



UNICAMP

---

**MARIANE BARROSO PEREIRA**

**PERFIL CLÍNICO, LABORATORIAL E EPIDEMIOLÓGICO DE  
PACIENTES CHAGÁSICOS IDOSOS SEGUIDOS EM UM SERVIÇO DE  
REFERÊNCIA**

**CLINICAL, LABORATORY AND EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF  
ELDERLY CHAGASIC PATIENTS FOLLOWED IN A REFERENCE  
SERVICE**

**Campinas,2012**



---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**MARIANE BARROSO PEREIRA**

**PERFIL CLÍNICO, LABORATORIAL E EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES  
CHAGÁSICOS IDOSOS SEGUIDOS EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA**

**CLINICAL, LABORATORY AND EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF ELDERLY  
CHAGASIC PATIENTS FOLLOWED IN A REFERENCE SERVICE**

Dissertação de Mestrado apresentada à faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Gerontologia.

Master thesis submitted to the College of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP for obtaining a Master's Degree in Gerontology.

**Orientador:** Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

**Tutor:** Associate Professor Eros Antonio de Almeida

**Co-tutor:** Associate Professor Sandra Cecília Botelho Costa

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANE BARROSO PEREIRA E ORIENTADA PELO PROF. DR. EROS ANTONIO DE ALMEIDA

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) Orientador (a)

**Campinas, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS - CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P414p Pereira, Mariane Barroso, 1984-  
Perfil clínico, laboratorial e epidemiológico de  
pacientes chagásicos idosos seguidos em um serviço de  
referência / Mariane Barroso Pereira. -- Campinas, SP :  
[s.n.], 2012.

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

1. Idoso. 2. Doença de Chagas. 3. Reação em cadeia  
da polimerase. I. Almeida, Eros Antonio de, 1951-. II.  
Costa, Sandra Cecília Botelho, 1951-. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Clinical, laboratory and epidemiological profile of elderly chagasic patients followed in a reference service.

**Palavras-chave em inglês:**

Elderly

Chagas Disease

Polymerase chain reaction

**Área de concentração:** Gerontologia

**Titulação:** Mestra em Gerontologia

**Banca examinadora:**

Eros Antonio de Almeida [Orientador]

Glaucia Elisete Barbosa Marcon

Jamiro da Silva Wanderley

**Data da defesa:** 30-08-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Gerontologia

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO**

MARIANE BARROSO PEREIRA (RA: 096376)

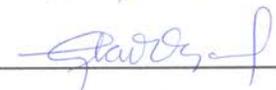
Orientador (a) PROF(A). DR(A). EROS ANTONIO DE ALMEIDA

Membros:

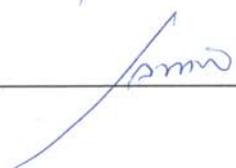
1. PROF(A). DR(A). EROS ANTONIO DE ALMEIDA



2. PROF(A). DR(A). GLAUCIA ELISETE BARBOSA MARCON



3. PROF(A). DR(A). JAMIRO DA SILVA WANDERLEY



Programa de Pós-Graduação em Gerontologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de agosto de 2012

Dedico este trabalho à minha família que  
sempre meu deu apoio incondicional durante essa caminhada.

Ao Dr. Eros e Dra.Sandra por me aceitarem como orientada e por me guiarem nessa jornada.

A Dra. Maria Elena por me iniciar nesse projeto com idosos chagásicos e também pelos ensinamentos.

Agradeço aos meus amigos do laboratório Angélica, Camila, Paula, Tycha, Jéssica, Jamile, Juliana, Emanuel, Fernanda, Renata, Josiele pelos incentivos, companheirismo e conselhos.

Um agradecimento especial à Angélica e Camila por repassarem seus conhecimentos que foram essenciais ao meu mestrado.

Ao pessoal do Ambulatório do GEDoCh, principalmente à Irene pelo carinho e pelo auxílio durante as coletas.

Aos idosos por cederem seu tempo e paciência durante a pesquisa.

Ao Maicon, por estar presente em todos os momentos.

À Flávia, por incentivar a minha vinda à Campinas para fazer meu mestrado e por sua amizade e companhia.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado,  
mas faz parte do processo da busca.  
E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura,  
fora da boniteza e da alegria.”

*Paulo Freire*

<b>Resumo</b> .....	xiv
<b>Abstract</b> .....	xv
<b>1.Introdução</b> .....	1
1.1 Doença de Chagas.....	3
1.2 Métodos de diagnóstico.....	6
1.3 Epidemiologia- prevalência e incidência.....	12
1.4 Envelhecimento dos portadores da doença de Chagas.....	16
<b>Objetivos</b> .....	17
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
<b>Casuística</b> .....	19
Extração do DNA.....	20
Amplificação do gene e eletroforese .....	21
Análise dos dados.....	22
<b>Resultados</b> .....	24
<b>Discussão</b> .....	39
<b>Conclusões</b> .....	49
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	51
<b>Anexos</b> .....	58

## **LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Variáveis gênero e idade dos idosos entrevistados no GEDoCh.....	25
Tabela 2	Distribuição da forma clínica da doença de Chagas.....	26
Tabela 3	Distribuição dos idosos entrevistados portadores da forma digestiva.....	26
Tabela 4	Distribuição da forma mista dos idosos chagásicos.....	27
Tabela 5	Distribuição da presença de comorbidades e uso de medicamentos.....	28
Tabela 6	Distribuição do número de comorbidades e de medicamentos utilizados.....	28
Tabela 7	Distribuição e percentual dos pacientes que viveram em zona rural, urbana e endêmica.....	32
Tabela 8	Distribuição e percentual dos antecedentes para doença de Chagas.....	33
Tabela 9	Resultados da N-PCR, Sorologia e $\beta$ -globina.....	36

Figura 1	Fotomicrografia do <i>T.cruzi</i> .....	14
Figura 2	Foto do triatomíneo transmissor da doença de Chagas .....	14
Figura 3	Ciclo da doença de Chagas .....	15
Figura 4	Distribuição geográfica dos locais de nascimento e da doença de Chagas.....	28
Figura 5	Distribuição geográfica das cidades migratórias .....	30
Figura 6	Distribuição geográfica das cidades de procedência .....	31
Figura 7	Amplificação pela Nested-PCR do teste de sensibilidade .....	34
Figura 8	Amplificação do gene da $\beta$ -globina .....	34
Figura 9	Amplificação pela N-PCR do DNA nuclear do <i>T.cruzi</i> .....	35

## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1	Distribuição da forma clínica entre gêneros .....	25
Gráfico 2	Distribuição das principais comorbidades dos idosos chagásicos entrevistados.....	27
Gráfico 3	Distribuição dos medicamentos mais utilizados pelos idosos entrevistados.....	27

A doença de Chagas, descoberta por Carlos Chagas em 1909, é uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que já teve a via vetorial como sua principal forma de transmissão. Com o controle da transmissão vetorial, a incidência de novos casos diminuiu, propiciando uma mudança nas características da população infectada. Atualmente, a população chagásica no Brasil é constituída, sobretudo, por portadores da forma crônica da doença. Estes indivíduos estão envelhecendo e necessitam de acompanhamento clínico adequado. Os objetivos foram avaliar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial de pacientes idosos portadores da doença de Chagas atendidos pelo Grupo de Estudos em Doença de Chagas do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Na primeira etapa foi realizada entrevista e coleta de amostra de sangue para testes moleculares e sorológicos. Posteriormente, verificaram-se os dados clínicos e os resultados sorológicos nos prontuários médicos. A amostra de sangue foi submetida a uma extração de DNA e amplificação gênica da região nuclear do parasito. Os dados foram tratados estatisticamente pelo programa BioEstat 5.0. Verificou-se que não houve prevalência de um gênero. Houve prevalência de idosos na faixa etária entre 60 e 69 anos e a forma cardíaca como a forma clínica mais comum. A hipertensão arterial foi a comorbidade prevalente, principalmente no gênero feminino. Os fármacos mais utilizados foram os anti-hipertensivos e os diuréticos. A polifarmácia foi detectada em 34% dos idosos. O teste sorológico foi reagente em 95% das amostras. Em 36% das amostras houve amplificação gênica. Conclui-se que os idosos atendidos pelo GEDoCh são idosos jovens, cardiopatas, hipertensos, fazem uso de medicamentos, possuem antecedentes para a doença de Chagas e os testes sorológicos são reagentes em sua maioria.

Chagas disease, discovered by Carlos Chagas in 1909, is a disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which already had the track vector as their main mode of transmission. With the control of vector transmission, the incidence of new cases decreased, providing a change in the characteristics of the infected population. Currently, the chagasic population in Brazil is constituted mainly by patients with the chronic form of the disease. These individuals are aging and require appropriate clinical follow-up. The objectives were to evaluate the clinical, epidemiological and laboratory elderly patients with Chagas disease seen by the Study Group on Chagas Disease, Clinical Hospital of University of Campinas. The first step was carried out with an interview and collect blood sample for molecular and serological tests. Later, there were the clinical and serologic findings in medical records. The blood sample was subjected to DNA extraction and amplification of the nuclear region gene of the parasite. The data were treated statistically by BioEstat 5.0. There was no prevalence of gender. There was prevalence of elderly people aged between 60 and 69 years and cardiac form as the most common clinical presentation. Hypertension comorbidity was prevalent, especially in females. The drugs used were antihypertensive and diuretics. Polypharmacy was detected in 34% of the elderly Serologic testing was positive in 95% of the samples. In 36% of the samples was gene amplification. We conclude that the elderly assisted by GEDoCh are younger elderly, cardiac patients, hypertensive use drugs, have antecedents for Chagas disease and serological tests are mostly reactive.

## 1. INTRODUÇÃO

---

O envelhecimento da população é uma das mais importantes mudanças demográficas que muitos países do mundo enfrentam e representa um desafio para a saúde pública (WHO, 1998).

As características principais desse processo de envelhecimento experimentado pelos países em desenvolvimento são, de um lado, o fato do envelhecimento populacional estar se dando sem que tenha havido uma real melhoria das condições de vida de uma grande parcela dessas populações e, por outro lado, a rapidez com que esse processo está ocorrendo (Ramos, 1987). Segundo a Organização Mundial da Saúde, até 2025, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos.

No Brasil, o envelhecimento é um fenômeno predominantemente urbano (82% dos idosos estão morando em cidades), e o processo de transição demográfica caracteriza-se pela rapidez com que o aumento absoluto e relativo das populações adultas e idosas vem modificando a pirâmide populacional (Negri *et al*, 2004). Essa mudança está associada ao decréscimo da taxa de fertilidade, juntamente com o aumento da longevidade (OMS, 2005).

Essas mudanças na população acarretam demandas crescentes para o indivíduo, a família, a comunidade e os diversos setores da sociedade, especialmente o de seguridade social e o da saúde. Emergem, assim, questões sobre a viabilidade financeira de sistemas de aposentadoria e sobre a sustentabilidade do sistema de saúde atual (Alves *et al*, 2007). Segundo Teixeira e colaboradores (2006), obter informações sobre as condições de saúde dos idosos e seus determinantes, assim como suas demandas e padrões de uso de serviços de saúde, é fundamental para orientar as políticas de saúde. Para o mesmo autor, estudos epidemiológicos que investigam idosos residentes na comunidade fornecem as informações necessárias, mas ainda são raros no Brasil. Nesses estudos, também se incluem as pesquisas das doenças crônicas que os acometem, dentre as quais quer se destacar no presente estudo, a doença de Chagas.

## 1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas passa por dois estágios - uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda dura de 6 a 8 semanas, sendo que a maioria dos pacientes infectados não aparenta estar doente e não apresenta evidências de danos orgânicos (Chagas, 1909). Após esse período, a maioria dos pacientes infectados permanece na fase crônica livre de alterações clínicas, classificados como forma indeterminada (Castro, *et al* 2002). Entretanto, muitos anos depois da fase crônica ter começado, entre 10 a 40% dos indivíduos infectados, dependendo da área geográfica, irão desenvolver lesões, principalmente no coração e em órgãos do sistema digestivo. Essa condição é chamada de forma cardíaca ou digestiva da doença de Chagas, ou ainda, forma mista, na dependência dos órgãos acometidos. A fase crônica persiste durante toda a vida do indivíduo infectado (Laranja *et al*,1956).

### FASE AGUDA

A fase aguda da doença de Chagas corresponde à fase inicial da tripanossomíase americana no hospedeiro vertebrado, tratando-se basicamente de uma infecção generalizada causada pelo *T. cruzi*. (Ministério da Saúde, 2004).

Ela inicia através das manifestações locais, quando o *T.cruzi* penetra na conjuntiva palpebral (sinal de Romana), ou na pele (chagoma de inoculação). Estas lesões aparecem em 50% dos casos agudos dentro de 4 a 10 dias após a picada do inseto vetor, regredindo em um ou dois meses (Neves *et al*,2004).

As manifestações gerais são: febre, mal-estar geral, cefaléia, astenia, hiporexia, edema, hipertrofia de linfonodos. Frequentemente, ocorre hepatoesplenomegalia. É caracterizada, algumas vezes, por miocardite, porém, na maioria das vezes, só é percebida através de alterações no eletrocardiograma. Às vezes, agrava-se numa forma

meningoencefálica, principalmente nos primeiros meses ou anos de vida (Ministério da Saúde, 2005 a ).

A grande maioria dos pacientes que são infectados pelo *T. cruzi* não morre durante a fase aguda, que pode ser oligo ou assintomática. Cerca de 10 anos ou mais após essa fase, parte dos indivíduos passa a ter sintomas cardíacos ou digestivos, constituindo a fase crônica sintomática (Higuchi, 2009).

### **FASE CRÔNICA**

A maioria absoluta dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, tenha ou não previamente apresentado uma forma aguda evidente, geralmente evolui para um estado de aparente equilíbrio parasito-hospedeiro, sem manifestações clínicas. Este estado de infecção silenciosa é denominado forma indeterminada (Higuchi, 2009).

A forma indeterminada tem particular relevância por ser a apresentação de maior prevalência em áreas endêmicas, além do evidente caráter benigno e do baixo potencial evolutivo da mesma (Ministério da Saúde, 2005 b).

Uma parte dos indivíduos com a doença de Chagas, após permanecerem assintomáticos por vários anos, apresenta sintomatologia relacionada com o coração (forma cardíaca), digestiva (forma digestiva), ou ambos (forma cardiodigestiva ou mista). Isto devido ao fato de que a infecção pelo *T.cruzi* pode acometer o miocárdio e o tubo digestivo (esôfago e cólon, principalmente). Observa-se processo inflamatório, com dano destes órgãos, nem sempre relacionada com o parasito, que usualmente se encontra escasso nesta fase (Neves *et al*, 2004).

A cardiopatia chagásica é a mais importante consequência clínica da infecção pelo *T. cruzi*. Estudos epidemiológicos mostraram que, entre os indivíduos com sorologia positiva específica, entre 10 e 30% têm algumas mudanças nas características eletrocardiográficas que indicam dano cardíaco causado pelo parasito. Essas mudanças

ocorrem entre 10 e 20 anos após a fase aguda da doença e se associam a uma gama variada de tipos de lesões. As manifestações clínicas variam de formas leves com poucos sintomas, até a insuficiência cardíaca e, a morte súbita. Inflamação acompanhada de fibrose dispersa por todo miocárdio resulta em lesões graves no coração, que é uma das expressões de maior morbidade da forma cardíaca da doença de Chagas. Os fatores que induzem a mudança da forma indeterminada para a cardíaca da doença ainda não são completamente conhecidos (WHO, 2002).

A forma digestiva caracteriza-se por alterações ao longo do trato digestivo, ocasionadas por lesão do plexo nervoso intramural (destruição neuronal parassimpática), com conseqüente alteração da motilidade e de morfologia, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns. São sinais e sintomas do megaesôfago: disfagia (sintoma mais freqüente e dominante), regurgitação, epigastralgia ou dor retroesternal, dor à deglutição, soluço, excesso de salivação, emagrecimento, hipertrofia das parótidas. O megacólon se caracteriza por constipação intestinal, meteorismo, distensão abdominal, fecaloma e volvo. (Ministério da Saúde, 2005).

## 1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado através de métodos que demonstram a presença do parasito no sangue, direta ou indiretamente, pela detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro e por testes moleculares (Marcon *et al*, 2002).

### MÉTODOS PARASITOLÓGICOS DIRETOS

Durante a fase aguda da doença de Chagas, um grande número de parasitos está presente no sangue periférico e podem ser detectados por testes parasitológicos diretos (WHO, 2002).

**Exame direto ou a fresco** - Nessa técnica uma pequena gota de sangue é colocada entre lâmina e lamínula e examinada exaustivamente ao microscópio óptico em objetiva de 40X(De Carli, 2001).

**Métodos de Concentração** - Caso os exames diretos sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração, tais como micro-hematócrito, teste de Strout ou QBC. Estes testes apresentam 80 a 90% de sensibilidade e são recomendados quando houver forte suspeita de doença de Chagas aguda e o teste direto a fresco resultar negativo. Em casos com presença de sintomas por mais de 30 dias, métodos de concentração devem ser a primeira escolha, devido ao declínio da parasitemia com o decorrer do tempo (Ministério da Saúde, 2005).

**Preparações coradas** - Este método oferece vantagem por permitir observar a morfologia do parasito, mas só será possível em casos de parasitemia muito elevada (Neves *et al*, 2004).

### MÉTODOS PARASITOLÓGICOS INDIRETOS

A fase crônica da doença caracteriza-se por baixo nível de parasitemia tornando impossível o diagnóstico pelos métodos diretos. O diagnóstico parasitológico da doença

nesta fase pode ser realizado por exames parasitológicos indiretos que consistem no enriquecimento da amostra de sangue, possibilitando a multiplicação do parasito existente (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

**Xenodiagnóstico** - Em geral, realiza o xenodiagnóstico natural, colocando-se os triatomíneos para sugar o paciente. O xenodiagnóstico artificial é indicado quando o paciente é alérgico a picada de inseto e, também, para melhor conforto do paciente. Para que o xenodiagnóstico dê bons resultados, há necessidade de se empregar espécies de triatomíneos bem adaptados as cepas locais do *T. cruzi*. Em geral, as espécies de triatomíneos que apresentam melhor susceptibilidade são: *T. infestans*, *Panstrongylus megistus*, *T. braziliensis* e *T. pseudomaculata*. (Neves *et al*, 2004)

**Hemocultura** - São utilizados 30 ml de sangue heparinizado de cada paciente. O plasma é desprezado após centrifugação e o sedimento lavado com meio LIT (Liver Infusion Tryptose) para eliminar possíveis anticorpos ainda presentes. O sedimento é distribuído em seis tubos de rosca contendo 6 ml de LIT. O material deve ser mantido a 25°C, homogeneizado a cada 48 horas e examinado quinzenalmente até 60 dias ou mais, se necessário (Neves *et al*, 2004).

**Xenocultura** - É realizado após o xenodiagnóstico. Os insetos são imersos em solução esterilizante de White e, posteriormente, o conteúdo intestinal destes são retirados em condições assépticas e semeados em tubos contendo meio LIT, acrescido de amplacilina e examinado posteriormente, como a hemocultura (Toledo *et al*, 1997).

**Inoculação em animais de laboratório**- A inoculação de camundongos ou cobaias jovens tem sido utilizada para fins de diagnóstico parasitológico. Atualmente, a inoculação de animais pode ser perfeitamente utilizada para isolamento de amostras de *T.cruzi* a partir de sangue positivo, tanto de pacientes como de outros reservatórios do parasito (De Carli, 2001).

## **Métodos Sorológicos**

O diagnóstico sorológico da infecção chagásica baseia-se na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG no soro do paciente, dependendo da fase da infecção. Os testes em geral apresentam uma alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico laboratorial da infecção chagásica. Do ponto de vista prático, os testes de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA podem ser tomados como referência ou padrão-ouro dos testes sorológicos para detecção da infecção pelo *T. cruzi* (De Carli, 2001).

**Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)** - Apresenta alta sensibilidade a partir do 15º dia de infecção, detectando anticorpos da classe IgM, que raramente ocorrem na fase crônica da doença, mas que são constantes na fase aguda, com títulos elevados. Em portadores da fase crônica da doença detecta anticorpos da classe IgG (Neves *et al*, 2004).

**Ensaio imunoenzimático (ELISA)** – Consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *T. cruzi*, obtidos a partir de cultura *in vitro* (ou antígenos recombinantes de *T. cruzi*). Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controles do teste e das amostras são adicionados posteriormente). Os anticorpos específicos presentes no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresenta o valor da densidade ótica igual ou superior ao ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo (Ministério da Saúde, 2005 b).

**Reação de fixação do complemento (RFC)** -. Este teste baseia-se na utilização de proteínas do sistema complemento, que são extremamente termolábeis, implicando em que, frequentemente, este reagente torne-se inadequado para a reação. De forma

geral, a sensibilidade do teste é baixa e a sua reprodutibilidade não satisfaz aos padrões exigidos atualmente (Ministério da Saúde, 2005).

**Teste de Hemaglutinação (HA)** - Foi desenvolvido para uso em bancos de sangue e em inquéritos epidemiológicos. Utilizam-se hemácias de carneiro sensibilizadas com extrato de *T. cruzi*, em suspensão concentrada a 10%. Basta adicionar, sobre uma lâmina de vidro, duas gotas do plasma e uma de reagente, agitar a mistura com leve movimento de rotação e ler ao fim de três minutos (Rey, 1991).

### **Métodos Moleculares**

**Reação em cadeia da polimerase (PCR)** - A PCR consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA de *T. cruzi* presentes em amostras de sangue, soro ou tecidos do paciente infectado. Esta técnica é de alta sensibilidade, pois é capaz de detectar quantidades de DNA de um único parasito (Neves *et al*, 2004). O diagnóstico é realizado pela observação de fragmentos de tamanho molecular esperados, revelados através da eletroforese do produto de amplificação em géis de agarose ou poliacrilamida (De Carli, 2001).

### **REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E A DOENÇA DE CHAGAS**

A reação em cadeia da polimerase é uma das ferramentas da biologia molecular que teve o mesmo efeito similar na pesquisa, como a descoberta das enzimas de restrição e o Southern Blot (Innis, 1990).

A PCR é uma técnica relativamente fácil de ser realizada em laboratório. O material inicial é o DNA molde, que contém a sequência que será amplificada. A quantidade de DNA utilizada em cada reação é muito pequena. Em uma reação típica de PCR, utiliza-se cerca de 100 a 200 nanogramas de DNA genômico total. Além desse, utilizam-se os iniciadores para definir a região que será amplificada, a DNA polimerase, e

a mistura dos quatro desoxirribonucleotídeos precursores. Todos esses reagentes são misturados em um tubo de reação que, contém, ainda uma quantidade de sal ideal para o funcionamento enzimático. (Carvalho, 2007)

Essa reação envolve dois iniciadores que flanqueiam o fragmento de DNA que vai ser amplificado, além de repetidos ciclos de desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* (iniciadores) com suas sequências complemento, e extensão do anelamento dos *primers* com a DNA polimerase. Esses *primers* hibridizam para o lado oposto da sequência alvo e são orientados para que a síntese de DNA pela polimerase ocorra através da região entre os *primers* (Innis, 1990).

Em todo ciclo, a quantidade de DNA sintetizado é o dobro do ciclo anterior. A técnica requer o uso de uma DNA polimerase especial, isolada de uma bactéria termofílica, que é estável em temperaturas mais altas, assim, ela não desnatura nos vários ciclos que são realizados em alta temperatura (Alberts, 2004).

O controle para cada exame da PCR inclui controle positivo e negativo do DNA estudado e mistura de reagentes sem DNA. Produtos da amplificação são analisados pela eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio, e os resultados são qualitativamente expressos (presença ou ausência das bandas específicas) (Diez *et al*, 2008).

O genoma do *T.cruzi* é caracterizado pela abundância de sequências de DNA repetitivas que podem ser usadas como alvo para a detecção e identificação do parasito (Marcon, 2002; Kirchoff & Donelson 1993). Tanto pode ser utilizado o kDNA, encontrado no cinetoplasto, quanto o DNA nuclear do parasito. Porém, o volume da amostra de sangue é um importante fator que pode ser considerado em pacientes crônicos com baixos níveis de parasitemia seguidos de tratamento (Castro *et al*, 2002).

Outros fatores distintos que podem contribuir no desempenho geral dos ensaios da PCR são: as características epidemiológicas das populações estudadas, a quantidade de

sangue coletado, o método de isolamento do DNA, a sequência-alvo do parasito (DNA nuclear satélite ou DNA do cinetoplasto [kDNA]), os *primers* selecionados para a PCR, os reagentes usados e as condições do termociclador (Castro, *et al* 2002).

Nos casos crônicos da doença de Chagas a quantidade de parasitos no sangue é muito baixa, portanto, o uso da técnica da PCR para o diagnóstico da doença se faz muito importante, e tem mostrado maior sensibilidade do que a sorologia convencional. (Sosa-Estani, 2006)

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA- PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA

Em 1909, Carlos Chagas, médico e então pesquisador assistente do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), descobriu em Lassance, interior de Minas Gerais, uma nova doença humana, a tripanossomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas (Kropf *et al*, 2000). Essa enfermidade é causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, que afeta milhões de pessoas, particularmente na América do Sul e na América Central (Higuchi *et al*, 2003). O principal meio de transmissão é a vetorial pelo triatomíneo, porém a doença também pode ser adquirida por transfusão sanguínea, transmissão oral, congênita, por acidente de laboratório, entre outras formas de transmissão.

No final dos anos 70, a área endêmica ou, mais precisamente, com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil, incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos domiciliados (Ministério da Saúde, 2005 b).

Em junho de 1991 na cidade de Brasília, Ministros da Saúde lançaram uma iniciativa de eliminação da transmissão da doença de Chagas nos países do Cone Sul: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). O programa consistiu na eliminação do inseto triatomíneo transmissor através de inseticidas residuais borrifados nas residências (Lima-Costa *et al*, 2001; Moncayo & Ortiz Yanine, 2006).

Os países que tiveram um efetivo controle da atividade do vetor também apresentaram um significativo declínio da incidência da doença de Chagas, acompanhada por uma redução da prevalência da doença (Dias *et al*, 2002). Uma vez eliminada a transmissão vetorial se faz imprescindível a manutenção da vigilância sanitária (Fernandes, 2005). Apesar do avanço significativo no controle da transmissão vetorial e por transfusão de sangue, ainda hoje existem cerca de oito milhões de pessoas infectadas no Brasil. Estima-se que apenas 0,5% destes recebam tratamento (Souza,

2010). Muitos desses pacientes que estão na fase crônica, e que vieram de zona endêmica, se deslocam para países não endêmicos para doença de Chagas. Esses movimentos populacionais começaram a criar novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos, com o *T. cruzi* se espalhando pelo mundo (Coura & Viñas, 2010). Em países não endêmicos, os meios de contaminação são através da transfusão de sangue, doação de órgãos e transmissão congênita, principalmente (Schmunis & Yadon, 2010). Estima-se que há mais de 300.000 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* nos EUA, 5.550 no Canadá, 80.000 na Europa e na região ocidental do Pacífico, 3.000 no Japão e 1500 na Austrália (Coura & Viñas, 2010). Com esse alcance mundial, é necessário que haja uma mobilização mundial de recursos nos países endêmicos e não endêmicos para promover pesquisas e manter ação de vigilância sustentável, de caráter permanente e integrado aos serviços, que é o maior desafio para o controle da doença de Chagas no momento (Lescure *et al* 2010; OPS, 2001).

#### **AGENTE ETIOLÓGICO E VETORES**

O *T. cruzi* é um protozoário, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). Nesta família encontra-se um ou dois flagelos que se originam de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar. Normalmente, contém uma estrutura paraflagelar e outra proeminente, conhecida como cinetoplasto. Este corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (Souza, 2012). Da família Trypanosomatidae fazem parte dois gêneros de importância médica: *Leishmania* e *Trypanosoma* (Malta, 1996). No sangue dos vertebrados, o *T. cruzi* se apresenta sob a forma de tripomastigota (fig 1) e, nos tecidos, como amastigotas. Nos invertebrados ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas,

que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes acumuladas nas fezes do inseto (Ministério da Saúde, 2005b).

**Figura 1:** Fotomicrografia do *T.cruzi*, disponível em:

<http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo4/6.html>



Figura 1: Forma tripomastigota sanguíneo em gota espessa corada com Giemsa

Os vetores são insetos triatomíneos pertencentes aos gêneros *Triatoma* (fig 2), *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Hemiptera; Reduviidae) ,conhecidos popularmente como “barbeiros” (Coura & Viñas, 2010). Eles vivem em palmeiras, tocas, montes de pedras ou outros refúgios, e se alimentam de sangue de diversos mamíferos e outros vertebrados, entre estes os humanos (Clayton, 2010).

Figura 2. Foto do triatomíneo transmissor da doença de Chagas, disponível em:

<http://www.icb.usp.br/~marcelcp/triatoma.htm>



Figura 2: *Triatoma infestans*

Figura 3: Ciclo da doença de Chagas, disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

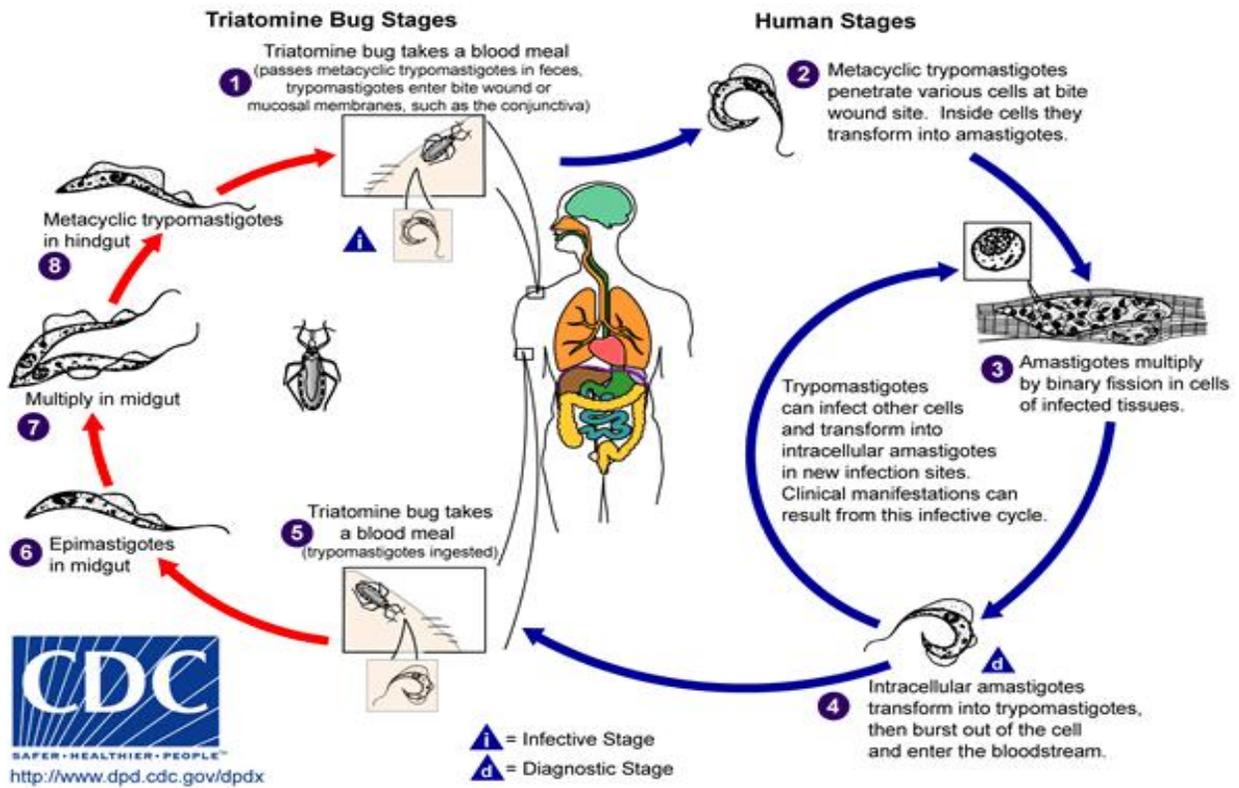


Figura 3: Esquema representando o ciclo da doença de Chagas

#### 1.4 ENVELHECIMENTO DOS PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS

Através da campanha de controle do principal vetor da doença de Chagas feita na década de 90, houve uma diminuição nos casos da fase aguda da doença. (Lima-Costa *et al*, 2001) e houve um aumento no caso de pacientes crônicos com uma maior faixa etária.

Esse aumento da sobrevida dos portadores da enfermidade se deve a melhora dos recursos terapêuticos nas últimas décadas, o que levou à superposição dos danos decorrentes da infecção pelo *T. cruzi* com os agravos associados às doenças crônico-degenerativas, mais comuns entre os idosos. (Bertanha *et al*, 2008)

A doença de Chagas se tornando um problema de saúde pública entre idosos, fez com que as autoridades sanitárias concentrem-se na assistência desse grande número de chagásicos crônicos em processo de envelhecimento. (Lima-Costa *et al*, 2001; Guariento *et al* 2002) Porém, há falta de investigações sobre a doença de Chagas nesses indivíduos. Além disso, milhões de pessoas infectadas há décadas atrás ainda precisam de tratamento, e precisam de atenção da comunidade científica. (Silva, 2010; Bilate & Cunha-Neto, 2008)

Devido o aumento dos idosos chagásicos e diante da necessidade de entender as necessidades dessa população, realizou-se uma análise do perfil epidemiológico, clínico e laboratorial dos pacientes chagásicos idosos atendidos pelo Grupo de Estudos em Doença de Chagas (GEDoCh) localizado no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

## **2.OBJETIVOS**

---

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial de pacientes idosos portadores da doença de Chagas atendidos pelo Grupo de Estudos em Doença de Chagas do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar as comorbidades dos pacientes com doença de Chagas e medicamentos utilizados;
- Verificar as possíveis áreas em que os pacientes adquiriram a doença de Chagas;
- Verificar as formas clínicas da doença de Chagas em idosos;
- Verificar a parasitemia por PCR e pela sorologia.

### **3. CASUÍSTICA**

---

Trata-se de um estudo com caráter descritivo, transversal, prospectivo e retrospectivo com aprovação do Comitê de Ética sob o número 254/2010. Para realizar a pesquisa, foram recrutados pacientes com idade maior ou igual a 60 anos, portadores da doença de Chagas atendidos pelo Ambulatório do GEDoCh por ordem de chegada, totalizado 85 idosos. No dia da consulta médica, o paciente foi informado sobre a pesquisa e convidado a participar. Após o convite, foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual constam todas as informações sobre a pesquisa, inclusive os objetivos, a justificativa e o número do processo do Comitê de Ética. Após a leitura e a compreensão do TCLE (anexo I), o voluntário manifestou o aceite assinando o Termo e o questionário (anexo II) foi aplicado. Após a entrevista, o paciente foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Clínica do HC para a coleta de sangue. Foram coletadas duas amostras do sangue do paciente. Uma foi usada pelo próprio Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas (HC) para realizar os testes sorológicos. A outra amostra foi encaminhada para a extração do DNA e o teste da PCR. Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

As coletas de sangue e dos dados para a pesquisa foram feitas no período entre junho de 2010 a dezembro de 2011.

### **3.1 EXTRAÇÃO DO DNA**

Para a extração do DNA de sangue total, foi utilizado o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook, *et al* (1989), com algumas modificações. Nessa etapa foi usada uma amostra de sangue como controle negativo de extração. Essa amostra negativa passou por teste sorológico e por amplificação (PCR) para comprovar a ausência

do parasito.

### 3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE E ELETROFORESE

#### Amplificação do gene da $\beta$ -globina humana

Para verificar a qualidade da extração do DNA e a ausência de inibidores de PCR, as amostras foram submetidas a uma amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana. (Saiki *et al* 1985) A reação consistiu na adição do DNA extraído em um mix de reagentes contendo 10 mM Tris-HCL (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada primer e 1 U de *Taq* DNA Polymerase e água para completar o volume total de 20  $\mu$ l. O par de *primers* utilizados foram PCO3 e PCO4 (PCO3: 5' ACACA ACTGTGTTCACTAGC 3' /PCO4: 5' CAACTTCATCCACGTTTACC 3') que amplificam uma região de 110 pares de base( Batista *et al*, 2010)

#### Amplificação do DNA nuclear pela Nested-PCR

A Nested-PCR (N-PCR) consiste em duas reações de PCR, na qual a segunda reação utiliza um par de *primer* interno à região amplificada pelo par de *primer* da primeira reação. Para a primeira reação foram utilizados os primers TCZ1 (5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3') e TCZ2(5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3') que amplifica uma região de 188 pares de bases e na segunda reação foi colocado 0,4  $\mu$ l do DNA amplificado na primeira reação e os primers utilizados foram o TCZ3 (5'-TGCTGCA(G/C)TCGGCTGATCGTTTTTTCGA-3') e TCZ4 (5'- CA(A/G)G(C/G)TTGTTTGGTGTCCAGTGTGTGA-3') que amplifica uma região de 149 pares de base. (Ochs *et al* 1996; Moser *et al* 1989; Batista *et al*, 2010; Marcon *et*

al, 2002)

A reação consiste na adição do DNA extraído em um mix reagentes contendo 8 mM Tris-HCL (pH 8,4), 20 mM KCl, 0,6 mM de  $MgCl_2$ , 0,08 mM de cada dNTP, 0,08 mM de cada primer e 0,5 U de Platinum ® *Taq* DNA Polymerase e água para completar o volume total de 20  $\mu$ l.

Foram empregados ciclos diferentes no termociclador para a primeira e a segunda reação. Ambas tiveram a desnaturação inicial a 94° por 5 minutos e uma extensão final a 72° por 7 minutos (Marcon, 2001). Como controle negativo dessa etapa, foi feita apenas uma mistura de reagentes sem a adição de DNA. E como controle positivo foi utilizado uma amostra com amplificação positiva já apresentou anteriormente. Cada amostra foi submetida a três reações. Ela foi considerada negativa quando não houve amplificação em nenhuma reação. A amostra considerada positiva teve amplificação do DNA em pelo menos uma reação.

### **Eletroforese em gel de agarose**

Após a amplificação tanto da  $\beta$ -globina quanto da Nested-PCR , cerca de 5  $\mu$ L do produto da PCR, acrescido de 2,0  $\mu$ L de corante azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídio e visualizado sobre a luz ultravioleta (Marcon, 2001).

### **Teste de sensibilidade**

A primeira etapa consistiu na extração de DNA de uma cultura de epimastigotas de *T.cruzi*. A cultura partiu de uma concentração de  $10^7$  parasitos por ml e o kit de extração utilizado foi o High Pure PCR Template Preparation Kit da Roche. Após a extração, fez-

se diluição seriada até obter a concentração de  $10^{-5}$ . A amplificação da região nuclear foi feita pela Nested-PCR descrita anteriormente.

### **3.3 ANÁLISE DOS DADOS**

Realizou-se uma análise descritiva dos dados coletados na pesquisa e estes foram organizados na forma de tabelas, figuras e gráficos.

Para montar os mapas de locais de nascimento, migração e procedência dos pacientes estudados, foi utilizado o programa Google Mapas®.

O programa utilizado para as análises estatísticas descritivas foi o BioEstat 5.0 ® .

## **4. RESULTADOS**

---

#### 4.1 RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO

Na tabela 1 abaixo, não houve que a diferença significativa entre os gêneros e predomina os idosos com idade inferior a 70 anos. A maioria dos idosos com idade maior que 70 anos se encontram no gênero masculino. O valor da mediana da idade, tanto total, como por gêneros foi de 64 anos.

**Tabela 1: Variáveis gênero e idade dos idosos entrevistados no GEDoCh.**

<i>Variáveis</i>	<i>Distribuição</i>	<i>Percentual</i>
Gênero masculino	41	48
Gênero feminino	44	52
<hr/>		
Faixa etária		
60-69	61	72
70-79	16	19
80-89	2	9
<hr/>		
Gênero feminino		
60-69	37	84
70-79	7	16
80-89	0	0
<hr/>		
Gênero masculino		
60-69	24	58,5
70-79	9	22
80-89	2	4,5

A forma clínica da doença de Chagas que os idosos entrevistados apresentaram está listada na tabela 2. Pode-se observar que a forma cardíaca foi a de maior porcentagem, totalizando 42%. Esses dados foram obtidos na entrevista e nos prontuários médicos. A segunda forma clínica de maior percentual foi a forma digestiva.

**Tabela 2: Distribuição da forma clínica da doença de Chagas**

<i>Forma clínica</i>	<i>Distribuição</i>	<i>Percentual</i>
Forma Indeterminada	14	16,5
Forma Cardíaca	36	42
Forma Digestiva	21	25
Forma Mista	14	16,5

Dentro da forma digestiva (tabela 3), avaliaram-se quais eram portadores de megaesôfago, megacólon e ambos. O mesmo se fez com a forma mista (tabela 4), para analisar qual tipo de associação entre a forma cardíaca e a forma digestiva.

**Tabela 3: Distribuição dos idosos entrevistados portadores da forma digestiva**

<i>Variáveis</i>	<i>Distribuição</i>	<i>Percentual</i>
Megaesôfago	11	52
Megacólon	4	19
Ambos	5	24
Esofagopatia sem mega	1	5

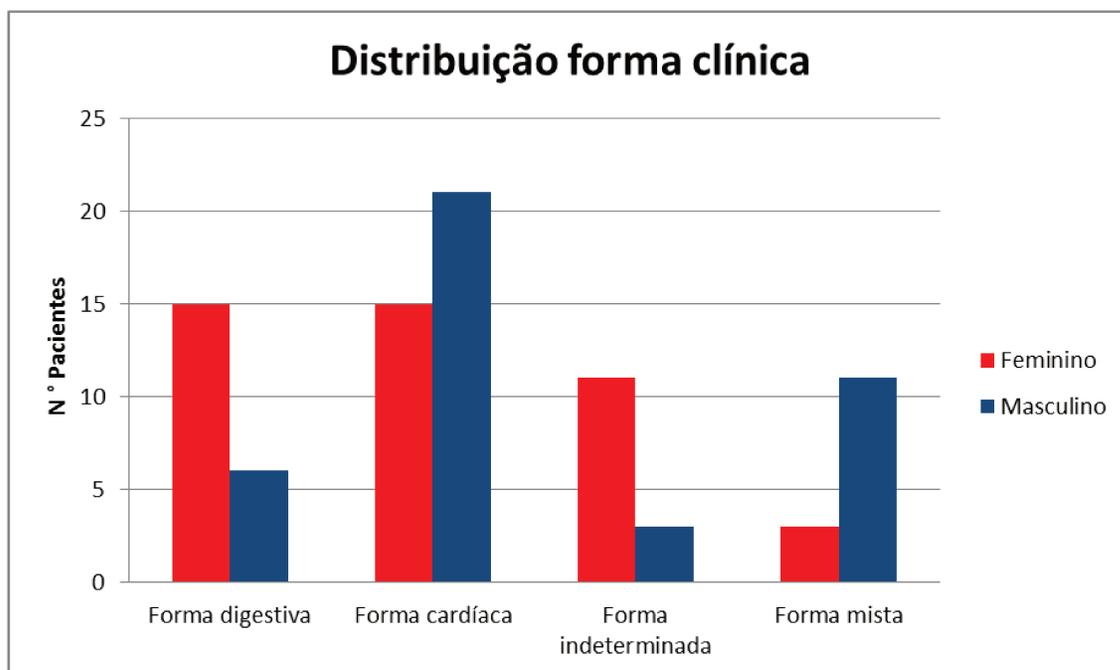
Dos portadores da forma digestiva, o megaesôfago é que se encontra na maioria dos pacientes. Na forma mista, a associação forma cardíaca com megacólon foi

encontrada em apenas um paciente. A forma indeterminada e a forma digestiva foram encontradas em sua maioria (gráfico 1) no gênero feminino.

**Tabela 4: Distribuição da forma mista dos idosos chagásicos**

<i>Variáveis</i>	<i>Distribuição Percentual</i>	
Cardíaca+megaesôfago	7	50
Cardíaca + megacólon	1	7
Cardíaca+ megaesôfago+megacólon	6	43

**Gráfico 1: Distribuição da forma clínica entre gêneros**



As variáveis comorbidades e uso de medicamentos são apresentadas nas tabelas 6 e 7. A maioria dos idosos (89,5%) são portadores de outras doenças e fazem uso de

medicamentos (87%). Analisando a quantidade de doenças associadas, 85% possuem menos de quatro doenças e 52 % utilizam menos de quatro medicamentos.. A polifarmácia (uso de mais de cinco medicamentos) foi observada em 34% dos idosos. A hipertensão arterial sistêmica foi a comorbidade (gráfico 2) mais encontrada (62%) nos idosos entrevistados e mais presente no sexo feminino. A segunda maior comorbidade foi a dislipidemia e encontrada igualmente nos dois gêneros.

**Tabela 5: Distribuição da presença de comorbidades e uso de medicamentos**

<i>Variáveis</i>	<i>Distribuição Percentual</i>		
Comorbidades	Não	9	10,5
	Sim	76	89,5
Medicamentos	Não	11	13
	Sim	74	87

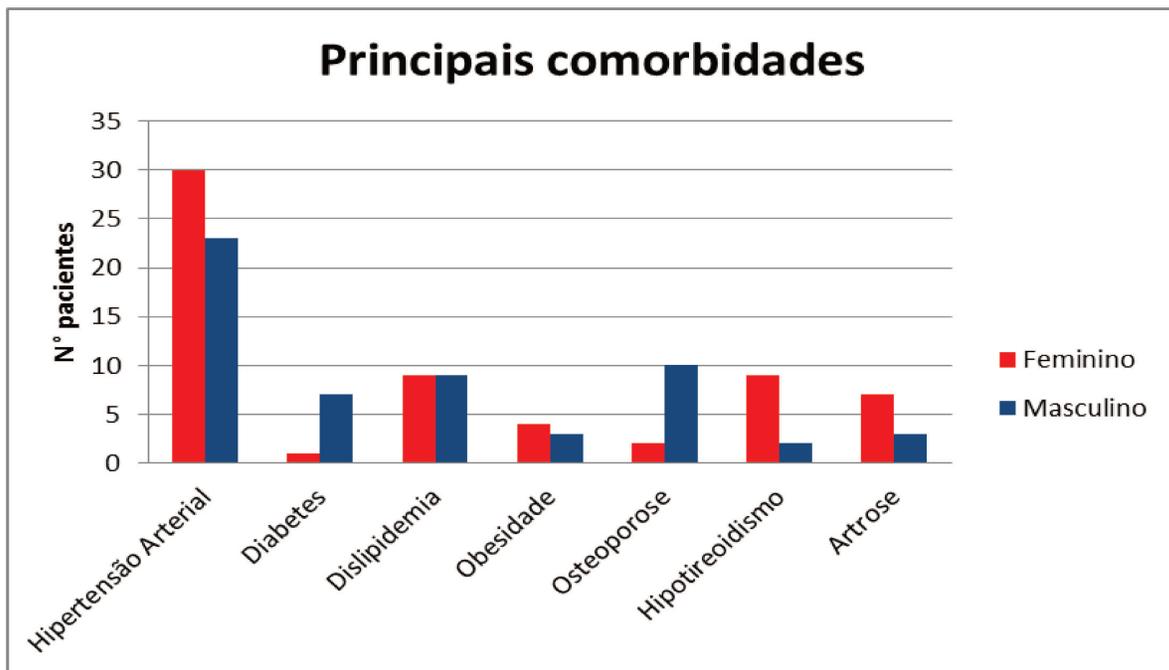
**Tabela 6: Distribuição do número de comorbidades e de medicamentos utilizados**

<i>Variáveis</i>	<i>Distribuição Percentual</i>		
Nº de comorbidades	≥4	13	15
	< 4	72	85
Nº de medicamentos	≥4	41	48
	<4	44	52

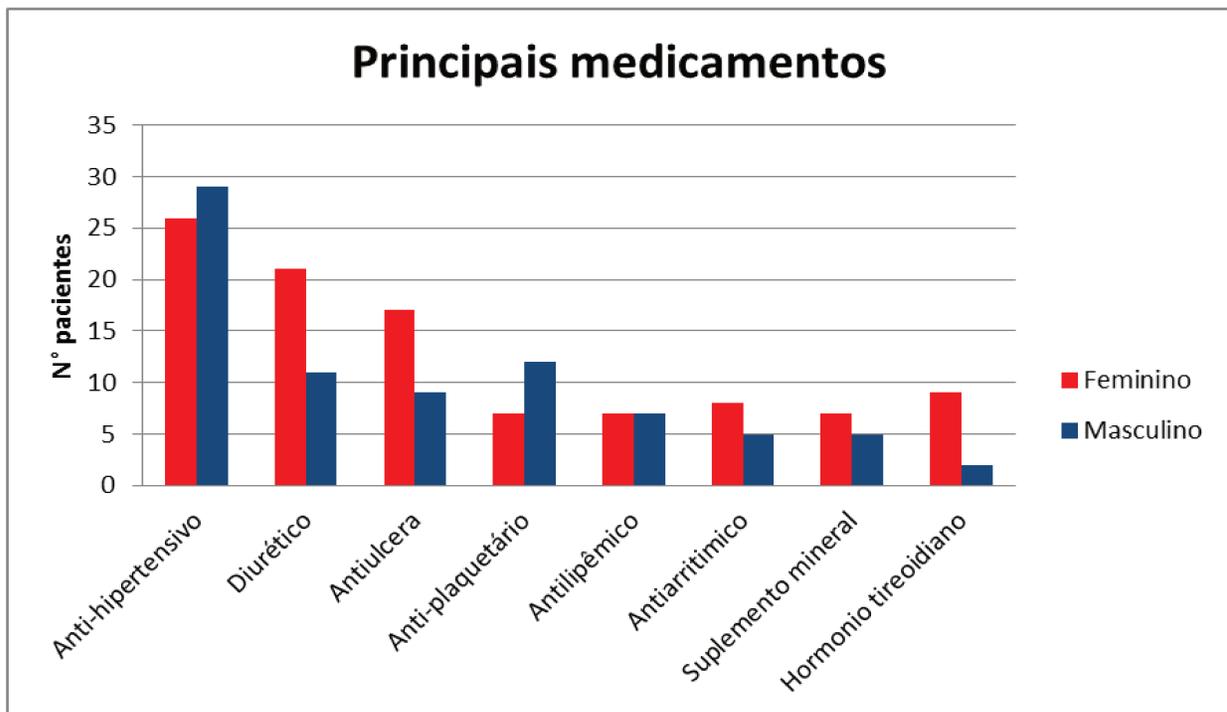
Os medicamentos mais utilizados (gráfico 3) pelos idosos pertencem à classe dos anti-hipertensivos (65%). Os diuréticos e antiulcerosos são utilizados em 37 e 34% dos

entrevistados. Segundo o gênero, o uso de diuréticos, antiulcerosos, antiarrítmicos e hormônio tireoidiano foram mais frequentes no gênero feminino. O uso de anti-hipertensivos não teve diferença significativa entre os gêneros: 63% das mulheres e 65% dos homens fazem uso desses fármacos.

**Gráfico 2: Distribuição das principais comorbidades dos idosos chagásicos entrevistados**



**Gráfico 3: Distribuição dos medicamentos mais utilizados pelos idosos entrevistados**



As variáveis cidades natais, procedência e cidades que migraram, foram mapeadas para verificar se os pacientes nasceram ou migraram para regiões endêmicas. Na figura 4 foram pontuadas as cidades em que os pacientes nasceram. O mapa ao lado mostra a área endêmica para doença de Chagas no Brasil e países da América do Sul. Comparando os dois mapas, pode-se concluir que os 85 pacientes entrevistados originaram de regiões endêmicas.

**Figura 4 : Distribuição geográfica dos locais de nascimento e da doença de Chagas**

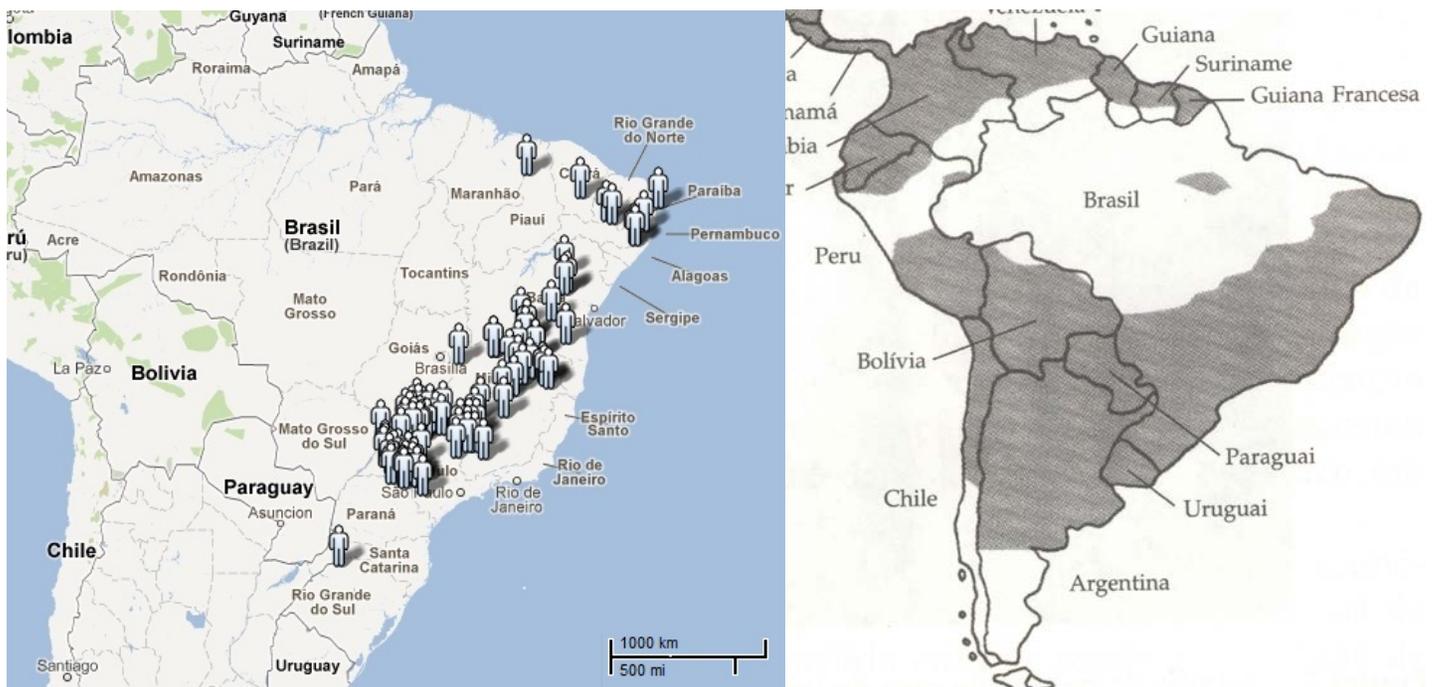


Figura 4: (OMS,1986) e Google® Maps

As cidades em que os pacientes residiram, foram coletadas e pontuadas na figura 5. A maioria dos pacientes migraram dentro da região endêmica. Apenas quatro cidades se encontram fora da zona endêmica.

Como os pacientes são atendidos na cidade de Campinas - São Paulo, Brasil, os locais de procedência da maioria dos entrevistados se situam em regiões próximas ao município. Demonstrando, também, que procuram grandes centros para o tratamento da doença de Chagas e das comorbidades que os acometem.

**Figura 5: Distribuição geográfica das cidades migratórias**



Figura5: Google Maps®

**Figura 6: Distribuição geográfica das cidades de procedência**



Figura 6: Google Maps®

Foram avaliados se os pacientes residiram em zona rural, urbana e endêmica, e o tempo de permanências nesses locais (tabela 7). O termo zona endêmica foi utilizado para descrever o local que os pacientes tiveram contato com o triatomíneo (cidade ou zona rural). Nota-se que a maioria viveu em zona rural e migrou para a zona urbana. Apenas 15% não souberam informar se residiram em zona endêmica. A média de tempo vivido em zona rural foi de 26,6 anos ( $\pm 15,6$ ), 41 anos ( $\pm 13$ ) na área urbana e 19 anos ( $\pm 13,4$ ) em área endêmica.

**Tabela 7: Distribuição e percentual dos pacientes que viveram em zona rural, urbana e endêmica**

<i>Variáveis</i>	<i>Zona Rural</i>	<i>Zona Urbana</i>	<i>Zona endêmica</i>
Sim	84 / 99%	81 / 95,3%	72 / 85%
Não	1 / 1%	4 / 4,7%	0 / 0
Não soube informar	0 / 0	0 / 0	13/ 15%
<b>Total</b>	<b>85/ 100%</b>	<b>85/ 100%</b>	<b>85/100%</b>

Dos 85 entrevistados, 83 relataram o conhecimento do inseto transmissor da doença de Chagas. O nome de como ele é chamado pelos pacientes foi levantado e apenas sete não souberam informar. Os nomes mais citados foram “barbeiro” e “chupança”. “Sanguessuga”, “chupão”, “procotó” e “borrachudo” também foram citados pelos indivíduos entrevistados.

Em relação à lembrança de quando foram picados, a idade que tinham quando aconteceu a picada e a quantidade de vezes que esse evento ocorreu, poucos souberam informar. Dos indivíduos entrevistados, 59 (69,5%) responderam que não se lembram se foram picados. Dos 26 que se lembram da picada do triatomíneo, 10 não souberam

informar que idade tinha quando aconteceu e a média da idade dos que souberam responder foi de 11 anos, variando de 6 a 26 anos.

Foi investigado também os antecedentes para doença de Chagas (tabela 8) dos idosos entrevistados. Cerca de 28% desses indivíduos já se submeteram a uma transfusão sanguínea e 66% possui algum familiar também portador da doença.

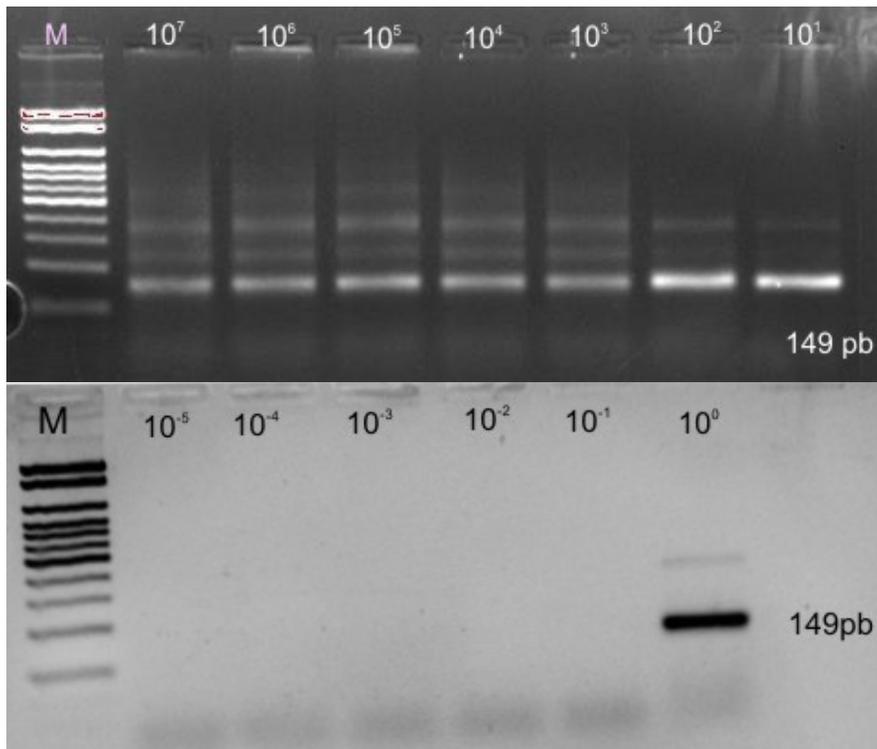
**Tabela 8: Distribuição e percentual dos antecedentes para doença de Chagas**

Antecedentes	Distribuição	Percentual	
Transfusão	Sim	24	28
	Não	61	72
Familiar	Sim	56	66
	Não	29	34
Vizinhos	Sim	31	36,5
	Não	54	63,5
Mãe	Sim	12	14
	Não	73	86

## 4.2 RESULTADOS PCR

A sensibilidade da Nested-PCR para *T. cruzi* padronizada no Laboratório de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular foi avaliada e os resultados estão na figura 7. A N-PCR foi sensível até a concentração de  $10^0$  que corresponde a um parasito por mililitro. A sensibilidade foi avaliada da concentração de  $10^7$  a  $10^{-5}$  *parasitos* por ml.

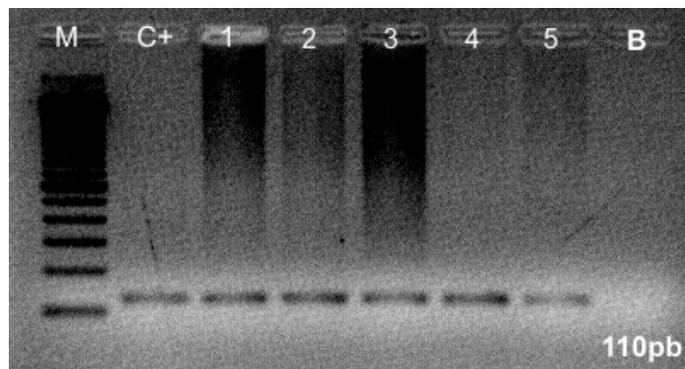
**Figura 7: Amplificação pela Nested-PCR do teste de sensibilidade**



M:marcador de peso molecular ;  $10^7$ - $10^{-5}$  concentrações

As amostras de sangue extraídas dos pacientes foram submetidas a amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana. Das 85 amostras, 10 não amplificaram, totalizando 11% (tab.9). Esse total de amostras não puderam ser submetidas a Nested-PCR por conter inibidores. Na fig. 8 pode-se observar a foto de um gel de agarose com os resultados da reação para  $\beta$ -globina.

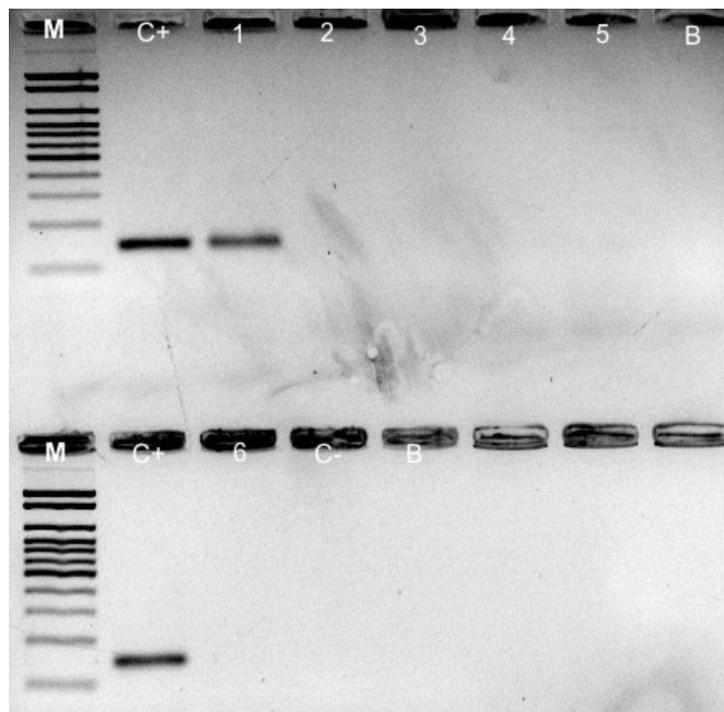
**Figura 8: Amplificação do gene da  $\beta$ -globina**



M:marcador de peso molecular; C+:controle positivo; 1-5: amostras; B: branco

A Nested-PCR para o DNA nuclear do *T.cruzi* foi positiva para 27 amostras das 75 positivas para a  $\beta$ -globina. O percentual de positividade foi de 36%. Os resultados da N-PCR, sorologia e  $\beta$ -globina estão dispostos na tab.9. Na fig.9 pode-se verificar a positividade da primeira amostra. O controle negativo e o branco da reação tiveram resultado negativo, demonstrando que não houve contaminação durante a extração e na PCR, respectivamente.

**Figura 9: Amplificação pela N-PCR do DNA nuclear do *T.cruzi***



M: marcador de peso molecular; C+ controle positivo; 1-6:amostras; C-:controle negativo; B:branco

**Tabela 9: Resultados da N-PCR, Sorologia e  $\beta$ -globina**

	N-PCR	Sorologia	B-globina		N-PCR	Sorologia	B-globina
1	-	+	+	21	-	+	+
2	-	+	+	22	-	+	+
3	-	+	+	23	-	+	+
4	-	+	+	24	-	+	+
5	-	+	+	25	-	+	+
6	-	+	+	26	-	-	+
7	-	+	+	27	-	+	+
8	-	+	+	28	-	+	+
9	-	+	+	29	-	+	+
10	-	-	+	30	-	+	+
11	+	+	+	31	+	+	+
12	-	Duvidoso	+	32	+	+	+
13	+	+	+	33	-	+	+
14	-	+	+	34	+	+	+
15	-	+	-	35	+	+	+
16	-	+	-	36	-	+	+
17	-	+	-	37	+	+	+
18	-	+	-	38	-	+	+
19	-	+	-	39	+	+	+
20	-	+	+	40	+	+	+

	N-PCR	Sorologia	B-globina
41	+	+	+
42	+	+	+
43	-	+	-
44	-	Duvidoso	+
45	-	+	-
46	-	+	+
47	-	+	+
48	-	+	-
49	-	+	+
50	-	+	+
51	-	+	+
52	+	+	+
53	-	+	+
54	-	+	-
55	-	+	+
56	-	+	+
57	+	+	+
58	-	+	+
59	+	+	+
60	+	+	+

	N-PCR	Sorologia	B-globina
61	-	+	-
62	-	+	+
63	-	+	+
64	+	+	+
65	+	+	+
66	-	+	+
67	-	+	+
68	+	+	+
69	+	+	+
70	+	+	+
71	-	+	+
72	+	+	+
73	-	+	+
74	+	+	+
75	+	+	+
76	-	+	+
77	-	+	+
78	-	+	+
79	+	+	+
80	+	+	+

	N-PCR	Sorologia	B-globina
81	+	+	+
82	-	+	+
83	+	+	+
84	-	+	+
85	-	+	+

Os resultados sorológicos foram obtidos durante a pesquisa nos prontuários dos pacientes. O resultado da sorologia pesquisado no prontuário foi o referente ao dia da coleta da amostra de sangue para a PCR. O teste foi realizado pelo Laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP e os métodos utilizados foram os testes de ELISA e IFI. Os pacientes representados na tabela 14 com resultado positivo (95%) obtiveram resultado positivo nos dois testes. Apenas 2 tiveram resultado duvidoso, pois apenas um dos testes foi positivo.

## **5.DISSCUSSÃO**

---

A partir dos resultados descritos da primeira parte do questionário foi possível identificar que apesar de totalizar 44 indivíduos (52%) do gênero feminino, o esperado era um número maior de idosas, já que em outros trabalhos como Alves *et al* (2009), o gênero feminino foi mais prevalente. Furtado (1997) destaca uma classificação onde os idosos na faixa etária entre 60 e 69 anos são considerados idosos jovens, na faixa etária entre 70 e 79 anos são considerados meio idosos e acima de 80 anos idosos velhos. Os idosos encontrados são considerados idosos jovens, pois 72% se encontram na faixa etária descrita acima. Dentre as mulheres, elas também são idosas jovens na sua maioria (84%) e foram encontrados poucos indivíduos considerados idosos velhos. Segundo Almeida *et al* (2007), a média de idade de chagásicos idosos encaixa-se na subclassificação de idosos jovens, a qual corresponde à faixa com maior número de idosos no Brasil. A média de idade do grupo total foi de  $65,5 \pm 5$ , anos,  $65 \pm 4,6$  anos para gênero feminino e  $66,1 \pm 6,1$  anos para gênero masculino. O valor da mediana encontrada foi de 64 anos para as três variáveis. Apesar do valor da mediana e da média de idade diferir do encontrado por Alves *et al* (2009) a presença de idosos com perfil jovem (60-69) foi dentro do esperado .

Quanto à forma clínica da doença de Chagas, a mais encontrada foi a forma cardíaca, totalizando 42% dos pacientes. Essa forma clínica foi a mais esperada, pois a cardiopatia chagásica foi a mais predominante nos estudos de Alves *et al* (2009); Almeida *et al* (2007) ; Guariento *et al* (2011), realizados no mesmo serviço. A alta porcentagem encontrada diferenciou dos trabalhos anteriormente citados, mas já era esperado, pois com o passar dos anos, alguns indivíduos na forma indeterminada se tornam sintomáticos. Já a segunda forma clínica mais recorrente diversificou nos estudos. A segunda no presente estudo foi a forma digestiva (25%), igualmente encontrada no trabalho de Almeida *et al* (2007), seguida da forma indeterminada e pela mista (16,5%)

.No trabalho de Alves *et al* (2009) e Guariento *et al* (2011) a segunda forma mais encontrada foi a mista.

A forma digestiva foi dividida entre os acometimentos do megaesôfago, megacólon, ambos e colo/esofagopatia sem mega. Dos portadores da forma digestiva, 52% possuem megaesôfago; o megacólon está presente em 19% dos idosos; 24% são acometidos por ambas e apenas um paciente possui esofagopatia sem mega.

Na forma mista, a associação mais predominante foi a cardíaca com o megaesôfago, presente em 50% dos pacientes. A associação da forma cardíaca com o megaesôfago e megacólon foi encontrada em 43% dos idosos. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves *et al* (2009), no qual o megaesôfago foi encontrado em 58,3%, megacólon em 16,7% e ambos em 25 %. E na forma mista, a forma cardíaca com o megaesôfago foi presente em 48,1%.

A forma digestiva e a forma indeterminada foram mais prevalentes no gênero feminino, 71,5% e 78,5% respectivamente. O gênero masculino foi predominante na forma mista 78,5%. Na forma cardíaca, 58% pertencem ao gênero masculino. A prevalência das mulheres na forma digestiva e indeterminada também foi encontrada em Alves *et al* (2009). A média de idade dos portadores da forma cardíaca foi de 65,7  $\pm$ 5,1 anos, 65  $\pm$  6 anos para a forma digestiva, 64,4 $\pm$ 5,1 anos para a forma mista e 66,7  $\pm$ 5,6anos para a forma indeterminada. Os valores da média estão dentro do esperado, já que a maioria dos idosos estudados está nessa faixa etária. No trabalho de Guariento *et al* 2011, a média da idade foi maior e teve na forma mista a maior média de idade entre os portadores.

A associação entre doença de Chagas e o processo de envelhecimento foi avaliado pelas comorbidades que atinge os pacientes e quantos e quais tipos de medicamentos estão sendo utilizados. Dentre os pacientes estudados, apenas nove, perfazendo um total de 10,5% não possui comorbidade. A média de comorbidade por

idoso foi de  $2,14 \pm 1,3$  doenças. O número de comorbidades pode se constituir em um indicador de pior condição de saúde dos idosos portadores da doença de Chagas e isso leva ao alto uso de serviços de saúde (Guariento *et al*, 2011; Lima-Costa *et al*, 2001). O uso de medicamentos foi observado em 87% dos idosos e a média de medicamentos por idoso foi de  $3,3 \pm 2,2$ . Pelo número de doenças acometidas, 85% possuem menos de quatro doenças, e 52% fazem o uso de menos que quatro medicamentos. Considera-se haver polifarmácia quando há uso desnecessário de pelo menos um medicamento ou presença de cinco ou mais fármacos em associação (Ministério da Saúde, 2008). A polifarmácia foi encontrada em 34% dos idosos. O amplo uso de medicamentos já é esperado, pois à medida que a população envelhece a demanda por medicamentos que retardem e tratem doenças crônicas, aliviem a dor e melhorem a qualidade de vida continuará a aumentar (OMS, 2005).

A hipertensão arterial sistêmica, comorbidade mais comum entre os idosos chagásicos, provavelmente manifesta-se com o avançar da idade independentemente da evolução da doença de Chagas (Almeida *et al* 2007). Como por exemplo, em um estudo com 1494 indivíduos residentes em Bambuí, estado de Minas Gerais, com idade maior que 60 anos, 61,5% eram hipertensos (Firmo *et al*, 2003) . De acordo com Bertanha *et al* (2008), como a hipertensão é um dos fatores de risco para doença cardiovascular, é relevante o estudo dessa enfermidade associada ao mal de Chagas. No presente estudo, 62% dos idosos são acometidos pela hipertensão arterial e ela foi mais presente no gênero feminino, totalizando 56%. No estudo de Alves *et al* (2009), com idosos do mesmo serviço (GEDoCh/UNICAMP), a hipertensão foi encontrada em 56,7% dos idosos. Já no estudo de Almeida *et al* (2007), e Gurgel & Almeida (2007), 39,3% e 32,7% são hipertensos, respectivamente. Uma porcentagem alta também foi encontrada por Silva *et al* (2010), no qual 64% dos indivíduos apresentavam hipertensão arterial. Outro dado a se colocar em pauta é que a população de Campinas tem alta prevalência de hipertensão

arterial. De acordo com os dados do inquérito de base populacional realizado em Campinas, metade dos moradores de Campinas com 60 anos ou mais é hipertenso. (SMS, 2009)

A incidência de dislipidemia nos idosos pesquisados foi de 21%. Esta foi a segunda comorbidade de maior prevalência na pesquisa. O hipotireoidismo, a osteoporose e artrose tiveram porcentagem de 13%, 12% e 12%, respectivamente. A hipertensão, dislipidemia, osteoporose e artrose foram as comorbidades de maior prevalência no estudo de Alves *et al* (2009). Apenas o hipotireoidismo foi encontrado em maior quantidade comparado ao trabalho citado acima. O Diabetes Mellitus e a obesidade foram encontrados em menor proporção: 9,5% e 8%. No estudo de Silva *et al* (2010), o diabetes foi encontrado em 14% dos indivíduos estudados. Dentro do gênero feminino o perfil é de idosas hipertensas, com osteoporose, hipotireoidismo, e artrose. Oitenta e sete e meio por cento dos idosos do gênero masculino possuem diabetes. A obesidade e a dislipidemia não tiveram diferença entre os sexos. Sobre a obesidade, apesar de ser um fator de risco para hipertensão, de acordo com Bertanha *et al* (2008), foi encontrada em apenas 8% dos idosos. As doenças crônicas associadas à doença de Chagas encontradas nos idosos estudados estão entre as doenças que mais afetam os idosos em todo o mundo, como as doenças cardiovasculares, hipertensão, derrame cerebral, diabetes, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças músculo-esqueléticas (como artrite e osteoporose), doenças mentais e cegueira (OMS, 2005).

Como as pessoas idosas freqüentemente têm problemas crônicos como os citados acima, elas necessitam utilizar mais medicamentos que pessoas mais jovens (OMS, 2005). Os medicamentos mais utilizados pelos idosos que participaram deste trabalho foram tabulados e o fármaco de uso mais freqüente pertence à classe dos anti-hipertensivos no qual 65% idosos fazem o uso. O segundo mais utilizado é o diurético que é usado por 37%. O uso de diuréticos encontrado no trabalho de Alves *et al* (2009) teve o

percentual de aproximadamente 45%. Os antiulcerosos são utilizados por 34% dos indivíduos e 23,5% utilizam antiplaquetários. Os fármacos antilipêmicos, antiarrítmicos, suplemento mineral e hormônio tireoidiano são utilizados respectivamente por: 16,5%, 15%, 14% e 12% dos idosos. Os fármacos mais utilizados por idosos de Campinas são os que agem sobre o aparelho cardiovascular (28%). No Município do Rio de Janeiro, 24% dos idosos usam pelo menos um anti-hipertensivo e 24% pelo menos um diurético (Rozenfeld, 2003). Pelo mesmo autor, o uso de fármacos é maior em mulheres e com o aumento da idade (acima de 70 anos). Os dados encontrados para o gênero feminino foram o alto uso de diuréticos, antiulcerosos, antiarrítmicos, antilipêmicos, suplemento mineral e hormônio tireoidiano. Os antiplaquetários foram mais frequentes no gênero masculino. Os anti-hipertensivos são usados igualmente pelos dois gêneros: 27 homens e 28 mulheres.

Na segunda parte do questionário aplicado, os idosos foram questionados quanto à cidade natal, cidades pelas quais migraram e cidades de procedências. A faixa territorial brasileira tradicionalmente considerada como de transmissão vetorial da doença de Chagas inclui grandes áreas das regiões Centro-oeste, Sul, Sudeste e Nordeste e todas as cidades de nascimento se encaixam nessas regiões (Drumond & Marcopito, 2006). Dentre as cidades para as quais os pacientes migraram, apenas quatro não se encontram na área endêmica. As cidades de procedência dos idosos mostra que os pacientes atendidos pelo GEDoCh residem perto do município de Campinas ou buscaram a região para facilitar o acesso ao sistema de saúde, já que o envelhecimento associa-se a uma maior prevalência de doenças e mais incapacidades. Por essa razão, caracteriza-se por ser uma fase da vida na qual a utilização de serviços de saúde tende a aumentar (Travassos & Viacava 2007).

Ainda no perfil epidemiológico, os idosos foram questionados quanto à residência em zona rural, urbana e endêmica (contato com o vetor). Oitenta e quatro pacientes já

residiram ou residem em zona rural, que totaliza 99%. Apenas um paciente relatou que já residiu em zona rural, porém não se recorda dos anos vividos nessa área. No estudo de Pompílio *et al* (2005) e Silva *et al* (2010) os indivíduos também foram questionados sobre a residência em zona rural. No primeiro foi encontrado o percentual de 88,3% de pacientes e no segundo todos os pacientes residiram em zona rural. A média de tempo vivido em zona rural foi de 26,6 anos com desvio padrão de 15,6. Dos residentes em zona rural, quatro idosos não migraram para a zona urbana.

Os residentes em zona urbana totalizam 95,3% dos entrevistados. O mesmo paciente que não soube relatar o tempo vivido em zona rural, também não soube informar o mesmo dado sobre o tempo de permanência em zona urbana. A média dos anos vividos em área urbana foi de aproximadamente 41 anos com desvio padrão de 13.

A permanência dos idosos em zona endêmica foi questionada segundo o contato com o inseto vetor. Setenta e dois idosos relataram que viveram em área endêmica, totalizando um percentual de 85%. Os 15% restantes não souberam informar se viveram em tal região, concomitantemente, os anos de moradia. Este percentual pode ser devido ao contato com o inseto ter sido no início da infância, assim não se recordam de tal fato. O tempo de permanência teve uma média aproximada de 19 anos com desvio padrão de 13,4 anos. O tempo mínimo foi de um ano e o máximo de 66 anos. No grupo de chagásicos estudado por Pompílio *et al* (2005), 50% relataram ter o triatomíneo no domicílio e por Silva *et al* (2010), o percentual foi menor, no qual apenas 14% relataram tal contato

O conhecimento do inseto transmissor da doença de Chagas foi estudado por Pompílio *et al* (2005) e 59,2% do grupo de chagásicos conhecem o vetor. Neste presente estudo o percentual de conhecimento do vetor foi de aproximadamente 97,5%. Os triatomíneos são conhecidos por diversos nomes nas diferentes regiões onde são encontrados. No Brasil, são conhecidos pelos seguintes nomes: barbeiro, chupão,

chupança, fincão, bicudo, percevejão, bicho-de-parede, bicho-de-parede preto, chupapinto, percevejo-do-sertão, percevejo francês, percevejo gaudério, percevejo grande, procotó, prorocotó, baratão, bruxa, piolho-de-piaçava, quiche do sertão, rondão, vunvun, cascudo (PAHO, 2008). Os entrevistados citaram: “barbeiro”, “chupança”, “sanguessuga”, “chupão”, “procotó” e “borrachudo”.

A média de idade em que os indivíduos entrevistados que se recordaram da picada do inseto vetor foi de 11 anos. A idade mínima foi de 6 anos e a máxima de 26. De acordo com Malta (1996), um terço das infecções pelo *T.cruzi* aconteceram antes dos dois anos de idade. Pode-se dizer que idosos recordaram de tal fato porque presenciaram a picada do “barbeiro” entre a pré-adolescência e a juventude.

A doença de Chagas pode ser transmitida principalmente pela via vetorial, congênita, transfusional e oral entre outras. Para verificar se os idosos pesquisados tinham antecedentes para esses principais meios de transmissão, eles foram questionados se haviam sido submetidos à transfusão sanguínea e se algum familiar, vizinho ou mãe são portadores da tripanossomíase americana. Segundo Malta (1996), a transmissão vetorial foi responsável por 70% das infecções. Assegurando essa informação, os antecedentes de familiares para a doença foi verificado em 66% dos idosos. Quanto aos vizinhos, apenas 36,5% se recordam de conviver com portadores da doença de Chagas. A transmissão por transfusão de sangue foi de grande importância quando não se fazia muito pela prevenção (Malta, 1996). O Brasil, que nos anos 80 apresentava prevalência média de 7,03% em candidatos à doação de sangue, teve este coeficiente diminuído para 3,18% na década de noventa e atualmente para 0,6% na hemorrede pública e de 0,7% na rede privada (Gontijo & Santos 2012). Dos idosos estudados, 72% não se submeteram a transfusão sanguínea. Quanto ao antecedente de transmissão congênita, apenas 14% relataram que suas mães eram portadoras da doença de Chagas.

A sorologia para a doença de Chagas deve ser realizada por duas técnicas, sendo uma delas o teste de ELISA (Brasil *et al* ,2010). Os testes de HAI, IFI e ELISA podem determinar o diagnóstico em virtualmente 100% dos casos (Ministério da Saúde, 2005 a). Os testes sorológicos realizados pelo Laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP foram ELISA e IFI. Pacientes com dois testes positivos eram considerados infectados pelo *T. cruzi*. Os considerados inconclusivos ou duvidosos tiveram apenas um resultado positivo (Ministério da Saúde, 2005a). Dos resultados consultados nos prontuários, apenas 2 foram considerados. Os resultados dos exames sorológicos foram esperados, já que os testes sorológicos possuem boa sensibilidade para a detecção do parasito. No estudo de Almeida *et al* 2007 , que trabalhou com pacientes idosos e não idosos, os títulos sorológicos não diferenciaram, podendo afirmar que os parasitos circulam pelo paciente, independente da idade.

A técnica da Nested- PCR utilizada neste estudo foi padronizada por Marcon (2001). O teste de sensibilidade da técnica foi realizado para se verificar quantos parasitos por mililitro de sangue a PCR é capaz de detectar. A partir de uma cultura de *T.cruzi* em meio LIT , foi extraído o DNA de pontos com concentração de  $10^7$  a  $10^5$  parasitos por ml. A técnica de N-PCR foi capaz de detectar concentração de até  $10^0$ , o que corresponde a um parasito por ml. Para uma PCR convencional, a técnica é considerada sensível. Em Piron *et al* 2007, a qPCR (Real-time PCR) foi sensível até 0,8 *parasitos* por ml. Em um estudo feito com camundongos por Campos *et al* 2002 e PCR para o kDNA, foi detectado de 1 a 2 *parasitos* por 500 $\mu$ l. Este estudo também mostrou que em casos de pequena quantidade de parasitos, a técnica (extração e PCR) deve ser realizada repetidamente para obter um bom resultado. Vale ressaltar que as amostras do presente estudo foram submetidas a três testes de PCR para confirmar o resultado. A amostra considerada positiva teve resultado positivo em pelo menos uma reação. Já a amostra negativa foi considerada como tal após três resultados negativos. Apesar das

repetidas reações, a detecção por Nested-PCR para indivíduos idosos apresentou baixa positividade (36%) comparando com os estudos de Marcon *et al* (2002), Batista *et al* (2010) e Aguiar *et al* (2011) que realizaram a mesma técnica. Porém, os pacientes desses estudos anteriores não eram idosos.

Foram pesquisados artigos que utilizaram esse público-alvo, mas não foram encontrados pesquisas de métodos de diagnósticos aplicados à população idosa portadora da doença de Chagas. Assim, o resultado é original e merece discussão, uma vez que para até onde pudemos verificar, é a primeira vez que se avalia a parasitemia pelo *T.cruzi* em idosos, utilizando PCR.

Os pacientes portadores da doença de Chagas acima dos 60 anos, provavelmente estão na fase crônica há pelo menos 40 anos, já que a média de idade da infecção pelo *T.cruzi* encontrada neste estudo foi de 11 anos de idade. Como o resultado da sensibilidade mostra que a técnica utilizada é sensível, podemos afirmar que a população idosa possui poucos parasitos circulantes. Em casos de portadores da doença de Chagas idosos que estão há muito tempo na fase crônica, aconselha-se a coleta de mais de uma amostra de sangue e em épocas diferentes para se aumentar a chance de ter mais parasitos circulantes, no caso de realizar a PCR convencional ou adotar a real-time PCR que é uma técnica mais sensível que a convencional.

## **6.CONCLUSÃO**

---

O perfil dos idosos atendidos pelo GEDoCh é de idosos jovens, hipertensos, polifármacos e com a forma cardíaca como a mais prevalente. Esses idosos nasceram em região endêmica e a maioria das cidades para as quais migraram, também pertencem à área de transmissão da doença de Chagas. O conhecimento do vetor pode ser verificado, porém poucos se recordaram quando foram picados pelo triatomíneo. A transmissão vetorial foi evidenciada. Os resultados sorológicos e moleculares demonstram que ainda há parasitas circulantes, porém, em pequena quantidade. A Reação em Cadeia da Polimerase em indivíduos idosos foi de fundamental importância para pesquisas futuras utilizando o método molecular.

A pesquisa com idosos, particularmente os que são portadores de doenças crônicas se faz necessária já que eles necessitam de um maior cuidado, pois além da enfermidade crônica, há também os problemas advindos com o avançar da idade. A pesquisa com os idosos chagásicos atendidos pelo GEDoCh precisa ser realizada com frequência para melhor entender como desenvolve a doença e suas comorbidades, melhorando assim, o serviço oferecido pelo grupo de estudos em doença de Chagas da Unicamp.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AGUIAR, C. *et al* Serological profiles and evaluation of *parasitoemia* by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. **Tropical Medicine & International Health** volume 17 no 3 pp 368–373 march 2012

ALBERTS, B. *et al*. **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo: Artmed, 2004

ALMEIDA, E.A. *et al*. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(3): 311-315, mai-jun,2007

ALVES,L.C. *et al* A influência das doenças crônicas na capacidade funcional dos idosos do Município de São Paulo,Brasil **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23(8):1924-1930, ago, 2007

ALVES, R.M.A. *et al*. Chagas' disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas' disease in elderly patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(6):622-628, nov-dez, 2009

BATISTA, A.M. *et al*. Evidence of Chagas disease in soronegative Brazilian patients with megaesophagus. **International Journal of Infectious Diseases** 14(2010) e974-e977

BERTANHA, L *et al*. Caracterização clínico-laboratorial de chagásicos hipertensos sem insuficiência cardíaca manifesta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(2): 163-168,2008

BILATE, A.M.B; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 50(2):67-74, March-April, 2008

BRASIL, P.E.A.A. *et al* ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease:systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases** 10:337 2010

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. Barueri: Manole, 2007.

CASTRO, A.M.; *et al* 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

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 1, 159–218. 1909

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature** 465, S4—S5 2010

COURA, J.R. ; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature** 465, S6–S7, 2010.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia clínica**: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. São Paulo: Editora Atheneu, 2001 810p

DIAS, J.C.P. *et al.* The impact of Chagas disease control in Latin America- A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol.97(5), p 603-612, 2002.

DIEZ, C.N. *et al.* Short Report: The Value of Molecular Studies for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease in Northeastern Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 78(4), 2008, pp. 624–627

DRUMOND, J.A.G.; MARCOPITO, L.F. Migração interna e a distribuição da mortalidade por doença de Chagas, Brasil, 1981/1998. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro 22(10):2131-2140, out, 2006

FERNANDES, R. M. **A Evolução no Conhecimento e o Controle da Doença de Chagas no Brasil**: um estudo de caso sobre a interação entre a ciência, a tecnologia, a saúde e a economia. 2005 Dissertação (mestrado) - CEDEPLAR / UFMG, Belo Horizonte. 2005

FIRMO, J.O.A.; BARRETO, S.M.; LIMA-COSTA, M.F. The Bambuí Health and Aging Study (BHAS): factors associated with the treatment of hypertension in older adults in the community. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 19(3):817-827. mai-jun, 2003

FURTADO, E. S. *Terceira idade: enfoques múltiplos*. *Motus corporis*, 4(2), 121-147, 1997

GONTIJO, E.D.; SANTOS, S.E. **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25> Acessado em: 12/06/2012

GUARIENTO, M.E; *et al.* Doença de Chagas e enfermidades associadas em um serviço de referência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 35(supl. III):207 2002 apud GUARIENTO, M.E.; *et al.* Propedêutica cardiológica para avaliação da cardiopatia chagásica na Atenção Primária **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Medica** 6(2): 53-58 2008

\_\_\_\_\_ *et al.* Perfil clínico de idosos portadores de doença de Chagas atendidos em serviço de referência. **Revista Brasileira de Clínica Medica**. São Paulo, 2011 jan-fev; 9(1):20-4

GURGEL, C.B.F.M.; ALMEIDA,E.A. Frequência da hipertensão arterial em chagásicos crônicos e sua repercussão no coração: estudo clínico e anatomopatológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** ,89(3):191-200 2007

HIGUCHI, M.L.; *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p.96-107, 2003.

HIGUCHI, M.L **Cardiopatia Chagásica Humana - Aspectos Anátomopatológicos e Patogenia**.Disponível em:  
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=94> Acesso em:  
30/04/2009.

INNIS, M.A. *et al* **PCR protocols** A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press ,1990.

KIRCHHOFF, L.V. ; DONELSON, J.E. PCR detection of Trypanosoma cruzi , African trypanosomes, and Leishmanias species. **Applications: Parasitic Pathogens**:443-445 1993

KROPF, S. P. *et al.* Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 5(2):347-365, 2000

LARANJA, F.S. *et al.* Chagas disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**, 1956, 14:1035–1060. apud WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**. Geneva: World Health Organization, 2002. (WHO Technical Report Series 811).

LESCURE, F.X; *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infectious Diseases** 2010, 10: 556-70.

LIMA-COSTA, M. F; BARRETO, S. M.; GUERRA, H. L. Ageing with *Trypanosoma cruzi* infection in a community where the transmission has been interrupted: The Bambuí Health and Aging Study (BHAS). **International Journal of Epidemiology**, v.30, p.887-893, 2001.

MALTA, J. **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996.

MARCON, G.E.B. **Detecção do DNA do *Trypanosoma cruzi* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em pacientes chagásico crônicos**. 2001 Dissertação (mestrado) – UNICAMP, Campinas. 2001

MARCON, G.E.B. *et al.* 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 Disease**, v. 43, p. 39-43, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas aguda**. 2004

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**. 2005 a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005 b

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos **Formulário terapêutico nacional 2008** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008.

MONCAYO, A; ORTIZ YANINE, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis ). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, vol.100, nº8, 663-677, 2006.

MOSER, D.R; KIRCHHOFF, L.V ; DONELSON, J.E. Detection of *T. cruzi* by DNA amplification using the Polimerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology** 1989, 27 (7): 1477 – 1482.

NEGRI, L. S.A. *et al.* Aplicação de um instrumento para detecção precoce e previsibilidade de agravos na população idosa. **Ciência & Saúde Coletiva**, 9(4):1033-1046, 2004

NEVES, D. P. *et al* **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

OCHS, D.E. *et al.* Postmortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by Polymerase Chain Reaction amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 1996; 54 (5), 526-529.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Envelhecimento ativo: uma política de saúde**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005. 60p

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Grupo de Trabajo OPS para Consulta en Planificación, Operativa, Estrategia y Evaluación de Etapas Avanzadas del Control Antivectorial en Enfermedad de Chagas**. Montevideo: Organización Panamericana de la Salud ,2001.

PAHO (2008). Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi*-Módulo III. Disponível em: <http://www.paho.org/cdmedia/tripanosomacruz/> Acessado em: 10/06/2012

PIRON, M. *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica** 103:195-200 ,2007.

POMPILIO, M.A. *et al.* Aspectos epidemiológicos,clínicos e parasitológicos da doença de Chagas em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(6):473-478.nov-dez,2005.

PORTELA-LINDOSO, A.A.B.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública** , 37(1):107-15 2003.

RAMOS, L.R. *et al.* Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. **Revista de Saúde Pública**, S. Paulo, 21: 211-24, 1987

REY, L. **Parasitologia** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1991.

ROZENFELD, S. Prevalência, fatores associados e mau uso de medicamentos entre os idosos: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 19(3):717-724, mai-jun, 2003

SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 1985; 230: 1350-1354.

SAMBROOK, J.;FRITSCH, E.F.;MANIATIS, T. **Molecular cloning- A Laboratory Manual** 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory, 1989.

SCHMUNIS, G.A; YADON, Z.E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica** 115 14-21 2010

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE CAMPINAS Boletim de mortalidade nº38. Disponível em: [http://2009.campinas.sp.gov.br/saude/boletins/mort\\_38/1.htm](http://2009.campinas.sp.gov.br/saude/boletins/mort_38/1.htm) Acessado em: 30/06/2012

SILVA, E.M. *et al* . Estudo clínico-epidemiológico da doença de Chagas no distrito de Serra Azul,Mateus Leme, centro-oeste do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43(2):178-181,mar-abr,2010.

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

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010

TOLEDO, M.J.O *et al*. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no Estado do Paraná, sul do Brasil. Resultados preliminares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30:197-203, mai-jun, 1997.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al*. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(5): 463-491, August 2006

TRAVASSOS, C.; VIACAVA, F. Acesso e uso de serviços de saúde em idosos residentes em áreas rurais, Brasil, 1998 e 2003. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23(10):2490-2502, out, 2007

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**. Geneva: World Health Organization, 2002. (WHO Technical Report Series 811).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Population ageing: a public health challenge**. Geneva: World Health Organisation Press Office; 1998. (Fact Sheet, 135) apud COSTA M. F. F. L *et al*. *The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil*. I **Revista de Saúde Pública**, 34 (2): 126-35, 2000

## 7. ANEXOS

---

**ANEXO I****Questionário - perfil clínico e epidemiológico****Parte 1**

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F

Forma clínica: Indefinida ( )  
Cardíaca ( )  
Digestiva ( )  
Mista ( )

Doenças associadas: Sim ( ) Não ( )

Quantas? \_\_\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Faz uso de medicamentos? Sim ( ) Não ( )

Quantos? \_\_\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Parte 2**

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_

Migração: Sim ( ) Não ( )

Quantas vezes? \_\_\_\_\_

Municípios em que residiu: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Área rural: ( ) Sim ( ) Não

Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Área urbana: ( ) Sim ( ) Não

Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Tem conhecimento do vetor? Sim ( ) Não ( )

Nome popular: \_\_\_\_\_

Sabe informar se foi picado? Sim ( ) Não ( )

Quantas vezes? \_\_\_\_\_

Com que idade? \_\_\_\_\_

Quanto tempo morou em área endêmica? \_\_\_\_\_

Antecedente de transfusão? Sim ( ) Não ( )

Antecedentes de familiares com Doença de Chagas? Sim ( ) Não ( )

Antecedentes de vizinhos com Chagas? Sim ( ) Não ( )

Antecedente de mãe com Chagas? Sim ( ) Não ( )

Outras formas de contaminação? \_\_\_\_\_

**ANEXO II****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado (a) a respeito dos termos do Projeto de Pesquisa “**Perfil clínico e epidemiológico de chagásicos idosos seguidos em um serviço de referência**”, realizado no Ambulatório Geral de Adultos do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e concordo em participar da entrevista relacionada ao projeto, que consiste de questionário sobre avaliação do perfil clínico e epidemiológico de idosos chagásicos e da coleta de sangue para posterior análise. Estou ciente de que:

1. Serei submetido à entrevista oral, registrada pela pesquisadora, com duração de aproximadamente 20 minutos;
2. Serei encaminhado à seção de coleta para a coleta de sangue.
3. Receberei esclarecimentos sobre possíveis dúvidas relacionadas à pesquisa;
4. Minha participação nessa pesquisa é voluntária e não terá qualquer implicação no acompanhamento ou tratamento que realizo no Ambulatório de Doença de Chagas (GEDoCh) deste hospital;
5. Tenho garantia do sigilo e caráter confidencial sobre as informações que prestarei à pesquisa;
6. Terei direito a uma cópia deste termo.
7. Poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para proceder eventual reclamação, através do endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP , telefone: (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 ou e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

---

ENTREVISTADO / A

PESQUISADORA

Campinas, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Pesquisadora responsável: Mariane Barroso Pereira / Fone: (19) 8825.8696

E-mail: mariane\_bio@yahoo.com.br

Orientador: Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida



CEP, 27/04/10  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 254/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0188.0.146.000-10

## I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “PERFIL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO DE CHAGÁSICOS IDOSOS SEGUIDOS EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Mariane Barroso Pereira

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 08/04/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 27/04/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

## II - OBJETIVOS

Analisar o perfil clínico, caracterizar outras doenças associadas em pacientes idosos portadores de Doença de Chagas, correlacionar os exames sorológicos com a PCR e verificar em quais áreas esses pacientes adquiriram a doença.

## III - SUMÁRIO

O presente estudo (descritivo, transversal e retrospectivo) visa estipular características clínicas e epidemiológicas relativas ao contágio e diagnóstico sorológico da Doença de Chagas entre pacientes idosos atendidos pelo Grupo de Estudos em Doença de Chagas (GEDoCh) do HC/UNICAMP. Serão aplicados questionários orais, bem como serão colhidas amostras de sangue entre 100 pacientes previamente selecionados.

## IV - COMENTÁRIOS DOS RELADORES

Projeto bem elaborado, com objetivos claros e exeqüíveis. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está bem redigido e a folha de rosto corretamente preenchida.

## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

## **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## **VII – DATA DA REUNIÃO**

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de abril de 2010.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP