumentar americana. Foi observado que das 10 amostras de pacientes com LV, uma (10%) foi positiva com AMA, uma (10%) foi positiva com TRIPO e duas (20%) foram positivas com EPI. Em se tratando de LTA, das 20 amostras testadas, 4 (20%) foram positivas com AMA, 6 (30%) foram positivas com TRIPO e 10 (50%) foram positivas com EPI (Figura 19).

Alguns fatores podem explicar esse percentual de resultados falso-positivos na técnica de FC-ATE-Triplex: o primeiro fator é o compartilhamento antigênico que existe entre os tripanossomatídeos, responsável pela reatividade cruzada existente entre o *T. cruzi* e a *Leishmania sp* (CHILLER *et al.*, 1990; VEXENAT *et al.*, 1996; GADELHA *et al.*, 2003). Vários trabalhos demonstram que a reatividade cruzada existente entre essas duas espécies de parasitos é um fator limitante no desenvolvimento de novos testes sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas. VEXENAT *et al.* (1996) observaram a presença de determinantes antigênicos comuns no *T. cruzi*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*. Os soros de pacientes chagásicos apresentaram na ELISA, 98% a 100% de resultados positivos quando antígenos de *L. braziliensis* e de *L. chagasi* foram utilizados. Os soros de pacientes com LV apresentaram na ELISA 100% de resultados positivos quando antígenos de *T. cruzi* ou *L. braziliensis* foram utilizados, enquanto os soros de pacientes com LT apresentaram na ELISA, 100% de resultados positivos quando antígenos *T. cruzi* ou de *L. chagasi* foram utilizados. As análises por “Western blot” também demonstraram bandas em comum entre as três espécies de tripanossomatídeos.

VITELLI-AVELAR *et al.* (2007), avaliando pela técnica de FC-AFEA a reatividade das amostras de soro de pacientes não chagásicos, porém portadores de outras doenças infecto-parasitárias relevantes, observaram que 52% das amostras de indivíduos com LV forneceram resultados falso-positivos. MATOS *et al.* (2011) com essa mesma proposta de avaliar a reatividade do soro pela FC-AFEA de amostras de indivíduos com outras doenças parasitárias, observaram um percentual de 6,8% de resultados falso-positivos, dentre eles pacientes com sífilis, LV e LTA. Na busca de melhorar o desempenho dos métodos sorológicos convencionais em relação a sua especificidade, vários testes diagnósticos para a doença de Chagas tem substituído os antígenos brutos por antígenos purificados, tais como a GP90kDa, GP72kDa, GP25kDa e a GP55kDa ou por antígenos recombinantes, peptídeos sintéticos e antígenos de tripomastigotas excretados/secretados (TESA) (SCHECHTER *et al.*, 1983; PERALTA *et al.*, 1994; UMEZAWA *et al.*, 1996; UMEZAWA *et al.*, 2001; MEIRA *et al.*, 2002; UMEZAWA *et al.*, 2003; MARCIPAR *et al.*, 2003; MEIRA *et al.*, 2004).

FLORES-CHÁVEZ *et al.* (2010), avaliando a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos convencionais e não convencionais na doença de Chagas, observaram que os testes sorológicos não convencionais que utilizam antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos apresentam menor percentual de reatividade cruzada com o soro de pacientes com LV. Da mesma forma, CARVALHO *et al.* (1993), avaliando a sensibilidade e a especificidade da IFI, HAI, ELISA na doença de Chagas, observaram que a ELISA utilizando antígenos recombinantes não demonstraram nenhuma reatividade cruzada com soros de pacientes com outras doenças infecto-parasitárias. NAKAZAWA *et al.* (2001), AMATO-NETO *et al.* (2005), BERRIZBEITIA *et al.* (2006) demonstraram que apesar da maior sensibilidade do TESA-blot no diagnóstico da doença de Chagas frente aos demais métodos sorológicos convencionais, são ainda observadas reações cruzadas com o soro de pacientes com LV e LTA. BERRIZBEITIA *et al.* (2012) desenvolveram um novo teste diagnóstico para a doença de Chagas utilizando proteínas de secreção/excreção das formas epimastigotas do *T. cruzi*. Apesar da alta sensibilidade (98%), o teste apresentou uma especificidade de 88%, sendo comum as reações cruzadas com *Ascaris sp* e *Leishmania sp*. Esses trabalhos demonstram que apesar dos testes que vem sendo desenvolvidos para o diagnóstico da doença de Chagas apresentarem uma alta sensibilidade, as reações cruzadas principalmente com o soro de pacientes com LV e LT ainda são freqüentes.

O segundo fator que devemos levar em consideração diante dos resultados falso-positivos na técnica de FC-ATE-Triplex, é que em relação aos pacientes com LTA da aldeia de Xacriabá, muitos podem apresentar uma co-infecção com a doença de Chagas, pois já foram relatados a presença de triatomíneos e casos de doença de Chagas humana em municípios vizinhos a aldeia, como o município de Montalvânia e o município de Porteirinha (COSTA *et al.*, 1998; DIOTAIUTI *et al.*, 1998; RASSI *et al.*, 2003). Todos esses pacientes com LTA não puderam ser tratados para a leishmaniose porque tinham alterações cardíacas e eletrocardiográficas, o que pode ser um indício a mais de serem portadores da infecção pelo *T. cruzi*. Além do mais, algumas amostras de sangue de indivíduos da aldeia com LTA já foram testadas através da PCR pela equipe de pesquisa do Laboratório de Doença de Chagas/NUPEB/UFOP e apresentaram resultados positivos para a doença de Chagas, o que reforça ainda mais a presença da co-infecção na região. Outro fator importante é que alguns moradores de Xacriabá têm relatado a pesquisadores do CPqRR/Fiocruz, a presença de triatomíneos na aldeia, o que pode ser indício de haver transmissão vetorial da DCh. Futuras investigações devem ser realizadas na região a fim de verificar se está mesmo ocorrendo a infecção pelo *T. cruzi* naquela localidade.

Um dado interessante do estudo é que as formas amastigotas e tripomastigotas apresentaram um menor percentual de resultados falso-positivos para LTA em relação às formas epimastigotas. A presença de um menor número de resultados falso-positivos com AMA (20%) e com TRIPO (30%) pode ser explicada porque essas formas evolutivas do *T. cruzi* por estarem presentes no hospedeiro vertebrado apresentam particularidades antigênicas não compartilhadas com outros tripanosomatídeos. Assim, a forma epimastigota por estar presente apenas no hospedeiro invertebrado compartilha diversos antígenos não só com as outras formas evolutivas do *T. cruzi*, mas também com outros tripanosomatídeos como a *Leishmania sp.*, o que explicaria a maior ocorrência de resultados falso-positivos com EPI (50%). Em desacordo com esse trabalho, BERRIZBEITIA *et al.* (2004) avaliaram pela técnica de ELISA, amostras de soro de CH, NI e de indivíduos com outras doenças infecto-parasitárias, utilizando antígenos de amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas (todos fixados) e observaram uma maior especificidade para as formas TRIPO (99,3%), enquanto EPI e AMA apresentaram uma especificidade de 98,3% e 97,6%, respectivamente. Os dados desse estudo corroboram os achados de MATSUMOTO *et al.* (1993), que avaliando o desempenho da IFI no imunodiagnóstico da doença de Chagas, com antígeno de

amastigotas de cultura de células e de epimastigotas, as formas AMA apresentaram 4,6% de resultados falso-positivos, enquanto as formas EPI apresentaram um percentual de 10,2% de resultados falso-positivos. Foi demonstrado então, que as formas amastigotas foram às formas evolutivas do *T. cruzi* que apresentaram uma maior especificidade. Além do mais, a técnica de FC-ATE-Triplex, mesmo apresentando resultados falso-positivos, mostrou ser uma metodologia útil na segregação sorológica de pacientes portadores de LV e de LTA.

Na terceira parte desse trabalho, foi verificado que avaliando a reatividade do soro de pacientes categorizados como TEA, com sorologia convencional positiva ou oscilante e xenodiagnóstico negativo, algumas amostras foram negativas na técnica de FC-ATE-Triplex, tanto com AMA, quanto com TRIPO e EPI, considerando as respectivas diluições e pontos de corte estabelecidos para essa metodologia. Das 28 amostras de soro de pacientes TEA, 15 (53,6%) foram negativas com AMA, 11 (39,3%) foram negativas com TRIPO e 8 (28,6%) foram negativas com EPI (Figura 20). Sete amostras foram negativas com AMA, TRIPO e EPI simultaneamente. Comparando a reatividade dessas mesmas 28 amostras de soro do grupo TEA pela técnica de FC-ALTA e pela técnica de FC-ATE-Triplex, 7 (25%) foram negativas na técnica de FC-ALTA (Figura 21) (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002). Dessas 7 amostras negativas na FC-ALTA, 6 foram negativas com AMA, 5 foram negativas com TRIPO e 3 foram negativas com EPI na técnica de FC-ATE-Triplex. MARTINS-FILHO *et al.* (2002) avaliaram amostras de soros dos pacientes TEA e observaram um amplo grau de reatividade das amostras, sendo 12 alto positivas, 9 baixo negativas e 7 negativas (considerando a diluição 1:256 e ponto de corte de 20%). Um percentual de 78% desses indivíduos, com menos de 10 anos de acompanhamento pós-tratamento, apresentaram valores de reatividade alto positivo, enquanto os com mais de 10 anos de acompanhamento pós-tratamento, apresentaram uma ampla gama de resultados, sendo 31,5% alto positivos, 31,5% baixo positivos e 37% negativos. Outro dado interessante desse trabalho, (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002) é que a frequência de amostras de soro negativas na FC-ALTA foi maior no grupo de pacientes com sorologia convencional oscilante (36,5%) do que os com sorologia convencional positiva (18%).

Os resultados indicam que embora os pacientes TEA apresentem sorologia convencional positiva ou oscilante, os que apresentaram resultados negativos na técnica de FC-ATE-Triplex podem estar em processo de cura ou mesmo serem considerados

curados, uma vez que também apresentam xenodiagnóstico negativo. Esses dados foram confirmados pela concordância de resultados entre as técnicas de FC-ALTA e FC-ATE-Triplex, em relação às amostras que apresentaram reatividade negativa na FC-ALTA (MARTINS-FILHO *et al.*, 2002). Estudos de avaliação da eficácia do tratamento etiológico da DCh na fase crônica, têm demonstrado que aproximadamente 30% dos pacientes tratados mantêm a sorologia positiva, enquanto os testes de LMC^o e parasitológicos são repetidamente negativos. Esses soros são caracterizados como dissociados e os pacientes podem ser considerados curados apesar dos resultados positivos residuais obtidos com a sorologia convencional (KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI *et al.*, 1984; GALVÃO *et al.*, 1993; MEIRA *et al.*, 2004). Trabalhos como o de GALVÃO *et al.* (1993), em um estudo de acompanhamento de pacientes chagásicos tratados a mais de 10 anos, demonstraram que cerca de 21 pacientes apresentaram IFI positiva, porém hemocultura e LMC^o (exceto em 5 pacientes) negativas. NORRIS *et al.* (1994), avaliando o soro desses pacientes classificados como dissociados, observaram uma diminuição ou uma perda da capacidade de precipitar a proteína regulatória do complemento, que foi correlacionada com a negatividade da LMC^o e hemocultura. MARTINS-FILHO *et al.* (1995), avaliando a reatividade do soro de pacientes chagásicos tratados e não tratados pela técnica de FC-ALTA, demonstraram que as amostras classificadas como discordantes apresentaram uma reatividade negativa na citometria de fluxo (considerando a diluição 1:256 e o ponto de corte de 20%). Também, MEIRA *et al.* (2004), avaliando 31 amostras de soros de pacientes chagásicos antes e após o tratamento, pelas técnicas de ELISA utilizando a proteína regulatória do complemento (ELISA rCRP), LMC^o, testes sorológicos convencionais, hemocultura e PCR, observaram que após o quarto ano de acompanhamento pós-tratamento etiológico, a sorologia convencional manteve-se positiva, enquanto todas as hemoculturas foram negativas, 50% das amostras foram negativas na PCR e 33,4% foram negativas na LMC^o e na ELISA rCRP.

A literatura revela que pacientes chagásicos quando tratados na fase crônica da doença de Chagas devem ser acompanhados cerca de 10 a 25 anos pós-tratamento etiológico (VIOTTI, 1994; CANÇADO, 1999; CANÇADO, 2002; COURA e CASTRO, 2002) para verificar a cura parasitológica. Este fenômeno se deve à persistente reatividade da sorologia convencional. Alguns fatores explicam a positividade da sorologia convencional por um longo período, quando testada em pacientes chagásicos crônicos tratados como, por exemplo: a presença de antígenos do

T. cruzi em células dendríticas do baço e em células cardíacas de camundongos tratados curados, mesmo na ausência de parasitos viáveis, mantendo anticorpos anti-*T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 1988; ANDRADE *et al.*, 1991), a reatividade cruzada de proteínas do coração do hospedeiro com moléculas da superfície do parasito (mimetismo molecular) (GARCIA *et al.*, 2005), a presença de epitopos anti-idiotípicos, que mimetizam epitopos do parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1988), a reatividade cruzada entre anticorpos anti-galactosil- α -1-3 galactose e o epitopo galactosil- α -1-3 galactose presente em extratos do parasito utilizados nos testes sorológicos convencionais e em microorganismos da flora normal (GAZZINELLI *et al.*, 1993), a integração do DNA do parasito ao genoma da célula hospedeira (HECHT *et al.*, 2010) e a permanência do kDNA do parasito nos tecidos dos hospedeiros (MARTINS *et al.*, 2008).

Outro dado interessante verificado na terceira parte do trabalho foi que as formas AMA do *T. cruzi* apresentaram um maior percentual de amostras de pacientes do grupo TEA negativas (53,6%) em relação às formas TRIPO (39,3%) e EPI (28,6%). Essas formas evolutivas do *T. cruzi*, além de apresentarem uma maior reatividade na técnica de FC-ATE-Triplex, podem ser boas fontes antigênicas na monitoração precoce pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, o que demonstra a aplicabilidade da técnica de FC-ATE-Triplex na monitoração precoce pós-tratamento etiológico da doença de Chagas.

Ainda, na terceira parte deste trabalho, a avaliação da reatividade de IgG1 anti-AMA, TRIPO e EPI em amostras de soros de pacientes dos grupos TC e TNC de novas amostragens populacionais, demonstrou que todas as amostras de soros de pacientes do grupo TNC foram positivas com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, enquanto todas as amostras do grupo TC foram negativas com AMA, 5 das 7 amostras foram negativas com TRIPO e 6 das 7 amostras foram negativas com EPI (Figura 22), considerando as respectivas diluições e pontos de corte estabelecidos na técnica de FC-ATE-Triplex. Uma das amostras que foi positiva com EPI apresentou um baixo índice de reatividade.

Outro resultado obtido na terceira parte desse estudo foi que a avaliação pela técnica de FC-ATE-Triplex de 24 amostras de soros de pacientes TEA de uma nova amostragem populacional, demonstrou que 7 (29,2%) foram negativas com AMA, 1 foi negativa com TRIPO (4,2%) e 7 foram negativas com EPI (29,2%) (Figura 23). Duas amostras do grupo TEA que foram positivas com AMA apresentaram índices de reatividade próximos ao ponto de corte de 40% (IR=40,30 e IR=40,70). Isto revela novamente que os dados aqui obtidos estão de acordo com os resultados encontrados na

População 1 desse estudo, em que os pacientes TNC apresentaram altos valores de reatividade e os pacientes TC apresentaram baixos valores de reatividade na técnica de FC-ATE-Triplex. No entanto, ao contrário do observado na População 1 em que todos os pacientes TC foram negativos nas três formas evolutivas do *T. cruzi*, 2 pacientes desse grupo foram positivos com TRIPO e 1 foi positivo com EPI. MARTINS-FILHO *et al.* (2002), avaliando pela técnica de FC-ALTA a reatividade de amostras de soro de pacientes chagásicos TC e TNC, também encontraram um resultado positivo em uma amostra pertencente ao grupo TC. MATOS *et al.* (2011), avaliando pela técnica de FC-AFEA a reatividade de amostras de soro de pacientes pertencentes aos grupos NI + TC e CH + TNC, observaram no grupo NI + TC um percentual de 4,6% de resultados falso-positivos. Os dados encontrados nesse trabalho revelam novamente um excelente desempenho das formas amastigotas vivas na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, uma vez que nessa fonte antigênica houve total segregação dos pacientes dos grupos TC e TNC na diluição 1:1000 e ponto de corte de 40%. Além do mais, as formas amastigotas apresentaram um bom desempenho na monitoração precoce pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, mesmo em uma nova amostragem populacional, uma vez que 7 dos 24 pacientes TEA foram negativos, e outros dois apresentaram índices de reatividade próximos ao ponto de corte de 40%. Esse resultado está de acordo com o observado na População 1 desse estudo. Os pacientes TEA que apresentaram resultados negativos com as três formas evolutivas do *T. cruzi*, novamente podem ser classificados como dissociados, uma vez que também apresentam resultados de hemocultura negativos, e podem estar em processo de cura ou mesmo serem considerados curados (KRETTLI *et al.*, 1982; KRETTLI *et al.*, 1984; GALVÃO *et al.*, 1993; NORRIS *et al.*, 1994; MARTINS-FILHO *et al.*, 2002; MEIRA *et al.*, 2004).

Na terceira parte desse estudo, foi demonstrado que a técnica de FC-ATE-Triplex, mesmo quando testada em novas amostragens populacionais, apresenta um excelente desempenho na monitoração pós-tratamento etiológico da doença de Chagas.

7. CONCLUSÕES

1- A técnica de FC-ATE-Triplex apresentou um bom desempenho no diagnóstico e na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico da doença de Chagas uma vez que foi capaz de segregar os grupos de pacientes chagásicos não tratados dos não infectados, pacientes chagásicos de pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana e pacientes tratados curados dos tratados não curados, além de um bom desempenho no controle de cura parasitológica precoce da doença de Chagas, pois pacientes tratados em avaliação com sorologia convencional positiva ou oscilante (que assim podem permanecer por muitos anos) apresentaram resultados negativos nesta técnica, sugerindo que eles podem estar em processo de cura ou serem considerados curados por apresentarem resultados de xenodiagnóstico ou hemocultura e/ou PCR negativos.

2- A técnica de FC-ATE-Triplex apresentou uma excelente acurácia global (com valores de área sob a curva iguais a 1), além de valores de co-positividade e de co-negatividade iguais a 100, em todas as diluições avaliadas.

3- Os critérios de interpretação para a técnica de FC-ATE-Triplex foram: diluição 1:000 e ponto de corte de 40% para as formas amastigotas, e diluição 1:250 e ponto de corte de 20% para as formas tripomastigotas e epimastigotas.

4- As formas amastigotas do *T. cruzi* apresentaram maior reatividade e especificidade na técnica de FC-ATE-Triplex, sendo assim a melhor fonte antigênica na monitoração da cura parasitológica pós-tratamento etiológico e no controle da cura parasitológica precoce da doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA IC, KRAUTZ GM, KRETTLI AU, TRAVASSOS LR. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. *J Clin Lab Anal*, 7(6): 307 – 316, 1993.

AMATO NETO V, DE MARCHI CR, FERREIRA CS, FERREIRA AW. Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(6): 534 – 535, 2005.

ANDRADE ALSS, ZICKER F, OLIVEIRA RM, SILVA SA, LUQUETTI AO, TRAVASSOS LR, ANDRADE SS, ANDRADE JG, MARTELLI CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet*, 348: 1407-1413, 1996.

ANDRADE ALSS, MARTELLI AMT, OLIVEIRA RM, SILVA AS, AIRES AIS, SOUSSUMI LMT, COVAS DT, SILVA LS, ANDRADE JG, TRAVASSOS LR, ALMEIDA IC. Benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six-year follow-up. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5): 594-597, 2004.

ANDRADE CR, ANDRADE PP, WRIGHT EP. *Leishmania donovani* donovani antigens recognized by Kalaazar patient sera and identification of cross-reacting antigens to Chagas' disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21:511–515, 1988.

ANDRADE LO, ANDREWS NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med*, 200(9):1135-43, 2004.

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

ANDRADE SG, STOCKER-GUERRET S, PIMENTEL AS, GRIMAUD JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 187-200, 1991.

ANDRADE SG, RASSI A, MAGALHÃES JB, FERRIOLLI-FILHO F, LUQUETTI AO. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 624 – 626, 1992.

ANDREWS NW, HONG KS, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 64(3):474 – 484, 1987.

ANDREWS NW, EINSTEIN M, NUSSENZWEIG V. Presence of antibodies to the major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in sera from Chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg*, 40(1):46 – 49, 1989.

ARAUJO FG & GUPTILL D. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 33:362-371, 1984.

ARCE-FONSECA M, RAMOS-LIGONIO A, LÓPEZ-MONTEÓN A, SALGADO-JIMÉNEZ B, TALAMÁS-ROHANA P, ROSALES-ENCINA JL. A DNA vaccine encoding for TcSSP4 induces protection against acute and chronic infection in experimental Chagas disease. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9): 1230 – 1238, 2011.

BAHIA-OLIVEIRA LMC, GOMES JAS, CANÇADO JR, FERRARI TC, LEMOS EM, LUZ ZP, MOREIRA MC, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection 14–30 Years Ago. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 634 – 638, 2000.

BERRIZBIETIA M, NDAO M, GOTTSCHALK M, ACHÉ A, VÁSQUEZ F, LACOUTURE S, MEDINA M, WARD B. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes, and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4): 1766 – 1769, 2004.

BERRIZBEITIA M, NDAO M, BUBIS J, GOTTSCHALK M, ACHÉ A, LACOUTURE S, MEDINA M, WARD BJ. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2): 291 – 296, 2006.

BERRIZBEITIA M, FIGUEROA M, WARD BJ, RODRÍGUEZ J, JORQUERA A, FIGUREA MA, ROMERO L, NDAO M. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA Antigens) for the diagnosis of Chagas disease. *Journal of Tropical Medicine*, 2012

BERTELLI, MS, GOLGHER RR, BRENER Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. *Journal Parasitology*, 63: 434 – 437, 1977.

BLANCO SB, SEGURA EL, CURA EN, CHUIT R, TULIÁN L, FLORES I, GARBARINO G, VILLALONGA JF, GURTNER RE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, 5 (4): 293 – 301, 2000.

- BORGES-PEREIRA J, COURA JR. Morbidade da doença de Chagas em populações urbanas do sertão da Paraíba. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20: 101-107, 1987.
- BRAGA MS, LAURIA-PIRES L, ARGANARAZ ER, NASCIMENTO RJ, TEIXEIRA AR. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42(3): 157–161, 2000.
- BRENER Z, CANÇADO JR, GALVÃO LM, LUZ ZP, FILARDI LS, PEREIRA ME, SANTOS LM, CANÇADO CB. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 149 – 153, 1993.
- BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol*, 27: 347-382, 1973.
- BRITTO CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (I): 122 – 135, 2009.
- BRITTO C, CARDOSO MA, VANNI CM, HASSLOCHER-MORENO A, XAVIER SS, OELEMANN W. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 110: 241-247, 1995.
- BRONFEN E, ALVARENGA NJ. O xenodiagnóstico e os critérios para avaliar o nível de parasitemia do paciente chagásico crônico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24: 37-42, 1991.
- BROWNER WS, NEWMAN TB, CUMMINGS SR. Designing a new study. III. Diagnostic Tests. *Designing clinical research*. Baltimore; Williams e Wilkins, 1998.
- BURGOS JM, ALTCHER J, PETRUCCELLI N, BISIO M, LEVIN MJ, FREILIJ H, SCHIJMAN AG. Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 65(1): 58–61, 2009.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6: 6 – 93, 1964.
- CAMARGO ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8: 227 – 234, 1966.
- CAMARGO ME, HOSHINO-SHIMIZU S, CORREA NS, PERES BA. Hemagglutination test for Chagas disease with chromium chloride, formalin-treated

erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 13: 45-50, 1971.

CANÇADO JR. Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (I): 331-335, 1999.

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

CANÇADO, J.R. Tratamento específico da doença de Chagas. In: CANÇADO, J.R, CHUSTER, M. (Eds). *Cardiopatia chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 327-355, 1985.

CARVALHO MR, KRIEGER MA, ALMEIDA E, OELEMANN W, SHIKANAI-YASSUDA MA, FERREIRA AW, PEREIRA JB, SÁEZ-ALQUÉZAR A, DORILHIAC-LLACER PE, CHAMONE DF, et al. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*, 33(10): 830 – 834, 1993.

CASTRO AM, LUQUETTI AO, RASSO A, RASSI GG, CHIARI E, GALVÃO LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 88: 894 – 900, 2002.

CASTRO CN, PRATA A, MACÊDO V. Influência da parasitemia na evolução da doença de Chagas crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(1): 1 – 6, 2005.

CERISOLA JA, CHABEN MF, LAZZARI JO. Test de hemaglutinación para el diagnostic de la enfermedad de Chagas. *Prensa Méd Argent*, 49: 1761-1767, 1962.

CERISOLA JA, ALVAREZ M, BOCK M, WEGNER D. A comparison of a new antigen from amastigotes of *Trypanosoma cruzi* and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of Chagas' disease by the indirect immunofluorescence test. *Revista Instituto de Medicina Tropical*, 13:162-166, 1971.

CERISOLA JA, ROHWEDDWE R, SEGURA EL, DEL PRADO CE, ALVAREZ M, MARTINI GJW. *El xenodiagnóstico*. Buenos Aires: Imp Inst Nac Invest Cardiovasc, 157p, 1974.

CHAGAS C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3(2): 219 – 275, 1911.

CHAGAS C. Nova Tripanozomiase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159 – 218, 1909.

CHIARAMONTE MG, ZWIRNER NW, CAROPRESI SL, HEREDIA V, TARANTO NJ, MALCHIODI EL. Study of cases of leishmaniasis in the Province of Salta:

evidences of mixed infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Medicina* 56:259–268, 1996.

CHIARI E, DIAS JCP, LANA M, CHIARI CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chaga's disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22: 19 – 23, 1989.

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

CHILER TM, SAMUDIO MA, ZOULER G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and leishmaniasis. *American Journal Tropical Hygiene*, 46: 650-656, 1990.

CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/consenso_chagas.pdf, 2005.

CORDEIRO FD, MARTINS-FILHO AO, ROCHA MOC, ADAD SJ, CORREA OLIVEIRA R, ROMANHA AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8: 112 – 118, 2001.

COSSIO PM, CASANOVA MB, MARIANI AL, GONZALEZ-CAPA S, FERNANDEZ L, ARANA RB. Cryostat sections with tissue amastigotes of *Trypanosoma cruzi* as a substrate for Chagas' disease serology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 79: 805 – 807, 1985.

COSTA FC, VITOR RWA, ANTUNES CMF, CARNEIRO M. Chagas disease control programme in Brazil: a study of the effectiveness of 13 years of intervention. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(4): 385 – 391, 1998.

COURA JR & CASTRO SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 3 – 24, 2002.

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

DIAS JCP. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Caderno de Saúde Pública*, 16: 43 – 59, 2000.

DIOTAIUTI L, AZEREDO BVM, BUSEK SCU, FERNANDES AJ. Controle do *Triatoma sordida* no peridomicílio rural do município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. *Revista Panamericana Salud Publica*, 3(1): 21 – 25, 1998.

DUFFY T, BISIO M, ALTCHER J, BURGOS JM, DIEZ M, LEVIN MJ, FAVOLERO RR, FREILIJ H, SCHIJMAN AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 3 (4): e419, 2009.

ESCRIBÀ JM, PONCE E, ROMERO AD, ALBAJAR-VIÑAS P, MARCHIOL A, BASSETS G, PALMA PP, LIMA MA, ZÚNIGA C, PONCE C. Treatment and seroconversion in a cohort of children suffering from recent chronic Chagas infection in Yoro, Honduras. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7): 986 – 991, 2009.

FABBRO D, ARIAS E, STREIGER M, PIACENZA M, INGARANO M, DEL BARCO M, AMICONE N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42 (2): 99-109, 2000.

FABBRO D, STREIGER ML, ARIAS ED, BIZAI ML, DEL BARCO M, AMICONE N. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1): 1 – 10, 2007.

FERNANDES CD, TIECHER FM, BALBINOT MM, LIARTEDB, SCHOLL D, STEINDEL M, ROMANHA A. Efficacy of benznidazole treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1): 27 – 32, 2009.

FERREIRA AW, AVILA SLM. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-Imunes*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 22: 24 -249, 2001.

FERREIRA AW, BELEM ZR, LEMOS EA, REED SG AND CAMPO-NETO A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4390-4395, 2001.

FISCHER E, OUAISSI MA, VELGE P, CORNETTE J, KAZATCHKINE MD. gp58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology*, 65(2):299 – 303, 1988.

FLORES-CHÁVEZ M, CRUZ I, RODRÍGUEZ M, NIETO J, FRANCO E, GÁRATE T, CAÑAVATE C. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(5): 284 – 293, 2010.

FLORES-GARCÍA Y, ROSALES-ENCINA JL, SATOSKAR AR, TALAMÁS-ROHANA P. IL-10-IFN- γ double producers CD4+ T cells are Induced by immunization with an amastigote stage specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biological Sciences*, 7(8): 1093 – 1100, 2011.

- GADIELHA AA, VERÇOSA AF, LORENA VM, NAKAZAWA M, CARVALHO AB, SOUZA WV, FERREIRA AG, SILVA ED, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, GOMES YM. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. *Vox Sang*, 85(3): 165 – 170, 2003.
- GALLERANO RR, SOSA RR. Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy. *Revista da Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba*, 57(2):135-62, 2000.
- GALVÃO LM, CHIARI E, MACEDO AM, LUQUETTI AO, SILVA AS, ANDRADE ALSS. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5066 – 5070, 2003.
- GALVÃO LM, NUNES RMB, CANÇADO JR, BRENER Z, KRETTLI AU. Litic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a ten years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87: 220-223, 1993.
- GAM AA & NEVA FA. Comparison of cell culture with epimastigote antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 26:47 – 57, 1977.
- GARCIA LM, COELHO-DOS-REIS JG, PERUHYPE-MAGALHÃES V, TEIXIERA-CARVALHO A, ROCHA RD, ARAÚJO MS, GOMES IT, CARVALHO SF, DIETZE R, LEMOS EM, ANDRADE MC, MARTINS-FILHO OA. Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology Methods*, 350(1-2):36 – 45, 2009.
- GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF, VILAS-BOAS F, RODRIGUES MM, CAMPOS-DE-CARVALHO AC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(4):1521- 1528, 2005.
- GAZZINELLI RT, GALVÃO LMC, CARDOSO JE, CANÇADO JR, KRETTLI AU, BRENER Z, GAZZINELLI G. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1795-1800, 1988.
- GAZZINELLI RT, GALVÃO LMC, KRAUTZ G, LIMA APC, CANÇADO JR, SCHARFSTEIN J, KRETTLI AU. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, 49: 625 – 635, 1993.
- GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SD, GALVÃO LM, CHIARI E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Experimental Parasitology*, 88: 28-33, 1998.

GOMES YM. PCR and serodiagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. *Appl Biochem Biotechnol*, 66(2):107 – 119, 1997.

GOMES YM, LORENA VM, LUQUETTI AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (1): 115 – 121, 2009.

GREINER PF, MAYWSKI RJ, MUSHLIN AI, GREENLAND P. Selection and interpretation of diagnostic testes and procedures: principles and applications. *Ann Intern Med*, 94:557-592, 1981.

GREINER M, PFEIFFER D, SMITH RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med Med*, 45: 23-41, 2000.

GUEDES PMM, VELOSO VM, GOLLOB KJ, AFONSO LC, CALDAS IS, VIANNA P, DE LANA M, CHIARI E, BAHIA MT, GALVÃO LM. IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *Vet Immunol Immunopathol*, 124(1-2): 163 – 168, 2008.

GUEDES PMM, SILVA G.K, GUTIERREZ F.R.S, SILVA J.S. Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther*, 9: 609 – 620, 2011.

HECHT MM, NITZ N, ARAÚJO PF, SOUSA AO, ROSA AC, GOMES DA, LEONARDECZ E, TEIXEIRA AR. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoS ONE*, 5(2):e9181, 2010.

HIDRON AI, GILMAN RH, JUSTINIANO J, BLACKSTOCK AJ, LAFUENTE C, SELUM W, CALDERON M, VERASTEGUI M, FERRUFINO L, VALENCIA E, TORNHEIM JA, O'NEAL S, COMER R, GALDOS-CARDENAS G, BERN C. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4(5): e688, 2010.

IIDA K, WHITLOW MB, NUSSENZWEIG V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J Exp Med*, 169(3):881 – 891, 1989.

JAESCHKE R, GUYATT GH, SACKETT DL. User`s guides to the medical literatuir. III. How to use an article about a diagnosis test. Are the results of the study valid? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*, 271: 389 – 391, 1994.

JUNQUEIRA ACV, CHIARI E, WINCKER P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of the Royals Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 129 – 132, 1996.

KRAUTZ GM, GALVÃO LM, CANÇADO JR, GUEVARA-ESPINOZA A, OUAISSI A, KRETTLI A. Use of a 24-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Recombinant Protein to

Monitor Cure of Human Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2086–2090, 1995.

KRAUTZ GM, KISSINGER JC, KRETTLI AU. The targets of lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, vol.16, n°1, 2000.

KRETTLI AU, WEISZ-CARRINGTON P, NUSSENZWEIG RS. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical & Experimental Immunological*, 37: 416-423, 1979.

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

KRETTLI AU, CANÇADO JR, BRENER Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. *Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, 76: 334-340, 1982.

KRETTLI AU, CANÇADO JR, BRENER Z. Criterion of cure of human Chagas disease after specific chemotherapy, recent advances. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79: 157 – 164, 1984.

LANA M, LOPES LA, MARTINS HR, BAHIA MT, MACHADO-DE-ASSIS GF, WENDLING AP, MARTINS-FILHO OA, MONTOYA RA, DIAS JCP, ALBAJAR-VIÑAS P, COURA JR. Clinical and laboratorial status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(8): 1139 – 1147, 2009.

LAURIA-PIRES L, BRAGA M, VEXENAT AC, NITZ N, SIMÕES-BARBOSA A, TINOCO DL, TEIXEIRA AR. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *American Journal Tropical Medicine e Hygiene*, 63: 111 – 118, 2000.

LUQUETTI AO. Etiological treatment for Chagas disease. *Parasitology Today*, 13: 127 – 128, 1997.

LUQUETTI AO, RASSI A. Conferencia: Perspectiva del uso de la serología (Ag naturales y otros) em la evaluación de la eficacia del tratamiento etiológico. Available: www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c003/luque.htm. 2002.

LUZ ZMP, COUTINHO MC, CANÇADO JR, KRETTLI AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27: 143-148, 1994.

MACHADO-DE-ASSIS GF, SILVA AR, DO BEM VA, BAHIA MT, MARTINS-FILHO OA, DIAS JC, ALBAJAR-VIÑAS P, TORRES RM, LANA M. Posttherapeutic

cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clinical Vaccine Immunology*, 19(8): 1283 – 1291, 2012.

MALCHIODI EL, CHIARAMONTE MG, TARANTO NJ, ZWIRNER NW, MARGNI RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin.Exp.Immunol*, 97:417–423, 1994.

MARCIPAR IS, WELCHEN E, ROODVELDT C, MARCIPAR AJ, SILBER AM, Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. *FEMS Microbiology Letters*, 220 (1): 149–154, 2003.

MARTINS HR, FIGUEIREDO LM, VALAMIEL-SILVA JC, CARNEIRO CM, MACHADO-COELHO GL, VITELLI-AVELAR DM, BAHIA MT, MARTINS-FILHO AO, MACEDO AM, LANA M. Persistence of PCR-positive tissue in benzimidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 1319 – 1327, 2008.

MARTINS MS, HUDSON L, KRETTLI AU, CANÇADO JR, BRENER Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical Experimental Immunology*, 61:343–350, 1985.

MARTINS-FILHO OA, PEREIRA MES, CARVALHO JAC, CANÇADO JR, BRENER Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2: 569 – 573, 1995.

MARTINS-FILHO OA, ELOI-SANTOS SM, CARVALHO AT, CÔRREA-OLIVEIRA R, RASSI A, LUQUETTI AO, RASSI GG, BRENER Z. Double-Blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 1107-1113, 2002.

MATOS CS, COELHO-DOS-REIS JG, RASSI A, LUQUETTI AO, DIAS JCP, ELOI-SANTOS SM, GOMES IT, VITELLI-AVELAR DM, WENDLING APB, ROCHA RDR, TEIXEIRA-CARVALHO A, PERUHYPE-MAGALHÃES V, ANDRADE MC, MARTINS-FILHO AO. Applicability of an optimized non-conventional flow cytometry method to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G for the serological diagnosis and cure assessment following chemotherapeutic treatment of Chagas disease. *Journal of Immunological Methods*, 369: 22 – 32, 2011.

MATSUMOTO TK, HOSHINO-SHIMIZU S, NAKAMURA PM, ANDRADE JR HF, UMEZAWA ES. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in

serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1486 – 1492, 1993.

MAZZA S, FREIRE RS. Manifestaciones cutâneas de inoculación, metastáticas y hematógenas em enfermedad de Chagas. Chagomas de inoculación, chagomas metastáticos y chagomas hematógenos. *Public MEPRA*, 46: 3 – 38, 1940.

MEIRA WSF, GALVÃO LMC, GONTIJO ED, MACHADO-COELHO GLL, NORRIS KA, CHIARI E. Trypanosoma cruzi recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3735 – 3740, 2002.

MEIRA WSF, GALVÃO LMC, GONTIJO ED, MACHADO-COELHO GLL, NORRIS KA, CHIARI E. Use of Trypanosomacruzi recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 707 – 712, 2004.

MENDES RP, HOSHINO-SHIMIZU S, SILVA AMM, MOTTA I, HEREDIA RAG, LUQUETTI A AND LESER P. Serological diagnosis of Chagas disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of Trypanosoma cruzi. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1829-1834, 1997.

MILES MA, LLEWELLYN MS, LEWIS MD, YEO M, BALEELA R, FITZPATRICK S, GAUNT MW, MAURICIO IL. The molecular epidemiology and phylogeography of Trypanosoma cruzi and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology*, 136(12):1509-28, 2009.

MIYAMOTO CT, GOMES ML, MARANGON AV, ARAUJO SM, BAHIA MT, MARTINS-FILHO AO, LANA M, TOLEDO MJO. Usefulness of the polymerase chain reaction for monitoring cure of mice infected with different Trypanosoma cruzi clonal genotypes following treatment with benznidazole. *Experimental Parasitology* 120: 45 – 49, 2008.

MONCAYO A& SILVEIRA AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (Suppl I): 17 - 30, 2009.

MOREIRA CIC, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A. Attempts to improve xenodiagnosis: comparative test of sensitivity using Rhodnius neglectus, Panstrongylus megistus, Triatoma vitticeps, Triatoma infestans in endemic areas of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(1): 91-96, 1997.

MOTT KE, FRANÇA JT, BARRETT TV, HOFF R, OLIVEIRA TS, SHERLOCK IA. Cutaneous allergic reactions to Triatoma infestans after xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 75: 3-10, 1980.

MURCIA L, CARRILERO B, MUÑOZ MJ, IBORRA MA, SEGOVIA M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8): 1759 – 1764, 2010.

NAKAZAWA M, ROSA DS, PEREIRA VR, MOURA MO, FURTADO VC, SOUZA WV, BARROS MN, ABATH FG, GOMES YM. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 28(5): 1024 – 1027, 2001.

NEVA FA, GAM AA. A complement-fixing antigen from *Trypanosoma cruzi* grown in cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:37 – 46, 1977.

NITZ N, GOMES C, DE CÁSSIA ROSA A, D'SOUZA-AULT MR, MORENO F, LAURIA-PIRES L, NASCIMENTO RJ, TEIXEIRA AR. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. *Cell*, 118(2):175 – 186, 2004.

NORRIS KA, HARTH G, SO M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun*, 57: 2372- 2377, 1989.

NORRIS KA, BRADT B, COOPER N, SO M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Journal of Immunology*, 147: 2240 – 2247, 1991.

NORRIS KA, GALVÃO LMC, SCHRIMPF JE, CANÇADO JR, KRETTLI AU. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. *Infect Immun*, 62: 4072-4074, 1994

OELEMANN WMR, TEIXEIRA MGM, VERÍSSIMO DA COSTA GC, BORGES-PEREIRA J, DE CASTRO JAF, COURA JR, PERALTA JM. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas disease. *Journal of Clinical and Microbiology*, 36: 2423-2427, 1998.

OLIVAS-RUBIO M, HERNANDEZ-MARTÍNEZ S, TALAMÁS-ROHANA P, TSUTSUMI V, REYES-LÓPEZ PA, ROSALES-ENCINA JL. cDNA cloning and partial characterization of amastigote specific surface protein from *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol*, 9(6):1083 – 1091, 2009.

OLIVEIRA DA SILVA E, SARAIVA EMB, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W. Analysis of the surface of *T. cruzi* amastigote forms obtained from different sources. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 86:127, 1991.

PARIS L, TOUAFEK F, ELGHOZZI MH, CHÉRIF S, MAZIER D. Chagas disease in chronic phase outside the endemic area. The diagnostic tools. *Bull Soc Pathol Exot*, 102 (5): 319 – 325, 2009.

PERALTA JM, TEIXEIRA MG, SHREFFLER WG, PEREIRA JB, BURNS JM Jr, SLEATH PR, REED SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4): 971–974, 1994.

PEREIRA JB, JUNQUEIRA ACV, SANTOS LC, CASTRO JAF, ARAUJO IB, COURA JR 1996. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica. I. Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29: 241 - 247, 1996.

PEREIRA JB, WILLCOX HPF, MARCONDES CB, COURA JR. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 22: 39-44, 1989.

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

PIRON M, FISA R, CASAMITJANA N, LÓPEZ-CHEJADE P, PUIG L, VERGÉS M, GÁSCON J, PRAT JG, PORTÚS M, SAULEDA S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 103: 195 – 200, 2007.

PISSINATI JF, GOMES IT, PERUHYPE-MAGALHÃES V, DIETZE R, MARTINS-FILHO OA, LEMOS EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Journal of Immunology Methods*, 336(2):193 – 202, 2008.

PORTELA-LINDOSO AA, SHIKANAI-YASUDA MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Revista de Saúde Pública*, 37(1):107 – 115, 2003.

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

PRIMAVERA KSC, HOSHINO-SHIMIZU S, UMEZAWA ES, PERES BA, MANIGOT DA, CAMARGO ME. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol*, 26: 2101 – 2104, 1988.

PRIMAVERA KSC, UMEZAWA ES, PERES BA, CAMARGO ME, HOSHINO-SHIMIZU S. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote,

tripomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Rev. Inst. Med. Trop.* 32: 172 – 180, 1980.

RAMIRÉZ JD, GUHL F, UMEZAWA ES, MORILLO CA, ROSAS F, MARIN-NETO JA, RESTREPO S. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *Journal Clinical Microbiology*, 47: 3945 – 3951, 2009.

RAMOS-LIGONIO A, LÓPEZ-MONTEON A, TALAMÁS-ROHANA P, ROSALES-ENCINA JL. Recombinant Ssp-4 protein from *Trypanosoma cruzi* amastigotes regulates nitric oxide production by macrophages. *Parasite Immunol*, 26: 409–18, 2004.

RASSI A, LUQUETTI AO, ORNELAS JF, ERVILHA JF, RASSI GG, RASSI AJR, AZEREVO BVM, DIAS JCP. The impact of the extensive chemical control of *Triatoma infestans* on the incidence of acute cases and the prevalence of human Chagas disease. The example of Montalvânia, Minas Gerais State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(6): 719 – 727, 2003.

RASSI AJR, RASSI A, MARIN-NETO J. Chagas disease. *Lancet*, 375: 1388 – 1402, 2010.

ROMAÑA C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de La enfermedad de Chagas. La conjuntivitis quizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) *Publico MEPR*, 22: 16 – 28, 1935.

RUSSOMANDO G, DE TOMASSONE MM, DE GUILLEN I, ACOSTA N, VERA N, ALMIRON M, CANDIA N, CALCENA MF, FIQUEIREDO A. Treatment of congenital Chaga's disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 487 – 491, 1998.

SACKETT DL, HAYNES RB, GUYATT GH, TUGWELL P. *Diagnosis. Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine*, 9-170. 1991.

SANTOS LS, TORRES RM, MACHADO-DE-ASSIS GF, BAHIA MT, MARTINS HR, TEIXEIRA-CARVALHO A, COELHO-DOS-REIS JG, ALBAJAR-VIÑAS P, MARTINS-FILHO OA, LANA M. In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1):35 – 44, 2012.

SCHECHTER M, FLINT JE, VOLLER A. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease), *The Lancet*, 2: 939 – 941, 1983.

SCHENONE H, ROJAS A, CASTILLO D. Comparative study of sensitivity and mortality of Triatomainfestan nymphs III and IV used in the xenodiagnosis of chronic chagasic patients. Bol Chil Parasitol, 55(1-2): 14 – 17, 2000.

SCHENONE H. Tratamiento etiológico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas en niños de Chile. Rev Pat Trop, 27 (1): 33-34, 1998.

SCHENONE H, ALFARO E, ROJAS A. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico em la infección chagásica humana. Bol Chil Parasitol, 29: 24-26, 1974.

SCHENONE H, ALFARO E, REYES H, TAUCHER E. Valor Del xenodiagnóstico em la infección chagásica crônica. Bolletín Chileno Parasitología, 23: 149-154, 1968.

SCHIJMAN AG, ALTCHEH J, BURGOS JM, BIANCARDI M, BISIO M, LEVIN MJ, FREILIJ H. Aetiological treatment of congenital Chaga's disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. Journal of Antimicrobial and chemotherapeutic, 52: 441 – 449, 2003.

SCHIJAMAN AG, BISIO M, ORELLANA L, SUED M, DUFFY T, JARAMILLO AMM, CURA C, AUTER F, VERON V et al. International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLOS Neglected Tropical disease, 5(1): e931, 2011.

SCHMUNIS, GA. Prevention of Transfusional Trypanosoma cruzi Infection in Latin America. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94 (Suppl I): 93 – 101, 1999.

SCHMUNIS, GA. A Tripanossomíase Americana e seu Impacto na Saúde Pública das Américas. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1:1-12, 2000.

SCHOFIELD CJ & DIAS JCP. The Southern Cone initiative against Chagas disease. Advances in Parasitology, 42: 1-27, 1999.

SHADOMY SV, WARING SC, MARTINS-FILHO OA, OLIVEIRA RC, CHAPPELL CL. Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to Trypanosoma cruzi in domestic canines in Texas. Clin Diagn Lab Immunol, 11(2): 313 – 319, 2004.

SHIKANAI-YASUDA MA, LOPES MH, TOLEZANO E, UMEZAWA E, AMATONETO V, BARRETO AC, HIGAKI Y, MOREIRA AA, FUNAYAMA G, BARONE AA. Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo, 32(1): 16 – 27, 1990.

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

- SILVEIRA JF, UMEZAWA ES AND LUQUETTI AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, 17: 286-291, 2001.
- SOLARI A, CAMPILLAY R, ORTIZ S, WALLACE A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Experimental Parasitology*, 97: 226 – 233, 2001.
- SOSA-ESTANI S, SEGURA EL, RUIZ AMR, VELAZQUEZ E, PORCEL BM, YAMPOTIS C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, 59(4): 526-529, 1998.
- SOSA-ESTANI S & SEGURA EL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. *Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1): 363–365, 1999.
- STREIGER ML, DEL BARCO ML, FABBRO DL, ARIAS ED, AMICONE NA. 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, 2004.
- SWETS JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240: 1285 – 1293, 1988.
- TAMBOURGI DV, KIPNIS TL, DA SILVA WD, JOINER KA, SHER A, HEATH S, HALL BF, OGDEN GB. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect Immun*, 61(9):3656 – 3663, 1993.
- TAN H, ANDREWS NW. Don't bother to knock--the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitology*, 18(10):427-8, 2002.
- UMEKITA, LF, BARBARO KC, MOTA I. Specificity and role of anti-*Trypanosoma cruzi* clearance antibodies. *Braz. J. Med. Biol. Res*, 29:25–31, 1996.
- UMEZAWA ES, HOSHINO-SHIMIZU S, CAMARGO ME. Antigenos de *Trypanosoma cruzi*: comparação das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas na reação da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da doença de Chagas, abstr. I29. Abstr. VII Annu. Meet. Basic Res. Chagas' Dis. 1980.
- UMEZAWA ES, NADCIMENTO MS, KESPER N Jr, COURA JR, BORGES-PEREIRA J, JUNQUEIRA AC, CAMARGO ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *Journal Clinical Microbiology*, 34(9): 2143 – 2147, 1996.
- UMEZAWA ES, BASTOS SF, CAMARGO ME, YAMAUCHI LM, SANTOS MR, GONZALEZ A, ZINGALES B, LEVIN MJ, SOUZA O, RANGEL-ALDAO R AND

SILVEIRA JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1554-1560, 1999.

UMEZAWA ES, NASCIMENTO MS, STOLF AM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 39(3): 169 – 176, 2001.

UMEZAWA ES, BASTOS SF, COURA JR, LEVIN MJ, GONZALEZ A, RANGEL-ALDAO R, ZINGALES B, LUQUETTI AO, DA SILVA JF. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*, 43 (1): 91–97, 2003.

UMEZAWA ES, LUQUETTI A, LEVITUS G, PONCE C, PONCE E, HENRIQUEZ D, REVOLLO S, ESPINOZA B, SOUZA O, KHAN B AND SILVA JF. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: Results of a collaborative study in six Latin American Countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 449-452, 2004.

VEXENAT AC, SANTNA JM, TEIXEIRA AR. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38(3): 177 – 185, 1996.

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

VIOTTI R, VIGLIANO C, LOCOCO B, BERTECCHI G, PETTI M, ALVAREZ MG, POSTAN M, ARMENTI A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144: 724-734, 2006.

VITELLI-AVELAR D, SATHLER-AVELAR R, WENDLING APB, ROCHA RDR, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS NE, DIAS JCP, RASSI A, LUQUETTI AO, ELÓI-SANTOS, MARTINS-FILHO AO. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *Journal of Immunological Methods*, 318: 102-112, 2007.

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

WENDLING AP, VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, GEIGER SM, TEIXEIRA-CARVALHO A, GONTIJO ED, ELÓI-SANTOS SM, MARTINS-FILHO QA. The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. *Journal of Immunological Methods*, 370(1-2): 24 – 34, 2011.

WHO. Control of Chagas disease. WHO technical report series 905, World Health Organization, Geneva, 2002.

WHO - World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, 2010.

WINCKER P, BRITTO C, PEREIRA JB, CARDOSO MA, OELEMANN W, MOREL CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 51(6): 771 – 777, 1994.

YOSHIDA N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1): 87-111, 2006.

ZINGALES B, MILES AM, CAMPBELL DA, TIBAYRENC M, MACEDO AM, TEIXEIRA MMG, SCHIJMAN AG, LLEWELLYN MS, LAGES-SILVA E, MACHADO CR, ANDRADE SG, STURM NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012.

ZULANTAY I, APT W, VALENCIA C, TORRES A, SAAVEDRA M, RODRÍGUEZ J, SANDOVAL L, MARTÍNEZ G, THIEME P, SEPÚLVEDA E. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 2224 – 2226, 2011.

ZULANTAY I, HONORES P, SOLARI A, APT W, ORTIZ S, OSUNA A, ROJAS A, LÓPEZ B, SÁNCHEZ G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48: 253-257, 2004.

ZWEIG MH, CAMPBELL G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine (Review). *ClinChem*, 39: 561-577, 1993.

