

*CAMILA DE AGUIAR*

**PERFIL SOROLÓGICO E AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA PELA  
NESTED-PCR E HEMOCULTURA DE INDIVÍDUOS TRATADOS COM  
BENZONIDAZOL PARA A INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Campinas, 2011



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**PERFIL SOROLÓGICO E AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA PELA  
NESTED-PCR E HEMOCULTURA DE INDIVÍDUOS TRATADOS COM  
BENZONIDAZOL PARA A INFECCÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Camila de Aguiar

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação da Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa e co-orientação do Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Ag93p Aguiar, Camila de, 1986 -  
Perfil sorológico e avaliação parasitológica pela  
nested-pcr e hemocultura de indivíduos tratados com  
benzonidazol para a infecção por *trypanosoma cruzi*. /  
Camila de Aguiar. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa  
Coorientador: Eros Antonio de Almeida  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Chagas, Doença de. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3.  
Reação em cadeia de polimerase. 4. Terapêutica. I.  
Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Almeida, Eros Antonio  
de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Serological profile and parasitological evaluation with nested-PCR and hemoculture of benzonidazol treated individuals for *Trypanosoma cruzi* infection

**Palavras-chave em inglês:**

Chagas disease

*Trypanosoma cruzi*

Polymerase chain reaction

Therapeutic

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Mestre em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Sandra Cecília Botelho Costa [Orientador]

Gláucia Elisete Barbosa Marcon

Sílvia de Barros Mazon

**Data da defesa:** 26-08-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Camila de Aguiar

---

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Cecília Botelho Costa

---

---

### Membros:

---

1. Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Sandra Cecília Botelho Costa

*Sandra Costa*

---

2. Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sílvia de Barros Mazon

*Sílvia Mazon*

---

3. Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Gláucia Elisete Barbosa Marcon

*Gláucia Marcon*

---

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 26/08/2011

---

*Aos meus pais, com todo amor e carinho.*

## *AGRADECIMENTOS*

À dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela orientação e confiança em mais um trabalho.

Ao dr. Eros Antonio de Almeida, pela idealização e colaboração com este projeto.

À amiga e parceira de viagens Angelica Martins Batista, por toda paciência e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Cláudia, Emanuel, Fernanda, Josi, Mariane, Paula e Renata, pelos momentos de descontração. À Tycha, em especial, pela dedicação com as hemoculturas.

À equipe do GEDoCh, em particular à Dra. Maria Elena, Dr. Jamiro e Irene.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho, muita saúde e força.

Aos queridos amigos Carol, Dani, Débora, Inajara, Lara, Marcelo e Raquel, pelo apoio e torcida, mesmo de longe.

Aos amigos de Itapira, que de alguma forma contribuíram com esta realização.

Aos meus pais e minha irmã, por todo suporte e carinho fornecidos para a conquista de mais um objetivo.

Ao meu namorado Vitor, por me ouvir e confortar nos momentos de dificuldade.

*"A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais volta ao seu tamanho original."*

(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
1. Considerações gerais sobre a doença de Chagas.....	16
2. Agente etiológico.....	17
3. Modos de transmissão.....	21
4. Aspectos clínicos.....	24
4.1. Fase aguda.....	24
4.2. Fase crônica.....	25
4.3. Reativação em imunossuprimidos.....	26
5. Patogênese.....	27
6. Diagnóstico laboratorial.....	28
6.1. Xenodiagnóstico.....	28
6.2. Hemocultura.....	29
6.3. Testes sorológicos.....	30
6.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
7. Tratamento etiológico.....	34
7.1. Nifurtimox.....	35
7.2. Benznidazol.....	36
7.3. Indicação da terapêutica específica.....	37
7.4. Eficácia e monitoração terapêuticas.....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
<b>CAPÍTULO 1: Serological profiles and evaluation of parasitemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by <i>Trypanosoma cruzi</i> treated with benznidazole</b> .....	42
<b>CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Nomenclatura da atual classificação de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em relação às anteriores.....	19
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> ; seta <b>A</b> : cinetoplasto; seta <b>B</b> : núcleo celular.....	20
<b>Figura 2.</b> Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> <b>A</b> – Formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> . <b>B</b> – Detalhe do “pseudocisto” de parasitos.....	20
<b>Figura 4.</b> Esquema do ciclo de transmissão vetorial da doença de Chagas.....	22
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da <i>nested</i> -PCR.....	33
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do nifurtimox (a) e do benzonidazol (b).....	37

*RESUMO*

A doença de Chagas afeta aproximadamente 9 milhões de pessoas em todo mundo, sendo a maioria dessa população constituída de indivíduos cronicamente infectados, o que a caracteriza como um importante problema de saúde pública. O seu agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitido, principalmente, por meio de insetos vetores triatomíneos. Outras formas de transmissão podem ocorrer via transfusão sanguínea, congênita, oral ou acidental. Durante a fase aguda da doença, o diagnóstico laboratorial é baseado na observação direta do parasito, através de exames microscópicos de amostras de sangue de indivíduos infectados. Na fase crônica, devido à parasitemia intermitente e ao aumento de anticorpos anti-*T. cruzi*, são utilizados métodos sorológicos convencionais (IFI e ELISA) para o diagnóstico. Como métodos confirmatórios, podem ser usados testes parasitológicos indiretos (hemocultura e xenodignóstico), porém, ambos apresentam baixa sensibilidade nessa fase. O tratamento etiológico da infecção por *Trypanosoma cruzi* tem como objetivo a eliminação do parasito, o que pode retardar a evolução clínica da infecção e prevenir lesões futuras características da doença, como o comprometimento do tecido cardíaco ou de órgãos do trato digestivo. Há dois medicamentos principais para a terapêutica da doença de Chagas: o nifurtimox (indisponível no Brasil) e o benzonidazol, ambos com efeitos colaterais importantes. A eficácia do tratamento é maior em pacientes tratados na fase aguda da infecção ou naqueles que se encontram recentemente na fase crônica da doença. O maior problema do tratamento, além da baixa eficácia quando aplicado à fase crônica, é a avaliação do critério de cura. As técnicas parasitológicas disponíveis são pouco sensíveis para detecção do parasito e resultados negativos não indicam, necessariamente, cura. Além disso, os testes sorológicos convencionais geralmente permanecem positivos por um longo período após o tratamento, tornando-os inadequados para a monitoração terapêutica. Atualmente, estudos relatam a eficiência da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como uma ferramenta para a monitoração adequada do tratamento etiológico da doença de Chagas. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a *nested*-PCR (N-PCR) como uma alternativa na determinação da eficácia do tratamento etiológico com benzonidazol, comparando-a com os testes sorológicos convencionais e a hemocultura. Para isso, realizou-se um estudo retrospectivo em pacientes que realizaram o tratamento corretamente entre 1980 e 2010, todos com testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para doença de Chagas antes do

tratamento. Dos 29 pacientes incluídos no estudo, 14 (48,3%) apresentaram resultados positivos pela N-PCR, 12 (41,4%) apresentaram resultados negativos e 3 (10,3%) inconclusivos. Em relação à hemocultura, todos os pacientes (100%) tiveram resultados negativos. Os testes sorológicos mantiveram-se positivos após o tratamento em 27/29 (93%) dos casos, sendo 7% de resultados inconclusivos. Portanto, pode-se concluir que a avaliação de cura da doença de Chagas apresenta uma grande dificuldade para o controle dessa enfermidade e que a técnica de N-PCR pode contribuir com o estabelecimento de critérios confiáveis para a determinação da eliminação do parasito após tratamento específico, além de constatação precoce de falha terapêutica.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; reação em cadeia da polimerase; terapêutica.

*ABSTRACT*

Chagas disease affects 9 million persons around the world, the major of them chronic infected individuals, characterizing it as an important public health problem. Etiologic agent, named *Trypanosoma cruzi*, is a protozoan transmitted by triatominae insects. Other routes of transmission are via blood transfusion, congenital, oral or accidental. During the acute phase, laboratorial diagnosis are based on direct visualization of parasites on blood by microscopic tests. In chronic stage, because of the intermittent parasitemia and increased anti-*T. cruzi* antibodies, conventional serology (IIF and ELISA) is used for diagnosis. Hemoculture and xenodiagnosis could be performed as confirmatory methods, however, both are low of sensitivity in this stage. Etiologic treatment of *T. cruzi* infection is focused on the elimination of the parasites, which should arrest the evolution of the disease and avert its irreversible long-term consequences such as cardiac and digestive damage. There are two drugs for specific treatment of Chagas disease: nifurtimox (not available in Brazil) and benznidazole, both of them with considerable adverse effects. Therapeutic efficacy is more significant in the acute and recent chronic phase of infection. Besides the low efficacy of treatment in chronic patients, the major problem is the criteria of cure. Parasitological methods of routine are poor of sensitivity and negative results do not indicate cure, necessarily. In addition, conventional immunological tests remain positive during a long time after treatment and are not indicated to monitor chemotherapy. Recently, authors reported the usefulness of polymerase chain reaction (PCR) as an efficient tool of etiological treatment evaluation in Chagas disease. This work aimed to evaluate nested-PCR (N-PCR) as an alternative to determinate efficacy of etiological treatment with benznidazole in comparison to serology and hemoculture. It was carried out a retrospective study in treated patients between 1980-2010, all of them with positive serological and/or parasitological tests before treatment. Out of 29 individuals studied, 14 (48,3%) had positive N-PCR, 12 (41,4%) had negative and 3 (10,3%) inconclusive results. All patients (100%) had negative hemoculture and serology was positive in 27/29 (93%) of the cases, with 7% of inconclusive results. We conclude that criteria of cure is a great difficulty of Chagas disease control and N-PCR assay may contribute to determinate parasite clearance as well earlier therapeutic failure.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; polymerase chain reaction; therapeutic.

*INTRODUÇÃO GERAL*

## **1. Considerações gerais sobre a doença de Chagas**

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descrita há mais de 100 anos pelo médico brasileiro Carlos Chagas, em um feito único na história da medicina, no qual um único pesquisador foi responsável por elucidar diversas características de uma mesma enfermidade, como os aspectos clínicos, o agente etiológico e o vetor responsável por sua transmissão (Chagas, 1909).

Originalmente, a infecção chagásica é uma enzootia que ocorre há muitos séculos e seu ciclo silvestre é resultante da movimentação do agente etiológico entre reservatórios e vetores em um grande número de ecótopos naturais. A evolução para uma antropozoonose é muito mais recente e surgiu como consequência da inserção do homem no ambiente silvestre, o que propiciou uma devastação florestal capaz de aproximar vetores e reservatórios do parasito da população, paralelamente às condições sociais precárias encontradas em muitos países, que favoreceram o desenvolvimento do ciclo doméstico da doença (Cimerman & Cimerman, 2005).

A circulação natural do parasito e de seus vetores estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, delimitando uma área com mais de 20 países endêmicos (Muñoz-Saravia et al, 2010). Nos últimos anos, com o advento do movimento migratório da população latina para países não endêmicos, a doença tornou-se um problema de saúde mundial. O total de pessoas infectadas é estimado em 8 a 9 milhões (PAHO, 2009) sendo que, no Brasil, a população de doentes crônicos é de 2 a 3 milhões de indivíduos (Oliveira et al, 2008).



O número de mortes atribuídas à doença de Chagas é de, aproximadamente, 15.000 por ano, sendo a maior parte dos óbitos relacionados à população em idade produtiva. Além das perdas de cunho social, o impacto econômico da enfermidade é grande, devido ao seu caráter incapacitante para diversas atividades laborais e ao alto custo da atenção ao paciente infectado (Silveira, 2007).

## **2. Agente etiológico**

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), pertencente ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Assim como outros representantes da ordem Kinetoplastida, o *T. cruzi* possui uma organela característica, chamada cinetoplasto, que contém uma condensação de DNA extra nuclear (kDNA), constituído de moléculas organizadas em forma de maxicírculos e minicírculos (Prata, 2001). O material genético do kDNA pode representar até 30% do DNA celular total (De Souza, 1999) e tem sido utilizado na investigação de características moleculares do parasito (Souto et al, 1996; Vago et al, 2000; Manoel-Caetano et al, 2008).

Pesquisas com marcadores genéticos de *T. cruzi* têm sido realizadas na tentativa de correlacionar as diferentes cepas às suas propriedades biológicas distintas, bem como às características clínicas e epidemiológicas da infecção (Moncayo & Yanine, 2006). Em estudos iniciados por Miles et al. (1977), com parasitos de diferentes hospedeiros em várias regiões do Brasil, foram descritas três classes distintas, com base nos padrões específicos de um grupo de

enzimas. Estas classes ou “linhagens enzimáticas” foram designadas zimodemos (Z1, Z2 e Z3). Um zimodemo inclui todos os parasitos com padrões eletroforéticos idênticos para as enzimas estudadas. Posteriormente, duas linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi* (I e II) foram definidas através da amplificação de marcadores genéticos no DNA nuclear e no kDNA em amostras isoladas de diferentes hospedeiros. A linhagem I corresponde ao Z2, enquanto que o Z1 pertence à linhagem II; a posição do Z3 não pôde ser definida nestes achados (Souto et al, 1996). No Brasil, a linhagem I está relacionada, geralmente, ao ciclo selvagem do parasito, enquanto a linhagem II está presente principalmente no ciclo doméstico (Fernandes et al, 1998).

Atualmente, Zingales et al (2009) propuseram uma nova classificação para as cepas do parasito, a qual recomenda a adoção da nomenclatura baseada em seis tipos de DTUs (*discrete typing units*), denominados *T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI. Segundo Tibayrenc (1998), os DTUs são sequências geneticamente mais relacionadas entre si do que com qualquer outra e são identificadas por técnicas de sequenciamento, através de marcadores moleculares ou imunológicos. Elas representam unidades relevantes de pesquisa epidemiológica e, também, de estudos clínicos, de patogenicidade, de produção de vacinas e medicamentos, entre outros. A nomenclatura dos seis DTUs e sua equivalência com as classificações anteriores estão esquematizadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Nomenclatura da atual classificação de cepas de *Trypanosoma cruzi* em relação às anteriores.

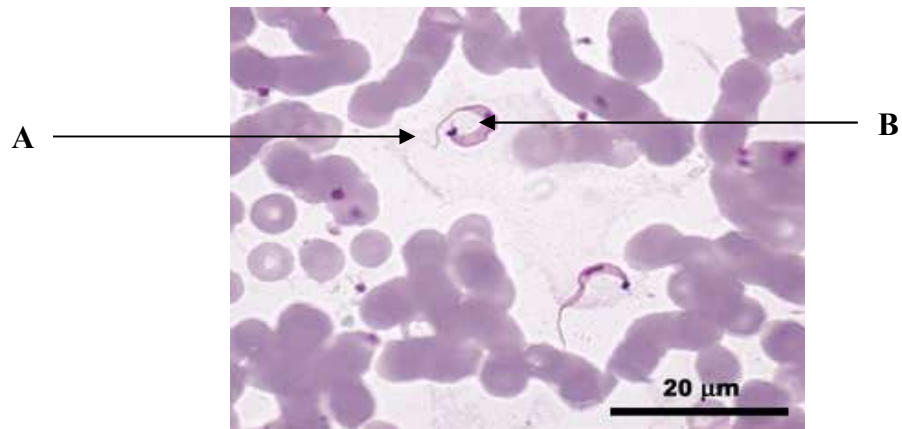
Nomenclatura DTU	Abreviação	Equivalência em relação aos grupos anteriores de <i>T. cruzi</i>
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I <sup>a,b</sup> e DTU I <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II <sup>a</sup> e DTU IIb <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT <sup>d</sup> , Z3-A <sup>e</sup> , DTU IIc <sup>c</sup> e <i>T. cruzi</i> III <sup>f</sup>
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 <sup>d</sup> , Z3-B <sup>e</sup> e DTU IIa <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Z2 Boliviano <sup>d</sup> , rDNA 1/2 <sup>g</sup> , clone 39 <sup>h</sup> e DTU II d <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Z2 Paraguai <sup>i</sup> , Zimodemo B <sup>j</sup> e DTU IIe <sup>c</sup>

a: Anônimo 1999; b: Falla et al. 2009; c: Brisse et al. 2000; d: Miles et al. 1981; DTU: *discrete typing units*; e: Mendonça et al. 2002; f: Freitas et al. 2006; g: Souto et al. 1996; h: Tybayrenc e Ayala 1991; i: Chapman et al. 1984; j: Carneiro et al. 1990.

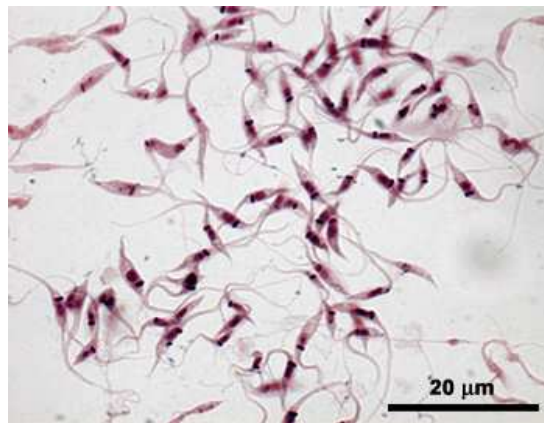
Fonte: Modificado de Zingales et al, 2009.

O ciclo biológico de *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, passando o parasito por uma fase de multiplicação extracelular em hospedeiro invertebrado (insetos triatomíneos) e intracelular em hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos de pequeno e médio porte). Os principais reservatórios silvestres são os marsupiais (especialmente os gambás), roedores, tatus, tamanduás, pequenos carnívoros (gatos e cachorros-do-mato), coelhos, vários tipos de macacos e morcegos (Neves, 2005).

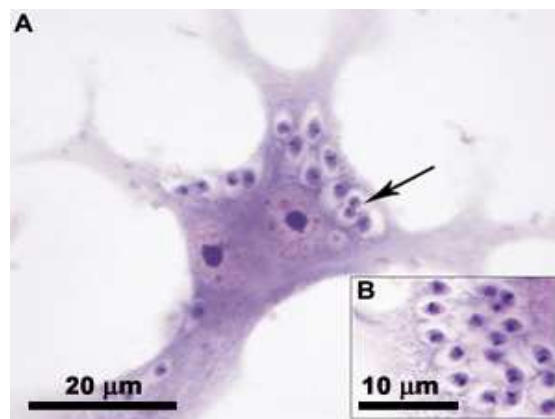
No complexo ciclo de vida do parasito, no mínimo três formas morfogenéticas podem ser reconhecidas: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas (Tanowitz et al, 1992). Tripomastigotas são os estágios infectantes não-replicativos do parasito, de morfologia fusiforme e alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo; são dotados de grande mobilidade e ocorrem na corrente sanguínea do vertebrado e nas porções distais do intestino do vetor (figura 1). Epimastigotas são as formas replicativas de *T. cruzi* encontradas no hospedeiro invertebrado ou em meio de cultura, dotadas de grande mobilidade; de morfologia alongada e cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo (figura 2). Amastigotas são formas esféricas ou ovaladas, destituídas de mobilidade e de flagelo livre; correspondem ao estágio de multiplicação intracelular nos hospedeiros vertebrados (figura 3) (De Souza, 2002; Cimerman & Cimerman, 2005).



**Figura 1.** Formas tripomastigotas de *T. cruzi*; seta **A**: cinetoplasto; seta **B**: núcleo celular.



**Figura 2.** Formas epimastigotas de *T. cruzi*.



**Figura 3.** **A** – Formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. **B** – Detalhe do “pseudocisto”.

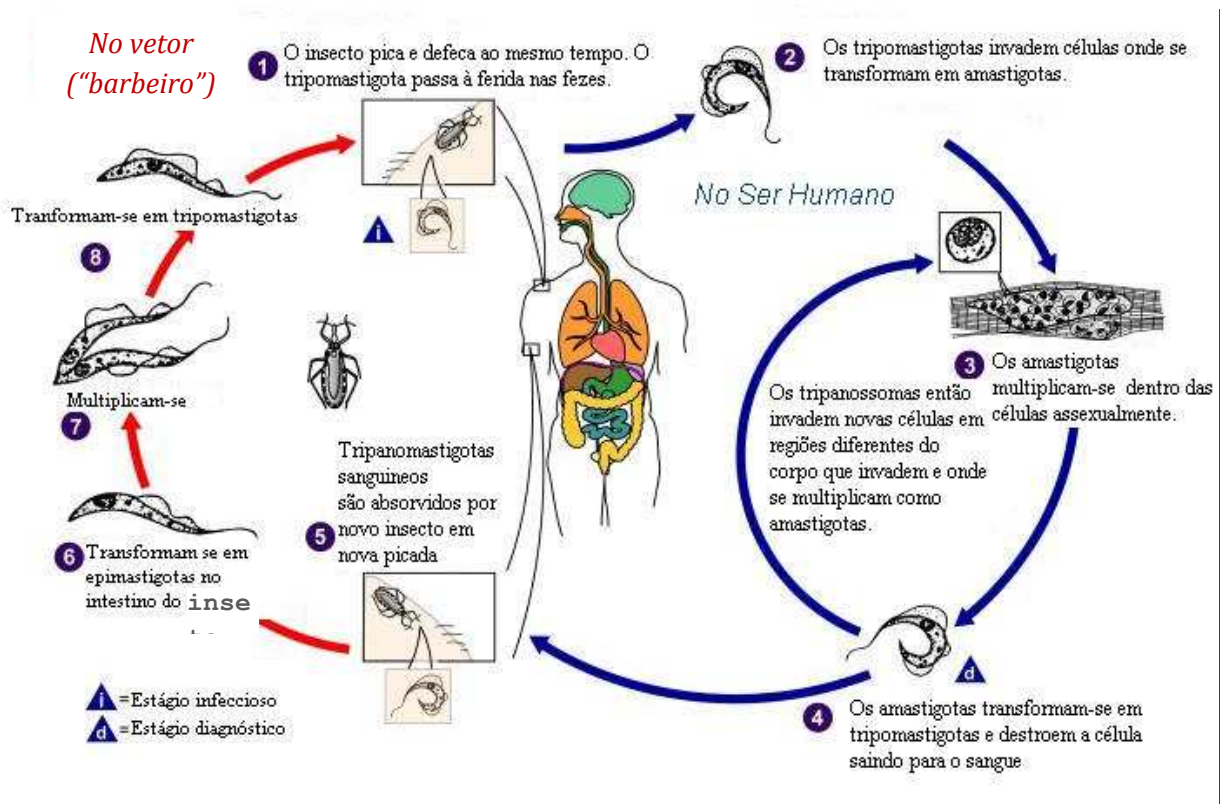
Fonte: FIOCRUZ, 2011.

### 3. Modos de transmissão

A transmissão natural da doença de Chagas é vetorial, através de insetos hematófagos conhecidos popularmente como “barbeiros”, pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. As principais espécies de triatomíneos envolvidos na transmissão da doença em países endêmicos são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* (Muñoz-Saravia et al, 2010). A colonização de habitações humanas por triatomíneos está relacionada à qualidade das construções, as quais conferem aos vetores locais adequados para se protegerem de predadores e abundante oferta alimentar (animais domésticos e pessoas). Desta forma, os habitats peridomiciliar e intradomiciliar criam um microambiente favorável aos triatomíneos, aumentando a taxa de transmissão da doença (WHO, 2002).

O inseto vetor pica os hospedeiros vertebrados infectados, sugando tripomastigotas presentes na corrente sanguínea. As formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas à medida que migram pelas diferentes porções do intestino do inseto (preferencialmente o intestino médio, onde multiplicam-se por divisão binária). Alguns desses epimastigotas transformam-se em tripomastigotas na porção final do tubo digestivo do inseto, em um processo denominado metaciclogênese, que gera as formas infectantes chamadas tripomastigotas metacíclicas (Coura, Moreira & Junqueira, 2008). Ao picar outro indivíduo, simultaneamente ao momento da hematofagia, o triatomíneo deposita suas fezes ou urina contaminadas com as formas infectantes de *T. cruzi* sobre a pele do hospedeiro vertebrado. Ao coçar essa região, o hospedeiro cria lesões imperceptíveis que permitem a entrada dos

parasitos na circulação. Os parasitos também podem penetrar através de mucosas da boca, nariz e olhos (WHO, 2002). Após a penetração, eles podem ser fagocitados por macrófagos ou invadir as células do hospedeiro, onde se transformam em amastigotas intracelulares (Tanowitz et al, 1992). O protozoário apresenta tropismo por células musculares estriadas e lisas, macrófagos e também por células epiteliais e fibroblastos. As formas amastigotas dividem-se repetidamente por divisão binária, formando “pseudocistos”, dentro dos quais ocorre a diferenciação das formas em tripomastigotas, que são liberados após a ruptura celular e, eventualmente, vão infectar outras células ou alcançar a corrente sanguínea, iniciando um novo ciclo (Coura, Moreira & Junqueira, 2008; De Souza, 2002). O ciclo de transmissão vetorial está representado na figura 4.



**Figura 4.** Esquema do ciclo de transmissão vetorial da doença de Chagas. *Fonte:* Modificado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

A partir da década de 90, as campanhas para controle e eliminação da infecção por *T. cruzi*, realizadas no continente americano com apoio das Organizações Mundial e Pan-Americana de Saúde (OMS/OPAS), em associação com governos nacionais e regionais, contribuíram para a interrupção da transmissão vetorial da doença em diversos países como Brasil, Chile e Uruguai, que foram declarados livres da transmissão por *Triatoma infestans*, o principal vetor domiciliar nessas regiões (WHO, 2002).

Outra forma de transmissão, comum em zonas urbanas, ocorre por meio da transfusão de sangue ou hemoderivados (exceto produtos liofilizados) e responde por aproximadamente 10% dos casos (Prata, 2001). Entretanto, indivíduos que recebem múltiplas transfusões, como hemofílicos, pacientes com outras doenças hematológicas ou aqueles que sofrem diálise, possuem uma chance 8,7 vezes maior de contaminação por *T. cruzi* (Schmunis, 1999). A terceira rota mais frequente é a congênita, com uma incidência anual de 5.000-18.000 casos por ano, inclusive em áreas não endêmicas. A probabilidade de infecção do bebê através da mãe chagásica varia de 1 a 10% (Prata, 2001). Atualmente, um modo de transmissão da doença de Chagas que tem ganhado destaque é a via oral, através da ingestão de alimentos com fezes contaminadas de triatomíneos ou urina de reservatórios silvestres, principalmente o suco da cana-de-açúcar (na região Sul) e do açaí (na região Norte) (Ianni & Mady, 2005; Valente, Valente & Pinto, 2001). Outros mecanismos esporádicos incluem a contaminação acidental por trabalhos laboratoriais e o transplante de órgãos (Prata, 2001).

## **4. Aspectos clínicos**

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases: aguda, logo após a entrada do parasito no organismo, e crônica, que se inicia após algumas semanas da infecção e perdura por toda a vida do indivíduo. Não há cura espontânea da doença (Cançado, 1999).

### **4.1. Fase aguda**

A fase aguda da infecção por *T. cruzi* é caracterizada, geralmente, pela ausência de manifestações clínicas, embora uma reação inflamatória cutânea na porta de entrada do parasito conhecida como chagoma, seja comum. Crianças ou, raramente, adultos, podem apresentar sintomas mais graves após um período de incubação de 7 a 14 dias. Esses sintomas podem incluir um edema indolor acima dos olhos ou em um só lado da face, característico da doença, chamado sinal de Romaña, além de conjuntivite, febre, náusea, vômito, diarreia, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Uma pequena porcentagem dos pacientes desenvolve miocardite severa ou meningoencefalite, podendo evoluir a óbito (2% a 8% dos casos) (Coura & Castro, 2002). Nesses pacientes, formas amastigotas são facilmente encontradas em células cardíacas e musculares esqueléticas. A maior parte dos indivíduos infectados recupera-se totalmente após três a quatro meses e, por isso, muitas vezes a doença não é diagnosticada na fase aguda (Tanowitz, 1992; Ribeiro & Rocha, 1998). O número de parasitos que entram em contato com o hospedeiro na infecção inicial é um fator de grande importância no desenvolvimento da doença. Em condições naturais, esse número é pequeno o que,



possivelmente, explica as discretas manifestações da fase inicial da infecção (Coura & Castro, 2002).

#### **4.2. Fase crônica**

Em todos os indivíduos infectados, a fase crônica da doença de Chagas inicia-se com um período assintomático, a forma indeterminada ou latente. Durante esse estágio, apesar de comprovada a infecção por *T. cruzi*, não há lesões aparentes e os estudos eletrocardiográficos e radiológicos do coração, esôfago e cólon aparecem normais. Mais de 50% dos indivíduos permanecem na forma indeterminada por toda a vida e muitos desconhecem a presença da doença, sendo comum a descoberta ao acaso, através de exames admissionais ou testes para triagem de doadores em bancos de sangue (Moncayo & Yanine, 2006). Após um período de latência de 10 a 15 anos, os pacientes podem evoluir para três tipos principais da doença: as formas cardíaca, digestiva ou mista.

A forma cardíaca é a mais expressiva manifestação clínica da doença, por sua frequência e gravidade. Ela atinge cerca de 30% da população infectada de áreas endêmicas, principalmente entre 20 e 40 anos (Coura, 2007). Na grande maioria dos casos, a sintomatologia é caracterizada por cardiomiopatia dilatada associada com miocardite, fibrose e disfunção cardíaca (FIOCRUZ, 2011). A morte súbita é uma característica da cardiopatia chagásica, que ocorre em 38% dos casos, correspondente a 6.000 mortes anuais, só no Brasil (Prata, 2001; Xavier et al, 2005).

A forma digestiva afeta de 15% a 20% da população infectada em áreas endêmicas e, geralmente, manifesta-se anteriormente à forma cardíaca. Embora as manifestações cardíacas

sejam comuns a todas as áreas geográficas onde a doença existe, a digestiva praticamente não ocorre em pacientes que vivem nos países americanos situados acima da linha do Equador. Todavia, ela é endêmica no Brasil Central, em áreas dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia, além de presente no Chile, Argentina e Uruguai. A manifestação mais frequente é o megaesôfago, vindo em seguida o megacólon (Malta, 1996). A maior incidência das formas cardíaca ou digestiva dependendo da região analisada pode ser explicada pela existência de diferentes cepas do parasito, além de mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro e na resposta imune do indivíduo (Manoel-Caetano & Silva, 2007). A desordem motora do esôfago, também conhecida como acalásia, acarreta em dificuldade para ingestão dos alimentos, que ficam em grande parte retidos no esôfago, causando a progressiva dilatação deste órgão, caracterizando o megaesôfago (FIOCRUZ, 2011). As alterações de motilidade do cólon provocadas pela doença de Chagas levam a um aumento de seu diâmetro e longitude (megacólon), sendo sua manifestação clínica inicial a constipação; a associação desses casos com o megaesôfago é frequente (Lazzari, 2007). A forma mista é caracterizada pela manifestação simultânea das formas cardíaca e digestiva.

#### **4.3. Reativação em imunossuprimidos**

Condições ou substâncias que provoquem imunossupressão em indivíduos infectados por *T. cruzi* podem reativar a doença de Chagas, com alta proliferação de parasitos, aparecimento de lesões cerebrais necróticas ou tumorais (75% dos casos) e intensificação de miocardite (44% dos casos). Esta condição está frequentemente associada às doenças como

leucemia e outras neoplasias, à co-infecção com o HIV (contagem de células CD4+ abaixo de 200/uL) e ao transplante de órgãos. Em relação aos pacientes co-infectados, durante a reativação, há um expressivo aumento da parasitemia, independentemente da forma clínica da doença. São frequentes a miocardite aguda, a cardiopatia exacerbada e a insuficiência cardíaca congestiva. O quadro clínico apresenta ainda manifestações sistêmicas como febre e sintomas de meningoencefalite (Prata, 2001). Sem tratamento, ou com tratamento tardio, a mortalidade da meningoencefalite por reativação da doença de Chagas em pacientes co-infectados é muito alta atingindo, praticamente, 100% dos indivíduos (Brasil, 2008).

## **5. Patogênese**

Duas hipóteses principais foram formuladas na tentativa de esclarecer os mecanismos patogênicos da doença de Chagas: a da autoimunidade e a da persistência do parasito. A primeira hipótese determina que a infecção por *T. cruzi* induz respostas imunes que são direcionadas aos próprios tecidos do hospedeiro, provocando lesões inflamatórias independentes do parasito. A segunda hipótese relaciona a presença do agente etiológico em regiões específicas dos tecidos do hospedeiro a uma reação inflamatória crônica, resultante do rompimento das células parasitadas. Por um longo período, a primeira hipótese prevaleceu sobre a segunda, uma vez que lesões eram identificadas em tecidos com aparente ausência de parasitos (Coura & Castro, 2002). Entretanto, o aparecimento de novas técnicas como a imunohistoquímica, reação em cadeia da polimerase e hibridização *in-situ*, proporcionou evidências de que parasitos persistem nos tecidos de pacientes na fase crônica da doença. Em teoria, portanto, seria sempre possível obter um resultado favorável em pacientes infectados

através da administração de um parasiticida eficiente (Moncayo & Yanine, 2006).

## **6. Diagnóstico laboratorial**

Os métodos laboratoriais de diagnóstico apresentam diferentes resultados de sensibilidade se aplicados na fase aguda ou crônica da doença. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia e início da formação de anticorpos anti-*T. cruzi* específicos, principalmente IgM. Sendo assim, o diagnóstico nessa fase é baseado na pesquisa direta de parasitos, que podem ser visualizados em microscopia óptica, a partir de exames de sangue a fresco, gota espessa ou esfregaço corado com Giemsa. Se necessário, podem ser usados métodos parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico e hemocultura. Na fase crônica, a quantidade de parasitos circulantes é muito baixa, inviabilizando os testes parasitológicos diretos para detecção de *T. cruzi*. A presença de anticorpos IgG aumenta consideravelmente e os testes sorológicos de rotina tornam-se o método padrão para o diagnóstico, assim como na triagem de doadores de sangue e em inquéritos epidemiológicos (Coura, Moreira & Junqueira, 2008). Os testes parasitológicos indiretos podem ser usados no esclarecimento de casos duvidosos, entretanto, possuem baixa sensibilidade devido à parasitemia intermitente em pacientes crônicos (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

### **6.1. Xenodiagnóstico**

Para a realização do xenodiagnóstico, são acondicionados cerca de 40 exemplares de triatomíneos, de uma determinada espécie, em quatro pequenas caixas de madeira ou de

plástico, cobertas por uma fina camada de tecido. As caixas são colocadas diretamente sobre a pele do paciente com suspeita da doença, para a alimentação dos insetos. Após 30 a 40 dias do repasto sanguíneo, o conteúdo intestinal dos insetos é analisado microscopicamente para a detecção de parasitos. Esse método possui sensibilidade de 13% até 50% em indivíduos sorologicamente positivos (Coura, Moreira & Junqueira, 2008). O emprego rotineiro dessa técnica fica restrito devido não somente à sua baixa sensibilidade, mas também pelas limitações da técnica, como o tempo prolongado para o resultado final (até 90 dias), necessidade de manter triatomíneos vivos em laboratório, perdas dos insetos durante o período de teste e reação alérgica do paciente à aplicação repetida do exame (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

## **6.2. Hemocultura**

A hemocultura baseia-se no enriquecimento de amostras sanguíneas através de um meio para cultivo de *T. cruzi*, geralmente o LIT (*liver infusion tryptose*). As amostras são mantidas em incubação por um período no qual são feitas visualizações ao microscópio óptico, geralmente mensais, para identificar a presença de parasitos. A sensibilidade desse método varia de 0% a 98%, dependendo de fatores relacionados ao protocolo adotado, como volume de sangue, temperatura de processamento e incubação, presença de anticoagulantes e meio de cultura utilizado (Krettli, 1999). Algumas modificações da técnica, como a elevação do tempo de cultivo para 120 dias e a diminuição do tempo entre a coleta da amostra e o seu processamento, foram responsáveis pelo aumento da taxa de detecção de parasitos (Luz,

1999). Além da sensibilidade variável, a hemocultura demanda tempo para a obtenção dos resultados e exige cuidado na manipulação das amostras para evitar contaminação.

### 6.3. Testes sorológicos

Usualmente, o diagnóstico é baseado nos resultados de testes imunológicos, não só pela maior facilidade de execução como também por fornecerem resultados em prazos curtos, diferentemente dos métodos parasitológicos já mencionados (Malta, 1996). Esses testes se baseiam na detecção de anticorpos desenvolvidos pelos chagásicos durante a fase crônica, predominantemente da classe IgG, contra uma complexa mistura de antígenos do parasito (Moncayo & Yanine, 2006). De acordo com Consenso em Doença de Chagas, considera-se indivíduo infectado aquele que apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* detectados por meio de dois testes sorológicos de princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas (Brasil, 2005). O uso de antígenos múltiplos permite uma melhor sensibilidade, porém aumenta a probabilidade de resultados falso-positivos por reatividade cruzada, principalmente nas áreas endêmicas para outras espécies próximas ao *T. cruzi*, como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma rangeli* (Moncayo & Yanine, 2006). Os títulos de anticorpos são variáveis e não estão correlacionados com a gravidade da doença (Cançado, 1999).

As técnicas mais utilizadas para o diagnóstico são as reações de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Maya et al, 2010). A HAI gera resultados em cerca de duas horas e não precisa de equipamentos sofisticados ou técnicos especializados para ser realizada; entretanto, sua sensibilidade (96% a 98%) é menor que as outras técnicas citadas. Os testes de IFI e ELISA

possuem excelente sensibilidade (virtualmente 100%), mas levam algumas horas para produzirem os resultados e precisam ser executados por pessoas qualificadas. A concordância entre os resultados apresentados pela análise simultânea dos três testes é de 95% (Moncayo & Yanine, 2006).

Alguns autores (Krettli, 1999; Krautz, Kissinger & Krettli, 2000) relataram o potencial do teste imunológico de lise mediada por complemento (LMCo), que identifica anticorpos líticos no soro de pacientes crônicos, para monitoração terapêutica. A presença desses anticorpos é indicativa de uma infecção ativa por parasitos vivos, enquanto seu desaparecimento, após tratamento específico, poderia estar relacionado à cura. Entretanto, a utilização da LMCo ainda é controversa, por ser uma técnica laboriosa e que consome tempo para ser executada, uma vez que necessita de tripomastigotas vivos, soro humano para obtenção do complemento e contagem de grande número de parasitos através de microscopia óptica (Gomes et al, 1999).

#### **6.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

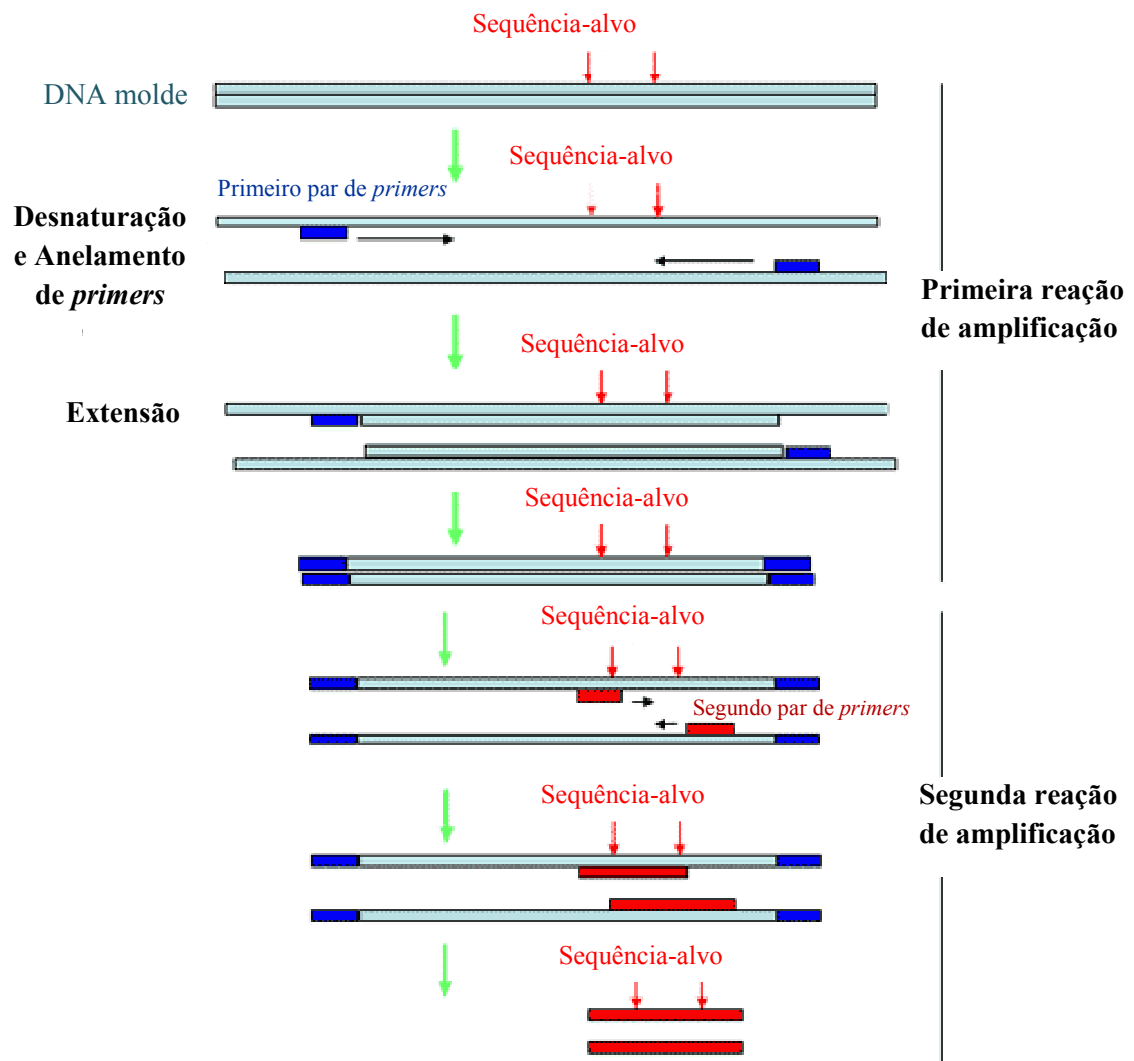
A PCR consiste na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, o que facilita uma enorme variedade de manipulações subsequentes, como a detecção de parasitos em testes diagnósticos. A região do DNA genômico a ser sintetizada é determinada por dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), que se anelam especificamente às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento genético que será

amplificado. A reação é submetida a diversos ciclos de amplificação com alternância da temperatura, constituídos de três etapas:

- desnaturação do DNA;
- anelamento dos *primers* às suas sequências complementares;
- extensão dos *primers* anelados pela ação da enzima DNA polimerase.

Os *primers* hibridizam as duas fitas da molécula em direções opostas e a síntese do DNA ocorre na região delimitada por eles, efetivamente dobrando a quantidade daquele segmento de DNA. Além disso, uma vez que os produtos da extensão são também complementares e capazes de serem ligados aos *primers*, cada ciclo dobra a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior. Ao final do processo, tem-se o acúmulo exponencial do fragmento de DNA utilizado, resultando em milhões de cópias (Saiki et al, 1988). Uma variação da PCR é a reação denominada *nested-PCR* (N-PCR), a qual foi padronizada em anteriormente em nosso laboratório e que necessita de dois conjuntos de *primers*, os quais são usados para amplificar uma região mais específica da sequência alvo. O segundo par de *primers* amplifica um fragmento menor de DNA localizado no interior do produto da primeira reação de amplificação (Marcon et al, 2002) (figura 5).





**Figura 5.** Representação esquemática da *nested*-PCR. Fonte: Modificado de <http://www.pcrstation.com/nested-pcr>.

A detecção do DNA de *T. cruzi* com base na PCR tem se mostrado eficiente para o diagnóstico da doença de Chagas em pacientes na fase crônica da doença (Ávila et al, 1993; Gomes et al, 1999; Castro et al, 2002; Piron et al, 2007), inclusive para elucidação de resultados negativos ou inconclusivos da sorologia (Salomone et al, 2003; Batista et al, 2010).

A região genômica do kDNA é organizado em uma estrutura com milhares de pequenas moléculas circulares, os minicírculos, representando 95% do conteúdo de kDNA da célula. Essas moléculas apresentam características que as tornam alvos para detecção pela PCR, considerando que há sequências de DNA altamente conservadas presentes em todas as cepas e isolados representativos das diferentes linhagens de *T. cruzi*. O alvo de amplificação do kDNA é um fragmento específico de 120 pb ("região conservada" do minicírculo) ou 330 pb ("região variável" do minicírculo) (FIOCRUZ, 2011).

Considerando o DNA nuclear do parasito, o alvo de detecção da PCR corresponde a uma família de sequências repetidas de 195 pb, que constitui aproximadamente 9% do total de seu material nuclear. Moser, Kirchhoff & Donelson (1989), conseguiram amplificar com sucesso um segmento de 188pb a partir dessa sequência repetitiva após a construção de iniciadores designados TCZ1 e TCZ2. Em estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório, Marcon et al (2002) utilizaram essa mesma região para a padronização da N-PCR, com a amplificação de um segmento mais específico de 149pb (interno ao de 188pb), a partir dos iniciadores denominados TCZ3 e TCZ4.

## **7. Tratamento etiológico**

Os dois medicamentos disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas são o nifurtimox e o benzonidazol, lançados há mais de 40 anos e sem resposta terapêutica satisfatória. Embora haja divergências quanto às taxas de cura da doença, há consenso sobre a

sua utilidade, dependendo de fatores como a fase da doença, idade do paciente e condições associadas (Brasil, 2005). A comprovação de cura, especialmente na fase crônica, depende de fatores como o tempo de seguimento e os exames utilizados, sendo uma das principais dificuldades relacionadas à terapêutica específica, juntamente com a ausência de novas drogas, resultante, entre outros fatores, da falta de interesse das indústrias farmacêuticas devido ao baixo retorno econômico. Apesar da existência de alguns estudos com drogas de potencial tripanocida, como o alopurinol e seus análogos cetoconazol e itraconazol, nenhum medicamento superior ao benzonidazol e nifurtimox foi desenvolvido até o momento (Maya et al, 2010).

O mecanismo de ação de ambos os medicamentos é por meio da formação de metabólitos nucleofílicos e/ou radicais livres intermediários, principalmente o hidroxila, que se liga a lipídios, proteínas e DNA, afetando o parasito, em todas as suas formas. Como consequência, os tecidos do hospedeiro também podem ser danificados, gerando reações adversas indesejadas (Oliveira et al, 2008).

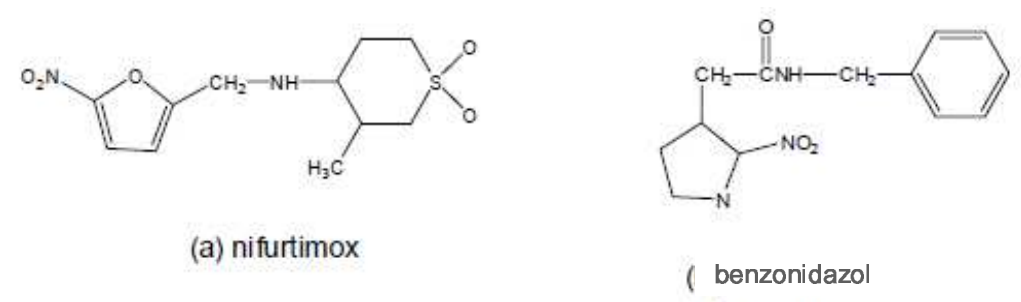
### **7.1. Nifurtimox**

O nifurtimox (figura 6-a) é um nitrofurano produzido pelo Laboratório Bayer e lançado em 1967 com o nome comercial de Lampit®, sendo a primeira droga usada no tratamento agudo da doença de Chagas. A dose indicada depende do estágio da doença e varia de 8-12mg/kg/dia por um período de 30 a 120 dias. Na fase crônica da doença, a dose recomendada é de 8-10mg/kg/dia por um período de 30 a 90 dias. Os efeitos adversos mais comuns do

tratamento com nifurtimox são: anorexia, perda de peso, alterações psicológicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas, como náusea, vômito e, ocasionalmente, cólica intestinal e diarreia. Desde a década de 80, a comercialização desse medicamento foi suspensa em alguns países, como Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (Coura & Castro, 2002).

## **7.2. Benzonidazol**

O benzonidazol (figura 6-b) é um nitroimidazol produzido originalmente pelo Laboratório Roche, em 1972, como Rochagan® ou Radanil® (Argentina). Entretanto, em 2003, a tecnologia de produção desse medicamento foi transferida para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), no Brasil (Jannin & Villa, 2007). A dose recomendada é de 5-7,5mg/kg/dia por um período de 30 a 60 dias. Embora menos tóxico para o indivíduo infectado, o benzonidazol também apresenta reações adversas importantes, que podem ser classificadas em três grupos: a) sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas (geralmente entre o sétimo e o décimo dia de tratamento, acometendo 20% dos pacientes), edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor muscular e nas articulações; b) depressão da medula óssea, trombocitopenia e agranulose (mais severa); c) parestesia e polineurite dos nervos periféricos. Dependendo da gravidade da reação alérgica, o medicamento deve ser imediatamente suspenso e deve-se iniciar a conduta terapêutica adequada para controlar os sintomas (Coura & Castro, 2002).



**Figura 6.** Estrutura química do nifurtimox (a) e do benzonidazol (b). *Fonte:* Coura & Castro, 2002.

### 7.3. Indicação da terapêutica específica

O tratamento para infecção por *T. cruzi* é extremamente recomendado para todos os casos agudos e congênitos, em reativações e em indivíduos com idade inferior a 18 anos. Em adultos com até 50 anos de idade, sem lesões avançadas, como cardiomegalia grave e megaesôfago com indicação cirúrgica, o tratamento também é indicado; acima dos 50 anos, é considerado opcional (Oliveira et al, 2008). Segundo Coura & Castro (2002), a administração do benzonidazol e nifurtimox não é recomendada a gestantes, pessoas muito debilitadas e em casos de doenças severas associadas, como infecções sistêmicas, insuficiências cardíaca, respiratória, renal ou hepática, hemopatias e neoplasias sem possibilidade de tratamento.

### 7.4. Eficácia e monitoração terapêuticas

Durante a fase aguda da doença, a porcentagem de cura após o tratamento etiológico ocorre em aproximadamente 70% dos casos (Marin-Neto et al, 2009). Cançado (1999) reportou 76% de cura em 21 pacientes agudos tratados com benzonidazol. Na fase crônica, entretanto, as taxas de cura parasitológica são estimadas em 10% a 20% dos casos. Acrescida

ao problema da terapêutica específica, uma dificuldade enfrentada pelos pesquisadores refere-se ao critério de cura, ou seja, o conjunto de parâmetros (clínicos e laboratoriais) utilizados na verificação da eficácia do tratamento de um paciente (Neves, 2005).

Em relação aos testes parasitológicos convencionais (xenodiagnóstico e hemocultura), a avaliação de cura após o tratamento na fase aguda da doença não é difícil, uma vez que a parasitemia é inicialmente alta e diminui dentro de um mês após o uso de medicamentos. O maior problema ocorre durante a fase crônica, quando a parasitemia é intermitente e há dificuldade de encontrar parasitos mesmo antes do tratamento, além do longo tempo de realização dos testes (até quatro meses) (Britto et al, 2001). Resultados negativos de testes parasitológicos analisados isoladamente, mesmo quando consecutivos após um longo período, não indicam a total erradicação do parasito, devido a condição intermitente da parasitemia (Cançado, 1999). Por outro lado, resultados positivos em qualquer momento indicam o fracasso terapêutico.

A negatividade dos testes imunológicos tem sido considerada como o único método tradutor de cura, uma vez que seria a consequência da eliminação do parasito no indivíduo infectado. Entretanto, o tempo necessário para a negatificação é variável e depende da fase da doença, sendo de 3-5 anos para a fase aguda, um ano para a infecção congênita, 5-10 anos para a fase crônica recente e acima de 20 anos na fase crônica de longa duração (Brasil, 2005). Os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* podem cair, embora esse fato não esteja, necessariamente, relacionado com a cura da doença, uma vez que alguns pacientes de longo seguimento manifestaram evolução clínica da infecção (Prata, 2001).

Uma ferramenta promissora para o monitoramento do tratamento específico da doença de Chagas é a PCR, que tem se mostrado sensível e específica para a rápida detecção

da suscetibilidade do parasito ao medicamento, permitindo modificação precoce da terapêutica em casos de resistência ou reativação da infecção chagásica (Muñoz, Murcia & Segovia, 2011). Diversos trabalhos apresentam a eficiência da técnica em relação aos testes parasitológicos convencionais, além fornecer resultados em menor tempo de seguimento pós-terapêutico do que os testes sorológicos (Gomes et al, 1999; Britto et al, 2001; Lacunza et al, 2006; Miyamoto et al, 2008; Murcia et al, 2010). Atualmente, está em andamento um estudo internacional multicêntrico denominado BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*), que tem dois objetivos principais: a) investigar, através de métodos baseados na PCR, se o tratamento etiológico com benzonidazol reduz significativamente a carga parasitária dos indivíduos tratados, bem como os efeitos adversos causados pelo medicamento; b) determinar se a terapêutica específica reduz a mortalidade e o seu impacto na evolução clínica de pacientes crônicos com a forma cardíaca da doença (Marin-Neto et al, 2009). Os resultados finais desse projeto são esperados para 2012-2013, a partir dos quais muitos aspectos a respeito da relevância do tratamento específico para a doença de Chagas serão elucidados.

Deste modo, a busca por uma alternativa mais sensível para o estabelecimento do critério de cura em pacientes crônicos da doença de Chagas, como a PCR, configura um dos principais objetivos relacionados ao controle desta enfermidade, uma vez que permitirá conclusões mais confiáveis sobre estudos acerca do desenvolvimento de novos medicamentos e contribuirá com o monitoramento adequado da terapêutica específica da infecção.

*OBJETIVOS*



- ✓ Avaliar a eficiência da *nested*-PCR na determinação de cura parasitológica da infecção por *T. cruzi* após o tratamento etiológico;
  
- ✓ Comparar os resultados de testes sorológicos e parasitológicos de pacientes crônicos tratados com benzonidazol para doença de Chagas.

*CAPÍTULO 1: Serological profiles and evaluation of parasitemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benzonidazole*

## **Serological profiles and evaluation of parasitemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole**

Camila Aguiar, Angelica M. Batista, Tycha B. S. Pavan, Eros A. Almeida, Maria E. Guariento, Jamiro S. Wanderley, Sandra C. B. Costa

Authors' affiliation: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, São Paulo, Brazil.

Address for correspondence: Sandra Cecília Botelho Costa, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, PO Box 6111, zip code: 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Tel.: 55 19 35219215

Fax: 55 19 32894107

Email address: costa@fcm.unicamp.br

**Submetido em 06/06/2011 a:** *Tropical Medicine and International Health.*

### **Abstract**

**OBJECTIVE:** This study aimed to evaluate the serological and parasitological status of patients with chronic Chagas disease after chemotherapy with benznidazole.

**METHODS:** A retrospective study was carried out with patients treated with benznidazole (5mg/Kg/day for 60 days) between 1980 and 2010. Twenty-nine patients who had Chagas disease confirmed by two reagent immunological tests and/or one positive xenodiagnosis before treatment were included. Conventional serology (ELISA and IIF) and parasitological tests (hemoculture and N-PCR) were performed.

**RESULTS:** At the time of treatment, the mean age of patients was  $36 \pm 7.24$  years old (20-39 years) and the time post-treatment varied from 1-29 years. After chemotherapy, 100% (29/29) of individuals had reagent ELISA and 93.1% (27/29) had positive results for IIF test. *T. cruzi* DNA was detected by N-PCR in 48.3% (14/29) of the cases. Negative results were observed in 41.4% (12/29) and inconclusive in 10.3% (3/29) of the samples. Hemoculture was negative for all individuals.

**CONCLUSIONS:** Our results suggest that N-PCR may be useful in early identification of therapeutic failure of Chagas disease. Although it is difficult to determine parasitological cure in negative N-PCR cases, we can infer that this condition represents a declination of parasitemia as a favorable consequence of etiological treatment.

## 1. Introduction

Chagas disease (CD) is a parasitological infection caused by *Trypanosoma cruzi* protozoan that remains as an important public health problem even after 101 years of its description (Chagas 1909). There is a statement of 8 to 9 million affected people around the world, especially in countries of Latin America where the vectorial transmission by triatomine insects is responsible for 40,000 new cases reported yearly (PAHO 2009). Other important routes of infection are blood transfusion, organ transplantation, congenital transmission and oral contamination (Moncayo & Yanine 2006). The acute phase is asymptomatic in most cases or can present mild and non specific clinical symptoms. In about one third of all cases, chronic form is characterized by lesions on heart, esophagus and colon tissues, with severe disorders of nerve conduction of these organs (Urbina 1999). In chronic stage, intermittent parasitemia is common and antibodies (IgG) against *T. cruzi* are frequently detected by conventional immunological tests. Xenodiagnosis and hemoculture present limited sensitivity in this stage because of the lack of parasites in blood and cannot be useful to diagnosis (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda 2003).

Two different mechanisms are considered to explain the pathogenesis of CD: the hypothesis of autoimmunity and the parasite persistence hypothesis. The first one prevailed for a long time as a dogma based on the apparent absence of parasites in damaged tissues of chronic patients. This observation suggests that *T. cruzi* infection induces inflammatory responses to host's tissues and it does not depend on the parasite persistence. However, recent studies using molecular assays-based methods have reported the presence of parasites in damaged tissues of cardiac and digestive chronic patients (Vago *et al.* 1996; Marcon *et al.* 2011) reinforcing the parasite persistence hypothesis. CD lacks effective treatment in all its phases and no immunoprophylaxis is available. The drugs available are nifurtimox (Lampit®) and benznidazole (Rochagan®). Both drugs may be

administrated orally for a minimum period of 30 days for nifurtimox (8-10 mg/kg/day) and 60 days for benznidazole (5-7mg/kg/day) trying to eradicate the parasites. In acute stage, these drugs are strongly recommended with an incidence rate of cure about 70%. In chronic phase, however, there is a disagreement about therapy utility because of allergic reactions, low cure rates and absence of criteria of cure (Marin-Neto *et al.* 2009). Side-effects could limit the use of these drugs in some cases, mainly nifurtimox, unavailable in some countries, like Brazil, because of its toxicity. Late chronic patients could be treated aiming to prevent or reduce evolution of lesions, with a parasitological cure estimated in 10-20% according to different analysis. In addition to the lower efficacy of etiological treatment, the lack of safe methods for cure evaluation collaborates to chemotherapy invalidation (Coura & Castro 2002).

In acute stage, conventional serological and parasitological tests become negative after one year of chemotherapy and could be useful to indicate success of treatment. In chronic stage, the persistence of positive results of immunological assays after drugs administration is frequent and the negative results, when it happens, can take years to appear, requiring much time of following (Flores-Chavez *et al.* 2006). Even decreased titres of *T. cruzi* antibodies do not mean a process of cure, since that it is possible a late evolution of disease (Prata 2001).

Xenodiagnosis and hemoculture, because of their low sensitivity, could present false-negative results (Britto *et al.* 1999). A recent alternative approach to monitor post-treatment of *T. cruzi* infection is the polymerase chain reaction (PCR)-based strategies, because of its high sensitivity to detect parasite DNA in blood samples of chronic patients, in comparison to other parasitological tests, even in cases of doubtful or negative serology (Gomes *et al.* 1999; Marcon *et al.* 2002; Batista *et al.* 2010). In order to evaluate PCR as a laboratory tool for establishment of parasite clearance, this retrospective study aimed to compare the serological and parasitological

results of individuals who were treated with benznidazole in chronic phase of CD, using three different diagnostic methods: conventional serology, hemoculture and nested-PCR (N-PCR).

## **2. Methods**

### *2.1. Patients*

A retrospective study was carried out to evaluate the presence of parasites in blood of individuals treated with benznidazole for *T. cruzi* infection at Clinical Hospital of the University of Campinas, from 1980 to 2010. The work was previously approved by the Institutional Ethical Committee in Human Research. A total of 135 clinical records were consulted and we identified 68 cases submitted to specific treatment. From this group, 14 persons did not conclude the recommended treatment period of 60 days (5-7 mg/kg/day) were excluded of the study. Considering the remaining population, 29 individuals were recruited and accepted to participate, through the written consent. All these participants had CD confirmed by two out three positive immunological tests (Machado-Guerreiro, IIF or ELISA) and/or one positive xenodiagnosis before treatment (except in two cases in which individuals came from another institution with positive diagnostic but without available data of the tests). To certificate the sensitivity of laboratorial tests, 10 individuals chronically infected (with two positive serologies), who did not receive treatment, were included in the control group.

### *2.2. Serological assays*

All patients included in this study were tested by two different serological assays (ELISA and IIF) after specific chemotherapy. Serological assays were performed at Laboratory of Immunology in the Department of Clinical Pathology and the results were obtained through

electronic data system of the Clinical Hospital of University of Campinas. The tests used were commercial kits for ELISA (BIOZIMA®) and IIF (Biolab®).

### *2.3. Hemoculture*

Hemoculture was performed according to Chiari *et al.* (1989) and Luz (1999), with modifications. It was collected 12 mL of peripheral blood of each patient in three EDTA tubes. Immediately after, the material was centrifuged at 3500 rpm, during 10 min (4° C), to discard plasma. The blood cells sediment was transferred to another tube and washed in LIT (liver infusion tryptose) medium, supplemented with FBS. The samples were centrifuged in the same conditions and supernatant was discarded. The blood cells were resuspended in 5 mL of LIT and incubated at 28°C. The period of culture was 90-120 days and microscopic observation was realized monthly.

### *2.4. DNA isolation of blood samples*

Four milliliters of peripheral blood were collected from each patient in EDTA tubes to prevent coagulation. Genomic DNA was isolated according to methodology previously described by Sambrook and Russel (2001), with modifications. After centrifugation at 2200 rpm during 10 min (4°C), plasma was immediately separated from blood cells. Red blood cells were treated with a lysis buffer (0.0114 mol/l NH<sub>4</sub>Cl and 0.01 mol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) and leukocytes were washed with TKM1 (10 mmol/l Tris-HCl pH 7.6, 10 mmol/l KCl, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 20 mmol/l EDTA) and with TKM2 (10 mmol/l Tris-HCl pH 7.6, 10 mmol/l KCl, 0.4 mol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/l EDTA) and sodium dodecyl sulfate 10%. The samples were incubated at 55°C for 30 min and NaCl (5 mol/l) was added to the supernatant after centrifugation. DNA was extracted with phenol/chloroform and precipitated with 3 mol/l ethanol/sodium acetate. After overnight storage at -20°C, DNA was washed with 70% ethanol and solubilized in 30 ml of deionized and sterile water.

### 2.5. N-PCR assays

One microliter of extracted DNA was amplified at least in duplicate through N-PCR based on a procedure described by Marcon *et al.* (2002). DNA amplification was carried out in a 20 ml reaction mixture containing 10 mmol/l Tris (pH 8.3), 50 mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/l of each dNTP, 0.1 mmol/l of each primer, and 1 U of TaqDNA polymerase. The primers used in first amplification set were TCZ1 (forward 5' – CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT - 3') and TCZ2 (reverse 5'- CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'). In the second round, 1 ul of amplified DNA was re-amplified using primers TCZ3 (forward 5'- TGCTGCA(G/C)TCGGCTGATCGTT-TTCGA - 3') and TCZ4 (reverse 5'- CA(A/G)G(C/G)TTGTTTGGTGTCCAGTGTGTGA - 3'). Annealing temperatures used were 65° C and 55° C for the first and second rounds, respectively. After second thermal cycling, 10 ul of each sample was electrophoresed in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and the 149-bp amplicon was visualized by ultraviolet transillumination. In addition, the beta-globin human gene was amplified for each sample to check DNA quality and the absence of inhibitors. To minimize the risk of contamination, first and second runs were set up in distinct laboratory areas and a reaction mixture with no DNA was processed in parallel with the samples in each reaction set.

### 3. Results

We studied a group of 29 individuals who received anti-*T. cruzi* specific therapy, composed by 51.7% (15/29) of women and 48.3% (14/29) of men. All patients were born in endemic areas for Chagas disease in Brazil, except in one case of possible congenital infection. The mean age at the time of treatment was  $36 \pm 7.24$  years old (8-56 years). The time of post-treatment varied from 1-29 years and most of analyzed subjects were followed-up to five years (62.1%), therefore 27.6% (8/29)



of the cases has between 5-10 years post-treatment and 10.3% (3/29) has more than ten years (Table 1). All patients completed treatment without serious reactions, despite of the side effects in 20.7% (6/29) of the cases. The symptoms reported were: dermatitis (2 cases), gastrointestinal disorders (2 cases), paresthesia (1 case) and one case of generalized indisposition.

Only twelve patients (41.4%) presented available data of xenodiagnosis before chemotherapy, with seven cases of positive results. Of these cases, four subjects repeated xenodiagnosis after treatment, with three negative and one persisting positive result (Table 1).

Before chemotherapy, 89.65% (26/29) of individuals had available data for serology, three of them with IIF associated to Machado-Guerreiro test (titres 1:4, 1:8 and 1:32) and 88.5% (23/26) with IIF associated to ELISA. The antibody titration by IIF varied from 1:40-1:1280. The titre of 1:40 was found in 7.7%, 1:80 in 23.1%, 1:160 in 34.6%, 1:320 in 19.2%, 1:640 in 7.7% and 1:1280 in 7.7%. After chemotherapy, 100.0% (29/29) of the cases were reagent to ELISA. According to IIF, two individuals (6.9%) showed inconclusive results with titres under the 1:40 cut-off. The rest of the group (27/29) had positive results with titres between 1:40 and 1:1280. IIF titres found were: 1:40 in 17.2%, 1:80 in 13.8%, 1:160 in 31.0%, 1:320 in 20.7%, 1:640 in 6.9% and 1:1280 in 3.5%, respectively. Comparing the IIF titres, 61.5% (16/26) of them decreased after treatment, 11.6% (3/26) remained with the same titration and 26.9% (7/26) increased (Table 1).

All samples showed positive results for beta-globin human gene. The N-PCR detected *T. cruzi* DNA in 48.3% (14/29) of the samples and parasite DNA was not amplified in 41.4% (12/29). Three cases (10.3%) were considered inconclusive, with discordant results (one positive result without concordance with repetitive reactions). None of the 29 collected samples were positive for hemoculture. The comparison of immunological and parasitological results after chemotherapy are summarized in Table 2.

In control group (non-treated), the mean age was  $60 \pm 3.68$  years old and all individuals were reagent to ELISA and IIF tests, with titration varying from 1:40 to 1:1280.

According to N-PCR assays, 70.0% (7/10) were positive, 20.0% (2/10) negative and one case (10.0%) was inconclusive. The hemoculture was positive in 40.0% (4/10) of the cases and the parasites were observed in a mean time of 63.5 (37-85) days after blood culture.

#### **4. Discussion**

Even though CD affects millions of people around the world, its treatment remains unsatisfactory. The drugs available do not have a proved efficacy in the elimination of parasitism and the major problem is the difficult to determinate *T. cruzi* clearance. The conventional immunological assays remain with positive results after years post-treatment and the antibody titres decreasing does not represent the cure itself, since some long term patients show disease evolution (Prata 2001). Furthermore, parasitological tests of routine (xenodiagnosis and hemoculture) are not adequate to monitor cure due to the low sensitivity in chronic phase, even when considering non-treated persons. Recently, PCR based assays have been pointed as an alternative tool to solve doubtful serology and to monitor specific treatment of CD, since its positivity is 2 to 3 times higher for chronic patients diagnosis when compared to parasitological tests mentioned above (Coura & Castro 2002). Our study purposed to evaluate two different parasitological assays (N-PCR and hemoculture) in comparison to conventional immunological assays (ELISA and IIF) as tools for investigation of chemotherapy effectiveness in a cohort of 29 individuals infected by *T. cruzi* who received benznidazole treatment.

In this work, N-PCR evidenced therapeutic failure in 48.3% of the cases, therefore parasite DNA were not found in 51.7% of the samples (negative and inconclusive results). Other reports based on PCR analysis demonstrated the unsuccessful of specific treatment in *T. cruzi* eradication at

a variable rate of 6.9% to 88.7% positive results for chronic patients (Britto *et al.* 1999; Lacunza *et al.* 2006; Fernandes *et al.* 2009; Murcia *et al.* 2010). This discrepancy is related to many factors considered by authors, such as CD stage, PCR protocols and number of patients studied. With a similar cohort of 28 individuals, Lana *et al.* (2009) found 85.2% and 7.1% of positive PCR and hemoculture results, respectively. A possible explanation could be that these authors collected two samples of each patient in an interval of one year, increasing the possibility of reaching *T. cruzi* DNA in bloodstream, since the parasitemia in the chronic phase is intermittent. The 100.0% of negative blood culture indicates the low efficacy of this technique to monitor cure of CD as also demonstrated by Fernandes *et al.* (2009). In the control group, 70.0% of the individuals presented positive results by hemoculture, reinforcing the lack of sensibility in chronic patients even without specific treatment.

The immunological assays showed that all patients remained with positive or inconclusive results with no seronegativation; these findings corroborate other reports where post-treatment serology was superior to 90.0% (Solari *et al.* 2001; Flores-Chavez *et al.* 2006; Murcia *et al.* 2010). According to Brazilian Consensus in Chagas disease (Ministério da Saúde 2005), three consecutive and persistent drop off of immunological tests dilution can be suggestive of cure; however, in this study, two cases with decreased titres presented positive PCR. As the same manner as occurs with parasitemia, the antibodies titres oscillate during the period of infection and the serology titration does not necessarily correspond to the number of parasites circulating. This also can be verified in the cases where titres increased even after antitrypanocidal chemotherapy.

These results demonstrate the great difficulty to determinate the success of specific treatment for CD, since considering immunological standpoint, all patients analyzed could be considered as non-cured (positive N-PCR in 48.3% of the cases). Considering the other cases, it is impossible to affirm certainly that they are parasitological cured, since the negative results of

parasitological tests do not guarantee *T. cruzi* clearance. Once suppressive activity of benznidazole on parasitemia is expected (Coura & Castro 2002), we could suggest that *T. cruzi* levels in blood was, at least, reduced by drug administration. The possibility of re-infection after treatment cannot be discarded, especially in the old cases evaluated. However, these individuals have been followed since chemotherapy at an ambulatory located in a non endemic area, what minimizes the possibility of vector contact.

The side-effects associated to the chemotherapy with no severe symptoms were observed in 20.7% of the cases studied, as described before (Marin-Neto *et al.* 2005). Although undesirable, the adverse reactions are not necessarily an impediment to drug prescription when an adequate follow-up is performed.

Despite objections in the establishment of criteria of cure in individuals treated for CD, etiological treatment with benznidazole in the chronic phase is recommended by several authors since there are evidences about its utility in preventing or minimizing lesions during disease evolution, improving the prognosis of these patients (Viotti *et al.* 1994; Gallerano & Sosa 2000; Fabbro *et al.* 2007).

In conclusion, our findings showed therapeutic failure in some cases evidenced by NPCR. However, we can suggest that benznidazole was efficient to decrease the number of parasites in bloodstream, since parasitological assays were negative/inconclusive in most cases. Further studies including more patients, the establishment of a systematic blood collecting and the quantitative measurement of parasitemia levels during and after chemotherapy could elucidate the real contribution of molecular assays as an efficient tool to evaluate *T. cruzi* clearance in Chagas disease treatment.

## Acknowledgments

We thank patients who accepted to participate of this work, laboratory colleagues and the Clinical Hospital staff. This work was supported by CAPES and FAEPEX.

There is no conflict of interest related to this article.

## 5. References

Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS & Costa SCB (2010) Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *International Journal of Infectious Diseases* **14**, 974-977.

Britto C, Cardoso A, Silveira C, Macedo V & Fernandes O (1999) Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina (Buenos Aires)* **59**, 176-178.

Chagas C (1909) Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 159-218.

Chiari E, Dias JCP, Lana M & Chiari CA (1989) Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **22**, 19-23.

Coura JR & Castro SL (2002) A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 3-24.

Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M & Amicone NA (2007) 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**, 1-10.

Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM *et al.* (2009) Efficacy of benznidazol 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**, 27-32.

Flores-Chavez M, Bosseno MF, Bastrenta B *et al.* (2006) Polymerase chain reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in Bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75**, 497–501.

Gallerano RR & Sosa RR (2000) Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas da Universidad Nacional de Córdoba* **57**, 135-162.

Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ & Chiari E (1999) Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 205-210.

Lacunza CD, Negrete OS, Mora MC *et al.* (2006) Use of the polymerase chain reaction (PCR) for early evaluation of etiologial treatment in young adults, chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Patologia Tropical* **35**, 227-232.

Lana M, Lopes LA, Martins HR *et al.* (2009) Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiologial treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 1139-1147.

Luz ZMP (1999) Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**, 295-298.

Marcon GEB, Andrade PD, de Albuquerque DM *et al.* (2002) Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **43**, 39-43.

Marcon GEB, Albuquerque DM & Batista AM *et al.* (2011) *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **106**, 85-91.

Marin-Neto JA, Rassi Jr A, Avezum Jr A, Mattos AC & Rassi A (2009) The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 319-324.

Ministério da Saúde/Brasil (2005) Consenso Brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **38**, supl. III.

Moncayo A & Ortiz Yanine MI (2006) An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **100**, 663–677.

Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA & Segovia M (2010) 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**, 1759–1764.

PAHO/OMS (2009) Eliminação de doenças negligenciadas e outras infecções relacionadas à pobreza. *Boletim Epidemiológico* 28, Washington, DC. Available at: [http://new.paho.org/bulletins/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=565](http://new.paho.org/bulletins/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=565) (accessed 15 March 2011).

Portela-Lindoso AAB & Shikanai-Yasuda MA (2003) Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Revista de Saúde Pública* **37**, 107-115.

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

Sambrook J & Russel DW (2001) In *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York, 2368p.

Solari A, Ortíz S, Soto A *et al.* (2001) Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 years follow-up by PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 515-519.

Urbina JA (1999) Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *Journal of Molecular Medicine* **77**, 332-338.

Vago AR, Macedo AMM, Adad SJ, Reis DA & Corrêa-Oliveira R (1996) PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *The Lancet* **348**, 891-892.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H & Segura E (1994) Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal* **127**, 151-162.



**Table 1** Epidemiological, clinical and laboratorial data of Chagas disease patients before and after treatment with benznidazole

Patient	Sex	Age	Laboratorial tests before treatment				Time post-treatment (years)	Laboratorial tests after treatment				
			MG	ELISA	IIF	XN		ELISA	IIF	XN	HC	N-PCR
1	M	37	-	R	1:320	P	7,5	R	1:40	-	N	P
2	M	44	-	R	1:80	-	8,5	R	1:320	-	N	P
3	F	25	-	R	1:80	N	9	R	1:20	-	N	I
4	M	53	-	R	1:160	-	4,5	R	1:160	-	N	N
5	F	34	-	-	-	-	29	R	1:320	-	N	P
6	F	36	-	R	1:320	-	2	R	1:80	-	N	P
7	M	33	-	R	1:40	-	4,5	R	1:160	-	N	P
8	F	56	1:32	-	1:1280	-	2,5	R	1:320	-	N	P
9	M	34	-	R	1:160	-	2,5	R	1:160	-	N	N
10	M	36	-	R	1:80	-	4	R	1:40	-	N	N
11	F	25	-	R	1:160	P	4,5	R	1:40	-	N	N
12	M	37	-	R	1:80	-	3	R	1:640	-	N	N
13	M	48	-	-	-	-	28	R	1:320	-	N	P
14	F	44	-	R	1:160	-	1,5	R	1:80	-	N	N
15	F	20	-	R	1:320	P	9,5	R	1:160	N	N	N
16	F	26	-	R	1:160	N	1	R	1:80	-	N	P
17	F	39	1:8	-	1:320	N	8	R	1:160	-	N	N
18	F	47	-	R	1:640	P	10	R	1:320	P	N	P
19	M	43	-	R	1:40	-	1,5	R	1:80	-	N	N
20	M	8	1:4	-	1:160	P	12,5	R	1:10	N	N	P
21	M	35	-	R	1:80	P	7	R	1:40	N	N	N
22	M	31	-	R	1:640	-	2	R	1:1280	-	N	N
23	F	33	-	R	1:160	-	3	R	1:320	-	N	N
24	M	43	-	-	-	P	5	R	1:160	-	N	I
25	F	31	-	R	1:160	-	4	R	1:160	-	N	P
26	F	37	-	R	1:320	N	2	R	1:160	-	N	I
27	F	34	-	R	1:1280	N	3,5	R	1:640	-	N	P
28	M	30	-	R	1:80	-	2	R	1:160	-	N	P
29	F	42	-	R	1:160	-	3	R	1:40	-	N	P

MG: Machado-Guerreiro test. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. IIF: indirect immunofluorescence. XN: xenodiagnosis. HC: hemoculture. N-PCR: nested-polymerase chain reaction. R: reagent. P: positive. N: negative. I: inconclusive. - : not informed.

**Table 2** Comparison of serological and parasitological results of experimental group after etiological treatment for Chagas disease with benznidazole

n = 29	ELISA (%)	IIF (%)	HC (%)	N-PCR (%)
Positive results	29/29 (100)	27/29 (93.1)	0 (0)	14/29 (48.3)
Negative results	0 (0)	0 (0)	29/29 (100)	12/29 (41.4)
Inconclusive results	0 (0)	2/29 (6.9)	0 (0)	3/29 (10.3)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. IIF: indirect immunofluorescence. HC: hemoculture. N-PCR: nested-polymerase chain reaction.

*CONCLUSÕES*

- ✓ O controle de cura da doença de Chagas apresenta-se como um grande problema devido à ausência de métodos eficientes que comprovem a eliminação do parasito;
  
- ✓ Dos 29 indivíduos analisados, 14 (48.3%) apresentaram resultados positivos pela N-PCR, evidenciando falha terapêutica nesses casos. Doze indivíduos (41.4%) apresentaram resultados negativos da N-PCR. Embora esta não seja uma prova definitiva de cura parasitológica, esses indivíduos devem ser monitorados para uma avaliação mais precisa sobre a eficácia do tratamento.
  
- ✓ A hemocultura apresentou resultados negativos em 100% dos casos analisados, confirmando a sua baixa eficiência para o seguimento pós-terapêutico da doença de Chagas;
  
- ✓ Os testes imunológicos convencionais (IFI e ELISA) permaneceram com resultados positivos mesmo anos após o tratamento etiológico, o que evidencia a dificuldade de estabelecimento do critério de cura a partir da sorologia;
  
- ✓ Estudos futuros que considerem o monitoramento quantitativo do número de parasitos durante a terapia específica e que realizem a sistematização de coletas após o tratamento, poderão contribuir para a avaliação dos métodos moleculares na indicação de cura parasitológica da doença de Chagas.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J Clin Microbiol. 1993 Sep;31(9):2421-6.

Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SCB. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. Int J Infect Dis. 2010;14:974-7.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38 Supl III. 29pp.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST/AIDS. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV. 2008. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/publicacao>>. Acesso em: 5 jun. 2011.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:1-4.

Cançado JR. Criteria of Chagas Disease cure. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999 Jan;94 Suppl I: 331-5.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi 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*. Parasitol Res. 2002;88:894-900.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909 Ago;1(2):159-218.

Cimerman B & Cimerman, S. Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 390 p.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Jan;102 Suppl 1:113-22.

Coura JR & Castro SL. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:3-24.

Coura JR, Moreira CJC, Junqueira ACV. Curso de capacitação para detecção do *Trypanosoma cruzi*: módulo I. 2008. Disponível em: <[http://new.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&task=cat\\_view&gid=1193&Itemid=423](http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=1193&Itemid=423)> Acesso em: 27 mai 2011.

De Souza W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 Suppl 1:17-36.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Design*. 2002;8: 269-85.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira ACV et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998;58(6);807-11.

FIOCRUZ – Fundação do Instituto Oswaldo Cruz. Centenário da Descoberta da Doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

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

Ianni BM & Mady C. Como era gostoso o meu caldo de cana... Arq Bras Cardiol. 2005 Dez; 85(6):379-81.

Jannin J & Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102 Suppl I: 95-7.

Krautz GM, Kissinger JC, Krettli AU. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today. 2000;16(1):31-4.

Krettli AU. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* chronic infections in humans: usefulness of the complement regulatory protein antigens and lytic antibodies in the control of cure. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:301-4.

Lacunza CD, Negrete OS, Mora MC, Uncos A, Segura MA, Del Castillo N et al. Use of the polymerase chain reaction (PCR) for early evaluation of etiological treatment in young adults, chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Patol Trop. 2006;35:227-32.

Lazzari JO. Enfermedad de Chagas en el adulto. In: La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, 2007:77-96.

Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:295-8.

Malta J. Doença de Chagas. São Paulo: Sarvier, 1996. 202p.

Manoel-Caetano FS, Carareto CMA, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. Trans Roy Soc Med Trop Hyg. 2008 Nov;102(11):1102-7.

Manoel-Caetano FS & Silva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cad Saúde Pública. 2007;23(10):2263-74.

Marcon GE, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley Jda S, de Almeida EA, Guariento ME, Costa SC. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 May;43(1):39-43.

Marin-Neto JA, Rassi Jr A, Avezum Jr A, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:319-24.

Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biol Res. 2010;43:323-31.

Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1977;71: 217-25.

Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, Araujo SM, Bahia MT, Martins-Filho AO et al. Usefulness of the polymerase chain reaction for monitoring cure of mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes following treatment with benznidazole. Exp Parasitol. 2008;120:45-9.

Moncayo A & Yanine, MIO. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol. 2006 Dec;100(8):663-77.

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



Muñoz MJ, Murcia L, Segovia M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(1):5-7.

Muñoz-Saravia SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev.* Epub 2010 Dec 17. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/x41382k3t6820480>>. Acesso em 11 jun. 2011.

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. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1759-64.

Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494pp.

Oliveira MF, Nagao-Dias AT, Pontes VMO de, Júnior ASS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Rev Patol Trop.* 2008 Jul-Set; 37(3):209-28.

PAHO – Pan American Health Organization. Eliminação de doenças negligenciadas e outras infecções relacionadas à pobreza. *Boletim Epidemiológico* 28. Disponível em: <[http://new.paho.org/bulletins/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=565](http://new.paho.org/bulletins/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=565)> Acesso em: 5 jun. 2011.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007 Sep;103(3):195-200.

Portela-Lindoso AA & Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica.* 2003 Feb;37(1):107-15.

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

Ribeiro ALP & Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31:301-14.

Saiki RK, Gelfand, DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239:487-91.

Salomone OA, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M et al. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1558-62.

Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:93-101.

Silveira A. O manejo da doença de Chagas como problema de Saúde Pública. In: *La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral.* Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, 2007:119-27.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major *phylogenetic* lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasit.* 1996;83:141-52.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Witfner M. Chagas' Disease. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Oct;5(4):400-19.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998;28:85-104.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DA, Macedo AM, Adad S et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas Disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1805-9.

Valente, VC, Valente SAS, Pinto AYN. Perfil parasitológico e sorológico em microepidemia familiar de doença de Chagas em Abaetetuba, Estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34:20-1.

WHO – World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Tech. Rep. Ser. 811. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva. 2002. 120pp.

Xavier SS, Sousa AS, Brasil PEAA, Gabriel FG, Holanda MT, Hasslocher-Moreno A et al. Incidência e preditores de morte súbita na cardiopatia chagásica crônica com função sistólica preservada. *Revista da SOCERJ.* 2005 Set-Out;18(5):457-63.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jan;104(7):1051-4.